

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

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS,
ANATOMOPATOLÓGICOS E IMUNO-
HISTOQUÍMICOS DO LINFOMA EM BOVINOS (1965-
2014)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Welden Panziera

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS,
ANATOMOPATOLÓGICOS E IMUNO-HISTOQUÍMICOS DO
LINFOMA EM BOVINOS (1965-2014)**

Welden Panziera

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Patologia e Patologia Clínica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Orientador: Rafael A. Fighera

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS,
ANATOMOPATOLÓGICOS E IMUNO-HISTOQUÍMICOS DO LINFOMA
EM BOVINOS (1965-2014)**

elaborada por
Welden Panziera

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Rafael A. Fighera, Dr.
(Presidente/Orientador)

Marcia C. Silva, Dra., UFSM

Ricardo Barbosa de Lucena, Dr., UFPB

Santa Maria, 13 de fevereiro de 2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família em especial ao meu pai Helvio Panziera, minha mãe Maria Leonilda e aos meus irmãos Wildon Panziera e Thales Panziera, por todo o apoio, amor, educação, incentivo e paciência que tiveram comigo em todos os momentos.

À Ananda Paula Kowalski pela ajuda, paciência, carinho e companheirismo.

Um agradecimento em especial aos amigos e colegas Glauco Galiza, Ronaldo Bianchi, Paula Giaretta, Tatiane Faccin, Taiara Müller, Felipe Pierezan, Elisa Trost e Ricardo Lucena, pela grande amizade. Agradeço a eles pela ajuda, pelo incentivo, pelos ensinamentos e pelo apoio.

Ao meu orientador Rafael Almeida Figuera pelos ensinamentos e confiança.

À professora Glaucia D. Kommers e aos professores Claudio Barros e Luiz Francisco Irigoyen pelos ensinamentos.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação, seja pessoal ou profissional.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS, ANATOMOPATOLÓGICOS E IMUNO-HISTOQUÍMICOS DO LINFOMA EM BOVINOS (1965-2014)

AUTOR: Welden Panziera
ORIENTADOR: Rafael A. Figuera
Santa Maria, 13 de fevereiro de 2015

Foi realizado um estudo retrospectivo dos arquivos do Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) com base nos casos de necropsia e materiais de necropsia de bovinos dos últimos 50 anos (1965-2014). Foram incluídos nesse estudo somente os laudos que possuíam o diagnóstico de linfoma (n=128). Dos laudos que informavam o sexo (n=111), 84,7% correspondiam a fêmeas e 15,3% a machos. Dos laudos em que constava a raça (n=108), a mais prevalente foi a holandesa (63%). Em relação à idade (n=107), houve uma variação entre um e 14 anos. A maioria dos bovinos era adulta (80,4%) e a maior concentração dos casos ocorreu entre 5-8 anos (57,9%). Clinicamente (n=89), linfadenomegalia foi o achado mais frequentemente observado (74,1%). Na necropsia (n=125), 71,2% dos bovinos apresentavam aumento de volume dos linfonodos; essa linfadenomegalia foi classificada como localizada em 89,6% dos casos e generalizada em 10,3% dos casos. Realizou-se também a avaliação fenotípica (histologia) e imunofenotípica (imunohistoquímica [IHQ]) de 86 casos de linfoma bovino. Com base nestes resultados, os linfomas foram assim distribuídos utilizando-se a classificação proposta pela *Working Formulation (WF) of Non-Hodgkin's Lymphomas for Clinical Usage*: difuso de grandes células não clivadas (46,5%), difuso de grandes células clivadas (33,7%), difuso de pequenas e grandes células (4,6%), difuso de pequenas células – tipo plasmocitoide (7%), imunoblástico (3,5%), difuso de pequenas células – tipo intermediário (2,3%), difuso de pequenas células não clivadas (1,2%) e difuso de pequenas células não clivadas – tipo Burkitt (1,2%). Na IHQ, 27 dos 86 (31,4%) linfomas foram positivos para o anticorpo monoclonal CD79 α , utilizado para detecção de linfócitos B, e nenhum caso foi positivo para o anticorpo policlonal CD3, utilizado para detecção de linfócitos T. Com base nestes resultados, os linfomas B foram assim distribuídos utilizando-se a *Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms (REAL)*: linfoma difuso de grandes células B (81,5%), linfomas imunoblásticos de grandes células (11,1%) e linfomas linfoplasmocíticos (7,4%). Os resultados aqui apresentados permitem concluir que à semelhança do que vem sendo descrito em outras partes do mundo, os linfomas bovinos são basicamente difusos e predominantemente de grau intermediário, de grandes células, com núcleos clivados ou não clivados. Esses linfomas são decorrentes da proliferação neoplásica de linfócitos B e correspondem, em sua quase totalidade (92,6%), ao que atualmente é incluído na REAL como linfoma difuso de grandes células B.

Palavras-chave: Doenças de bovinos. Leucose enzoótica bovina. Linfoma. Linfossarcoma. Sistemas de classificação de tumores linfoides.

ABSTRACT

MSc Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

EPIDEMIOLOGICAL, CLINICAL, PATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL ASPECTS OF LYMPHOMA IN CATTLE (1965-2014)

AUTHOR: Welden Panziera
ADVISER: Rafael A. Fighera
Santa Maria, February 13, 2015

The epidemiological, clinical and pathological aspects of 128 cases of bovine lymphoma are retrospectively described in this study (1965-2014). Out of the cases were the gender was informed (n=111), 84.7% of affected animals were females and 15.3% were males. Out of the cases were breed was informed (n=108), 63% of affected animals were Holstein cows. The age of affected cows (n=107) varied from 1 to 14 years, with most animals being adults (80.4%) with 5 to 8 years of age (57.9%). The most common clinical sign (n=89) was lymphadenomegaly (74.1%). Gross findings (n=125) included enlargement of lymph nodes in 71.2% of the cases; this finding was classified as localized in 89.6% of the cases and generalized in 10.3% of the cases. A retrospective study of 86 cases of bovine lymphoma classified as with diffuse pattern of distribution and verified by phenotypic (histology) and immunophenotypic (immunohistochemistry [IHC]) is presented. Based on these results, the lymphoma cases were classified by the *Working Formulation (WF) of Non-Hodgkin's Lymphomas for Clinical Usage* as: diffuse large non-cleaved cell (46.5%), diffuse large cleaved cell (33.7%), diffuse mixed small and large cell (4.6%), diffuse small cell – plasmacytoid (7%), immunoblastic (3.5%), diffuse small cell – intermediate (2.3%), diffuse small non-cleaved cell (1.2%), and diffuse small non-cleaved cell Burkitt's (1.2%). According to the IHC, 27 out of 86 (31.4%) lymphomas were positive to monoclonal antibody CD79 α , used to detect B cells, and none were positive for polyclonal antibody CD3, used to detect T cells. Based on this, the B-cell type lymphomas were distributed as follows: diffuse large B-cell lymphoma (81.5%), large cell immunoblastic lymphoma (11.1%), and lymphoplasmacytoid lymphoma (7.4%), according the *Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms (REAL)*. The results of this retrospective study, similar to what has been described in other parts of the world, allow us to conclude that bovine lymphomas are basically diffuse and predominantly made of intermediate-grade, large cells, with cleaved or non-cleaved nuclei. These lymphomas are due to neoplastic proliferation of B cells and correspond to almost all (92.6%) to what is currently classified as diffuse large B-cell lymphoma by REAL.

Key words: Cattle diseases. Enzootic bovine leukosis. Lymphoma. Lymphosarcoma. Classification of lymphoid neoplasms.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	7
Linfoma enzoótico.....	8
Linfoma esporádico	11
ARTIGO 1- ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E ANATOMOPATOLÓGICOS DO LINFOMA EM BOVINOS: 128 CASOS (1965-2013)	15
Abstract.....	16
Resumo	17
Introdução.....	18
Material e métodos.....	19
Resultados	19
Discussão	23
Conclusões.....	29
Referências.....	29
ARTIGO 2 - CLASSIFICAÇÃO DE 86 CASOS DE LINFOMA EM BOVINOS DE ACORDO COM A <i>WORKING FORMULATION (WF) OF NON-HODGKIN'S LYMPHOMAS FOR CLINICAL USAGE</i> E A <i>REVISED EUROPEAN-AMERICAN CLASSIFICATION OF LYMPHOID NEOPLASMS (REAL)</i>	39
Abstract.....	40
Resumo	41
Introdução.....	42
Material e métodos.....	43
Resultados	45
Discussão	46
Conclusões.....	50
Referências.....	50
DISCUSSÃO	63
CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS	66

1. INTRODUÇÃO

As expressões “neoplasias linfoides”, “distúrbios linfoproliferativos” e “leucose linfoide” denotam um grande grupo de entidades neoplásicas malignas que se manifestam com diferentes aspectos clínicos e anatomopatológicos, mas que tem em comum originar-se dos linfócitos. Linfoma (previamente linfossarcoma) é uma forma de apresentação do distúrbio linfoproliferativo em que o tumor linfoide se origina mais frequentemente em órgãos hematopoiéticos sólidos, como linfonodo, baço ou tecido linfoide associado à mucosa (MALT), e, menos frequentemente, em órgãos não linfoides, porém sempre fora da medula óssea (FIGHERA; GRAÇA, 2010). É um neoplasma hematopoiético descrito em várias espécies de animais, e em bovinos, dependendo do local do mundo, é considerado o neoplasma mais frequentemente incriminado como causa de morte (JACOBS et al., 2002; RADOSTITS et al., 2007; GARRY, 2008). Constitui uma doença de notificação mensal obrigatória ao Serviço Veterinário Oficial (RADOSTITS et al., 2007). Em um estudo retrospectivo recente, realizado no Rio Grande do Sul, de 6.706 necropsias de bovinos, 586 casos correspondiam a neoplasias. Desses 586 casos, 101 eram linfomas (17,2% de todos os tumores) (LUCENA et al., 2011).

Diferentemente de outras espécies de mamíferos domésticos, bovinos possuem uma classificação anatômica própria para os linfomas. Ao contrário da tradicional subdivisão em multicêntrico, alimentar, mediastínico e extra-nodal, os linfomas bovinos são divididos em dois grandes grupos: enzoóticos e esporádicos (FIGHERA; GRAÇA, 2010). Linfomas enzoóticos são causados pelo vírus da leucemia bovina (BLV, *bovine leukemia virus*) (VALLI, 2007), um retrovírus da família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* (RADOSTITS et al., 2007; RAVAZZOLO; COSTA, 2012). Já os linfomas esporádicos não têm relação com essa infecção viral. Linfomas enzoóticos ocorrem basicamente em bovinos adultos, com idade entre 2 e 15 anos, mas mais frequentemente entre cinco e sete anos, e em rebanhos em que técnicas de manejo propiciem a disseminação do BLV. Por outro lado, linfomas esporádicos ocorrem em bovinos entre um mês a quatro anos de idade, ou seja, em uma faixa etária inferior aos afetados pelos casos enzoóticos. Linfomas enzoóticos são agrupados sob a denominação “leucose enzoótica bovina” (LEB), uma expressão comumente utilizada em veterinária para se referir à doença causada

pela presença dos tumores, independentemente de suas localizações ou do aspecto anatomopatológico (FIGHERA; GRAÇA, 2010).

1.1. Linfoma enzoótico

O linfoma enzoótico é causado pelo BLV, transmitido principalmente de forma horizontal através de fômites sujos de sangue, tais como instrumentos cirúrgicos, luvas de palpação retal e agulhas hipodérmicas. Outras formas de transmissão horizontal do BLV incluem hematofagia por insetos, transfusão sanguínea, descorna, tatuagem e colocação de brincos (WERLING et al., 2004; BARROS et al., 2006; BARROS, 2007; RADOSTITS et al., 2007). Embora o vírus possa ser ocasionalmente encontrado no sêmen de touros, a inseminação artificial não parece ser um meio importante de disseminação do vírus. Estudos demonstram que pode haver contaminação do sêmen com sangue infectado no momento da coleta (RADOSTITS et al., 2007). Vacas prenhes sorologicamente positivas podem transmitir o vírus para o feto. Isso provavelmente ocorre como resultado da exposição transplacentária ao vírus durante a gestação. Entretanto, menos de 10% dos animais nascidos dessas fêmeas são portadores do vírus ao nascer (RADOSTITS et al., 2007; RAVAZZOLO; COSTA, 2012).

A prevalência do linfoma enzoótico é alta em áreas onde o BLV ocorre de forma enzoótica. Essa forma apresenta maior prevalência nas raças leiteiras de alta produção devido ao tipo de criação, que por ser intensiva permite uma maior proximidade entre os animais e requer práticas de manejo constantes, o que influencia muito na disseminação do BLV. Entretanto, quando bovinos de corte são criados em confinamento, os índices de infecção podem assemelhar-se aos observados em vacas leiteiras (FIGHERA; GRAÇA, 2010). No mesmo estudo retrospectivo descrito anteriormente, que identificou 101 casos de linfoma em bovinos, 57% dos bovinos afetados eram de raças leiteiras, e a maioria dos linfomas foi interpretada como enzoótico (LUCENA et al., 2011).

No Brasil, vários estudos epidemiológicos para determinar a prevalência da LEB foram realizados, todos utilizando avaliação sorológica de rebanhos. Em um estudo envolvendo aproximadamente 10.000 amostras no Rio Grande do Sul, detectou-se uma prevalência de 8% de bovinos soropositivos (RAVAZZOLO; COSTA, 2012). Em Santa Catarina e Paraná essa prevalência é maior, sendo de

aproximadamente 38% em ambos os Estados. Estados do Sudeste, como Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro, demonstram as maiores soroprevalências do país (29,5%, 47,4% e 53% respectivamente) (TOSTES, 2005). Estima-se que a infecção pelo BLV atinja pelo menos 20% da população adulta de gado leiteiro nos Estados Unidos, 6 a 11% no Canadá, 27% na França, 37% na Venezuela e 33% na Argentina. Não há quase animais reagentes no Reino Unido, Nova Zelândia e Austrália (RADOSTITS et al., 2007). Embora em algumas regiões a prevalência da infecção pelo BLV seja muito alta, é importante ressaltar que apenas 1 a 5% dos bovinos sorologicamente positivos desenvolverão linfoma (FIGHERA; GRAÇA, 2010). A possibilidade do uso de vacinas contra o BLV tem sido explorada. Entretanto, as perspectivas não são boas até agora (RADOSTITS et al., 2007).

Hematologicamente, cerca de dois terços dos bovinos adultos com linfoma enzoótico apresentam hemogramas normais, e o restante desenvolvem anemia não regenerativa leve e/ou leve a moderada mudança no número de leucócitos. Alguns bovinos desenvolvem linfocitose reativa, que pode ser persistente (linfocitose persistente) em cerca de 30% dos bovinos infectados (JACOBS et al., 2002; RAVAZZOLO; COSTA, 2012). Linfocitose persistente representa um aumento crônico benigno de linfócitos circulantes que persiste por vários meses (BARROS, 2007).

Vários sinais clínicos são associados com o linfoma enzoótico, e dependem da localização das massas tumorais e das funções vitais afetadas (BARROS, 2007; RADOSTITS et al., 2007). A apresentação mais comum é o aumento de volume dos linfonodos (linfadenomegalia), principalmente dos pré-escapulares e pré-crurais (ilíacos internos), que às vezes podem atingir tamanhos gigantescos (RADOSTITS et al., 2007; FIGHERA; GRAÇA, 2010). Os linfonodos ilíacos internos geralmente são acometidos, e são facilmente detectados por palpação retal (BARROS et al., 2006; BARROS, 2007). Outros sinais clínicos importantes incluem: perda de peso, queda da produção leiteira, anorexia, febre, dispneia, constipação (devido ao aumento dos linfonodos do trato gastrointestinal), diarreia (muitas vezes com sangue devido às úlceras abomasais provocadas pelo tumor), exoftalmia (devido ao aumento dos linfonodos da região retrobulbar), incoordenação, paresia/paralisia progressiva dos membros pélvicos (devido à compressão da medula espinhal por massas neoplásicas epidurais), insuficiência cardíaca direita (devido à presença de massas neoplásicas no átrio direito) e distocia (JACOBS et al., 2002; BARROS et al., 2006;

BARROS, 2007; RADOSTITS et al., 2007; VALLI, 2007; GARRY, 2008; FRY; MCGAVIN, 2009; FIGHERA; GRAÇA, 2010).

Na necropsia, os órgãos mais comumente acometidos são os linfonodos, coração, abomaso, intestinos e o útero. Outros órgãos/tecidos em que massas neoplásicas são frequentes incluem: rins, canal vertebral, musculatura esquelética, baço e ureteres (JACOBS et al., 2002; BARROS et al., 2006; VALLI, 2007; GARRY, 2008; FRY; MCGAVIN, 2009). Os padrões de lesões encontrados incluem: aumento difuso do órgão (observado principalmente nos linfonodos), formações de nódulos ou massas ou espessamento difuso da parede do órgão (FIGHERA; GRAÇA, 2010).

O envolvimento nodal constitui o achado de necropsia mais frequente, e caracteriza-se por um aumento generalizado dos linfonodos superficiais e internos. Ao corte são macios, por vezes friáveis. A superfície de corte é homogênea, branco-amarelada, não sendo possível realizar uma delimitação córtico-medular (padrão difuso) (JACOBS et al., 2002; BARROS et al., 2006; BARROS, 2007; VALLI, 2007; FRY; MCGAVIN, 2009; FIGHERA; GRAÇA, 2010). Nos linfonodos maiores são comuns áreas necróticas amareladas ou avermelhadas, multifocais ou focalmente extensas. Raramente, pode ocorrer um padrão caracterizado por múltiplos nódulos brancos e multifocais (padrão folicular) (FIGHERA; GRAÇA, 2010).

No coração, segundo órgão mais acometido pelo linfoma, observa-se principalmente um padrão nodular ou massivo, que ocorre sempre no átrio direito, mas que pode infiltrar outras áreas, de acordo com a evolução de cada caso. Não há descrições na literatura porque o átrio direito é a cavidade mais envolvida. Quando o coração é afetado, lesões de insuficiência cardíaca congestiva direita, como ascite, fígado de noz-moscada, edema subcutâneo e edema cavitários, são comuns (BARROS et al., 2006; BARROS, 2007). No abomaso, observam-se grandes massas, nódulos ou placas, recobertas por mucosa íntegra ou ulcerada. Na medula espinhal, os tumores ocorrem principalmente na região lombar e estão dispostos extraduralmente ao longo do canal vertebral, o que leva a compressão da medula espinhal e, conseqüentemente, sinais neurológicos (BARROS, 2007; FIGHERA; GRAÇA, 2010).

Histologicamente, os linfomas representam um grupo heterogêneo de neoplasmas com grande variedade morfológica. Por essas razões, numerosas tentativas têm sido feitas na oncologia humana e veterinária, para estabelecer classificações racionais desses tumores. Devido às numerosas similaridades entre

os linfomas de humanos e animais, as propostas de classificações foram adaptadas de esquemas de classificação de linfomas não Hodgkin de humanos (PARODI, 2001). Dentre as principais classificações estão: classificação de Rappaport, sistema Kiel, classificação de Lukes e Collins, *Working Formulation (WF) of Non-Hodgkin's Lymphomas for Clinical Usage* e *Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms (REAL)* (PARODI, 2001; FIGHERA; GRAÇA, 2010).

No Brasil, a classificação utilizada ainda hoje pela maioria dos patologistas veterinários baseia-se em uma modificação da WF. Esta classificação subdivide os linfomas de acordo com o índice mitótico, o padrão de distribuição da neoplasia, o tamanho das células e a forma do núcleo. Assim, os linfomas são ditos de alto grau, grau intermediário, ou baixo grau, foliculares ou difusos, de grandes células, pequenas células, ou mistos e clivados ou não clivados (FIGHERA; GRAÇA, 2010). Atualmente, a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) para linfomas em animais já obedece às normas do sistema REAL. Esse sistema fornece uma extensa subdivisão dos linfomas e baseia-se principalmente na morfologia, no imunofenótipo e no genótipo desses neoplasmas (PARODI, 2001; VALLI et al., 2002, FIGHERA; GRAÇA, 2010). Com base nessa revisão, os linfomas e as leucemias linfoides são classificados em quatro grandes grupos: neoplasias de células B precursoras, neoplasias de células T precursoras, neoplasias de células B maduras e neoplasias de células T maduras e células nulas (VALLI et al., 2002, FIGHERA; GRAÇA, 2010).

Um grande estudo realizado no Canadá, que classificou 1.198 casos de linfomas bovinos usando a WF, demonstrou que o tipo difuso de grandes células e de alto grau é característico de linfomas enzoóticos. Além disso, o estudo relaciona as altas taxas de mitoses com a etiologia viral responsável pela forma enzoótica (VERNAU et al., 1992). Quando esses neoplasmas linfoides são submetidos ao sistema de classificação REAL, linfomas difusos de grandes células B são os tumores de maior ocorrência em bovinos, sendo que aproximadamente metade estão associados com a infecção pelo BLV (VALLI et al., 2002).

1.2. Linfoma esporádico

Sob a expressão “linfoma esporádico” encontram-se todos os casos de linfoma de bovinos que não são associados à infecção pelo BLV. Esses linfomas são raros e

difícilmente ocorre mais de um caso em um mesmo rebanho (BARROS et al., 2006; FIGHERA; GRAÇA, 2010; LUCENA et al., 2011). Linfomas esporádicos ocorrem basicamente de três formas: multicêntrica, tímica e cutânea (FIGHERA; GRAÇA, 2010).

Linfoma multicêntrico, também chamado de linfoma de bezerro ou linfoma juvenil, ocorre em bezerros de um a seis meses de idade (THURMOND, 2002; BARROS, 2007; RADOSTITS et al., 2007; FIGHERA; GRAÇA, 2010). Os principais sinais clínicos observados são linfadenomegalia, depressão, perda de peso, fraqueza, palidez das mucosas, taquicardia e taquipneia. Menos frequentemente observa-se febre, timpanismo ruminal, ataxia e diarreia. Hematologicamente observa-se anemia microcítica e hipocrômica, baixa concentração de hemoglobina e leucocitose por linfocitose (THURMOND, 2002; BARROS et al., 2006; BARROS, 2007). A doença progride para a morte em 2-8 semanas. Na necropsia, há linfadenomegalia simétrica dos linfonodos superficiais e profundos e infiltração de células neoplásicas no coração, fígado, baço, rim e medula óssea, e, menos comumente, outros órgãos também podem estar afetados, como o timo e útero (THURMOND, 2002; FIGHERA; GRAÇA, 2010; VALLI, 2007).

Linfoma tímico, também chamado de linfoma adolescente, acomete bovinos com seis meses a dois anos e meio de idade (THURMOND, 2002; BARROS, 2007; RADOSTITS et al., 2007; FIGHERA; GRAÇA, 2010). Bovinos da raça Hereford parecem apresentar maior predisposição em desenvolver essa forma de linfoma (BARROS et al., 2006). Clinicamente, linfoma tímico é caracterizado pela presença de massas grandes e únicas no pescoço (região ventral) e no mediastino anterior, podendo ocorrer compressão do esôfago e traqueia. Os bovinos acometidos podem apresentar disfagia, timpanismo, tosse e dispneia. A evolução é de 2-9 semanas (THURMOND, 2002; BARROS et al., 2006; BARROS, 2007). Ocasionalmente, linfonodos, músculos da região da cabeça e ossos (mandíbula e maxilar) podem ser acometidos pela infiltração neoplásica (JACOBS et al., 2002; FIGHERA; GRAÇA, 2010). Linfadenomegalia não é comum (BARROS, 2007).

