

## ESTUDOS HISTOLÓGICOS EM LINFONODOS DE BOVINOS SOROPOSITIVOS AO VIRUS DA LEUCOSE BOVINA\*

### HISTOLOGICAL STUDIES OF LYMPH NODES OF BOVINES SEROPOSITIVE TO THE BOVINE LEUKEMIA VIRUS

Eduardo Furtado Flores\*\*  
Rudi Weiblen\*\*\*\*

Dominguita Lühers Graça\*\*\*  
André Luiz Bagolin Palmeira\*\*\*\*\*.

#### RESUMO

Cortes de linfonodos superficiais e ilíacos de 48 vacas soropositivas e 2 soronegativas ao vírus da Leucose Bovina (VLB) foram examinados visando a detecção de possíveis alterações histológicas relacionadas com o linfossarcoma bovino. Trinta animais soropositivos e um soronegativo apresentaram quadros de hiperplasia linfóide (HL), 10 apresentaram linfadenopatia benigna (LB) e 7 animais soropositivos e 1 soronegativo apresentaram hiperplasia linfóide e reticular simultaneamente. Essas alterações possuem caráter benigno e aparentemente não têm relação com a infecção pelo VLB. Nenhum corte evidenciou conclusivamente a existência de lesões neoplásicas. No entanto, linfonodos de 8 animais soropositivos mostraram características histológicas interpretadas como sugestivas de estágios iniciais de transformação neoplásica. No entanto, com base somente nessas características e devido à impossibilidade do acompanhamento clínico e histológico desses animais, não foi possível formular conclusões definitivas sobre a natureza de tais alterações.

**Palavras-chave:** leucose bovina, hiperplasia linfóide, histologia

#### SUMMARY

Paraffin sections of superficial and iliac lymph nodes of forty eight cows seropositive and two seronegative to Bovine Leukemia Virus (BLV) were examined in order to detect possible histological changes related to bovine lymphosarcoma. Thirty animals seropositive and one seronegative showed

cytologic pictures of lymphoid hyperplasia (LH), ten showed benign lymphadenopathy and seven animals presented with LH and reticular hyperplasia (RH) simultaneously. All those changes are of benign nature and apparently they do not relate to the infection with BLV. None of the sections evidenced conclusively the existence of neoplastic lesions. However, sections of lymph nodes from eight animals seropositive to BLV showed histological changes suggestive of the initial phases of neoplastic transformation. Nonetheless based upon those changes only and due to the impossibility of a clinical and histological follow up of the animals, it was not possible to draw any definitive conclusion over the nature of those changes.

**Key words:** bovine leukemia virus, lymphosarcoma, histological lesions

#### INTRODUÇÃO

O linfossarcoma multicêntrico dos bovinos adultos é uma enfermidade altamente fatal do sistema linforreticular caracterizada pela proliferação de células neoplásicas que freqüentemente resulta em infiltração difusa de órgãos não linfóides ou formação de massas tumorais sólidas. A enfermidade ocorre principalmente em gado leiteiro, sobretudo na faixa dos seis aos nove anos (SORENSEN, 1979).

A etiologia dessa forma de linfossarcoma tem sido atribuída a um retrovírus denominado de Vírus da Leucose Bovina (VLB) (MILLER et al, 1969). Uma vez infectados, os bovinos permanecem portadores do VLB por toda sua vida, embora a manifestação clínica da enfermidade seja relativamente infreqüente. Em torno de 30% dos animais infectados desenvolvem uma linfocitose

\* Parte da dissertação de mestrado apresentada pelo primeiro autor ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97119-900 Santa Maria, RS. Pesquisa parcialmente financiada pelo FINE (UFSM) e pelo CNPq.

\*\* Médico Veterinário, Mestre, Professor Assistente do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), da UFSM.

\*\*\* Médico Veterinário, PhD, Professor Titular do Departamento de Patologia da UFSM.

\*\*\*\* Médico Veterinário, PhD, Professor Titular do DMPV da UFSM.