Linfoma cutâneo afeta bovinos com um a quatro anos de idade (RADOSTITS et al., 2007; FIGHERA; GRAÇA, 2010). As lesões iniciais aparecem como urticas, e em seguida evoluem para lesões elevadas, circulares e sem pelos. Algumas lesões podem ser ulceradas e com necrose central (JACOBS et al., 2002). Geralmente, a pele do pescoço, da região das escápulas, períneo e membros posteriores é a mais

acometida (THURMOND, 2002; JACOBS et al., 2002; BARROS et al., 2006; BARROS, 2007). Na histologia, a invasão da pele pelos linfócitos tumorais lembra a micose fungoide de humanos (THURMOND, 2002; BARROS et al., 2006). Eventualmente, os bovinos desenvolvem a forma multicêntrica de linfoma (JACOBS et al., 2002) e vários outros órgãos podem estar afetados, como linfonodos, coração, fígado, rim, medula espinhal, pulmão e abomaso (BARROS, 2007). As lesões aparecem e depois regredem por meses, e por algum tempo a pele pode ficar livre de lesões (JACOBS et al., 2002). As recidivas podem ocorrer com o reaparecimento das lesões cutâneas e sinais de envolvimento de órgãos internos, como na forma enzoótica da doença (RADOSTITS et al., 2007).

A imuno-histoquímica é comumente utilizada em linfomas bovinos para confirmar a origem das células neoplásicas (JACOBS et al., 2002). Os linfomas enzoóticos (forma que está associada à infecção pelo BLV) originam-se, predominantemente, de linfócitos B maduros, já os linfomas esporádicos (forma que não está associada à infecção pelo BLV) originam-se principalmente de linfócitos T (ISHIGURO et al., 1994; TANI et al., 1997; VERNAU et al., 1997; STEP et al., 2001; JACOBS et al., 2002; HARBO et al., 2004). O uso de anticorpos para a imunomarcagem de linfócitos B e T já foi padronizado há vários anos e diversos são aqueles que têm sido utilizados para a imunomarcagem de linfócitos tumorais em bovinos (ISHINO et al., 1990; ASAHINA et al., 1995; TANI et al., 1997; SATO et al., 2002; OTROCKA-DOMAGALA et al., 2012). Preconiza-se para linfócitos B a utilização do anticorpo primário monoclonal anti-humano CD79 α cy, produzido em camundongos, e para linfócitos T, a utilização do anticorpo policlonal anti-humano CD3, produzido em coelhos. Além desses, outros anticorpos (CD2, CD4, CD8, CD5) também são utilizados na imunofenotipagem dos linfomas bovinos (HARBO et al., 2004; BUCZINSKI et al., 2006; ANJIKI et al., 2009; OTROCKA-DOMAGALA et al., 2012).

Com isso, esse estudo tem como objetivos: (1) abordar os aspectos epidemiológicos, clínicos e anatomopatológicos obtidos a partir dos casos de linfoma em bovinos, e assim fornecer subsídios, principalmente aos clínicos de grandes animais, para que possam, a campo, realizar com propriedade o diagnóstico presuntivo, tanto *in vivo* como *post-mortem*, desse neoplasma; e (2) auxiliar os patologistas veterinários na utilização da classificação atual dos linfomas, já há anos empregada para tumores linfoides de humanos, usando para isso dois sistemas de

classificação: *Working Formulation (WF) of Non-Hodgkin's Lymphomas for Clinical Usage* e *Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms (REAL)*. Desse estudo resultaram dois trabalhos científicos. A introdução, material e métodos, resultados e discussão obtidos desses dois trabalhos são incluídos na íntegra a seguir.

2. ARTIGO 1

Aspectos epidemiológicos, clínicos e anatomopatológicos do linfoma em bovinos: 128 casos (1965-2013)

Welden Panziera, Ronaldo M. Bianchi, Glauco J.N. Galiza, Paula R. Pereira, Renata D. Mazaro, Claudio S.L. Barros, Glauca D. Kommers, Luiz F. Irigoyen e Rafael A. Figuera

1º. TRABALHO

(Publicado na revista *Pesquisa Veterinária Brasileira* 34(9):856-864, 2014)

**Aspectos epidemiológicos, clínicos e anatomopatológicos do linfoma em bovinos:
128 casos (1965-2013)¹**

Welden Panziera², Ronaldo M. Bianchi², Glauco J.N. Galiza², Paula R. Pereira³, Renata D. Mazaro⁴, Claudio S.L. Barros⁵, Gláucia D. Kommers⁵ Luiz F. Irigoyen⁵
e Rafael A. Fighera^{5*}

ABSTRACT.- Panziera W., Bianchi R.M., Galiza G.J.N., Pereira P.R., Mazaro R.D., Barros C.S.L., Kommers G.D., Irigoyen L.F. & Fighera R.A. 2014. [**Epidemiological, clinical and pathological aspects of lymphoma in cattle: 128 cases (1965-2013).**] Aspectos epidemiológicos, clínicos e anatomopatológicos do linfoma em bovinos: 128 casos (1965-2013). Pesquisa Veterinária Brasileira 34(9):856-864. Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: anemiaveterinaria@yahoo.com.br

The epidemiological, clinical and pathological aspects of 128 cases of bovine lymphoma are described in this study. Out of the cases where the gender was informed (n=111), 84.7% of affected animals were females and 15.3% were males. Out of the cases where breed was informed (n=108), 63% of affected animals were Holstein cows. The age of affected cows (n=107) varied from 1 to 14 years (57.9%), with most animals being adults (89.7%) with 5 to 8 years of age (57.9%). The most common clinical sign (n=89) was lymphadenomegaly (74.1%). Other clinical signs associated with the respiratory system (dyspnea, pulmonary stridor, and tachypnea), cardiovascular system (tachycardia, subcutaneous edema, and positive venous pulse), digestive system (ruminal atony, bloat, and diarrhea), and nervous system (pelvic limb paresis and staggering pace) were less prevalent. Gross findings (n=125) included enlargement of lymph node in 71.2% of the cases; this finding was classified as localized in 89.6% of the cases and generalized in 10.3% of the cases. Out of the cases where the affected lymph

¹ Recebido em 08 de maio de 2014.

Aceito para publicação em 5 de setembro de 2014.

Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor.

² Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia e Patologia Clínica, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Bairro Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil..

³ Curso de Medicina Veterinária, CCR-UFSM, Santa Maria, RS. Bolsista PROBIC/CNPq/UFSM.

⁴ Curso de Medicina Veterinária, CCR-UFSM, Santa Maria, RS. Bolsista PIBIC/CNPq/UFSM.

⁵ Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, UFSM, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900. *Autor para correspondência: anemiaveterinaria@yahoo.com.br

nodes were identified (n=58) the distribution of the lymphadenomegaly was the following: mesenteric (51.7%), mediastinal (37.9%), prescapular (29.3%), internal iliac (27.6%), superficial inguinal (25.8%), and tracheobronchial (18.9%). Other commonly affected organs included heart (40%), liver (15.2%), kidney (14.4%), abomasum (12.8%), uterus (11.2%), intestine (10.4%), and lung (7.2%). Tumor masses within the vertebral canal were observed in a few cases (3.2%). Based on the epidemiology and localization of the lesions, the majority of the cases (96%) in this study were classified as enzootic lymphoma (96%) and the remainder of the cases (4%) as sporadic lymphoma. The results herein presented will serve as a guide to large animal practitioners and veterinary pathologists and will help in the confirmation of their suspicion when dealing with cases of bovine lymphoma.

INDEX TERMS: Diseases of cattle, bovine enzootic leucosis, lymphoma, lymphosarcoma, hematopoietic tumors.

RESUMO.- Por meio de um estudo retrospectivo, os aspectos epidemiológicos, clínicos e anatomopatológicos de 128 casos de linfoma bovino são descritos. Dos protocolos que informavam o sexo (n=111), 84,7% correspondiam a fêmeas e 15,3% a machos. Dos protocolos em que constava a raça (n=108), a mais prevalente foi a holandesa (63%). Em relação à idade (n=107), houve uma variação entre um e 14 anos. A maioria dos bovinos era adulta (89,7%) e a maior concentração dos casos ocorreu ao redor de 5-8 anos (57,9%). Em relação aos sinais clínicos (n=89), linfadenomegalia foi o achado mais frequentemente observado (74,1%). Outros sinais clínicos, principalmente aqueles relacionados com os sistemas respiratório (dispneia, estertoração pulmonar e taquipneia), cardiovascular (taquicardia, edema subcutâneo e pulso venoso positivo), digestório (atonía ruminal, timpanismo e diarreia) e nervoso (paresia dos membros pélvicos e andar cambaleante), foram pouco prevalentes. Na necropsia (n=125), 71,2% dos bovinos apresentavam aumento de volume dos linfonodos; essa linfadenomegalia foi classificada como localizada em 89,6% dos casos e generalizada em 10,3% dos casos. Dos protocolos que informavam os linfonodos acometidos (n=58), a distribuição foi a seguinte: mesentéricos (51,7%), mediastínicos (37,9%), pré-escapulares (29,3%), ilíacos internos (27,6%), inguinais superficiais (25,8%) e traqueobrônquicos (18,9%). Além dos linfonodos, outros órgãos comumente afetados pelo linfoma neste estudo incluíram:

coração (40%), fígado (15,2%), rim (14,4%), abomaso (12,8%), útero (11,2%), intestino (10,4%) e pulmão (7,2%). A presença de massas tumorais no canal vertebral foi observada em poucos casos (3,2%). Com base na epidemiologia e na localização das lesões, a maioria dos casos (96%) foi classificada como linfoma enzoótico e o restante (4%) como linfoma esporádico. Os resultados encontrados neste estudo irão auxiliar clínicos de grandes animais e patologistas veterinários na suspeita e no diagnóstico definitivo do linfoma na espécie bovina.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Doenças de bovinos, leucose enzoótica bovina, linfoma, linfossarcoma, tumores hematopoiéticos.

INTRODUÇÃO

As expressões “neoplasias linfoides”, “distúrbios linfoproliferativos” e “leucose linfoide” denotam um grande grupo de entidades neoplásicas malignas que se manifestam com diferentes aspectos clínicos e anatomopatológicos, mas que tem em comum originar-se dos linfócitos. Linfoma (previamente linfossarcoma) é uma forma de apresentação do distúrbio linfoproliferativo em que o tumor linfoide se origina mais frequentemente em órgãos hematopoiéticos sólidos, como linfonodo, baço ou tecido linfoide associado à mucosa (MALT), e, menos frequentemente, em órgãos não linfoides, mas não na medula óssea (Figuera & Graça 2010). É um neoplasma hematopoiético descrito em várias espécies de animais e, em bovinos, dependendo da localização geográfica, é considerado o neoplasma mais frequentemente incriminado como causa de morte, principalmente em raças leiteiras (Marshak et al. 1962, Hare et al. 1964, Smith 1965, Jacobs et al. 2002, Burton et al. 2010).

Diferentemente de outras espécies de mamíferos domésticos, os bovinos possuem uma classificação anatômica própria para os linfomas. Ao contrário da tradicional subdivisão em multicêntrico, alimentar, mediastínico e extra-nodal, os linfomas nessa espécie são divididos em dois grandes grupos: enzoóticos (forma mais prevalente) e esporádicos (Figuera & Graça 2010). Linfomas enzoóticos são causados pelo vírus da leucemia bovina (BLV, *bovine leukemia virus*) (Valli 2007a), um retrovírus da família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e gênero *Deltaretrovirus* (Ravazzolo & Costa 2012). Diferentemente, os linfomas esporádicos não têm nenhuma relação com infecção viral (Valli 2007a), são raros e dificilmente ocorrem em mais de um caso em um mesmo

rebanho (Barros 2007). Linfomas esporádicos ocorrem basicamente de três formas: multicêntrica, tímica e cutânea (Jacobs et al. 2002).

Linfomas enzoóticos ocorrem principalmente em bovinos adultos, geralmente com idades entre cinco e sete anos, e em rebanhos em que técnicas de manejo propiciem a disseminação do BLV. Por outro lado, linfomas esporádicos ocorrem em bovinos entre um mês e quatro anos de idade (Fighera & Graça 2010). Os sinais clínicos variam de acordo com os órgãos afetados, mas as principais manifestações clínicas descritas na literatura incluem perda de apetite, emagrecimento progressivo, diminuição na produção de leite, linfadenomegalia superficial e profunda, febre e sinais respiratórios e cardíacos (Radostits et al. 2007).

O Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) conta com uma rotina de diagnóstico expressiva dentro de sua área de abrangência. Com isso, o principal objetivo deste estudo foi determinar a prevalência dos linfomas em bovinos nessa rotina diagnóstica, abordando seus aspectos epidemiológicos, clínicos e anatomopatológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram revisados os protocolos dos casos de leucose em bovinos diagnosticados no LPV UFSM entre 1965 e 2013 (n=128), obtendo-se os dados relacionados à epidemiologia, à clínica e à anatomopatologia de cada caso. Os aspectos epidemiológicos incluíam sexo, raça e idade (n=128). Os aspectos clínicos basearam-se no histórico relatado pelos clínicos e que constava nos laudos de necropsias e biópsias (n=89), e os aspectos anatomopatológicos incluíam os achados macroscópicos, que constavam na descrição do patologista (n=125). Sempre que possível foi realizada uma reavaliação do padrão macroscópico de cada caso, com base no arquivo fotográfico do laboratório. Os diagnósticos foram validados através do exame histológico de cada caso.

RESULTADOS

Achados epidemiológicos

Entre 1965 e 2013 foram diagnosticados 128 casos de linfoma em bovinos. Os bovinos necropsiados eram provenientes de municípios da região de abrangência do LPV-UFSM (Região Central do Estado do Rio Grande do Sul). Dos 128 casos de linfoma, o sexo não estava informado em 17. Dos 111 casos em que o sexo constava nos protocolos, 94 (84,7%) correspondiam a fêmeas e 17 (15,3%) a machos. Em relação à

raça, 20 protocolos não informavam esse dado. Dos 108 casos em que a raça constava, a mais prevalente foi a holandesa, com 68 casos (63%). Outras raças incluíam: Nelore (5/108 [4,6%]), Charolês, (4/108 [3,7%]), Hereford (4/108 [3,7%]), Jersey (2/108 [1,8%]), Angus (1/108 [0,9%]), Braford (1/108 [0,9%]), Devon (1/108 [0,9%]) e Tabapuã (1/108 [0,8%]). Bovinos sem raça definida (SRD) perfizeram 19,4% dos casos (21/108).

A idade estava informada em 107 protocolos, e variou de um a 14 anos. Desses bovinos, 96 (89,7%) eram adultos (com três ou mais anos de idade) e notou-se uma nítida concentração dos casos ao redor de 5-8 anos (62/107 [57,9%]). O restante (11/107 [10,3%]) era jovem, sendo que destes, quatro bovinos tinham menos de dois anos de idade.

Achados clínicos

Dos 128 casos, 89 protocolos tinham descrições referentes às manifestações clínicas. Os bovinos acometidos pelo linfoma apresentaram uma grande variedade de sinais clínicos. De modo geral, demonstraram uma doença com um curso variando de subagudo (acima de oito dias) a crônico (vários meses de evolução), sendo linfadenomegalia a manifestação clínica mais frequentemente observada (66/89 [74,1%]). Dos casos em que foram informados os linfonodos acometidos (36/66 [54,5%]), 30 (83,3%) bovinos apresentavam linfadenomegalia localizada. Seis bovinos (16,6%) demonstraram aumento generalizado dos linfonodos. Nos casos em que a linfadenomegalia era localizada, observou-se uma grande diferença de acometimento entre os linfonodos superficiais (22/30 [73,3%]) e os profundos (2/30 [6,6%]).

As manifestações clínicas relacionadas com o trato respiratório incluíam: dispneia (16/89 [18%]), estertoração pulmonar (10/89 [11,2%]) e taquipneia (6/89 [6,7%]). Os achados clínicos com o envolvimento do sistema cardiovascular demonstravam manifestações relacionadas à insuficiência cardíaca congestiva, como: taquicardia (12/89 [13,5%]), edema subcutâneo (todos os casos afetando a região submandibular, peitoral e abdominal ventral) (10/89 [11,2%]) e pulso venoso positivo (7/89 [7,8%]). O acometimento do trato digestório relacionava-se com sinais de atonia ruminal (6/89 [6,7%]) e timpanismo (6/89 [6,7%]). Diarreia foi descrita em quatro casos (4,5%). Manifestações clínicas com o envolvimento do sistema nervoso central caracterizaram-

se por: decúbito (17/89 [19,1%]), paresia dos membros pélvicos (12/89 [13,5%]), andar cambaleante (10/89 [11,2%]) e movimentos de pedalagem (1/89 [1,1%]).

Outros sinais clínicos incluíam: emagrecimento progressivo (35/89 [39,3%]), apatia (18/89 [20,2%]), anorexia (14/89 [15,7%]), febre (11/89 [12,3%]), diminuição na produção de leite (8/74 [10,8%]), exoftalmia (Fig.1) (7/89 [7,8%]) e palidez das mucosas (6/89 [6,7%]). Sinais clínicos observados em uma única oportunidade (1,1%) incluíam: cianose, tosse, distocia, regurgitação, cegueira, salivação intensa, protrusão de terceira pálpebra e hematúria.

Achados anatomopatológicos

Dos 128 casos de linfoma incluídos neste estudo, 125 protocolos tinham descrições referentes à localização dos tumores. Desses 125 casos, 89 (71,2%) apresentavam aumento de volume dos linfonodos. Dos 89 casos, em 58 protocolos havia informações que permitiam classificar a linfadenomegalia como localizada (52/58 [89,6%]) ou generalizada (6/58 [10,3%]). Nos casos em que a linfadenomegalia foi considerada localizada, os linfonodos profundos foram mais afetados (22/52 [42,3%]) do que os linfonodos superficiais (12/52 [23%]). Ambos os linfonodos (superficiais e profundos) estiveram afetados em cerca de um terço dos casos (18/52 [34,6%]). De modo geral, quando somados os dados referentes à linfadenomegalia localizada e generalizada, os principais linfonodos que apresentaram linfadenomegalia incluíam: mesentéricos (Fig.2) (30/58 [51,7%]), mediastínicos (22/58 [37,9%]), pré-escapulares (17/58 [29,3%]), ilíacos internos (Fig.3) (16/58 [27,6%]), inguinais superficiais (15/58 [25,8%]), traqueobrônquicos (11/58 [18,9%]) e hepáticos, ilíacos externos, cervicais, submandibulares e retrobulbares (Fig.4) (10/58 [17,2%]). O aspecto morfológico dos linfonodos foi descrito como macio ao corte e com superfície de corte branca, amarela, cinza ou levemente vermelha e sem delimitação córtico-medular (Fig.5). A linfadenomegalia variou de leve a acentuada, ocorrendo inclusive na forma de grandes massas, com até 10 vezes o volume normal.

Outro órgão acometido pelo linfoma foi o coração (50/125 [40%]). Dos protocolos que informavam a localização das lesões (14/50), o átrio direito foi a principal cavidade envolvida (11/14 [78,6%]), seguido pelo ventrículo direito (3/14 [21,4%]). Dois dos três casos em que o ventrículo direito estava afetado, também havia acometimento do ventrículo esquerdo. No geral, quando havia lesão cardíaca, o linfoma apresentava-se

com dois padrões macroscópicos. Em um deles, observado em 31 dos 50 casos (62%), o neoplasma formava nódulos ou massas branco-amareladas de diferentes tamanhos, que emitiam projeções irregulares para o lúmen das câmaras cardíacas (principalmente átrio direito) (Fig.6). Em 15 casos (30%) havia somente espessamento da parede do órgão e observavam-se áreas branco-amareladas (Fig.7) mais facilmente visualizadas ao corte (Fig.8).

O fígado foi afetado em 19 dos 125 casos de linfoma (15,2%). Desses, em sete casos não havia informações macroscópicas. Nos casos em que as lesões foram descritas, elas incluíam: hepatomegalia difusa (7/12 [58,3%]), hepatomegalia nodular (4/12 [33,3%]) e acentuação do padrão lobular (1/12 [8,3%]). O acometimento do abomaso pelo linfoma (16/125 [12,8%]) caracterizou-se pela presença de nódulos e massas projetadas para a luz do órgão (9/16 [52,2%]) ou espessamento da parede (Figs.9 e 10) (6/16 [37,5%]). Em ambos os padrões de apresentação, ulceração foi uma constante. Os nódulos e as massas eram brancacentos ou amarelos e variavam de 8 a 20 cm de diâmetro. O intestino foi acometido em 13 dos 125 casos (10,4%) e o aspecto morfológico de quase a totalidade dos casos (12/13 [92,3%]) consistia de nódulos (Figs.11 e 12) ou massas, semelhante ao descrito previamente no abomaso. Menos frequentemente foram observadas lesões no omaso (6/125 [4,8%]), que incluíam: espessamento da parede (3/5 [60%]) e formação de nódulos ou massas (2/5 [40%]). Os aspectos macroscópicos eram semelhantes aos descritos para o abomaso e intestinos.

Os rins estavam afetados em 18 casos (14,4%), sendo que em 13 desses (72,2%), foram observados nódulos ou massas branco-amareladas que envolviam tanto o córtex quanto a medular. A pelve renal foi envolvida em apenas um desses casos (5,5%). Uma apresentação na forma de áreas corticomedulares brancacentas foi vista em cinco desses casos (27,7%) (Fig.13). Em três casos (3/125 [2,4%]) houve também acometimento de pelo menos um dos ureteres, o que causava hidronefrose ipsilateral.

Linfoma uterino foi visto em 14 casos (11,2%). Daqueles em que havia descrição macroscópica nos protocolos (12/14), a apresentação consistia de nódulos ou massas, semelhante às descritas para os outros órgãos. Em quatro bovinos (4/12 [33,3%]), essas alterações (nódulos ou massas) eram observadas em somente um dos cornos uterinos.

Outros órgãos afetados pelo linfoma incluíram: pulmão (9/125 [7,2%]), músculos esqueléticos (9/125 [7,2%]), baço (8/125 [6,4%]), retículo (5/125 [4%]), canal

vertebral (Fig.14) (4/125 [3,2%]), rúmen, timo, bexiga, vagina e língua (3/125 [2,4%]), pâncreas, esôfago e ovários (2/125 [1,6%]) e cérebro, tonsilas, vesícula biliar e pele (1/125 [0,8%]).

Classificação

Com base nos dados epidemiológicos, principalmente na idade do bovino afetado e na quantidade de casos em uma mesma propriedade, nos achados clínicos e nos aspectos anatomopatológicos, principalmente na distribuição dos órgãos afetados, os 125 casos de linfoma foram classificados como: 120 enzoóticos (96%) e cinco esporádicos (4%). Esses cinco casos de linfoma esporádico incluíam quatro linfomas tímicos (3,2%) e um linfoma cutâneo (0,8%). Nenhum caso de linfoma multicêntrico foi observado.

DISCUSSÃO

Linfoma constitui um dos principais tumores de bovinos e está associado a grandes perdas econômicas na cadeia produtiva desta espécie. Em áreas onde a produção leiteira é predominante, esse neoplasma constitui uma importante causa de morte (Hare et al. 1964, Jacobs et al. 2002, Radostits et al. 2007). Na América do Norte, o linfoma é responsável por cerca de 60% de todos os tumores observados em bovinos de leite (Oliver-Espinosa et al. 1994). Além dos prejuízos na bovinocultura de leite, este tumor também provoca perdas na indústria frigorífica, sendo responsável por condenações de órgãos ou carcaças (Hare et al. 1964, Anderson & Jarrett 1968, Schamber et al. 1982, Thurmond et al. 1985, Carlson 2002). Na rotina do LPV-UFSM, um estudo recente (Lucena et al. 2011) demonstrou que o linfoma é o terceiro tumor mais diagnosticado em bovinos, atrás apenas dos carcinomas de células escamosas do trato digestório superior e da pele, induzidos pela ingestão continuada de samambaia-do-campo (*Pteridium aquilinum*) (Moreira Souto et al. 2006) e por radiação ultravioleta (Rosa et al. 2012), respectivamente. Dados semelhantes foram observados em outro estudo (Carvalho et al. 2014) que determinou a prevalência de tumores em ruminantes e equídeos no semiárido do Nordeste brasileiro. Linfoma foi o segundo tumor mais frequente em bovinos, ficando atrás dos carcinomas de células escamosas localizados no olho e tecido periocular, pele e sistema reprodutor feminino, todos eles associados à radiação solar.