\*\*\*\*\* Médico Veterinário, Sadia Agropastoril Caixa Postal 50, 89694-000 Faxinal dos Guedes, SC.



persistente (LP) de caráter benigno, enquanto a ocorrência de linfossarcoma raramente excede os 5% (FERRER et al, 1979). Virtualmente todos os bovinos infectados desenvolvem anticorpos anti-VLB e a sua detecção através de técnicas sorológicas é considerada evidência da infecção (MARSHAK et al, 1979).

Nos animais que desenvolvem o linfossarcoma, usualmente, ocorre o envolvimento generalizado dos linfonodos e também de outros órgãos (MOULTON & DUNGWORTH, 1978). Os linfonodos mais freqüentemente afetados são os ilíacos, retromamários e mesentéricos (MARSHAK et al, 1962; MOULTON & DUNGWORTH, 1978); o coração, abomaso, rins, intestinos, útero, tecidos retrobulbares do olho e perimedulares também são, comumente, envolvidos no processo (SORENSEN, 1979). Os linfonodos afetados geralmente estão aumentados de volume e a sua consistência varia de firme a macia até friável e a sua coloração desde um branco-acinzentado a um branco-amarelado até um rosa pálido (MOULTON & DUNGWORTH, 1978).

A maior característica da superfície de corte desses linfonodos é a perda da estrutura normal do órgão, sendo impossível distinguir os limites córtico-medulares e as estruturas cordonais e foliculares (MOULTON & DUNGWORTH, 1978). Nas fases precoces do processo há o acúmulo de células neoplásicas nos cordões medulares com extensão progressiva para a periferia dos nódulos primários do córtex e para os seios subcapsulares. A contínua proliferação dessas células tumorais leva à invasão da cápsula e infiltração da fáscia periférica e do tecido adiposo perinodal (DUNGWORTH et al, 1964). Os linfossarcomas dos bovinos podem ser de vários tipos, dependendo do tipo celular predominante, sendo que o mais freqüente é o linfocítico (FUJIMOTO et al, 1969; MOULTON & DUNGWORTH, 1978). Nesta forma de LB a célula envolvida na proliferação tumoral é o linfócito B (YAMAMOTO et al, 1985).

O diagnóstico histológico das lesões benignas ou malignas nos linfonodos baseia-se na arquitetura e alterações celulares interpretadas com o conhecimento do histórico e dos sinais clínicos (VALLI, 1985). Alguns desses diagnósticos podem apresentar dificuldades, sobretudo quando não há invasão tumoral em órgãos não linfóides tais como coração e abomaso. No exame macroscópico e também microscópico sem o conhecimento do histórico e sem essas sessões tumorais típicas, pode haver dúvida se a alteração representa uma linfadenite, hiperplasia benigna ou um linfossarcoma (SMITH, 1965).

Uma das distinções mais difíceis é entre uma hiperplasia linfóide difusa e o linfossarcoma. Na hiperplasia folicular, mesmo quando é extensa, é rara a destruição ou perda da região paracortical, enquanto no linfossarcoma os folículos geralmente parecem estar isolados, devido à atrofia paracortical. Linfossarcomas foliculares geralmente possuem o manto folicular composto por lin-

fócitos pequenos e as áreas mais claras ou escuras são ocupadas por células morfológicamente semelhantes, enquanto na hiperplasia benigna há uma marcante variação nos tipos celulares nas camadas foliculares (VALLI, 1985).

Os aumentos de volume dos linfonodos sem o conhecimento ou especificação da causa são denominados genericamente de linfadenopatias. Essas linfadenopatias podem ser localizadas quando o processo causal é restrito à região de drenagem ou generalizadas devido a tumores primários ou processos infecciosos sistêmicos (VALLI, 1985). Nas linfadenopatias de caráter benigno ocorrem quadros citológicos variáveis. Já nos linfossarcomas geralmente existe um tipo celular, mono ou bimórfico, usualmente com a predominância de células linfóides médias e uma mescla de células pequenas e grandes. O critério mais importante para distinguir uma linfadenopatia benigna de um linfossarcoma é o padrão de cromatina dos linfócitos: nos processos benignos, os linfócitos reativos exibem menos detalhes nucleares internos que nos processos neoplásicos (VALLI, 1985).

Após vacinações, num período que dura aproximadamente três semanas, os linfonodos que drenam as regiões vacinais usualmente desenvolvem uma hiperplasia paracortical difusa, com freqüente obscurecimento dos centros germinativos do córtex. Exames histológicos efetuados nessa fase também podem apresentar dificuldades de interpretação, pois essa perda da organização folicular também é sugestiva de linfossarcoma difuso (VALLI, 1985).

Este estudo foi desenhado visando a detecção de alterações histológicas precoces que pudessem ser correlacionadas com achados sorológicos e hematológicos dos animais de experimentação.

## MATERIAL E MÉTODOS

O material para a realização de cortes histológicos foi obtido por punção biópsia de linfonodos ou pela colheita de peças por ocasião do abate. Foram realizadas 31 biópsias, sendo 30 em animais sorologicamente positivos e uma em animal sorologicamente negativo (para fins de comparação e controle) para o vírus da Leucose Bovina (VLB).

Os animais foram identificados como positivos ao VLB através da técnica de imunodifusão em gel de ágar com antígeno glicoprotéico (gp 51) (MILLER & VAN DER MAATEN, 1977), com algumas modificações descritas por FLORES et al (1988). O antígeno utilizado foi cedido pela EMBRAPA/ CNPSA/ CONCÓRDIA/ SC.

Os animais que foram submetidos às biópsias eram inicialmente examinados clinicamente, principalmente quanto aos linfonodos superficiais (pré-femural, pré-



escapular, retromamários e submandibulares) e ilíacos. Após a tricotomia e antissepsia da região com álcool iodado, eram injetados 5ml de uma solução bupivacaína a 5% em cada campo e deixava-se agir por 5 minutos. A colheita do material era feita com o auxílio de um coletador de biópsia cilíndrico metálico, com um diâmetro de corte de 4mm. Após a fixação do linfonodo, a superfície de corte do coletador era ajustada sobre a pele e introduzida nesta mediante pressão e movimentos circulares. Após a transfixação e remoção do cilindro de pele resultante, o coletador era introduzido através do orifício e o procedimento era repetido sobre o linfonodo, resultando em um cilindro de 4mm desse órgão. Esse fragmento era então removido com uma pinça anatômica e colocado em um frasco contendo formol a 10%. Usualmente era colhido um fragmento do linfonodo pré-escapular e outro do pré-femural de um mesmo lado do animal. Em alguns casos, entretanto, foi colhido o material de apenas um dos linfonodos, devido à dificuldade de localização e fixação do linfonodo pelo excesso de tecido adiposo no local.

Foram colhidas também amostras de 18 animais sorologicamente positivos e de um soronegativo ao VLB que foram abatidos. Após o abate, eram examinados os principais órgãos afetados pela enfermidade segundo MARSHAK (1968) e SORENSEN (1979). Como nenhum órgão desses animais apresentou alterações macroscópicas sugestivas de linfossarcoma, foram colhidos os linfonodos pré-escapular, pré-femural e ilíacos de cada meia carcaça, os quais foram acondicionados em frascos com formol a 10%. O material para a realização de cortes histológicos foi enviado ao setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria onde foi incluído em parafina e confeccionadas lâminas histológicas coradas pela técnica da Hematoxilina e Eosina para estudos com microscopia ótica.

## RESULTADOS

As alterações histológicas encontradas em linfonodos de bovinos positivos ao vírus da Leucose Bovina (VLB) através da técnica de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), foram classificadas em quatro grupos e estão descritas na Tabela 1.

As lesões enquadradas nos grupos Ia e Ib. encontram-se ilustradas nas Figuras 1 e 2.