Assim como é descrito na literatura (Marshak et al. 1962, Smith 1965, Jacobs et al. 2002, Barros 2007, Valli 2007a, 2007b, Garry 2008, Fighera & Graça 2010, Fry & McGavin 2013), a grande maioria (96%) dos casos de linfoma neste estudo foram classificados como linfoma enzoótico, apresentação que é estritamente relacionada com o envolvimento do BLV. Entretanto, o critério utilizado foi exclusivamente a localização das massas tumorais associada com a idade dos bovinos afetados, já que nos laudos não havia informações referentes a exames complementares (sorologia, por exemplo) que permitissem inferir sobre a infecção pelo BLV. Os casos de linfoma esporádico foram incomuns (4%) e ocorreram apenas sob duas formas de apresentação (tímico e cutâneo), à semelhança do que já era esperado com base na literatura (Barros 2007, Radostits et al. 2007, Fighera & Graça 2010).

Fêmeas bovinas e da raça holandesa foram mais afetadas. Essa prevalência deve-se basicamente ao tipo de criação que, por ser mais intensiva em vacas de leite, permite uma maior proximidade entre os animais e requer práticas de manejo constantes, o que influencia muito na disseminação do BLV (Carlson 2002, Radostits et al. 2007). Além disso, a proporção de fêmeas em relação aos machos em um rebanho leiteiro é maior (Marshak et al. 1962). Estudos demonstram também que pode haver suscetibilidade genética em alguns rebanhos (Marshak et al. 1962, Hare et al. 1964). A maior parte dos autores afirma que bovinos de corte são menos acometidos pelo linfoma enzoótico (Jacobs et al. 2002, Radostits et al. 2007). Esse aspecto foi também observado neste estudo, e isso se deve principalmente ao abate precoce dos animais (Jacobs et al. 2002, Carlson 2002, Radostits et al. 2007). Porém, quando os bovinos são criados em confinamento, o número de animais afetados pode assemelhar-se aos das vacas leiteiras (Fighera & Graça 2010).

Neste trabalho os bovinos tinham entre um e 14 anos de idade e o maior número de casos ocorreu entre cinco e oito anos (57,9%), semelhantemente ao que é descrito na literatura (Marshak et al. 1962, Hare et al. 1964, Smith 1965, Burton et al. 2010). Embora o risco de linfoma aumente com a idade, existe uma distribuição bimodal, na qual há um pico de ocorrência em bovinos com menos de um ano de idade e outro entre cinco e oito anos (Jacobs et al. 2002). Alguns autores demonstram um número de casos relevantes em bovinos mais jovens (Smith 1965, Anderson & Jarrett 1968, Schamber et al. 1982, Misdorp 2002), reforçando o modelo bimodal sugerido. A tendência para o número de casos de linfoma desaparecer em bovinos mais velhos (nove anos ou mais) é

a mesma que foi observada em cães (Rosenthal 1982), sendo provavelmente decorrente da diminuição da população total dessas idades e não devido a real diminuição da prevalência (Smith 1965). Com base nesses argumentos, a maior prevalência entre cinco e oito anos pode ser atribuída a diminuição da população de bovinos mais velhos, o que explicaria, pelo menos em parte, as idades observadas neste estudo.

Os sinais clínicos apresentados por bovinos com linfoma enzoótico são variáveis, pois dependem principalmente do órgão em que o tumor se localiza. É importante ressaltar, que apenas 1% a 5% dos bovinos sorologicamente positivos para BLV desenvolverão linfoma (Radostits et al. 2007). Linfadenomegalia dos linfonodos palpáveis constitui a principal manifestação clínica observada e representa um sinal de extrema importância para a suspeita clínica deste tumor (Marshak et al. 1962, Hare et al. 1964, Smith 1965, Barros 2007, Radostits et al. 2007, Valli 2007a, Garry 2008). Neste estudo, linfadenomegalia esteve presente em aproximadamente 75% dos casos, sendo a manifestação clínica mais frequente. Em relação ao acometimento nodal superficial ou profundo, os linfonodos superficiais foram mais afetados. Linfadenomegalia superficial é considerada um achado clássico de linfoma (Radostits et al. 2007) e, portanto, esse é o primeiro diagnóstico diferencial a ser pensado quando o veterinário se depara com esse sinal clínico. Embora o envolvimento de linfonodos profundos também seja comum, sua identificação é mais difícil, sendo possível pela palpação retal naqueles casos em que ocorre acometimento dos linfonodos ilíacos internos (Barros 2007, Radostits et al. 2007, Garry 2008). Talvez a falha no exame físico completo, principalmente a ausência da palpação retal, possa ter contribuído para a baixa prevalência da linfadenomegalia profunda neste estudo.

O aumento de volume dos linfonodos pode resultar em várias consequências clínicas (Garry 2008); tumores envolvendo linfonodos profundos geralmente estão relacionados com sinais que denotam o acometimento dos sistemas respiratório, cardiovascular, digestório e nervoso. Manifestações clínicas que demonstram alterações no sistema respiratório (dispneia, taquipneia e estertoração pulmonar) foram observadas em aproximadamente um terço dos bovinos acometidos por linfoma neste estudo. Estas alterações estão diretamente relacionadas com aumento de linfonodos que envolvem o trato respiratório principalmente os mediastínicos, submandibulares e traqueobrônquicos (Marshak et al. 1962, Grimshaw et al. 1979, Ivany et al. 2000, Barros

2007, Radostits et al. 2007, Garry 2008). Além dos linfonodos, houve acometimento pulmonar em alguns casos, contribuindo para o agravamento dos sinais respiratórios.

Manifestações clínicas que indicavam acometimento cardíaco pelo linfoma foram observadas em aproximadamente 32% dos casos. Sinais como taquicardia, edema subcutâneo da região ventral e pulso venoso positivo ocorreram com frequência. Estes achados clínicos somados a ausculta cardíaca alterada, são típicos de alterações provocadas pelo linfoma no coração e indicam insuficiência cardíaca congestiva (Barros 2007, Radostits et al. 2007, Garry 2008).

Sinais que demonstram o envolvimento do trato gastrointestinal são comuns e geralmente os bovinos afetados apresentam diarreia, melena, atonia ruminal, constipação e timpanismo (Jacobs et al. 2002, Radostits et al. 2007, Valli 2007a, Garry 2008). Alterações clínicas semelhantes foram observadas nos casos aqui estudados e em todos havia comprometimento de algum órgão gastrointestinal ou de linfonodos mesentéricos. Além disso, quando havia timpanismo, o esôfago estava, também, acometido pelo linfoma. As manifestações clínicas gastrointestinais podem ser provocadas independentemente da forma de acometimento macroscópico dos órgãos, ou seja, ocorrem quando houver formação de nódulos ou massas (apresentação nodular ou massiva) ou quando ocorrer espessamento das suas paredes (apresentação difusa) (Radostits et al. 2007, Valli 2007a). Embora melena não tenha sido descrita em nenhum bovino deste estudo, sugere-se que este sinal clínico possa não ter sido percebido ou informado, pois em cerca de 10% dos casos havia úlceras no abomaso durante a necropsia.

Muitos bovinos deste estudo (cerca de 40%) demonstraram sinais de emagrecimento progressivo, apatia, anorexia e diminuição da produção de leite. Essas alterações geralmente são atribuídas a sinais de distúrbios digestivos provocados pelo linfoma (Marshak et al. 1962, Jacobs et al. 2002, Barros 2007, Radostits et al. 2007, Valli 2007a).

Manifestações neurológicas foram observadas em aproximadamente 15% dos bovinos e consistiam principalmente em andar cambaleante, paresia dos membros pélvicos e decúbito, sequencialmente. Essas alterações são atribuídas à presença do linfoma no canal vertebral e consequente compressão medular exercida pelas massas neoplásicas (Jacobs et al. 2002, Barros 2007, Radostits et al. 2007, Valli 2007a, Garry 2008). Paresia ou paralisia dos membros pélvicos são mais comumente observadas

quando o tumor está localizado nas regiões tóraco-lombar, lombar ou sacral (Garry 2008, Villar et al. 2012), pois quando o neoplasma envolve as regiões cervical ou torácica cranial observa-se tetraparesia (Garry 2008). Embora um grande número de bovinos aqui estudados tivessem manifestações neurológicas, apenas em poucos casos (3,2%) havia descrições de envolvimento do espaço epidural à necropsia. Essa dissociação entre sinais clínicos de síndrome medular e achados anatomopatológicos de massa neoplásica no canal vertebral comprimindo a medula espinhal pode ser explicada pela não abertura da coluna vertebral durante a necropsia.

Exoftalmia foi observada em poucos casos (cerca de 8%) de linfoma por nós avaliados, à semelhança do que foi descrito em alguns estudos (Marshak et al. 1962, Burton et al. 2010, Filho et al. 2011). Este achado clínico reflete o acometimento dos linfonodos retrobulbares pelo linfoma e pode ser tanto unilateral, quanto bilateral (Malatestinic 2003, Barros 2007, Radostits et al. 2007, Valli 2007a, Garry 2008).

Palidez das mucosas, um sinal clínico que permite inferir sobre a possibilidade da ocorrência de anemia, foi descrito em cerca de 7% dos bovinos. A patogênese mais comumente reconhecida como responsável pela anemia nesses casos é a perda de sangue pelo trato digestório devido à presença de massas tumorais ulceradas no abomaso (Hare et al. 1964). Apesar desse mecanismo ser o mais comumente retratado na literatura, causas de anemia não diretamente associadas às massas tumorais, ou seja, que ocorrem como síndrome paraneoplásica, são bem descritas em outras espécies e possivelmente possam ocorrer em bovinos (Fighera et al. 2006).

Na necropsia, o padrão das lesões encontradas foi semelhante ao que tem sido descrito por diferentes autores na literatura veterinária (Jacobs et al. 2002, Valli 2007a, Valli 2007b, Fighera & Graça 2010, Fry & McGavin 2013), entretanto, a prevalência no acometimento de cada órgão mostrou algumas diferenças. Os principais órgãos afetados pelo linfoma neste estudo foram (em ordem decrescente de frequência): linfonodos, coração, fígado, rim, abomaso, útero, intestino e pulmão. Linfonodos demonstraram sempre um padrão de aumento de volume difuso e nos demais órgãos, mais frequentemente, observaram-se formações nodulares ou massivas, branco-amareladas de diferentes tamanhos. Menos comumente, alguns órgãos como coração e estômagos, apresentaram apenas espessamento de suas paredes, sem formação de nódulos ou massas. Esse padrão macroscópico de apresentação do linfoma permitiu presumir o diagnóstico da maioria dos casos já na necropsia.

O acometimento nodal foi observado em aproximadamente 70% dos casos, semelhantemente ao que foi relatado em um dos maiores estudos acerca da distribuição das massas tumorais no linfoma bovino (Smith 1965). Ao contrário do que é descrito por alguns autores (Jacobs et al. 2002, Barros 2007, Valli 2007a), nossos resultados demonstram que linfadenomegalia localizada é cerca de nove vezes mais prevalente do que a forma generalizada. Além disso, os linfonodos profundos foram aproximadamente duas vezes mais acometidos do que os linfonodos superficiais. A distribuição quanto aos linfonodos acometidos foi semelhante ao que se conhece da literatura (Smith 1965), entretanto, os linfonodos mediastínicos, o segundo linfocentro mais afetado, não são citados como os mais envolvidos pela maior parte dos autores (Marshak et al. 1962, Jacobs et al. 2002).

O coração foi o segundo órgão mais prevalente em relação à distribuição dos tumores. Geralmente, o acometimento cardíaco é observado em mais da metade dos casos (Marshak et al. 1962, Smith 1965, Burton et al. 2010). Em relação à localização do linfoma no coração, à semelhança do que se conhece da literatura (Marshak et al. 1962, Smith 1965, Jacobs et al. 2002, Barros 2007, Valli 2007a, Garry 2008, Figuera & Graça 2010), o átrio direito foi a cavidade mais comumente afetada pelo tumor.

Órgãos do sistema digestório também apresentaram envolvimento significativo pelo linfoma. Entretanto, a prevalência do acometimento do abomaso foi bastante baixa (12,8%) e semelhante a do intestino (10,4%). Esse resultado contrasta fortemente com o que é descrito na literatura, principalmente em livros de patologia (Jacobs et al. 2002, Barros 2007, Valli 2007a, Figuera & Graça 2010) e em alguns artigos (Bertone 1990, Burton et al. 2010). Cabe ressaltar que os dois maiores trabalhos realizados sobre a distribuição das massas tumorais vistas à necropsia (n=63) (Marshak et al. 1962) ou na inspeção de carne (n=1.113) (Smith 1965) são contraditórios, pois demonstram prevalência de 6,7% e 57%, respectivamente.

Em casos de linfoma bovino, o acometimento do cérebro como parte de um quadro multicêntrico é um achado muito raro (Smith & Anderson 1977, Sweeney et al. 1986, Braun et al. 2005) e não descrito em nenhum estudo sobre distribuição das lesões (Marshak et al. 1962, Smith 1965, Burton et al. 2010). Os sinais neurológicos observados neste caso foram decorrentes da ocupação do espaço intracraniano pela massa e conseqüente compressão das estruturas adjacentes, à semelhança do que ocorre com outros neoplasmas intracranianos (Sherman 1987).

CONCLUSÕES

Os resultados aqui apresentados permitem concluir que, na Região Central do Rio Grande do Sul, vacas de leite, principalmente entre 5-8 anos de idade, representam a categoria mais predisposta ao desenvolvimento de linfomas, basicamente aqueles de ocorrência enzoótica.

Esses bovinos quase sempre são diagnosticados com base na presença de linfadenomegalia persistente, principalmente dos linfonodos superficiais, mas também pela palpação retal dos linfonodos ilíacos internos.

A associação desses achados epidemiológicos e clínicos permite o diagnóstico presuntivo do linfoma em bovinos e a necropsia acaba por validar esses casos, já que praticamente não há outra entidade clínica que apresente aspectos anatomopatológicos semelhantes ao linfoma nessa espécie.

REFERÊNCIAS

- Anderson L.J. & Jarrett W.F.H. 1968. Lymphosarcoma (leukemia) in cattle, sheep and pigs in great Britain. *Cancer* 22:398-405.
- Barros C.S.L. 2007. Leucose bovina, p.159-169. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R. (Eds), *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. Vol.1. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria. 694p.
- Bertone A.L. 1990. Neoplasms of the bovine gastrointestinal tract. *Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract.* 6:515-523.
- Braun U., Jehle W. & Soldati G. 2005. Malignant cerebellar lymphoma in a calf. *Vet. Rec.* 156: 215-216.
- Burton A.J., Nydam D.V., Long E.D. & Divers T.J. 2010. Signalment and clinical complaints initiating hospital admission, methods of diagnosis, and pathological findings associated with bovine lymphosarcoma (112 cases). *J. Vet. Intern. Med.* 24:960-964.
- Carlson G.P. 2002. Diseases of the hematopoietic and hemolymphatic systems, p.1019-1084. In: Smith B.P. (Ed.), *Large Animal Internal Medicine*. 3rd ed. Mosby, Saint Louis. 1735p.
- Carvalho F.K.L., Dantas A.F.M., Riet-Correa F., Andrade R.L.F.S., Nóbrega Neto P.I., Miranda Neto E.G., Simões S.V.D. & Azevedo S.S. 2014. Estudo retrospectivo das neoplasias em ruminantes e equídeos no semiárido do Nordeste Brasileiro. *Pesq. Vet. Bras.* 34:211-216.
- Figuera R.A., Souza T.M., Rodrigues A. & Barros C.S.L. 2006. Aspectos clinicopatológicos de 43 casos de linfoma em cães. *Revta Cient. Med. Vet. Pequenos Anim. Estim.* 4:139-146.
- Figuera R.A. & Graça D.L. 2010. Sistema hematopoiético, p.337-422. In: Santos R.L. & Alessi A.C. (Eds), *Patologia Veterinária*. Roca, São Paulo. 892p.
- Filho A.P.S., Afonso J.A.B., Souza J.C.A., Riet-Correa F., Dantas A.F., Dantas A.C., Costa N.A. & Mendonça C.L. 2011. Linfossarcoma em bovinos no Agreste Meridional de Pernambuco. *Pesq. Vet. Bras.* 31:591-597.

- Fry M.M. & McGavin M.D. 2013. Medula óssea, células sanguíneas e sistema linfático, p.701-773. In: Zachary J.F. & McGavin M.D. (Eds), Bases da Patologia em Veterinária. 5ª ed. Elsevier, Rio de Janeiro. 1324p.
- Garry F. 2008. Miscellaneous infectious diseases, p.606-639. In: Divers T.J. & Peek S.F. (Eds), Diseases of Dairy Cattle. 2nd ed. Saunders Elsevier, Philadelphia. 686p.
- Grimshaw W.T.R., Wiseman A., Petrie L. & Selman I.E. 1979. Bovine leucosis (lymphosarcoma): a clinical study of 60 pathologically confirmed cases. Vet. Rec. 22:267-272.
- Hare W.C.D., Marshak R.R., Abt D.A., Dutcher R.M. & Croshaw J.E. 1964. Bovine lymphosarcoma: a review of studies on cattle in the Eastern United States. Can. Vet. J. 5:180-198.
- Ivany J.M., Kersting K.W. & Thompson J.R. 2000. Lymphosarcoma of the pharyngeal region in a 7-month-old beef steer. Can. Vet. J. 41:486-488.
- Jacobs R.M., Messick J.B. & Valli V.E. 2002. Tumors of the hemolymphatic system, p.119-198. In: Meuten D.J. (Ed.), Tumors in Domestic Animals. 4th ed. Iowa State Press, Ames. 788p.
- Lucena R.B., Rissi D.R., Kommers G.D., Pierezan F., Oliveira-Filho J.C., Macêdo J.T.S.A., Flores M.M. & Barros C.S.L. 2011. A retrospective study of 586 tumours in Brazilian cattle. J. Comp. Pathol. 145:20-24.
- Malatestinic A. 2003. Bilateral exophthalmos in a Holstein cow with lymphosarcoma. Can. Vet. J. 44:664-666.
- Marshak R.R., Coriell L.L., Lawrence W.C., Croshaw J.E., Schryver H.F., Altera K.P. & Nichols W.W. 1962. Studies on bovine lymphosarcoma. I. Clinical aspects, pathological alterations, and herd studies. Cancer Res. 22:202-217.
- Misdorp M. 2002. Tumours in calves: comparative aspects. J. Comp. Pathol. 127:96-105.
- Moreira Souto M.A., Kommers G.D., Barros C.S.L., Piazer J.V.M., Rech R.R., Riet-Correa F. & Schild A.L. 2006. Neoplasias do trato alimentar superior de bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Pesq. Vet. Bras. 26:112-122.
- Oliver-Espinosa O., Physick-Sheard P.W., Wollenberg G.K. & Taylor J. 1994. Sporadic bovine leukosis associated with ataxia and tibiotarsal joint swelling: a case report. Can. Vet. J. 35:777-779.
- Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W. & Constable P.D. 2007. Diseases associated with viruses and *Chlamydia*. I, p.1157-1305. In: Ibid. (Eds), Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia. 2156p.
- Ravazzolo A.P. & Costa U.M. 2012. *Retroviridae*, p.953-985. In: Flores E.F. (Ed.), Virologia Veterinária: virologia geral e doenças víricas. 2ª ed. Editora da UFSM, Santa Maria. 888p.
- Rosa F.B., Kommers G.D., Lucena R.B., Galiza G.J.N., Tochetto C., Silva T.M. & Silveira I.P. 2012. Aspectos epidemiológicos, clinicopatológicos e imuno-histoquímicos de carcinomas de células escamosas vulvares em 33 vacas. Pesq. Vet. Bras. 32:1127-1132.
- Rosenthal R.C. 1982. Epidemiology of canine lymphosarcoma. Comp. Cont. Educ. Pract. Vet. 4:855-858.
- Schamber G.J., Olson C. & Witt L.E. 1982. Neoplasms in calves (*Bos taurus*). Vet. Pathol. 19:629-637.
- Sherman D.M. 1987. Localized diseases of the bovine brain and spinal cord. Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract. 3:179-181.

- Smith H.A. 1965. The pathology of malignant lymphoma in cattle: a study of 1113 cases. *Pathol. Vet.* 2:68-94.
- Smith B.P. & Anderson M. 1977. Lymphosarcoma of the brain in a Holstein bull. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 130:333.
- Sweeney R.W., Divers T.J., Ziemer E. & Lichtensteiger C.A. 1986. Intracranial lymphosarcoma in a Holstein bull. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 189:555-556.
- Thurmond M.C., Lapuz G.R., Farver T.B. & Mandac G.C. 1985. Retrospective study of four years of carcass condemnation rates for malignant lymphoma in California cows. *Am. J. Vet. Res.* 46:1387-1391.
- Valli V.E.O. 2007a. Hematopoietic system, p.107-324. In: Maxie M.G. (Ed.), *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. Vol.3. 5th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia. 737p.
- Valli V.E.O. 2007b. *Veterinary Comparative Hematopathology*. Blackwell, Ames. 572p.
- Villar D., Duque L., Giraldo C., Montes J.E.P., Pallares F. & Schwartz K. 2012. Posterior paralysis in a Holstein cow with enzootic bovine leukosis. *Revta Colomb. Cienc. Pec.* 25:325-329.

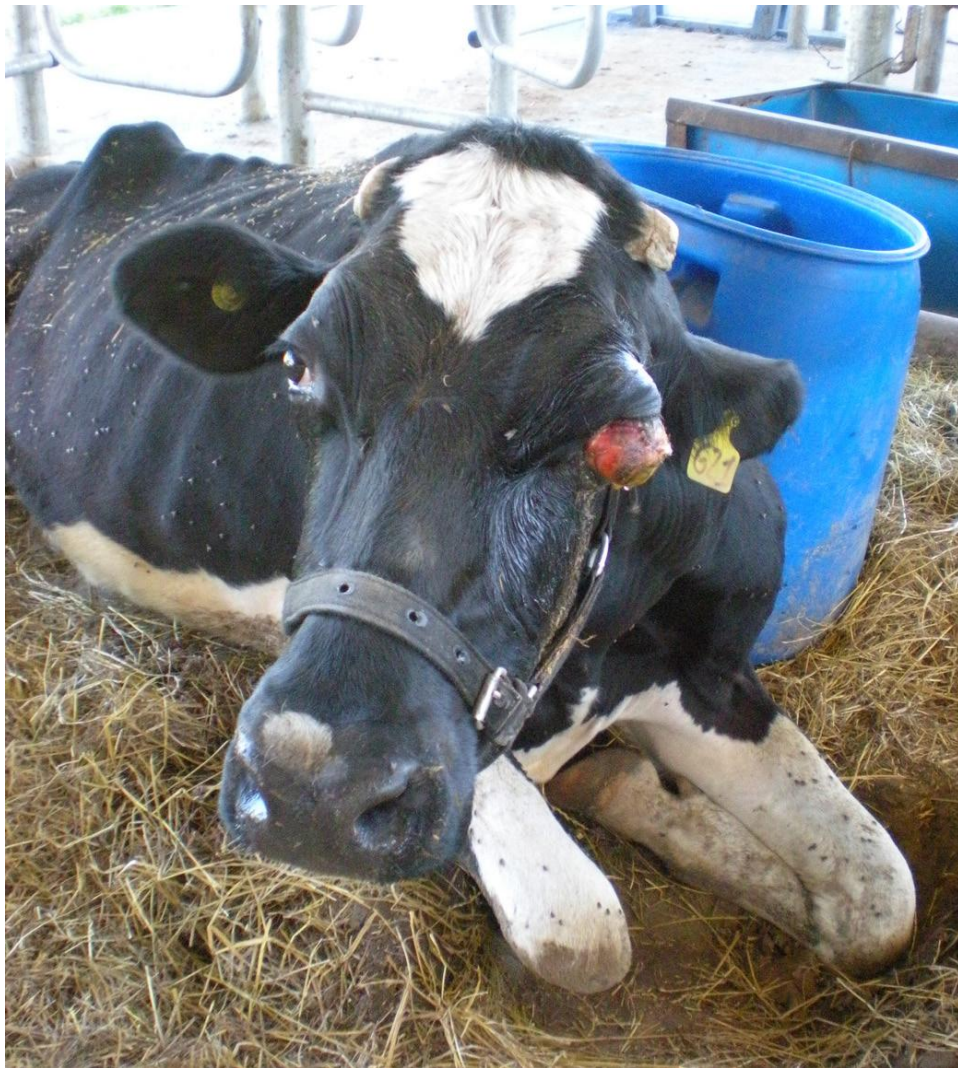


Fig.1. Marcada protrusão unilateral do globo ocular em um bovino com linfoma. Além da exoftalmia, esse bovino também demonstra mal estado corporal.

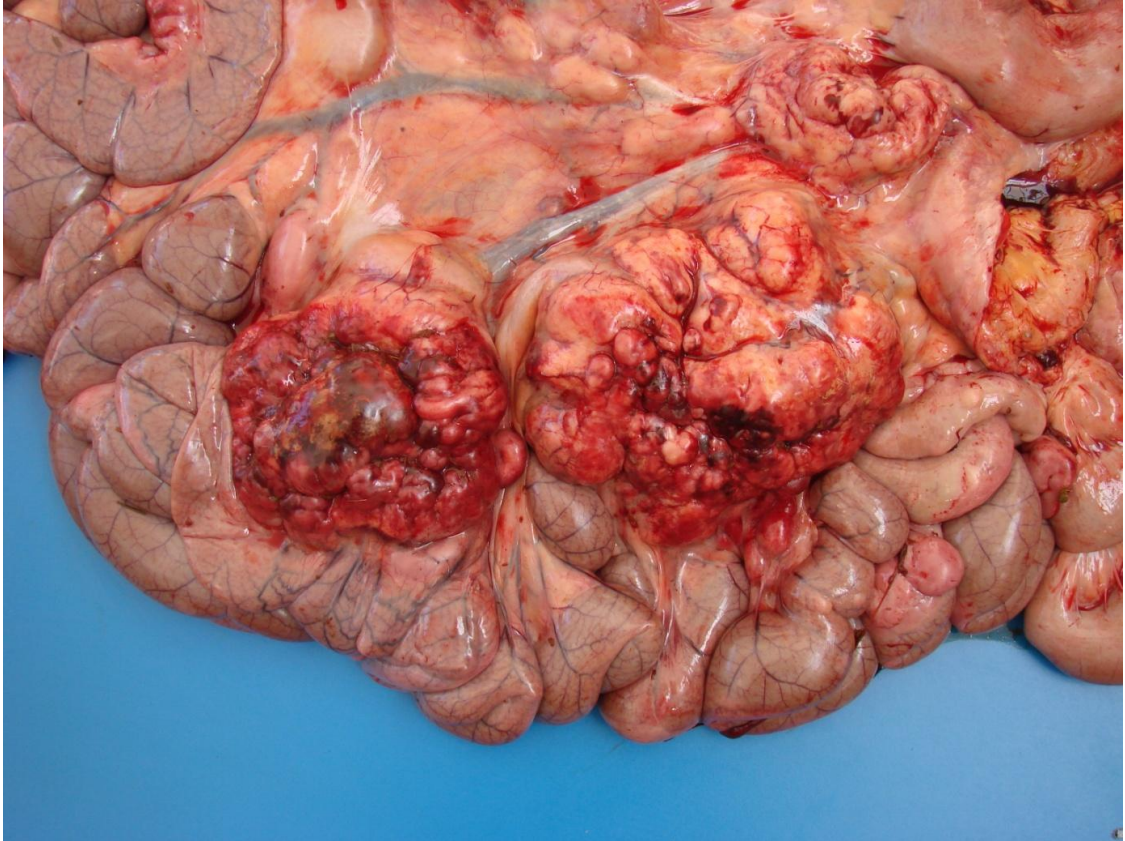


Fig.2. Acentuado aumento de volume da cadeia linfática mesentérica em um bovino com linfoma.

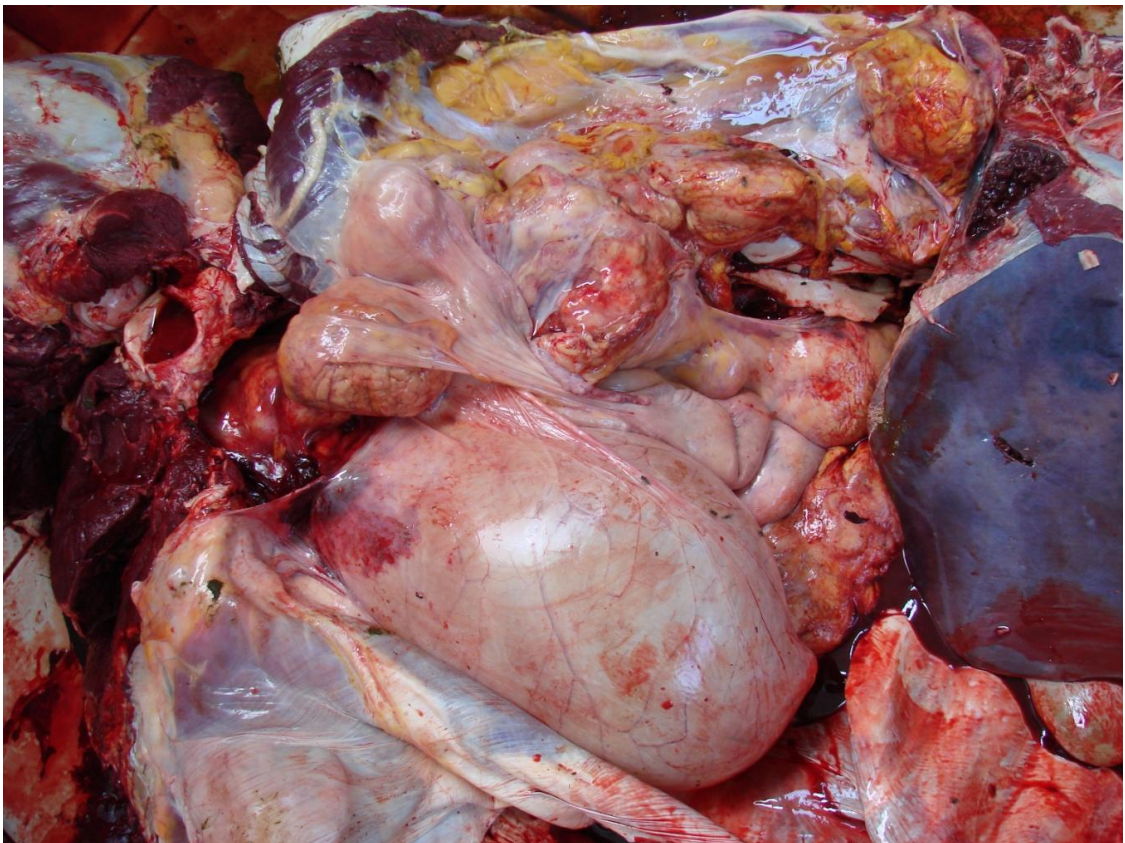


Fig.3. Múltiplas massas tumorais que ocupam a entrada da cavidade pélvica em um bovino com linfoma. Essas massas com frequência são perceptíveis pela palpação retal.



Fig.4. Linfadenomegalia retrobulbar em um bovino com linfoma. Observe que o linfonodo afetado tem basicamente o mesmo volume do globo ocular.

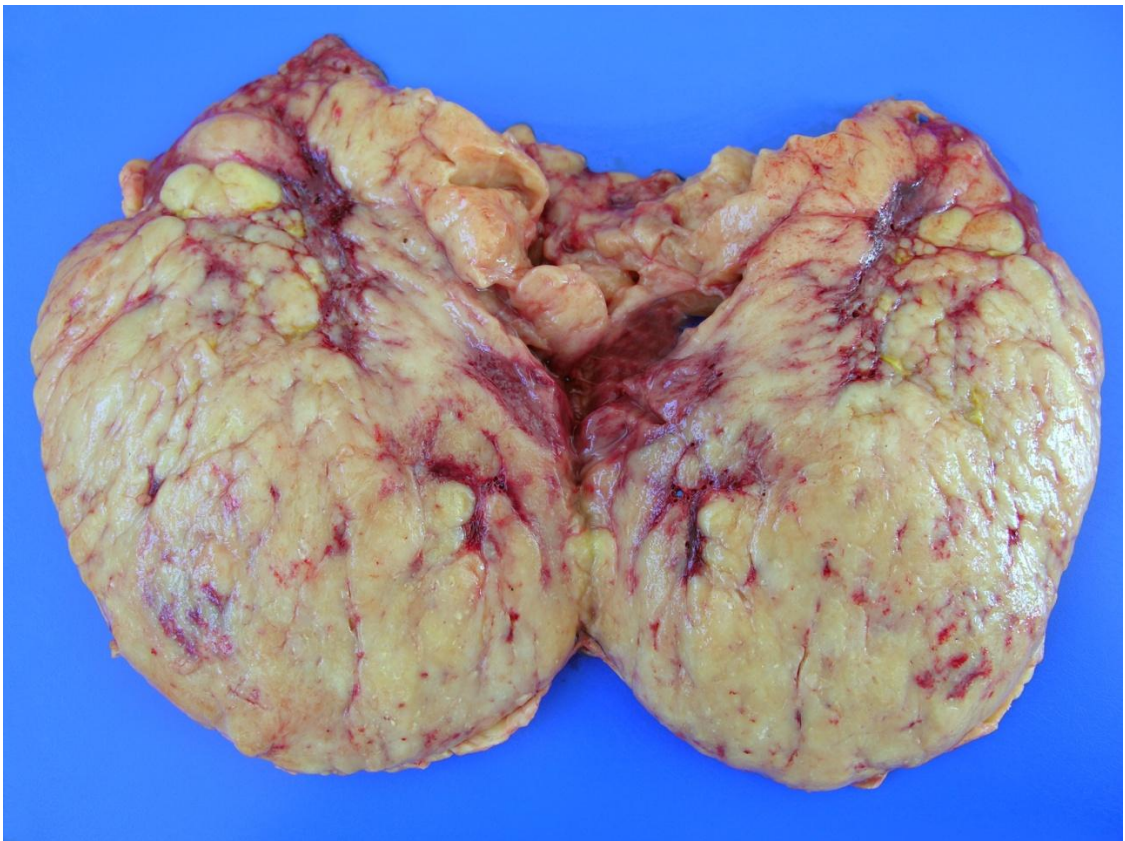


Fig.5. Obliteração completa do parênquima nodal que não permite a delimitação córtico-medular em um bovino com linfoma. Esse aspecto da superfície de corte dos linfonodos é característico.



Fig.6. Nódulos e massas branco-amareladas de diferentes tamanhos e que se projetam para o interior da câmara cardíaca (átrio direito) em um bovino com linfoma. Esse padrão botrioide é o mais comumente observado em bovinos com linfoma cardíaco.

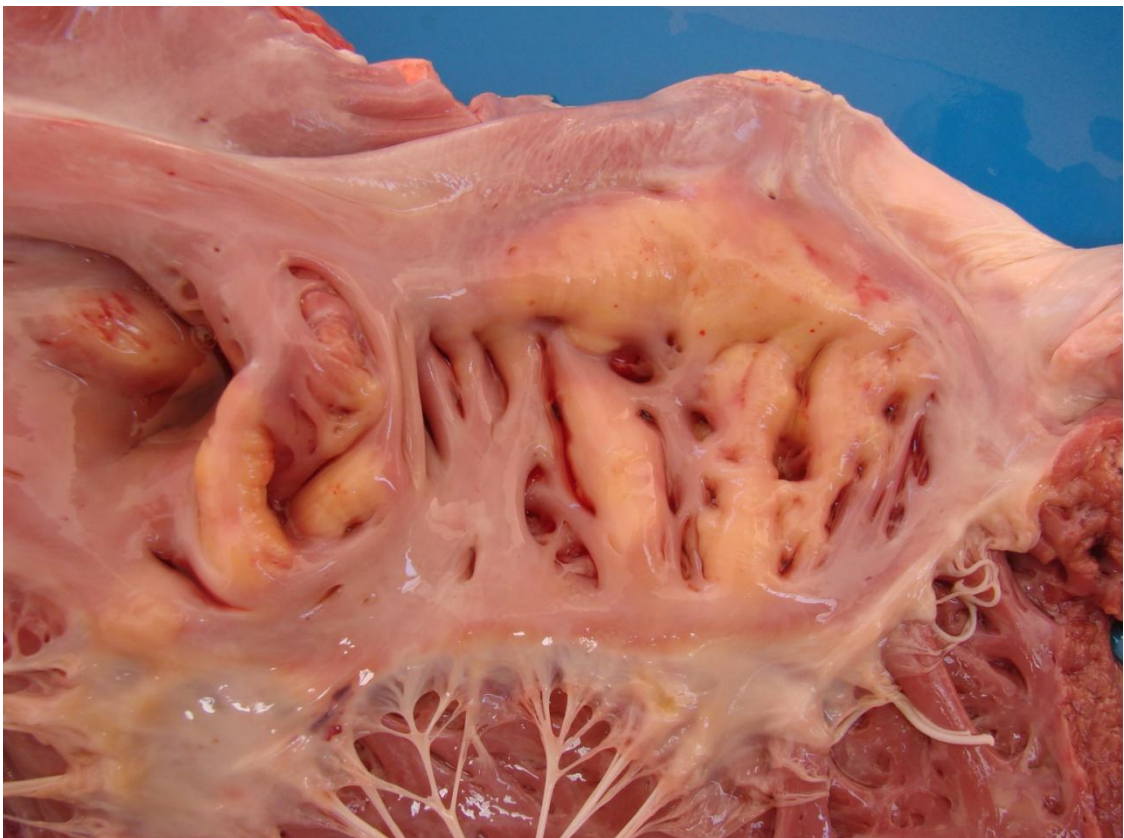


Fig.7. Espessamento transmural do átrio direito em um bovino com linfoma. Nessa forma de apresentação, massas e nódulos não ocorrem.

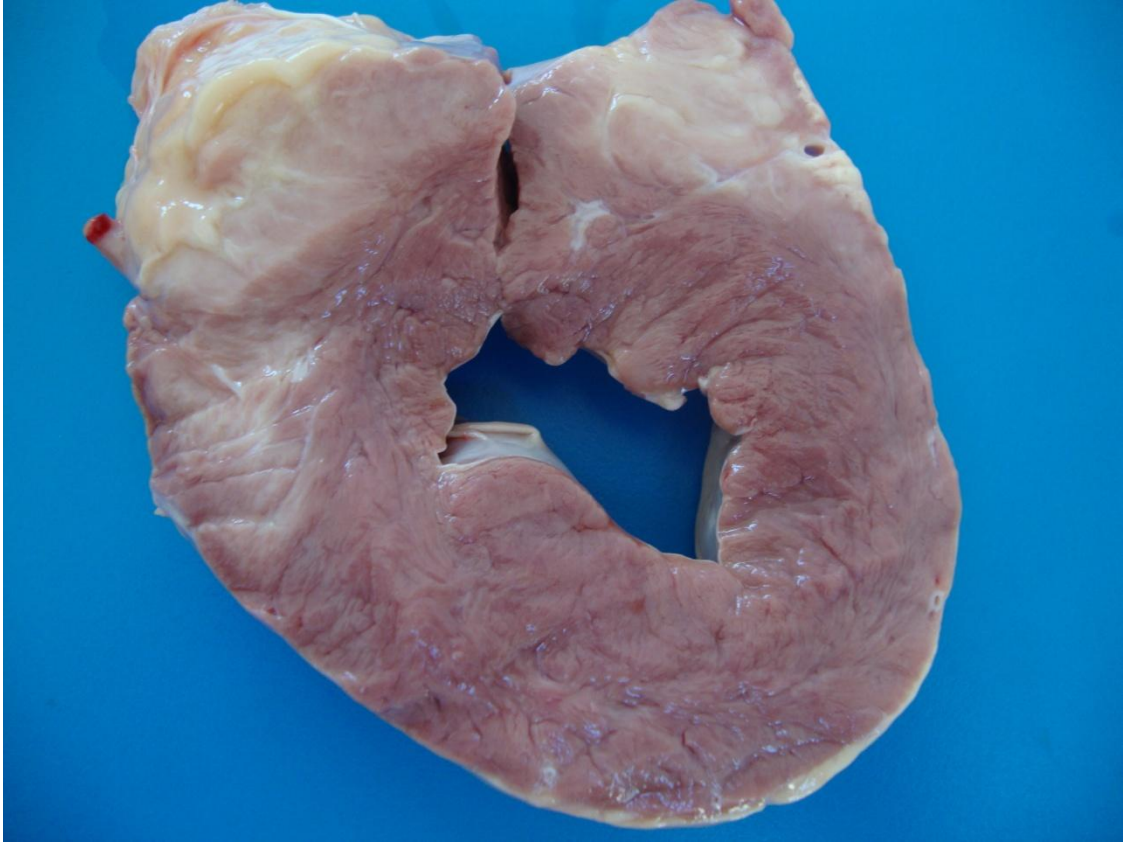


Fig.8. Áreas brancacentas na superfície de corte do coração de um bovino com linfoma. Esse é um exemplo dos casos em que a lesão é vista apenas na superfície de corte do órgão.

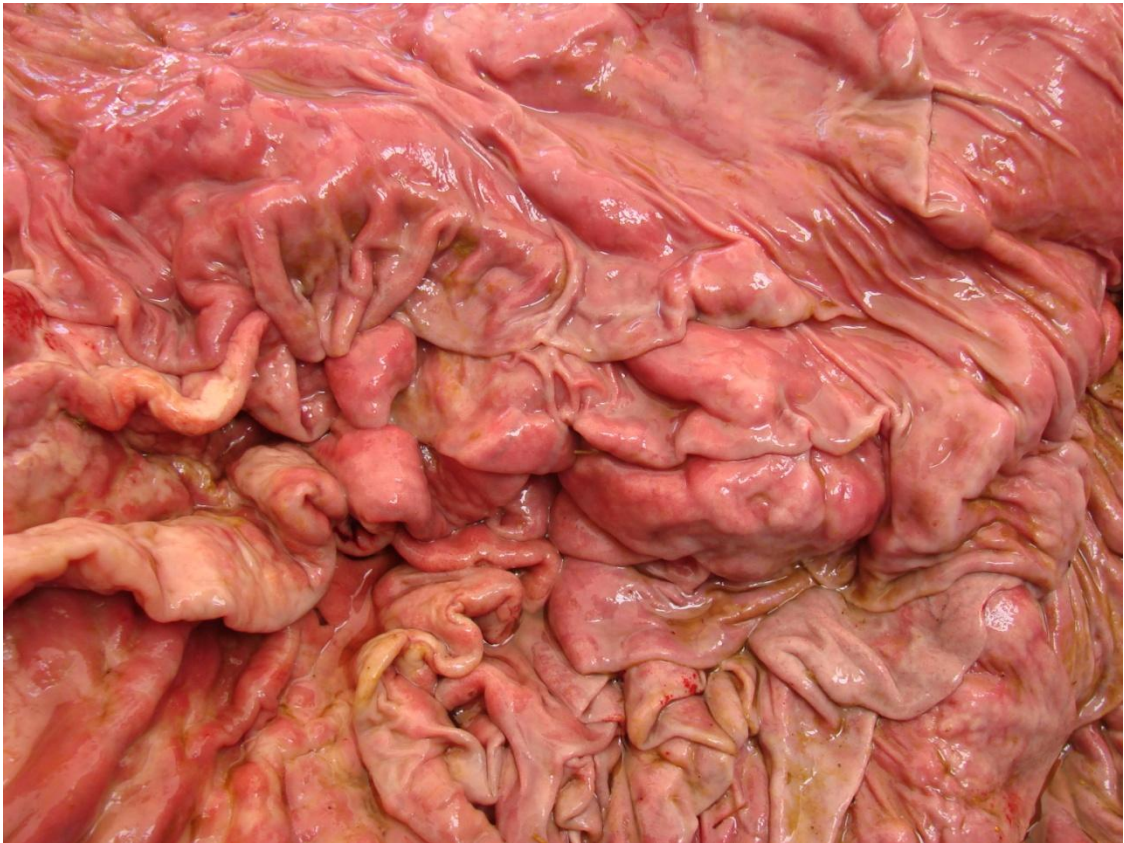


Fig.9. Marcado espessamento das pregas do abomaso em um bovino com linfoma.



Fig.10. Superfície de corte do abomaso do bovino da Figura 9. Observe o marcado espessamento da parede do abomaso por um tecido homoganeamente brancacento.

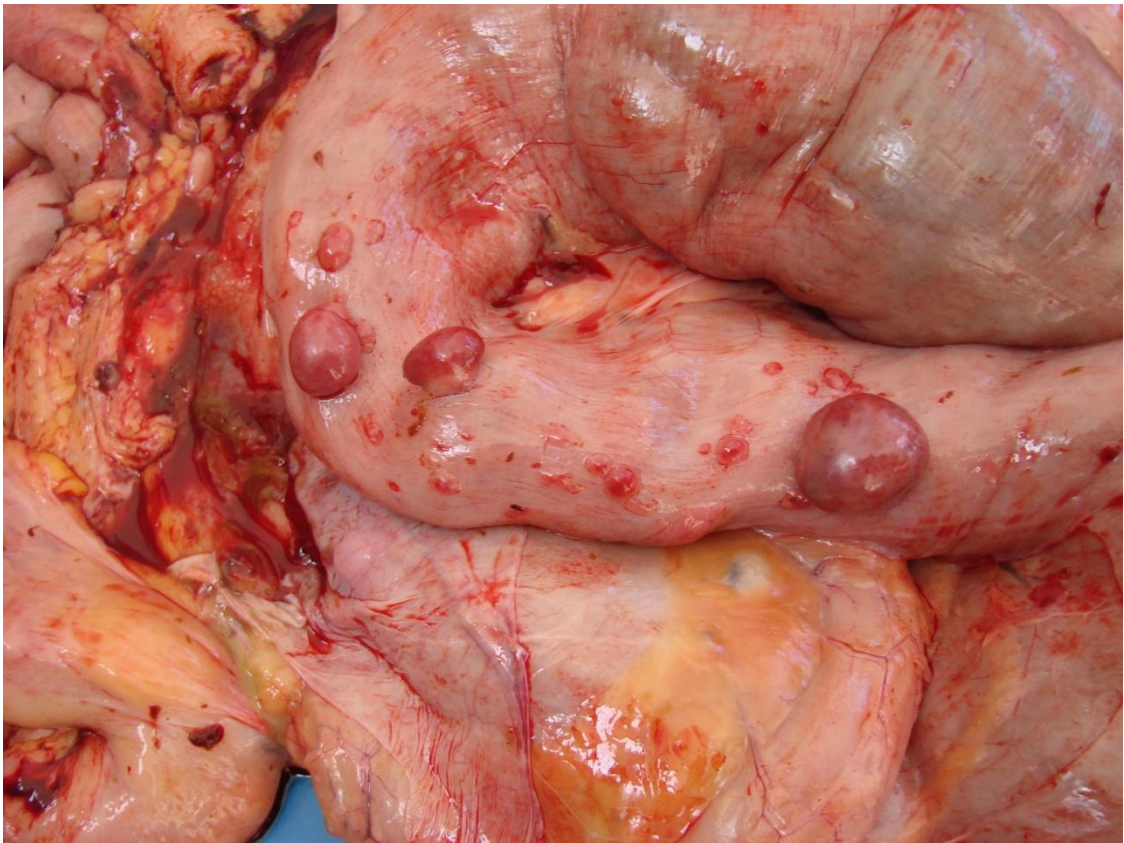


Fig.11. Múltiplos nódulos hemisféricos e avermelhados que se projetam através da serosa do cólon em um bovino com linfoma.