Os cortes dos linfonodos pré-escapular e pré-femural obtidos por biópsia de um animal soronegativo, cujos valores linfocitários foram de 5.311 e 5.810/mm<sup>3</sup>, em três exames mensais

consecutivos, apresentaram um quadro de hiperplasia linfóide (grupo IIIa). O corte do linfonodo pré-femural de outro animal soronegativo colhido em abatedouro, cujos valores linfocitários foram de 7.140, 7.050 e 6.910/mm<sup>3</sup>, apresentou linfadenopatia benigna (LB), sendo enquadrado no grupo II. Um animal soropositivo submetido à

TABELA 1 - Classificação das alterações histológicas encontradas em linfonodos de bovinos positivos ao vírus da Leucose Bovina (VLB) pela técnica de imunodifusão em gel de ágar (IDGA).

GRUPO	ALTERAÇÕES	Nº DE ANIMAIS	OBSERVAÇÕES
Ia	Presença de células linfóides jovens, desagregadas, com citoplasma de contornos poliédricos e nucléolos proeminentes. Essas células mostram vacuolização nuclear, as vezes pseudo-inclusões e núcleos clivados. O citoplasma é basofílico ou ligeiramente eosinofílico. Há ausência de folículos linfóides no córtex, proliferação trabecular inconstante e hipertrofia das artérias. É notada a presença de células jovens nos linfáticos eferentes.	6	Três desses animais apresentaram outro tipo de alteração em um dos linfonodos examinados, e outro apresentou lesão com características intermediárias com o grupo Ib.
Ib	Centros germinativos extensos, às vezes ocupando toda a porção do córtex e paracórtex entre duas trabéculas. São compostos de células blásticas de citoplasma basofílico de extensão variável e grandes núcleos vacuolizados e cromatina marginalizada, às vezes com pseudo-inclusões e com um ou mais nucléolos grandes; quando é um só é central, sendo mais são periféricos. Algumas células apresentam núcleo clivado. Índice mitótico moderado. São observadas células necróticas em meio à proliferação. O conjuntivo envolvente é bem evidenciado. Os cordões medulares tem poucas células maduras (próplasmócitos e plasmócitos). Existe no córtex e no paracórtex um número variável de células linfocitárias maduras aranjadas compactamente. A arquitetura do órgão está ligeiramente modificada. Há presença de agrupamentos de células germinativas nos seios medulares.	2	Um desses animais apresentou outro tipo de lesão em um dos linfonodos. Outro animal apresentou lesão com características intermediárias com o grupo Ia.
II	Linfadenopatia benigna (LB): hiperplasia linfóide e reticular com alterações vasculares/circulatórias e presença de polimorfonucleares.	10	Quatro animais apresentaram outra alteração em um dos linfonodos.
IIIa	Hiperplasia linfóide (HL)	30	Onze animais apresentaram outra alteração em um dos linfonodos examinados.
IIIb	Hiperplasia linfóide e reticular (HLR)	7	Três desses animais apresentaram linfonodos com outro tipo de lesão.
IV	Outras lesões: granuloma actinomicóide, hemorragia, hemossiderose e linfadenite.	5	