Fig.12. Nódulo solitário na entrada do duodeno em um bovino com linfoma.



Fig.13. Rim difusamente infiltrado por linfócitos neoplásicos em um bovino com linfoma. Esse padrão difuso de infiltração renal é visto apenas como um esmaecimento da coloração, apesar da manutenção da forma.



Fig.14. Massa tumoral no interior do canal vertebral em um bovino com linfoma. Note a compressão medular exercida pela proliferação neoplásica.

3. ARTIGO 2

Classificação de 86 casos de linfoma em bovinos usando os sistemas *Working Formulation (WF) of Non-Hodgkin's Lymphomas for Clinical Usage* e a *Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms (REAL)*

Welden Panziera, Ronaldo M. Bianchi, Tatiane C. Faccin, Glauco J.N. Galiza, Érika M.B. Lopes, Glaucia D. Kommers e Rafael A. Fighera

2º. TRABALHO

(A ser submetido à revista *Pesquisa Veterinária Brasileira*)

Classificação de 86 casos de linfoma em bovinos de acordo com a *Working Formulation (WF) of Non-Hodgkin's Lymphomas for Clinical Usage* e a *Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms (REAL)*¹

Welden Panziera², Ronaldo M. Bianchi², Tatiane C. Faccin², Glauco J.N. Galiza³, Érika M.B. Lopes⁴, Glaucia D. Kommers⁵ e Rafael A. Fighera^{5*}

ABSTRACT.- [Classification of 86 bovine lymphomas cases according to the *Working Formulation (WF) of Non-Hodgkin's Lymphomas for Clinical Usage* and *The Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms (REAL)*.]

Classificação de 86 casos de linfoma em bovinos de acordo com a *Working Formulation (WF) of Non-Hodgkin's Lymphomas for Clinical Usage* e a *Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms (REAL)*. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(00)00-00. Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: anemiaveterinaria@yahoo.com.br

A retrospective study of 86 cases of bovine lymphoma classified as with diffuse pattern of distribution and verified by phenotypic (histology) and immunophenotypic (immunohistochemistry [IHC]) is presented. Regarding the size of the neoplastic lymphocytes, 83.8% was classified as large cells lymphoma and 11.6% as small cells lymphoma. Mixed lymphomas, i.e., formed by large and small cells simultaneously represented only 4.6% of all cases. Regarding their mitotic index, 84.9% of lymphomas was included in the intermediate-grade, 10.5% as low-grade and 4.6% as high-grade. Regarding the nucleus morphology, lymphomas with mostly non-cleaved cells (58.2%) or cleaved cells (37.2%) were the more frequent than those with a balanced mixed proportion of cleaved and non-cleaved cells (4.6%). Based on these results, the 86 lymphoma cases were classified by the *Working Formulation (WF) of Non-Hodgkin's Lymphomas for Clinical Usage* as: diffuse large non-cleaved cell (46.5%), diffuse large cleaved cell (33.7%), diffuse mixed small and large cell (4.6%), diffuse small cell –

¹ Recebido em XX de xxxxxx de 2015

Aceito para publicação em.....

Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor.

² Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia e Patologia Clínica, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Bairro Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil.

³ Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Cuiabá (UNIC), Cuiabá, MT 78065-480, Brasil.

⁴ Curso de Medicina Veterinária, CCR-UFSM, Santa Maria, RS. Bolsista PIBIC/CNPq/UFSM.

⁵ Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, UFSM, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900. *Autor para correspondência: anemiaveterinaria@yahoo.com.br

plasmacytoid (7%), immunoblastic (3.5%), diffuse small cell – intermediate (2.3%), diffuse small non-cleaved cell (1.2%), and diffuse small non-cleaved cell Burkitt's (1.2%). According to the IHC, 27 out of 86 (31.4%) lymphomas were positive to monoclonal antibody CD79 α , used to detect B cells, and none were positive for polyclonal antibody CD3, used to detect T cells. Based on this, the 27 B-cell type lymphomas were distributed as follows: diffuse large B-cell lymphoma (81.5%), large cell immunoblastic lymphoma (11.1%), and lymphoplasmacytoid lymphoma (7.4%), according the *Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms* (REAL). The results of this retrospective study, similar to what has been described in other parts of the world, allow us to conclude that bovine lymphomas are basically diffuse and predominantly made of intermediate-grade, large cells, with cleaved or non-cleaved nuclei. These lymphomas are due to neoplastic proliferation of B cells and correspond to almost all (92.6%) to what is currently classified as diffuse large B-cell lymphoma by REAL.

INDEX TERMS: Cattle diseases, enzootic bovine leukosis, lymphoma, lymphosarcoma, classification of lymphoid neoplasms.

RESUMO.- Por meio de um estudo retrospectivo, realizou-se avaliação fenotípica (histologia) e imunofenotípica (imuno-histoquímica [IHQ]) de 86 casos de linfoma bovino. Quanto ao padrão de distribuição, todos os linfomas foram incluídos como difusos. Em relação à dimensão dos linfócitos neoplásicos, 83,8% dos linfomas foram considerados como de grandes células e 11,6% como de pequenas células. Linfomas mistos, ou seja, constituídos por grandes e pequenas células, representaram apenas 4,6% dos casos. Quanto ao número de mitoses, 84,9% dos linfomas foram incluídos como de grau intermediário, 10,5% como de baixo grau e 4,6% como de alto grau. No que se refere à morfologia do núcleo, linfomas em que predominavam linfócitos não clivados (58,2%) ou linfócitos clivados (37,2%) foram mais frequentes do que aqueles em que havia uma mistura igualmente proporcional de linfócitos clivados e não clivados (4,6%). Com base nestes resultados, os 86 linfomas foram assim distribuídos utilizando-se a classificação proposta pela *Working Formulation (WF) of Non-Hodgkin's Lymphomas for Clinical Usage*: difuso de grandes células não clivadas (46,5%), difuso de grandes células clivadas (33,7%), difuso de pequenas e grandes células (4,6%), difuso de

pequenas células – tipo plasmocitoide (7%), imunoblástico (3,5%), difuso de pequenas células – tipo intermediário (2,3%), difuso de pequenas células não clivadas (1,2%) e difuso de pequenas células não clivadas – tipo Burkitt (1,2%). Na imuno-histoquímica, 27 dos 86 (31,4%) linfomas foram positivos para o anticorpo monoclonal CD79 α , utilizado para detecção de linfócitos B, e nenhum caso foi positivo para o anticorpo policlonal CD3, utilizado para detecção de linfócitos T. Com base nestes resultados, os 27 linfomas B foram assim distribuídos utilizando-se a *Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms* (REAL): linfoma difuso de grandes células B (81,5%), linfomas imunoblásticos de grandes células (11,1%) e linfomas linfoplasmocíticos (7,4%). Os resultados aqui apresentados permitem concluir que à semelhança do que vem sendo descrito em outras partes do mundo, os linfomas bovinos são basicamente difusos e predominantemente de grau intermediário, de grandes células, com núcleos clivados ou não clivados. Esses linfomas são decorrentes da proliferação neoplásica de linfócitos B e correspondem, em sua quase totalidade (92,6%), ao que atualmente é incluído na REAL como linfoma difuso de grandes células B.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Doenças de bovinos, leucose enzoótica bovina, linfoma, linfossarcoma, sistemas de classificação de tumores linfoides.

INTRODUÇÃO

Linfoma, também denominado linfossarcoma, é um neoplasma hematopoiético descrito em várias espécies animais e, em bovinos, dependendo da localização geográfica, é considerado o tumor mais frequentemente incriminado como causa de morte, principalmente em raças leiteiras (Jacobs et al. 2002). Os linfomas bovinos são divididos em dois grandes grupos: enzoóticos e esporádicos. Linfomas enzoóticos são causados pelo vírus da leucemia bovina (BLV, *bovine leukemia virus*) e ocorrem predominantemente em bovinos adultos, principalmente de raças leiteiras, com idades entre 5 a 8 anos. Os linfomas esporádicos não apresentam nenhuma relação com infecção pelo BLV e são subdivididos em três formas: multicêntrica (também chamado linfoma do bezerro ou juvenil), tímica (também chamado linfoma adolescente) e cutânea (Jacobs et al. 2002, Barros 2007, Fighera & Graça 2010).

Os linfomas representam um grupo heterogêneo de neoplasmas, com uma grande variedade de apresentações morfológicas, principalmente microscópica e muitas manifestações clínicas. Por essas razões, numerosas tentativas têm sido feitas na oncologia humana e veterinária para estabelecer classificações racionais para esses tumores. Devido às numerosas similaridades que existem entre os linfomas de animais e os linfomas humanos não Hodgkin (NHL), a maioria das propostas de classificação em animais foram adaptadas de esquemas consagrados em hematopatologia humana (Ioachim 1994, Parodi 2001, Jacobs et al. 2002), que incluem: método de Rappaport, sistema Kiel, classificação de Lukes-Collins, *Working Formulation (WF) of Non-Hodgkin's Lymphomas for Clinical Usage* (Exposição Sistemática dos Linfomas Não Hodgkin para Uso Clínico) e *Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms (REAL)* (Classificação Europeu-Americana Revisada dos Neoplasmas Linfoides) (Ioachim 1994, Parodi 2001, Jacobs et al. 2002, Figuera & Graça, 2010). Em medicina veterinária, todos esses sistemas foram aplicados da forma como foram desenvolvidos, e suas aplicações serviram para demonstrar um surpreendente nível de subtipos de linfomas e leucemias nos animais (Valli et al. 2002).

No Brasil, a classificação utilizada pela maioria dos patologistas veterinários baseia-se na WF. Esta classificação subdivide os linfomas de acordo com: 1) o padrão de distribuição da neoplasia, 2) o índice mitótico, 3) o tamanho das células neoplásicas e, 4) a forma do núcleo (Parodi 2001). Entretanto, atualmente, a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) para linfomas em animais já obedece às normas da REAL. Essa classificação divide os linfomas de animais em entidades agrupadas de acordo com as manifestações clinicopatológicas e com a origem dos linfócitos neoplásicos (Figuera & Graça 2010).

Devido à importância do linfoma bovino na rotina diagnóstica do Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) (Lucena et al. 2011, Panziera et al. 2014), o objetivo deste estudo foi realizar a avaliação fenotípica e imunofenotípica desses neoplasmas, através da histologia e da imuno-histoquímica (IHQ), respectivamente.

MATERIAL E MÉTODOS

Para classificação microscópica dos linfomas, foram utilizados dois sistemas reconhecidos internacionalmente: WF e REAL. No sistema de classificação da WF

(Quadro 1), os tecidos já emblocados em parafina, foram recortados e corados pela hematoxilina e eosina (HE). Os seguintes critérios classificatórios foram adotados: 1) padrão de distribuição (folicular ou difuso), 2) índice mitótico (baixo grau, alto grau ou grau intermediário), 3) dimensão das células neoplásicas (pequenas, grandes ou misto de pequenas e grandes) e 4) formato do núcleo (clivado, não clivado ou misto de clivado e não clivado). Quanto ao padrão de distribuição das células neoplásicas, os linfomas foram classificados em um de dois padrões: uma proliferação que causa obliteração completa da arquitetura normal do tecido (padrão difuso) ou uma proliferação na forma de nódulos (padrão folicular ou nodular). Quanto ao índice mitótico, foram contadas as figuras de mitoses em campo de maior aumento (1.000x) sob imersão. Realizou-se uma média da contagem de 10 campos consecutivos. Os valores de referência para o índice são os mesmos em todas as espécies animais, pois derivam de valores pré-estabelecidos para linfoma de humanos, ou seja: menor ou igual a 1 (baixo grau), de 2 a 4 (grau intermediário) e maior ou igual a 5 (alto grau). A dimensão das células neoplásicas foi determinada por comparação com o volume dos eritrócitos (5,5 μ m). Assim, os linfomas foram considerados como de pequenas células quando essas equivaliam a, no máximo, o volume de um eritrócito e meio; e de grandes células quando essas equivaliam ao volume de dois eritrócitos ou mais.

Para a realização da REAL (Quadro 2) foi utilizada a técnica de IHQ a fim de determinar a origem dos linfócitos neoplásicos presentes em tecidos embebidos em parafina, ou seja, a diferenciação entre linfócitos B e T, utilizando para isso os anticorpos anti-CD79 α y e anti-CD3, respectivamente. Realizou-se a desparafinização e reidratação dos tecidos e, para recuperação antigênica utilizou-se solução tampão de Tris-EDTA pH 9,0 no forno de micro-ondas em potência alta por 10 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio a 3% por 20 minutos. Em todos os protocolos, o bloqueio das reações inespecíficas foi realizado com caseína (leite em pó desnatado) a 5% por 30 minutos em temperatura ambiente. Como anticorpo primário utilizou-se anticorpo policlonal anti-CD3 humano e anticorpo monoclonal anti-CD79 α y humano produzidos em coelho e camundongo, respectivamente. Os anticorpos foram diluídos em solução salina tamponada com fosfato e *Tween* (PBST) na seguinte proporção: 1:400 para o anticorpo anti-CD3 e 1:200 para o anticorpo anti-CD79 α y. Após a diluição, foram incubados na estufa a 37°C por uma hora. O anticorpo secundário

(polímero)¹ foi utilizado consecutivamente, incubado em temperatura ambiente por 30 minutos e marcado através da adição do cromógeno de tetracloreto de 3-3' diaminobenzidina (DAB)² por cinco minutos. As lavagens entre as etapas da técnica foram feitas com PBST. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Harris³. Como controles positivos utilizaram-se tonsilas de bovinos. Como controle negativo utilizou-se uma secção do tecido analisado incubado apenas com PBST. Foram considerados como linfoma de células B, todos os linfomas que tiveram suas células neoplásicas imunomarcadas para CD79 α , mas não para CD3, e como linfomas de células T, todos os linfomas que tiveram suas células neoplásicas imunomarcadas para CD3, mas não para CD79 α .

RESULTADOS

Todos os 86 casos de linfomas bovinos avaliados histologicamente utilizando os critérios estabelecidos pela WF apresentaram um padrão de distribuição difuso, no qual os linfócitos neoplásicos obliteravam completamente o parênquima dos linfonodos (Figura 1) e variavelmente dos demais órgãos acometidos (Figura 2). Nesses linfonodos, não havia como distinguir córtex e medula, devido ao obscurecimento completo da estrutura nodal (“apagamento nodal”). Em relação à dimensão dos linfócitos neoplásicos, a grande maioria (72/86 [83,7%]) era de grandes células (Figura 3). Linfomas de pequenas células foram diagnosticados infreqüentemente (10/86 [11,6%]) (Figura 4). Linfomas mistos, ou seja, com proporção semelhante de pequenas e grandes células, foram ainda menos comuns (4/86 [4,6%]) (Figura 5). Quanto ao número de mitoses, a maioria dos linfomas (73/86 [84,9%]) foram incluídos como de grau intermediário. Linfomas de baixo (9/86 [10,5%]) e alto (4/86 [4,6%]) graus foram incomuns. Alguns linfomas de grau intermediário e todos os de alto grau apresentavam grande quantidade de macrófagos com citoplasma repleto de restos apoptóticos (“macrófagos com corpúsculos tingíveis”), o que dava ao tecido um padrão do tipo “céu estrelado” (Figura 6). No que se refere à morfologia do núcleo, linfomas em que predominavam linfócitos não clivados (50/86 [58,2%]) (Figura 7) ou linfócitos clivados (32/86 [37,2%]) (Figura 8) foram mais freqüentes do que aqueles em que havia uma mistura igualmente proporcional de linfócitos clivados e não clivados (4/86 [4,6%]).

¹ Easy Path EP-12-20502®, Erviegas, Rua Lacedemonia, 268, Jardim Brasil, São Paulo, SP, Brasil.

² Dako Cytomation K3468®, Dako Cytomation, 6392 Via Real, Carpinteria, CA, USA.

³ Easy Path EP-101071®, Erviegas, Rua Lacedemonia, 268, Jardim Brasil, São Paulo, SP, Brasil.

Com base nesses achados, a prevalência dos diagnósticos morfológicos utilizando a WF pode ser contemplada no Quadro 3.

Dos 86 casos de linfoma bovino em que foi realizada a técnica de imuno-histoquímica, 27 casos (31,4%) foram positivos para o anticorpo monoclonal CD79 α , utilizado para detecção de linfócitos B (Figuras 9 e 10), e nenhum caso foi positivo para o anticorpo policlonal CD3, utilizado para detecção de linfócitos T. Com base nos resultados, os 27 casos de linfomas confirmadamente reconhecidos como sendo oriundos de linfócitos B foram utilizados para classificação conforme o sistema REAL. Assim, utilizando critérios morfológicos e imuno-histoquímicos, a maior parte (22/27 [81,5%]) dos linfomas foi considerada como linfoma difuso de grandes células B (Figuras 11 e 12). Linfoma imunoblástico de grandes células (3/27 [11,1%]) (Figuras 13 e 14), outro linfoma de grandes linfócitos B, foi ocasionalmente diagnosticado, assim como linfoma linfoplasmocítico (2/27 [7,4%]) (Figuras 15 e 16).

DISCUSSÃO

Esquemas de classificação de tumores linfoides, adaptados da oncologia humana, são amplamente utilizados em medicina veterinária e suas relevâncias dependem de estudos clinicopatológicos (Ioachim 1994, Valli et al. 2002). Trabalhos envolvendo classificação desses neoplasmas são realizados principalmente utilizando pequenos animais, e estão associados com importância prognóstica. Em bovinos, estudos relacionados com classificação de linfomas são escassos, embora esse represente um dos principais tumores dessa espécie. Mais recentemente, para o diagnóstico mais acurado dos linfomas, tornou-se importante, além da classificação com base exclusivamente na morfologia, a determinação imuno-histoquímica do tipo de células (B ou T) (Jacobs et al. 2002). Assim, esses aspectos podem ser avaliados com a utilização concomitante dos sistemas de classificação da WF e REAL.

A WF foi proposta em meados da década de 1980, não como uma nova classificação, mas como um meio de traduzir os diversos sistemas em uso na época (método de Rappaport, sistema Kiel e classificação de Lukes-Collins) e com o intuito de facilitar as comparações clínicas e os tratamentos terapêuticos (Parodi 2001). Um grande estudo de classificação histológica de linfoma em bovinos realizado no Canadá (Vernau et al. 1992), demonstrou a aplicabilidade da WF nesta espécie. Nesse, quase dois terços dos tumores linfoides de bovinos adultos (possivelmente todos enzoóticos)

foram classificados como linfomas difusos de grandes células clivadas e linfomas difusos de grandes células não clivadas, ambos os tipos histológicos com prevalências equivalentes (35,5% e 30,6%, respectivamente). Utilizando o índice mitótico como um indicador do grau do tumor, estes dois padrões foram considerados pelos autores (Vernau et al. 1992) como de grau elevado. Dados semelhantes foram observados neste estudo, no qual a grande maioria dos linfomas apresentou esses mesmos padrões histológicos (33,7% e 46,5%, respectivamente), entretanto, os linfomas aqui descritos foram de grau intermediário na sua quase totalidade. Embora tenha sido observada maior prevalência de linfomas de grau intermediário, deve-se levar em consideração esse dado no estudo do comportamento dos linfomas enzoóticos. O envolvimento do vírus da leucemia bovina (BLV) na patogênese desses linfomas pode predispor esses tumores a uma alta taxa proliferativa e a uma perda do comportamento de diferenciação. Além disso, sugere-se que a perda de diferenciação seja responsável pela baixa incidência de linfoma folicular em bovinos (Vernau et al. 1992). Esses linfomas são extremamente raros na espécie bovina, o que contrasta fortemente com humanos, no qual esse neoplasma representa mais de um terço (Jacobs et al. 2002).

De maneira geral, a maioria dos linfomas em animais é de grau intermediário a alto grau e constituídos por grandes células (Jacobs et al. 2002). Em cães, diversos estudos demonstram que os linfomas de alto grau (imunoblástico, linfoblástico e difuso de pequenas células não clivadas) representam cerca de dois terços dos linfomas caninos. Os outros 20% dos linfomas nessa espécie são de grau intermediário e de grandes células não clivadas (Carter et al. 1986, Greelee et al. 1990, Teske et al. 1994, Arespachoga et al. 2007). Similar aos cães, os gatos possuem linfomas de grau predominantemente intermediário e alto. No entanto, linfomas de grandes células clivadas e linfomas imunoblásticos são bem mais frequentes do que em cães, enquanto que linfomas de grandes células não clivadas e linfomas linfoblásticos são menos prevalentes (Valli et al. 2000, Jacobs et al. 2002). Algumas semelhanças e diferenças podem ser traçadas entre os linfomas bovinos e os linfomas em pequenos animais. A principal similaridade inclui o grau desses tumores, pois assim como observado nesse estudo, tumores de baixo grau são pouco frequentes (Jacobs et al. 2002). Em relação às diferenças, a variação entre os tipos histológicos é a principal delas. Linfoma imunoblástico, por exemplo, apresentam alta prevalência em gatos e cães (aproximadamente 37% e 25%, respectivamente) quando comparados aos bovinos.

Neste estudo, por exemplo, os linfomas imunoblásticos perfizeram apenas 3,5% dos casos, ou seja, cerca de 10 e 7 vezes menos comuns do que em cães e gatos, respectivamente.

Diferenças também são observadas entre os linfomas bovinos e os linfomas de equinos e suínos. Em equinos, o linfoma difuso de pequenas e grandes células (linfoma difuso misto) representa o tipo histológico predominante, com aproximadamente 38% dos casos (Jacobs et al. 2020). Neste estudo, o mesmo padrão histológico fez apenas 4,6% dos linfomas bovinos, semelhante ao descrito por outros autores (Vernau et al. 1992, Jacobs et al. 2002). Em suínos, cerca de 60% dos linfomas são incluídos no tipo difuso de grandes células não clivadas. Entretanto, a grande diferença da espécie suína com a bovina e com as outras espécies, está na ocorrência de linfomas tipo Burkitt. Em um estudo envolvendo 36 suínos com linfoma, 16 casos foram classificados como tipo Burkitt (Hayashi et al. 1988). Linfomas tipo Burkitt são infrequentes ou raros em bovinos e nos demais animais domésticos (Jacobs et al. 2002). Dado semelhante foi observado neste estudo.

A maior prevalência de alguns tipos histológicos em determinadas espécies, pode ser correlacionada com as etiologias dos linfomas. Essa relação pode ser melhor observada em bovinos e felinos, espécies que possuem etiologias virais estabelecidas no desenvolvimento desses tumores. Essa associação entre a etiologia e o padrão histológico representa uma aplicabilidade prática que auxilia no momento do diagnóstico histológico do linfoma. No caso dos linfomas bovinos, a localização dos tumores e a epidemiologia, associado ao tipo histológico, permite a classificação do neoplasma em enzoótico ou esporádico. Esses aspectos são importantes na rotina anatomopatológica, principalmente quando técnicas adicionais não estão disponíveis. Outra aplicabilidade dos sistemas de classificação, particularmente da WF, é em relação ao uso de protocolos quimioterápicos em pequenos animais. A maioria dos estudos demonstra que tumores de alto grau respondem melhor a quimioterapia do que tumores de baixo grau, entretanto, cães com tumores de baixo grau podem ter a doença de progressão bem mais lenta e viver um tempo relativamente longo sem um tratamento agressivo (Gray et al. 1984, Teske et al. 1994, Kiupel et al. 1999).

Um aumento na sofisticação das análises citogenéticas e imuno-histoquímicas dos linfomas em medicina veterinária, associada a uma crescente disponibilidade de marcadores imunológicos, resultou, nos últimos anos, na implementação do sistema

REAL para animais. Esse esquema fornece uma extensa subdivisão dos linfomas e baseia-se principalmente na interação da morfologia e com o imunofenótipo (Parodi 2001, Valli et al. 2002, Figuera & Graça 2010). Com base nessa revisão, os tumores linfoides (linfomas e as leucemias linfoides) são classificados em quatro grandes grupos: neoplasias de células B precursoras, neoplasias de células T precursoras, neoplasias de células B maduras e neoplasias de células T maduras e células nulas (Valli et al. 2002). Neste estudo, assim como é descrito na literatura (Valli et al. 2002, Valli 2007), linfoma difuso de grandes células B, representou o linfoma bovino mais prevalente de todos, perfazendo cerca de 80% dos casos. Linfomas de grandes células, presuntivamente do tipo de células B, são os tumores de maior ocorrência em bovinos, felinos, equinos e suínos (Valli et al. 2002). Dois terços dos linfomas em bovinos são do tipo de grandes células B, sendo que aproximadamente metade dos quais estão associados com a infecção pelo BLV e tendem a ter maior variação na forma nuclear, mais comumente relacionada a dobras nucleares em formato de entrâncias, ou seja, correspondem aos linfomas difusos de grandes células clivadas da WF (Valli 2007).

Analisando o conjunto dos dados obtidos, principalmente aqueles relacionados com os tipos histológicos encontrados na WF, pode-se inferir através da IHQ uma maior prevalência de linfomas B. Do total de amostras analisadas, aproximadamente um terço (31,4%) puderam ser confirmadas através dessa técnica como linfomas que se originaram dessas células. Vários fatores podem ter contribuído para a ausência de imunomarcagem nos cerca de dois terços restantes dos casos (68,6%). Dentre eles devem ser considerados, por exemplo, o tempo de fixação em formol. As amostras foram remetidas ao longo de cerca de 50 anos, sendo que vários cuidados relativos ao tempo de fixação ideal para IHQ possivelmente não foram tomados nas primeiras décadas. Adicionalmente, mesmo em casos mais recentes, muitas amostras foram remetidas fixadas em formol por tempo indeterminado. Sabe-se que a imunomarcagem, mesmo após a aplicação de métodos de recuperação antigênica, pode ficar muito comprometida pela fixação prolongada em formol. Outro fator observado foi a autólise de algumas amostras, que não interferiu criticamente na interpretação das características histológicas, mas resultou em imunomarcagem negativa de alguns casos (Ramos-Vara 2005, Ramos-Vara & Miller 2013).

CONCLUSÕES

Os resultados aqui apresentados permitem concluir que à semelhança do é descrito em outras partes do mundo, os linfomas bovinos são basicamente difusos e predominantemente de grau intermediário, de grandes células, com núcleos clivados ou não clivados. Esses linfomas são decorrentes da proliferação neoplásica de linfócitos B e correspondem, em sua quase totalidade, ao que atualmente é classificado no sistema REAL como linfoma difuso de grandes células B.

REFERÊNCIAS

- Arespachoga A.G., Schwendenwein I. & Weissenböck H. 2007. Retrospective study of 82 cases of canine lymphoma in Austria based on the Working Formulation and Immunophenotyping. *J. Comp. Path.* 136:186-192.
- Barros C.S.L. 2007. Leucose bovina, p.159-169. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R. (Eds), *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. Vol.1. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria. 694p.
- Carter R.F., Valli V.E.O. & Lumsden J.H. 1986. The cytology, histology and prevalence of cell types in canine lymphoma classified according to the National Cancer Institute Working Formulation. *Can. J. Vet. Res.* 50:154-164.
- Figuera R.A. & Graça D.L. 2010. Sistema hematopoiético, p.337-422. In: Santos R.L. & Alessi A.C. (Eds), *Patologia Veterinária*. Roca, São Paulo. 892p.
- Gray K.N., Raulston G.L., Gleiser C.A. & Jardine J.H. 1984. Histologic classification as an indication of therapeutic response in malignant lymphoma of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 184:814-817.
- Greenlee P.G., Filippa D.A., Quimby F.W., Patnaik A.K., Calvano S.E., Matus R.E., Kimmel M. Hurvitz A.I. & Lieberman P.H. 1990. Lymphomas in Dogs: a morphologic, immunologic, and clinical study. *Cancer* 66:480-490.
- Hayashi M., Tsuda H., Okumura M., Sakata T., Ito N. & Suchit T. 1988. Histopathological classification of malignant lymphomas in slaughtered swine. *J. Comp. Path.* 98:11-21.
- Ioachim H.L. 1994. NonHodgkin Lymphoma, p.337-490. In: *Ibid.* (Ed.), *Lympho Node Pathology*. 2th ed. J.B. Lippincott Company, Philadelphia. 707p.
- Jacobs R.M., Messick J.B. & Valli V.E. 2002. Tumors of the hemolymphatic system, p.119-198. In: Meuten D.J. (Ed.), *Tumors in Domestic Animals*. 4th ed. Iowa State Press, Ames. 788p.

- Kiupel M., Teske E. & Bostock D. 1999. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Vet. Pathol.* 36:292–300.
- Lucena R.B., Rissi D.R., Kommers G.D., Pierezan F., Oliveira-Filho J.C., Macêdo J.T.S.A., Flores M.M. & Barros C.S.L. 2011. A retrospective study of 586 tumours in Brazilian cattle. *J. Comp. Pathol.* 145:20-24.
- Panziera W., Bianchi R.M., Galiza G.J.N., Pereira P.R., Mazaro R.D., Barros C.S.L., Kommers G.D., Irigoyen L.F. & Figuera R.A. 2014. Aspectos epidemiológicos, clínicos e anatomopatológicos do linfoma em bovinos: 128 casos (1965-2013). *Pesq. Vet. Bras.* 34(9):856-864.
- Parodi A.L. 2001. Classification of malignant lymphoma in domestic animals: history and conceptual evolution. *European J. Vet. Path.* 7:43-50.
- Ramos-Vara J.A. 2005. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet. Pathol.* 42:405–426.
- Ramos-Vara J.A & Miller M.A. 2013. When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry—the red, brown, and blue technique. *Vet. Pathol.* 0:1-46.
- Teske E., Wisman P., Moore P.F. & van Heerde P. 1994. Histological classification and immunophenotyping of canine Non-Hodgkin's lymphoma. Unexpected high frequency of T-cell lymphomas with B-cell morphology. *Exp. Hematol.* 22:1179–1187.
- Valli V.E., Jacobs R.M., Norris A., Couto C.G., Morrison W.B., McCaw D., Cotter S., Ogilvie G. & Moore A. 2000. The histologic classification of 602 cases of feline lymphoproliferative disease using the National Cancer Institute Working Formulation. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12:295–306.
- Valli V.E.O., Jacobs R.M., Parodi A.L., Vernau W. & Moore P.F. 2002. Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals. Armed Forces Institute of Pathology American Registry of Pathology, Washington. V.8, Second Series, 190p.
- Valli V.E.O. 2007. Hematopoietic system, p.107-324. In: Maxie M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Vol.3. 5th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia. 737p.
- Vernau W., Valli V.E.O., Dukes T.W., Jacobs R.M., Shoukri M. & Heeney J.L. 1992. 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.

Quadro 1. Sistema de classificação através da *Working Formulation (WF) of Non-Hodgkin's Lymphomas for Clinical Usage* (Adaptado de Ioachim 1994)

Baixo Grau	Difuso de pequenas células não clivadas Difuso de pequenas células não clivadas – tipo plasmocitoide Difuso de pequenas células não clivadas – tipo intermediário Folicular de pequenas células Folicular de pequenas e grandes células (misto)
Grau Intermediário	Folicular de grandes células Difuso de pequenas células clivadas Difuso de grandes células não clivadas Difuso de grandes células clivadas Difuso de pequenas e grandes células (misto)
Alto Grau	Imunoblástico Linfoblástico Difuso de pequenas células não clivadas Difuso de pequenas células não clivadas – tipo Burkitt

Quadro 2. Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms (REAL) (Adaptado de Valli et al. 2002)

Neoplasias de células B precursoras	Linfoma linfoblástico de células B
Neoplasias de células T precursoras	Linfoma linfoblástico de células T
Neoplasias de células B maduras	Linfoma linfocítico crônico de células B Linfoma linfocítico de células B – tipo intermediário Linfoma linfoplasmocítico Linfomas foliculares Linfoma centrofolicular (graus I, II e III) Linfoma de células do manto Linfoma da zona marginal nodal Linfoma da zona marginal esplênico Linfoma da zona marginal extranodal Linfoma de grandes células B Linfoma de células B rico em células T Linfoma imunoblástico de grandes células Linfoma difuso de grandes células B Linfoma tímico de célula B Linfoma intravascular de grandes células B Linfoma tipo Burkitt Linfoma semelhante ao tipo Burkitt
Neoplasias de células T maduras e de células nulas	Linfoma de grandes linfócitos T granulares Linfomas cutâneos de células T Linfoma cutâneo não epiteliotrópico Linfomas cutâneos epiteliotrópicos Tipo micose fungoide/síndrome de Sézary Tipo reticulose pagetoide Linfoma extranodal de células T periféricas Tipo linfoide misto Tipo inflamatório misto Linfoma angioimunoblástico Linfoma angiotrópico Linfoma angiocêntrico Linfoma angioinvasivo Linfoma intestinal de células T Linfoma hepatoesplênico Linfoma anaplásico de grandes células T Linfoma semelhante ao de células T do adulto

Quadro 3. Prevalência dos 86 casos de linfomas bovinos classificados através da *Working Formulation of Non-Hodgkin's Lymphomas for Clinical Usage*

Grau	Tipo celular	Enzoótico		Esporádico		Total de casos	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Baixo	Difuso de pequenas células linfocítico-plasmocitoide	6	7,3	0	0	6	7,0
	Difuso de pequenas células linfocítico-intermediário	3	3,7	0	0	3	3,5
Intermediário	Difuso de grandes células	39	47,5	1	25	40	46,6
	Difuso de grandes células clivadas	27	32,9	2	50	29	33,7
	Difuso misto	4	4,9	0	0	4	4,6
Alto	Imunoblástico	3	3,7	0	0	3	3,5
	Pequenas células não clivado tipo Burkitt	0	0	1	25	1	1,2
Total		82	100	4	100	86	100

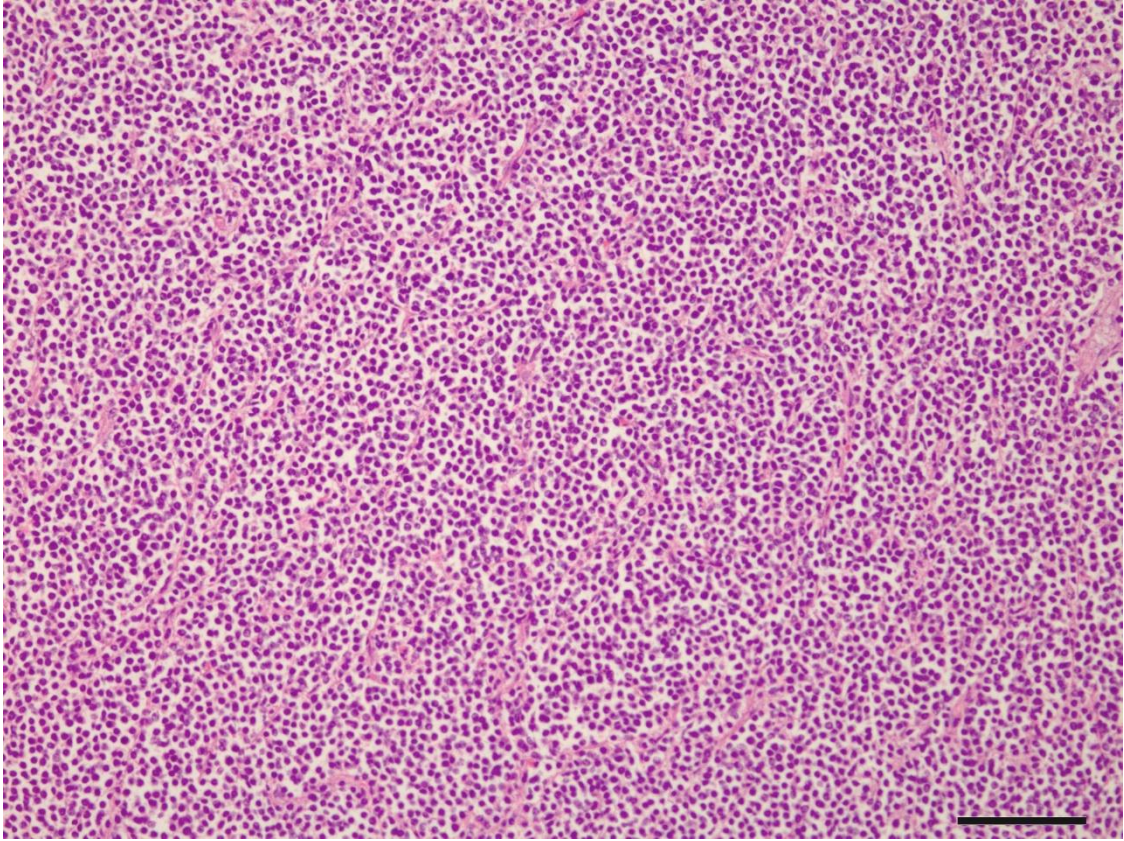


Figura 1. Obliteração completa do parênquima do linfonodo (“apagamento nodal”) de um bovino com linfoma por um manto denso de linfócitos neoplásicos (padrão difuso). HE, Obj.10x.

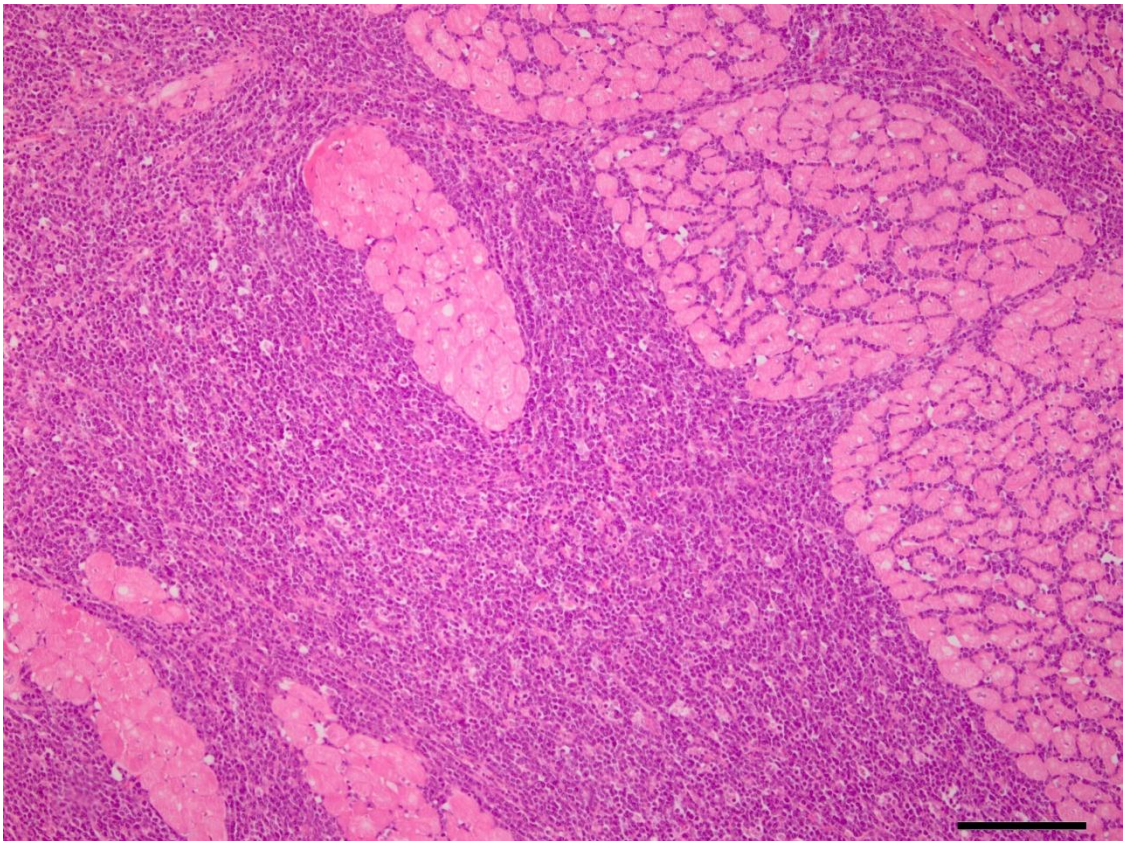


Figura 2. Proliferação neoplásica difusa no coração de um bovino com linfoma. Notem que as fibras cardíacas estão dissecadas por uma intensa população de linfócitos tumorais. HE, Obj.10x.

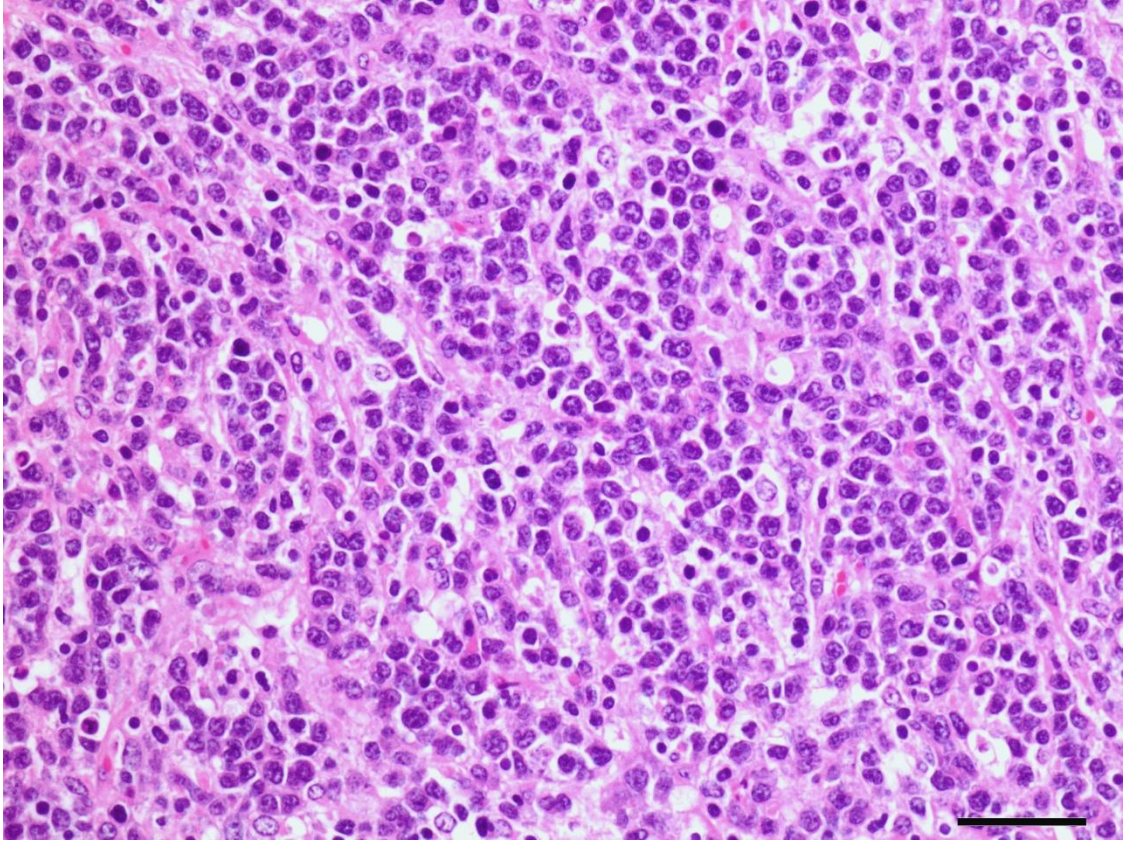


Figura 3. Proliferação difusa de grandes linfócitos (linfoma de grandes células) no linfonodo de um bovino com linfoma. A grande maioria desses linfócitos possui aproximadamente o volume de pelo menos dois eritrócitos. HE, Obj.40x.

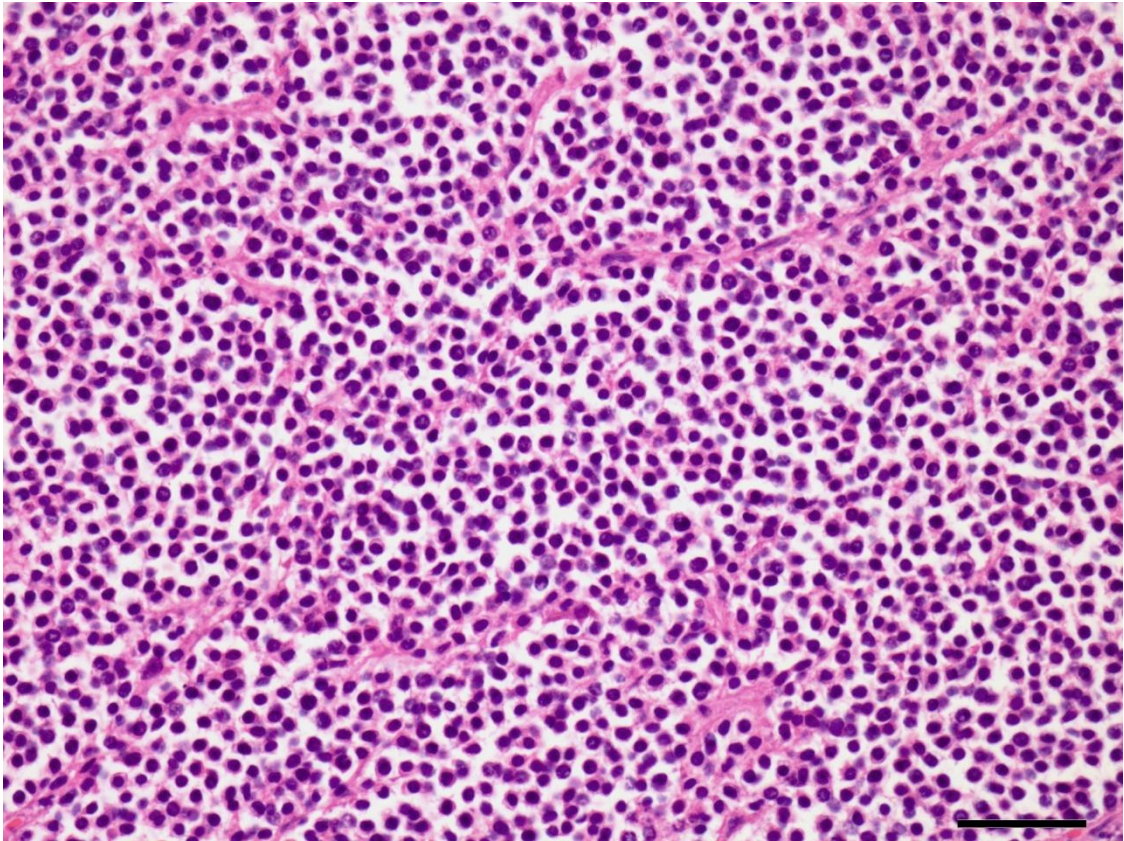


Figura 4. Proliferação difusa de pequenos linfócitos (linfoma de pequenas células) no linfonodo de um bovino com linfoma. Há uma população monomórfica de pequenas células com o núcleo formado por cromatina intensamente agregada. Notem a grande diferença de tamanho desses linfócitos quando comparados aos linfócitos da Figura 3. HE, Obj.40x.