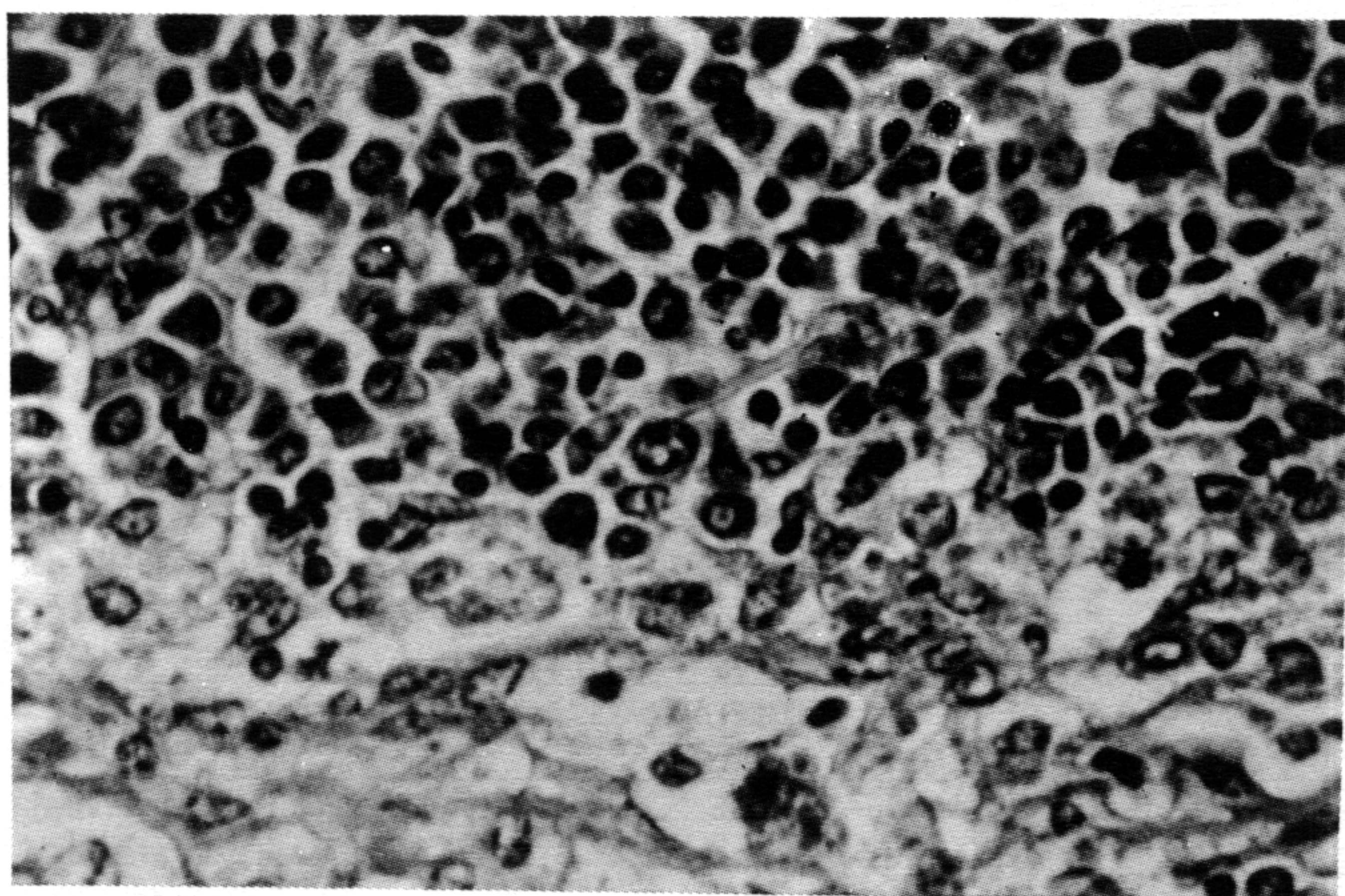


FIGURA 1 - Corte de linfonodo de bovino soropositivo ao vírus da Leucose bovina. Córtex. Presença de células angulares, citoplasma basofílico e núcleos com cromatina densa e nucléolos evidentes. Lesão do Grupo Ia. Obj.40

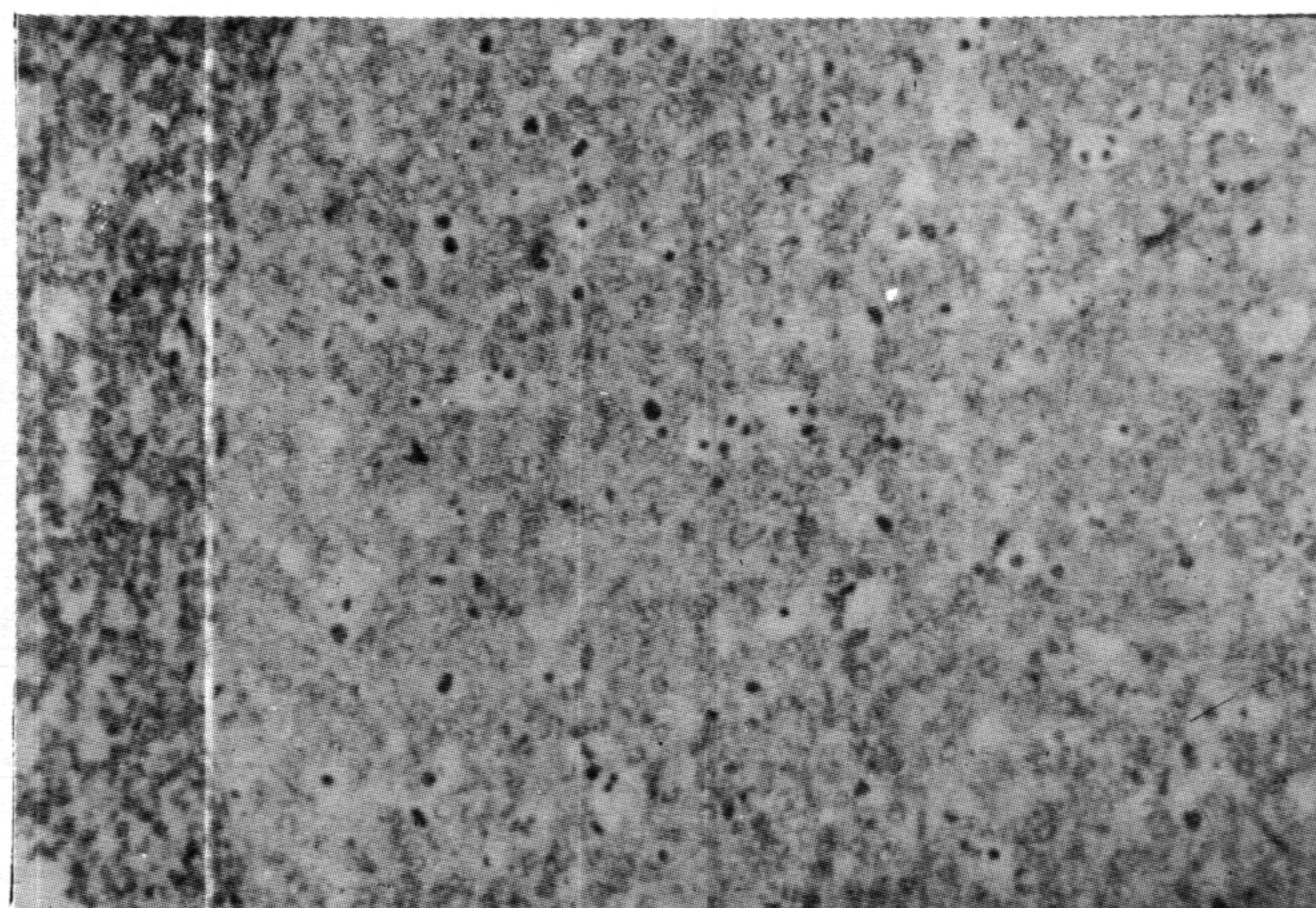


FIGURA 2 - Corte de linfonodo superficial de bovino soropositivo ao vírus da Leucose bovina. Córtex. Extenso centro germinativo comprime células maduras (alto). Numerosas células necróticas são observadas em meio à proliferação. Lesão do Grupo Ib. Obj.16