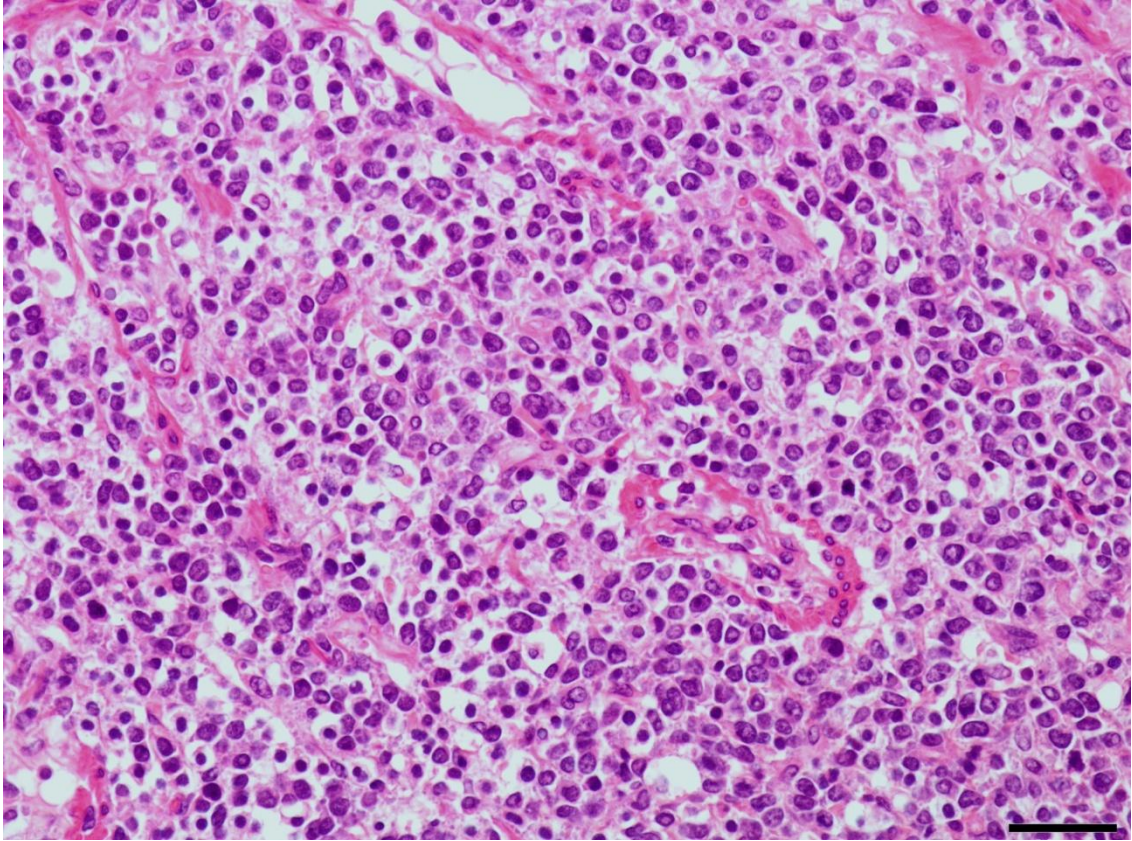


Figura 5. Proliferação difusa de pequenos e grandes linfócitos (linfoma misto) no linfonodo de um bovino com linfoma. Nesse tipo histológico há notável diferença de tamanho entre as células tumorais e perda do monomorfismo. HE, Obj.40x.

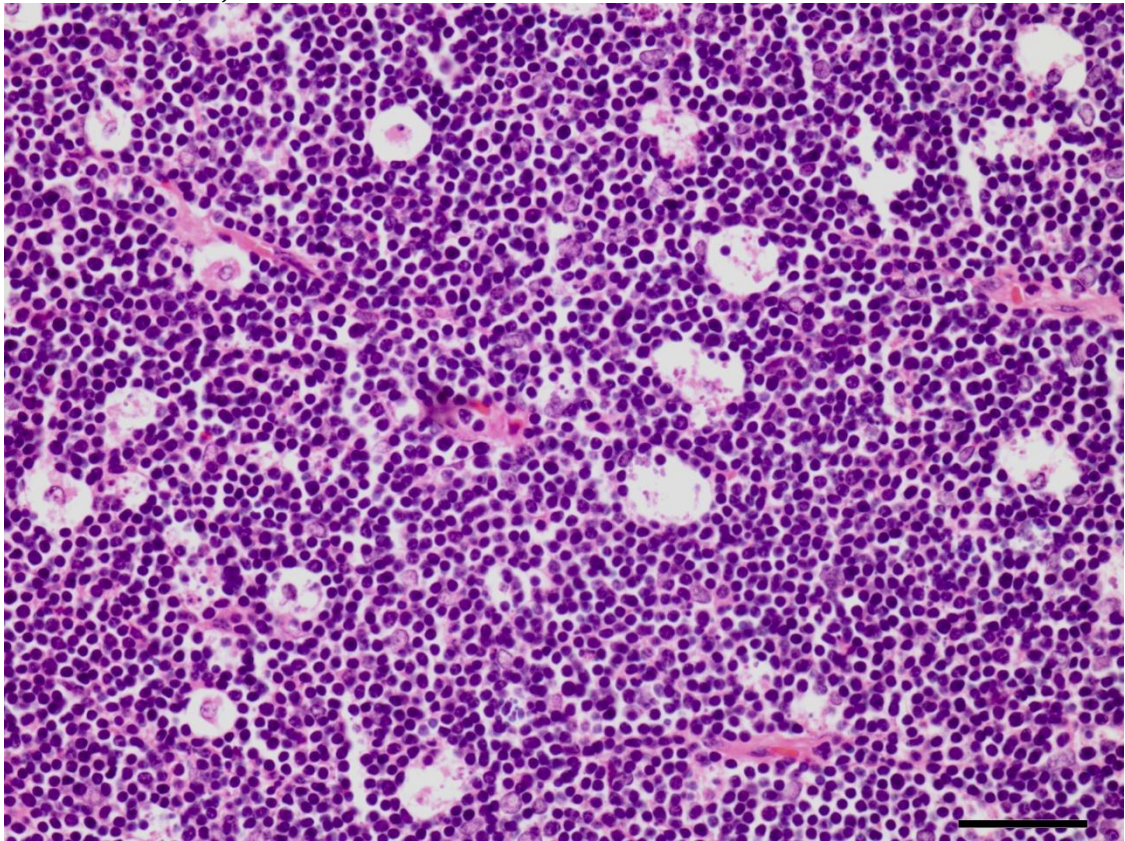


Figura 6. Proliferação difusa de linfócitos neoplásicos no linfonodo de um bovino com linfoma. Observe a grande quantidade de macrófagos com citoplasma repleto de restos apoptóticos ("macrófagos com corpúsculos tingíveis"). Esse padrão histológico é comparado a um "céu estrelado". HE, Obj.40x.

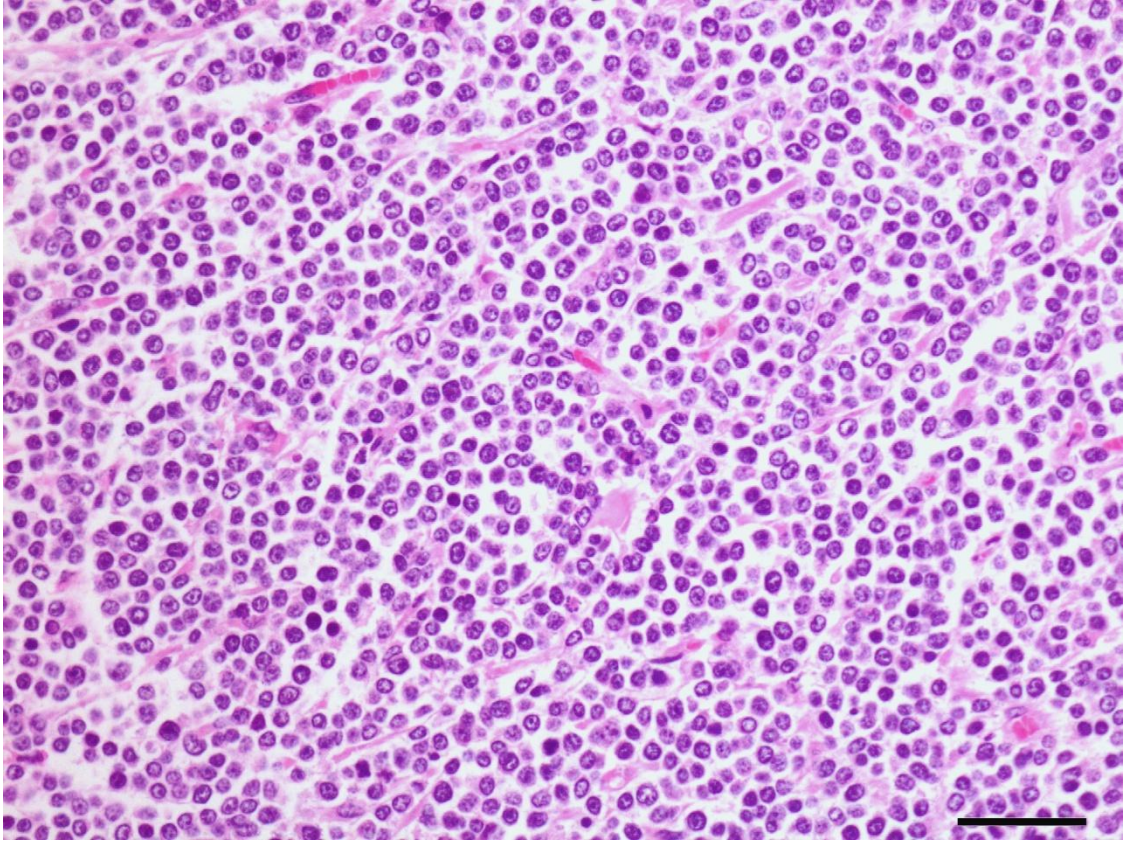


Figura 7. Proliferação difusa de linfócitos não clivados no linfonodo de um bovino com linfoma. Nesse padrão histológico, praticamente todas as células neoplásicas possuem o núcleo arredondado e sem clivagem. HE, Obj.40x.

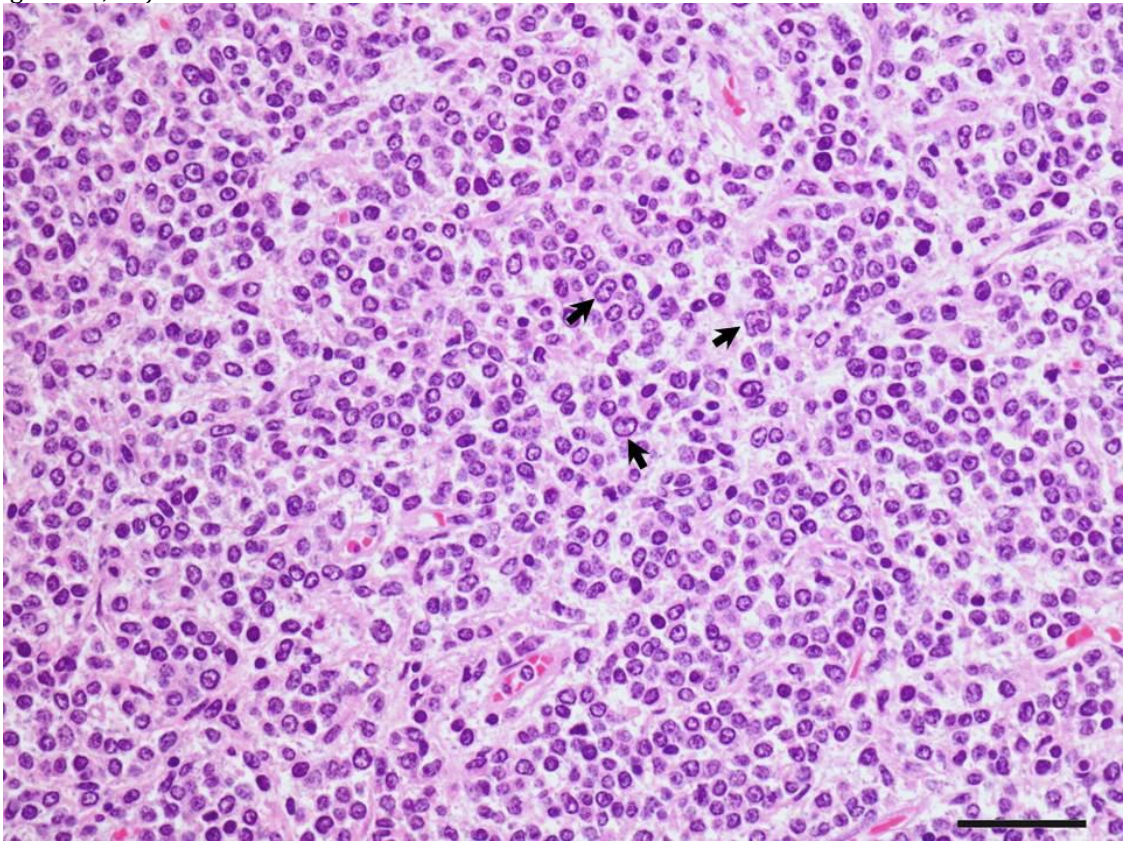


Figura 8. Proliferação difusa de linfócitos clivados no linfonodo de um bovino com linfoma. Note que uma grande quantidade de linfócitos tumorais possuem dobras nucleares em formato de entrâncias (núcleo clivado [setas]). HE, Obj.40x.



Figura 9. Linfócitos neoplásicos fortemente imunomarcados para o anticorpo monoclonal CD79 α cy no linfonodo de um bovino com linfoma. Obj.20x.

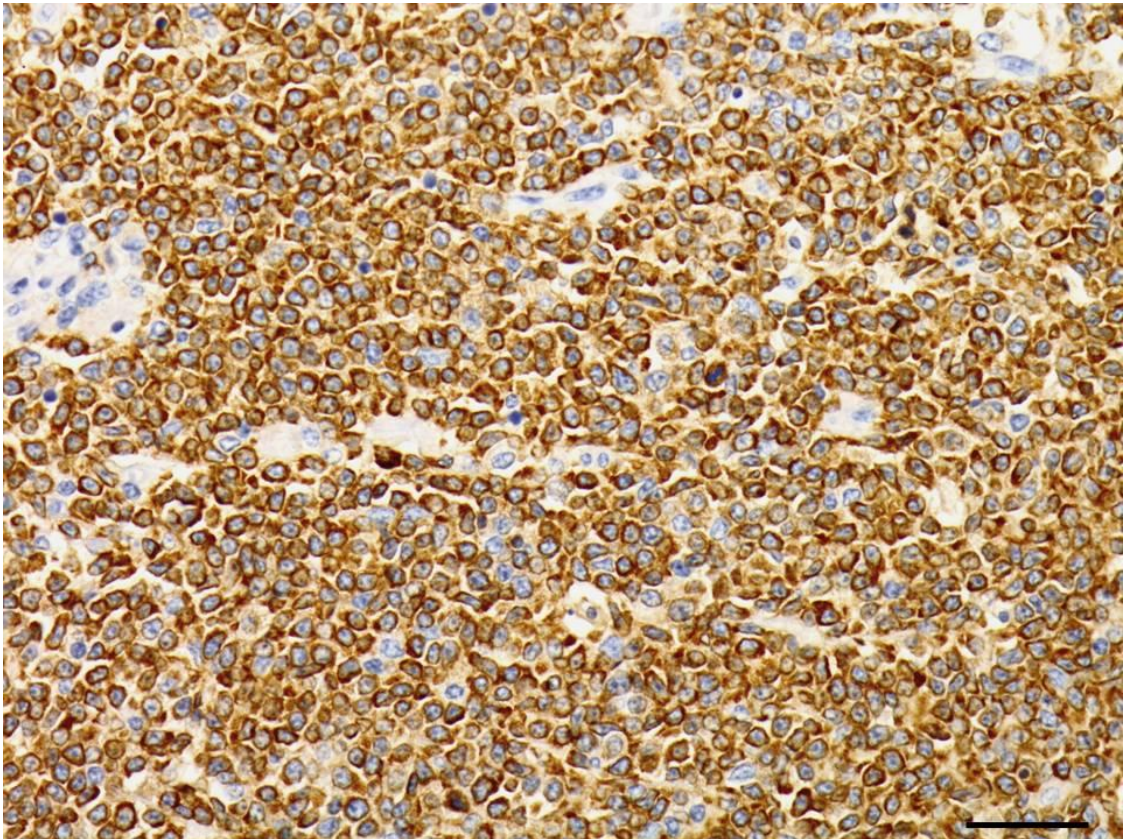


Figura 10. Maior aumento da Figura 9. Observe a marcada imunoreatividade no citoplasma dos linfócitos tumorais. Obj.40x.

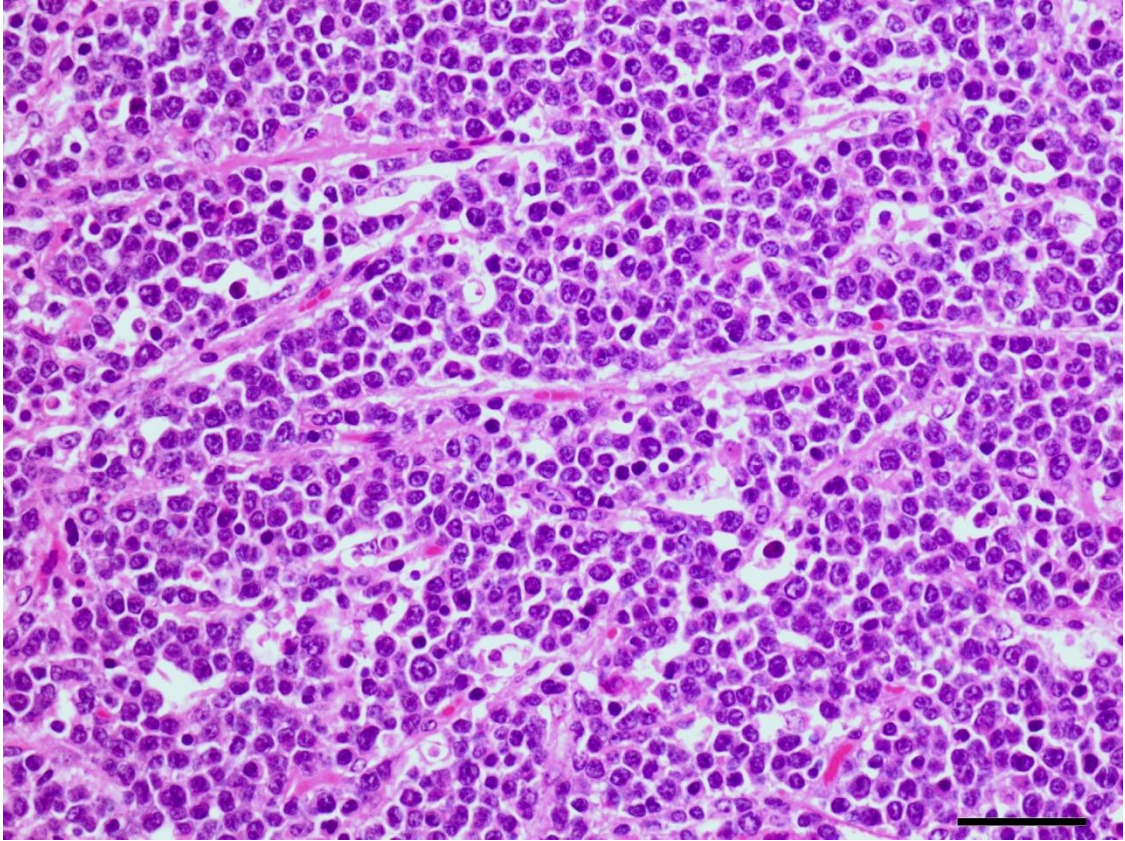


Figura 11. Linfoma difuso de grandes células B no linfonodo. Esse neoplasma é caracterizado por uma população difusa de grandes linfócitos tumorais. HE, Obj.40x.

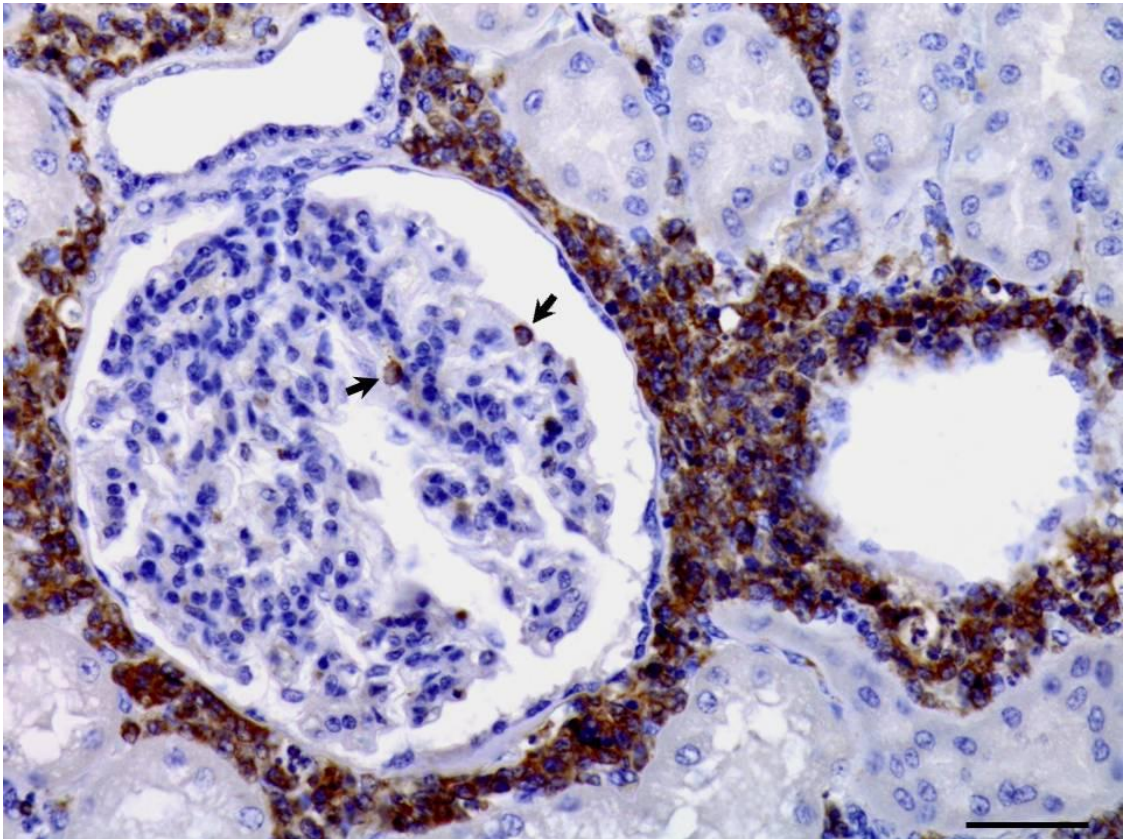


Figura 12. Imuno-histoquímica de um linfoma difuso de grandes células B no rim. Há intensa imunomarcagem dos linfócitos tumorais para o anticorpo monoclonal CD79 α cy. Note também raras células imunomarcadas no interior do glomérulo (setas). Obj.40x.