biópsia apresentou aumento de volume dos linfonodos pré-femorais e retromamários. Esses linfonodos estavam bastante aumentados e com consistência firme; a mobilidade e a sensibilidade eram normais. O exame clínico geral desse animal, através de inspeção, assim como o exame retal dos linfonodos ilíacos não revelou qualquer alteração. O exame histológico de um corte do linfonodo pré-femural desse animal evidenciou um quadro de hiperplasia linfóide (Grupo IIIa). Os demais animais soropositivos que foram submetidos à biópsia não apresentaram anormalidades quanto ao volume, consistência, sensibilidade e mobilidade dos linfonodos superficiais (pré-femorais, pré-escapulares, retromamários e submandibulares) e ilíacos submetidos a exame clínico. Alguns fragmentos obtidos por biópsia não foram aproveitáveis, geralmente pela falta de representatividade do tecido. O exame macroscópico da carcaça e dos órgãos internos dos dezenove bovinos abatidos (18 soropositivos e um soronegativo) não revelou lesões sugestivas de linfossarcoma.

## DISCUSSÃO

Os exames histológicos realizados em cortes de linfonodos superficiais e ilíacos de 48 vacas soropositivas ao VLB evidenciaram um significativo número de casos de hiperplasia linfóide (HL): trinta dos 48 animais e 42 dos 86 fragmentos examinados. Essas alterações estão usualmente associadas com uma contínua atividade linfóide em resposta a um determinado estímulo desen-

cadeante. Esse não foi um achado surpreendente, visto que a maior parte dos linfonodos examinados drenam áreas de superfície corporal, usualmente expostas à ação de diversos agentes ambientais e patológicos. Segundo VALLI (1985), quadros de hiperplasia linfóide difusa podem eventualmente ser confundidos com processos malignos, sobretudo quando há perda da arquitetura normal do órgão, o que não foi evidenciado no presente trabalho.

Sete animais soropositivos apresentaram hiperplasia linfóide e reticular concomitantemente nos fragmentos examinados. A proliferação reticular geralmente ocorre com maior frequência em linfonodos que drenam áreas sujeitas a processos inflamatórios crônicos, sobretudo as superfícies corporais.

Quadros de linfadenopatia benigna, (LB) identificados em linfonodos de dez animais soropositivos e em um dos soronegativos examinados, foram interpretados como manifestações reativas a processos benignos.

Os exames histológicos dos linfonodos dos bovinos positivos ao VLB não demonstraram conclusivamente a existência de lesões microscópicas de natureza neoplásica. Nesses cortes não foi evidenciada proliferação desordenada de células com características neoplásicas típicas, como as descritas por SMITH (1965), FUJIMOTO et al (1969) e por MOULTON & DUNGWORTH (1978) que levasse à destruição da arquitetura dos linfonodos, conforme descrito por DUNGWORTH et al (1964). Considerando que a infecção pelo VLB é, na maioria das vezes, inaparente (FERRER et al, 1979), que o desenvolvimento do linfossarcoma geralmente é precedido de um longo período de incubação (SORENSEN,



1979) e que pode iniciar em qualquer ponto do sistema linforreticular (MARSHAK et al, 1962), isto não constituiu-se em um achado surpreendente. Nesse sentido, apenas dois casos de linfossarcoma comprovados por exames histológicos já foram registrados anteriormente nos rebanhos estudados.

Embora não fossem evidenciadas lesões neoplásicas típicas, alguns cortes de linfonodos apresentaram determinadas características que não permitiram o seu enquadramento nos grupos de alterações benignas previamente mencionados. Por algumas características observadas, esses cortes foram classificados separadamente (grupos Ia e Ib, Tabela 1). Essas lesões foram identificadas em linfonodos de sete animais com idades entre cinco e oito anos, cujos valores linfocitários situavam-se dentro dos limites normais e que eram pertencentes a dois rebanhos, um dos quais com histórico recente de linfossarcoma.

A presença dessas lesões em cortes de linfonodos de bovinos positivos ao LVB, cuja habilidade oncogênica já foi demonstrada repetidas vezes, pode ser sugestiva de fases iniciais de transformação neoplásica. Células com características nucleares e citoplasmáticas semelhantes às do grupo Ia freqüentemente ocorrem em linfossarcomas do tipo histiocítico (SMITH, 1965); MOULTON & DUNGWORTH, 1978), enquanto células com características semelhantes às evidenciadas nos cortes enquadrados no grupo Ib são também encontradas nos linfossarcomas linfoblásticos (FUJIMOTO et al, 1969). A arquitetura desses linfonodos estava preservada, com exceção de uma discreta desordenação observada nos cortes do grupo Ib.

Se por um lado, essas alterações forem compatíveis e por isso sugestivas de estágios iniciais de transformação tumoral, não existem subsídios suficientes para uma afirmação conclusiva nesse sentido. Isso somente poderia ser obtido pelo acompanhamento clínico e também através de exames histológicos periódicos para seguir a evolução do processo.

Deve-se considerar também a possibilidade de que essas alterações representem outro tipo de resposta do tecido linfóide que não uma transformação neoplásica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DUNGWORTH, D.L., THEILEN, G.H., LENGYEL, J. Bovine lymphosarcoma in California. II. The thymic form. *Path Vet*, v. 1, p. 233-250, 1964.
- FERRER, J.F., MARSHAK, R.R., ABT, D.A. et al. Relationship between lymphosarcoma and persistent lymphocytosis in cattle: a review. *J Am Vet Med Assoc*, v. 175, n. 7, p. 705-708, 1979.
- FLORES, E.F., WEIBLEN, R., PEREIRA, N.M. et al. Prevalência de anticorpos contra o vírus da leucose Bovina (VLB) no rebanho leiteiro de Santa Maria, RS. *Rev Centro de Ciências Rurais*, v. 18, n. 1, p. 67-73, 1988.
- FUJIMOTO, Y., MILLER, J., OLSON, C. The fine structure of lymphosarcoma in cattle. *Path Vet*, v. 6, p. 15-29, 1969.
- MARSHAK, R.R., CORIELL, L.L., LAWRENCE, W.C. et al. Studies on bovine lymphosarcoma. I. Clinical aspects, pathological alterations and herd studies. *Cancer Res*, v. 22, p. 202-217, 1962.
- MARSHAK, R.R. Criteria for determination of the normal and leukotic state in cattle. *J Natl Cancer Inst*, v. 41, p. 243-263, 1968.
- MARSHAK, R.R., ABT, D.A., FERRER, J.F. Hematology in the diagnosis of Bovine Leukosis. *BOVINE LEUKOSIS SYMPOSIUM*, 1979. Maryland. College Park, Maryland, 1979. p. 51-65, 232 p.
- MILLER, J.M., MILLER, L.D., OLSON, C. et al. Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. *J Natl Cancer Inst*, v. 43, p. 1297-1305, 1969.
- MILLER, J.M., VAN DER MAATEN, M.J. Use of glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. *Europ J Cancer*, v. 13, p. 1369-1375, 1977.
- MOULTON, J.E., DUNGWORTH, D.L. Tumors of the lymphoid and hemopoietic tissues. In: MOULTON, J.E. *Tumors in domestic animals*, 2. ed. Davis: University of California Press. 1978. p. 150-195.
- SMITH, H.A. The pathology of malignant lymphoma in cattle. A study of 1113 cases. *Path Vet*, v. 2, p. 68-94, 1965
- SORENSEN, D. Clinical manifestations of Bovine Leukosis. *BOVINE LEUKOSIS SYMPOSIUM*, 1979 Maryland. College Park, 1979. Maryland. p. 5-15, 232p.
- VALLI, V.E.O. The hematopoietic system. In: JUBB, D.V.F., KENNEDY, P.C., PALLMER, N. *Pathology of domestic animals* 3. ed. Orlando: Academic Press, 1985. p. 84-216.
- YAMAMOTO, T., KELLY, M., DODAMA, H. et al. Existence of cytotoxicity activity against BLV-transformed cells in lymphocytes from normal cattle and sheep. *Vet Immunology and Immunopathology*, v. 8 n. 1/2, p. 63-78, 1985.
- DUNGWORTH, D.L., THEILEN, G.H., LENGYEL, J. Bovine lymphosarcoma in California. II. The thymic form. *Path*