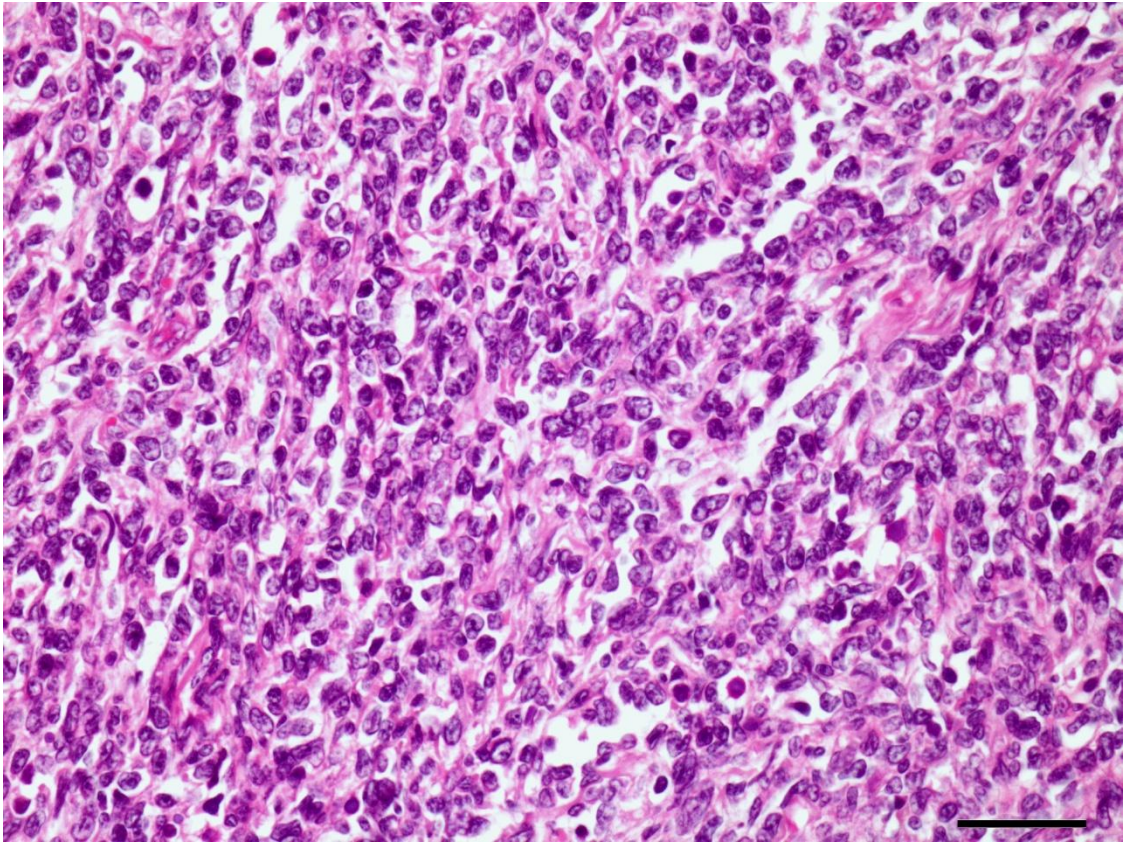


Figura 13. Linfoma imunoblástico no linfonodo. Observe que esse tipo histológico é caracterizado por uma proliferação de grandes linfócitos neoplásicos marcadamente pleomórficos. HE, Obj.40x.

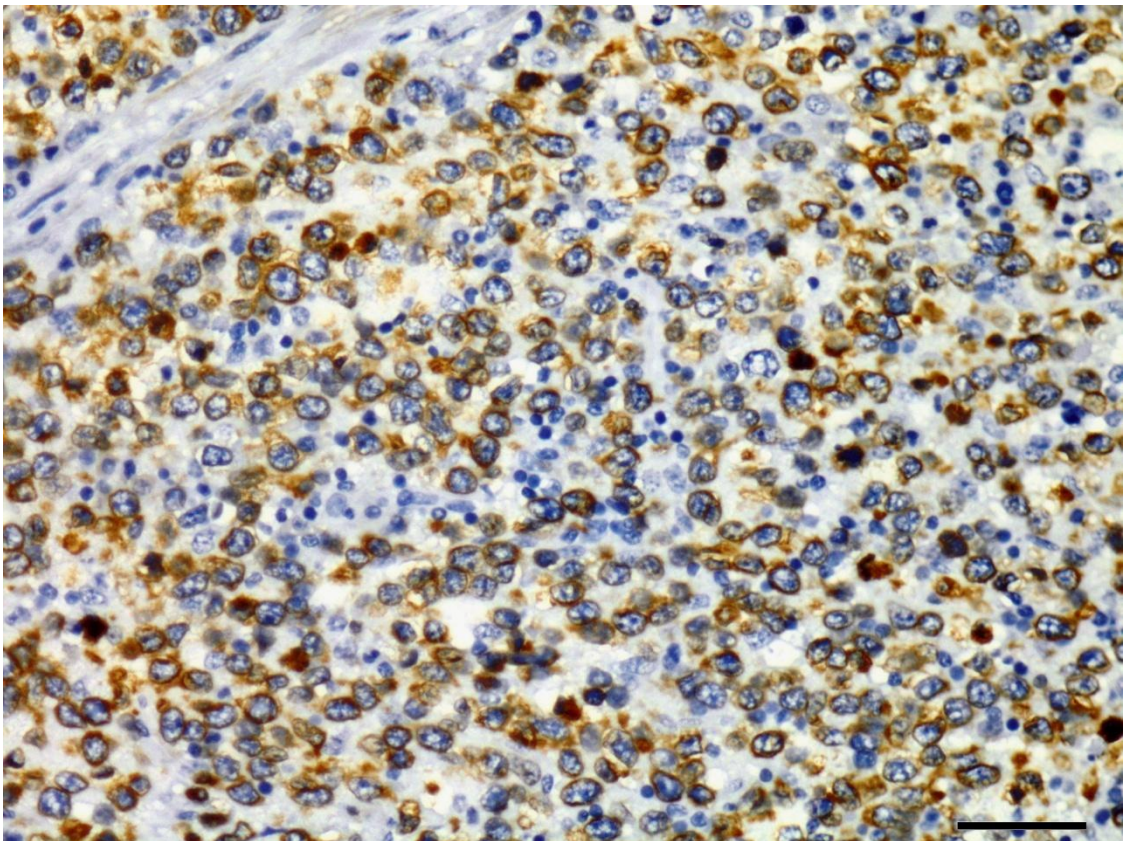


Figura 14. Imuno-histoquímica de um linfoma imunoblástico no linfonodo. Note a imunomarcção dos linfócitos pleomórficos para o anticorpo monoclonal CD79αcy. Obj.40x.

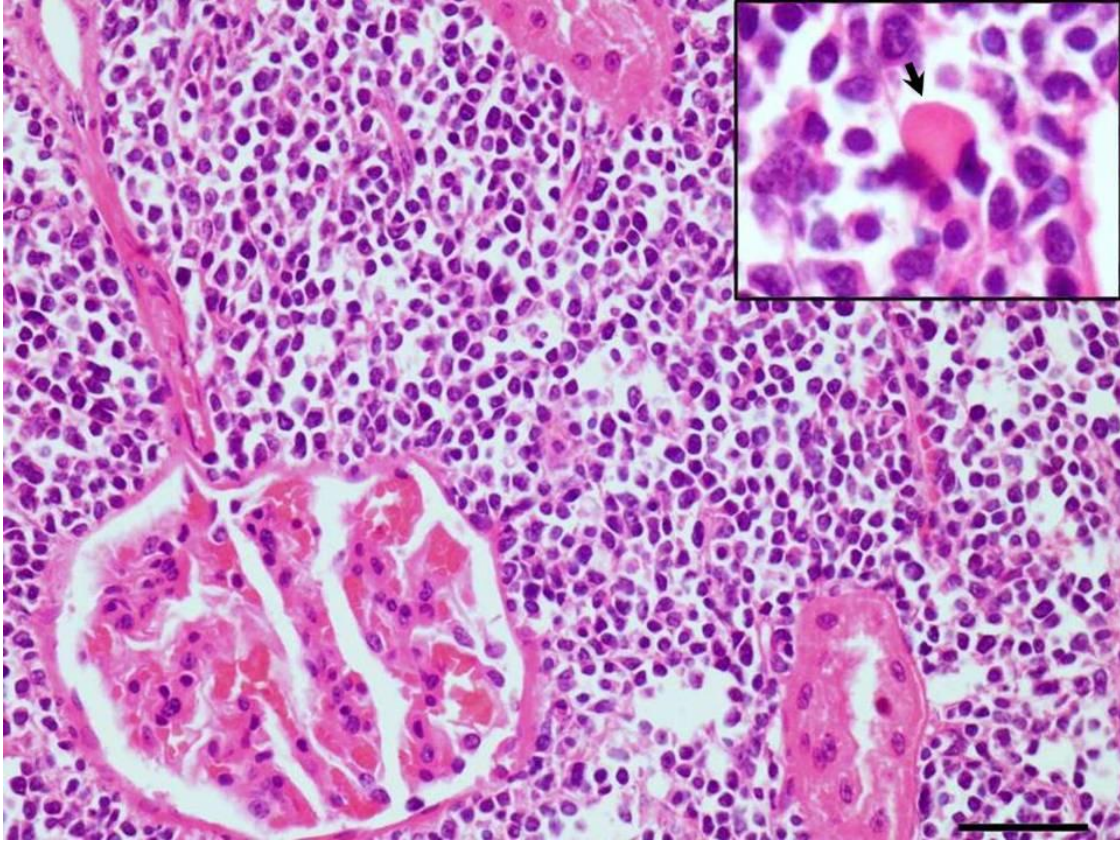


Figura 15. Linfoma linfoplasmocítico no rim. Os linfócitos neoplásicos são pequenos e a maioria possui o núcleo excêntrico e citoplasma eosinofílico. Células de Mott são vistas aleatoriamente (detalhe superior esquerdo [seta]). HE, Obj.40x.

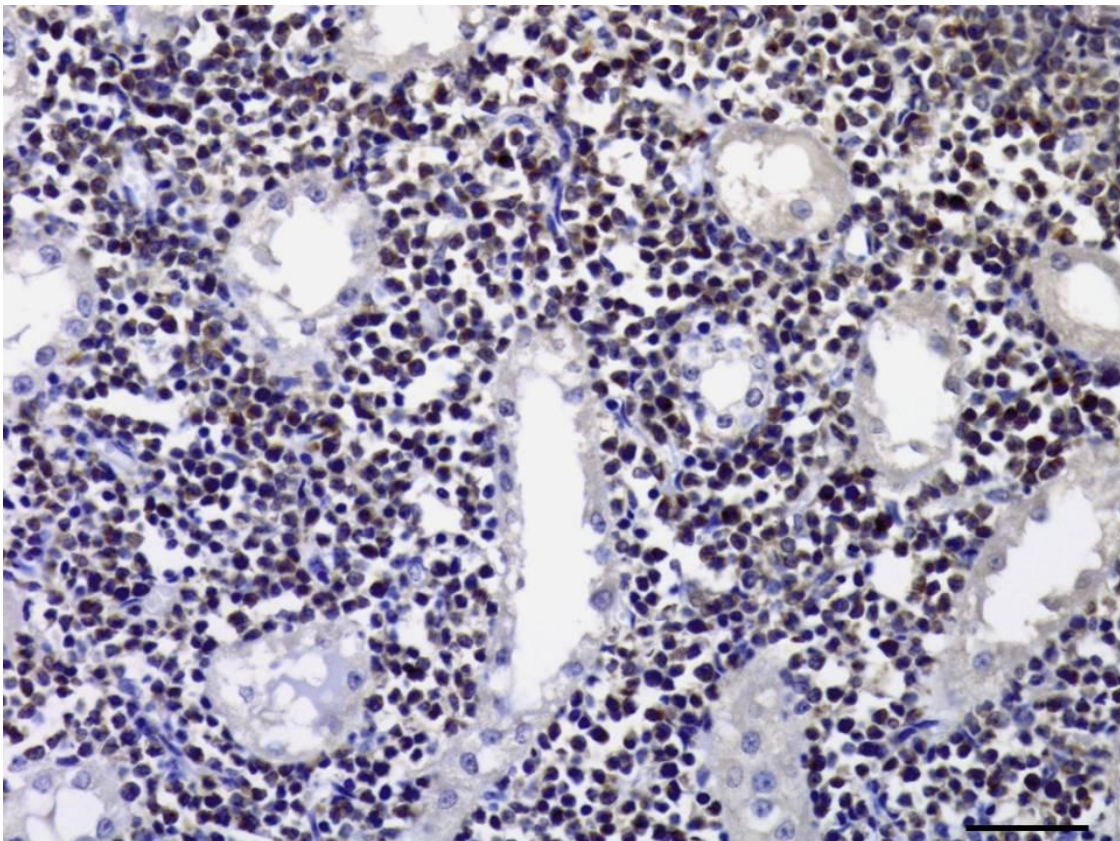


Figura 16. Imuno-histoquímica de um linfoma linfoplasmocítico no rim. Há moderada imunomarcção dos pequenos linfócitos para o anticorpo monoclonal CD79 α cy. Obj.40x.

4. DISCUSSÃO

Nesta dissertação estão incluídos dois artigos científicos referentes a um estudo retrospectivo realizado a partir dos arquivos do Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Foram examinados os laudos de necropsias e biópsias de bovinos feitas num período de cerca de 50 anos (1965-2014) e incluídos os laudos com o diagnóstico de linfoma.

No primeiro artigo os aspectos epidemiológicos, clínicos e anatomopatológicos de 128 casos de linfoma bovino são descritos. Nesse estudo, observou-se que na Região Central do Rio Grande do Sul, fêmeas bovinas, de raças leiteiras e com idades entre 5-8 anos representaram a categoria mais predisposta ao desenvolvimento de linfomas, basicamente aqueles de ocorrência enzoótica. Essa maior prevalência deve-se principalmente ao tipo de criação que, por ser mais intensiva em vacas de leite, permite uma maior proximidade entre os bovinos e requer práticas de manejo constantes, o que influencia muito na disseminação do BLV (RADOSTITS et al., 2007; FIGHERA; GRAÇA, 2010). Em relação aos sinais clínicos, aumento de volume dos linfonodos palpáveis foi o achado mais frequentemente observado (74,1%). Essa representa a principal manifestação clínica e constitui um sinal de extrema importância para a suspeita clínica do linfoma bovino (BARROS, 2007; RADOSTITS et al., 2007; VALLI, 2007; GARRY, 2008). Na necropsia (n=125), 71,2% dos bovinos apresentavam linfadenomegalia, que foi classificada como localizada em 89,6% dos casos e generalizada em 10,3% dos casos. Dos laudos que informavam os linfonodos acometidos (n=58), os linfonodos mesentéricos (51,7%) e mediastínicos (37,9%) constituíram os principais linfocentros acometidos. Outro órgão comumente afetado pelo linfoma neste estudo foi o coração, representando 40% dos casos, sendo o átrio direito a cavidade mais afetada. À semelhança do que é descrito na literatura (BARROS, 2007; RADOSTITS et al., 2007; FIGHERA; GRAÇA, 2010), linfonodo e coração correspondem aos principais sítios do linfoma na espécie bovina. A presença de massas tumorais no canal vertebral foi observada em poucos casos (3,2%) e pode ser explicada pela não abertura da coluna vertebral durante a necropsia. Com base na epidemiologia e na localização das lesões, a maioria dos casos (96%) foi classificada como linfoma enzoótico e o restante (4%) como linfoma esporádico.

O segundo artigo científico foi elaborado com o intuito de realizar uma avaliação morfológica e imunofenotípica de 86 dos 128 casos de linfoma bovino descritos previamente, através da histologia e da imuno-histoquímica (IHQ). Para a classificação desses neoplasmas utilizou-se os sistemas da *Working Formulation (WF) of Non-Hodgkin's Lymphomas for Clinical Usage* e *Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms (REAL)*. Todos os 86 linfomas avaliados histologicamente pelo sistema da WF apresentaram um padrão de distribuição difuso, no qual 83,8% dos casos eram de grandes células, 84,9% de grau intermediário e 58,2% correspondiam a tumores com linfócitos não clivados e 37,2% com linfócitos clivados. Dos 86 casos de linfoma bovino em que foi realizada a técnica de IHQ, 31,4% foram positivos para o anticorpo monoclonal CD79 α , utilizado para detecção de linfócitos B, e nenhum caso foi positivo para o anticorpo policlonal CD3, utilizado para detecção de linfócitos T. Esses tumores positivos para a linhagem B foram incluídos no sistema de classificação REAL. Assim, 81,5% dos linfomas foram considerados como linfoma difuso de grandes células B, 11,1% como linfomas imunoblásticos de grandes células e 7,4% como linfomas linfoplasmocíticos. Portanto, os linfomas bovinos desse estudo são basicamente difusos, predominantemente de grau intermediário e de grandes células, com núcleos clivados ou não clivados e decorrentes da proliferação neoplásica de linfócitos B. Esses achados microscópicos são característicos de linfomas enzoóticos e semelhantes aos descritos na literatura para essa forma da doença (VERNAU et al., 1992; JACOBS et al., 2002; VALLI et al., 2002; VALLI, 2007).

5. CONCLUSÕES

1. Os resultados aqui apresentados permitem concluir que, na Região Central do Rio Grande do Sul, vacas de leite, principalmente entre 5-8 anos de idade, representam a categoria mais predisposta ao desenvolvimento de linfomas, basicamente aqueles de ocorrência enzoótica.
2. Esses bovinos quase sempre são diagnosticados com base na presença de linfadenomegalia persistente, principalmente dos linfonodos superficiais, mas também pela palpação retal dos linfonodos ilíacos internos.
3. Na necropsia, linfonodos e coração (principalmente átrio direito) constituem os principais órgãos acometidos pelo linfoma.
4. A associação dos achados epidemiológicos e clínicos permite o diagnóstico presuntivo do linfoma em bovinos e a necropsia acaba por validar esses casos, já que praticamente não há outra entidade clínica que apresente aspectos anatomopatológicos semelhantes ao linfoma nessa espécie.
5. Linfomas difusos, predominantemente de grau intermediário e de grandes células, com núcleos clivados ou não clivados e decorrentes da proliferação neoplásica de linfócitos B, representam os principais achados microscópicos dos linfomas bovinos, basicamente da forma enzoótica.

6. REFERÊNCIAS

ANJIKI, T. et al. Immunohistochemical study on cutaneous B cell lymphoma in two cows. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v. 43, n. 1, p. 33-36, apr. 2009.

ASAHINA, M. et al. Phenotypic analysis of neoplastic cells from calf, thymic, and intermediate forms of bovine leukosis. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 32, n. 6, p. 683-691, nov. 1995.

BARROS, C. S. L. et al. Leucose Bovina. In: _____ (Orgs.). **Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil**. 1 ed. São Paulo: Vallé, 2006. p. 187-194.

BARROS, C. S. L. Leucose bovina. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J. R. J. (Orgs.). **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. v. 1. 3 ed. Santa Maria: Palloti, 2007. p. 451-457.

BUCZINSKI, S. et al. Cutaneous T cell lymphoma in a heifer seropositive for bovine leukosis. virus. **Veterinary Record**, London, v. 158, n. 19, p. 665-667, may. 2006.

FIGHERA, R. A.; GRAÇA, D. L. Sistema Hematopoiético. In: SANTOS, R. L.; ALESSI, A. C. (Orgs.). **Patologia Veterinária**. São Paulo: Roca, 2010. cap. 6, p. 337-422.

FRY, M. M; MCGAVIN, M. D. Medula óssea, células sanguíneas e sistema linfático. In: MACGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. (Orgs.). **Bases da patologia em veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 743-832.

GARRY, F.. Miscellaneous infectious diseases,. In: DIVERS T. J.; PEEK S. F. (Orgs.). **Diseases of Dairy Cattle**. 2 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2008. p. 606-639.

HARBO, S. J. et al. Characterization of lymphocyte populations by flow cytometry in a calf with sporadic juvenile lymphoma. **Veterinary Clinical Pathology**, Malden, v. 33, n. 3, p. 63-67, sep. 2004.

ISHIGURO, N. et al. Differentiation analysis of bovine T-lymphosarcoma. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 41, n. 1/2, p. 1-17, may. 1994.

ISHINO, S. et al. Pathological and immunohistochemical studies of follicular lymphoma in two calves. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 103, n. 3, p. 265-275, oct. 1990.

JACOBS, R. M. et al. Tumors of the Hemolymphatic System. In: MEUTEN, D. J. (Org.). **Tumors in domestic animals**. 4 ed. Ames: Iowa State Press, 2002. cap. 3, p. 119-198.

LUCENA, R. B. et al. A retrospective study of 586 tumours in Brazilian cattle. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 145, n. 1, p. 20-24, jul. 2011.

OTROCKA-DOMAGALA, I. et al. Immunohistochemical profile of multicentric cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma with generalized lymphadenopathy in a Holstein-Friesian cow: a case report. **Veterinary Medicine**, v. 57, n. 5, p. 251-257, 2012.

PARODI, A. L. Classification of malignant lymphoma in domestic animals: history and conceptual evolution. **European Journal of Veterinary Pathology**, v. 7, n. 2, p. 43-50, 2001.

RADOSTITS O. M. et al. Diseases associated with viruses and *Chlamydia*. I. In: _____ (Orgs.). **Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 10 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007. p. 1157-1305.

RAVAZZOLO, A. P.; COSTA, U. M. *Retroviridae*. In: FLORES, E. F. (Org.). **Virologia Veterinária**. 2 ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2012. p. 953-985.

SATO, K. et al. $\gamma\delta$ T-cell lymphoma in a cow. **Australian Veterinary Journal**, Sydney, v. 80, n. 11, p. 705-707, nov. 2002.

STEP, D. L. et al. An atypical lymphoma of T-cell lineage in the thorax of an aged cow. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 13, n. 2, p. 154-158, mar. 2001.

TANI, K. et al. Further analysis of the phenotype and distribution of tumor cells in sporadic B-cell and T-cell lymphomas in the lymph node and spleen of cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 55, n. 4, p. 283-290, mar. 1997.

THURMOND, M. C. Bovine lymphosarcoma. In: SMITH, B. P. (Org.). **Large Animal Internal Medicine**. 3 ed. St Louis: Mosby, cap. 35, 2002. p. 1067-1070

TOSTES, R. A. Situação da leucose bovina no Brasil: uma revisão. **Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente, v. 1, n. 1, p. 42-50, set. 2005.

WERLING, D. et al. Enzootic bovine leukosis. In: COETZER, J. A. W.; TUSTIN, R. C. **Infectious Diseases of Livestock**. 2 ed. África do Sul: Oxford University Press, cap. 58, 2004. p. 708-716.

VALLI, V. E. O. et al. Histological classification of hematopoietic tumors of domestic animals. 2 ed. WHO/AFIP, Washington, 2002.

VALLI, V. E. O. Hematopoietic system. In: JUBB; KENNEDY; PALMER'S (Orgs.). **Pathology of Domestic Animals**. vol. 2. 5 ed. Philadelphia: Elsevier, 2007. cap. 2, v. 2, 2007, p. 107-324.

VERNAU, W. et al. The immunophenotypic characterization of bovine lymphomas. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 34, n. 3, p. 222-225, may. 1997.

VERNAU, W. et al. Classification of 1,198 cases of bovine lymphoma using the National Cancer Institute Working Formulation for Human Non-Hodgkin's Lymphomas. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 29, n. 3, p. 183-195, may. 1992.