

Evento: XXV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DE LINFONODOS DE BOVINOS LEITEIROS ABATIDOS EM FRIGORÍFICOS DO NOROESTE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL PARA A PESQUISA DE LEUCOSE BOVINA¹
HISTOPATHOLOGICAL EVALUATION OF LYMPHONODS OF DAIRY BOVINE ANIMALS IN REFRIGERATORS IN THE NORTHWEST OF THE RIO GRANDE DO SUL STATE FOR BOVINE LEUCOSIS RESEARCH

**Cassiel Gehrke Da Silva², Maria Andréia Inkelmann³, Felipe Libardoni⁴,
Simóní Janaína Ziegler⁵, Bruna Da Rosa Santos⁶**

¹ Projeto de pesquisa realizado no curso de Medicina Veterinária da Unijuí

² Bolsista PIBIC/CNPq, aluno do curso de Medicina Veterinária/UNIJUI, kazgehrke@hotmail.com;

³ Professora do curso de Medicina Veterinária/UNIJUI, Orientadora, mariamedpath@gmail.com;

⁴ Professor do curso de Medicina Veterinária/UNIJUI, felipe.libardoni@unijui.edu.br.

⁵ Bolsista PROBIC/FAPERGS, aluna do curso de Medicina Veterinária/UNIJUI

⁶ Bolsista PIBIC/CNPq, aluna do Curso de Medicina Veterinária/UNIJUI

INTRODUÇÃO

A leucose bovina é uma doença infectocontagiosa disseminada mundialmente. Inicialmente foi observada em países da Europa, mas devido as importações de animais, se espalhou pelos países das américas. No Brasil, a doença foi descrita em 1943 e após surgiu em diversos estados brasileiros (BIRGEL, 2006).

O agente é um vírus da família Retroviridae, subfamília Oncovirinae, Vírus da Leucose Bovina - VLB (SILVA, 1988). Os bovinos são a espécie mais susceptível ao VLB, sendo que a faixa etária mais afetada são animais com idade acima de 6 anos, seguido pela faixa etária de animais com idade entre 4 e 6 anos (BIRGEL, 2006).

A leucose bovina traz grandes prejuízos econômicos ao produtor, pelo descarte de animais, pelos custos com testes para identificação da doença e pela queda na produção de leite. Um estudo feito por Da et. al. (1992) mostra que animais com linfocitose persistente tem uma queda tanto nos percentuais de produção de leite quanto nos de gordura do leite. No mercado de exportações há barreira ao comércio e exige-se que todos os animais devem estar livres da doença e as carcaças que apresentam lesão característica como aumento dos linfonodos são condenadas durante o abate (SILVA, 1988).

Os rebanhos leiteiros geralmente são mais acometidos pela leucose devido ao manejo intensivo que facilita a contaminação entre os animais. O uso dos mesmos materiais cirúrgicos e agulhas é um fator que dissemina o vírus no rebanho. Além de materiais, insetos hematófagos como Stomoxys calcitrans também são um fator que colabora para a transmissão do vírus de um animal para outro (SILVA, 1988; BARROS, et. al., 2009).

O animal pode não ter a sintomatologia clínica (SILVA, 1988), porém quando há a doença clínica, um ou mais linfonodos apresentam aumento de duas a 10 vezes o volume. Classicamente são descritas duas formas de manifestação da leucose, uma forma subclínica ou benigna da doença que cursa com linfocitose persistente, e uma forma maligna da doença que se constitui da formação do linfoma maligno (SOUZA, 2011).

Evento: XXV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

A forma maligna da doença é o linfossarcoma, que se desenvolve em 5% dos casos, sendo descritos percentuais de 0,1 a 10% dos casos (SILVA, 1988). Os sinais clínicos da doença vão depender do local onde os tumores são encontrados, podendo incluir distúrbios digestivos, inapetência, perda de peso, debilidade geral e manifestações neurológicas em alguns casos (RICHTER, 2015). Os linfonodos superficiais são aumentados de volume e palpáveis sob a pele. Na necropsia observam-se linfonodos e diversos tecidos infiltrados por massas neoplásicas. Os órgãos acometidos são abomaso, coração, baço, intestino, fígado, rim, omaso, pulmão e útero (SILVA, 1988).

O teste para identificação da doença é a Prova de Imunodifusão em Ágar Gel (IDGA), que consiste em identificar a presença de anticorpos contra as principais glicoproteínas do vírus. Caso seja positivo, o animal tem o vírus, porém pode ou não ter a doença (LAAN, 1999). Somente após três testes feitos em intervalos de 4 meses que deem resultados negativos podem considerar o rebanho livre da doença (SILVA, 1988). Como não existe vacina para a leucose (RICHTER, 2015), o descarte de animais que forem soropositivos para o vírus é aconselhado (SILVA, 1988).

METODOLOGIA

Análise do material coletado se dividiu em três partes sequenciais, iniciando pela coleta dos linfonodos (LN), em frigorífico, de vacas cujo destino anterior era produção de leite e foram descartadas para o abate, sendo retirados: LN intramamário, submandibular e pré-escapular. A coleta foi realizada durante a inspeção na linha de abate, sendo os LN retirados nesta mesma sequência. Após a coleta, os LN eram colocados em sacos plásticos identificados de acordo com sua localização na carcaça, foram colocados em uma caixa de isopor contendo gelo para preservar as amostras até serem transportadas ao Laboratório de Histopatologia da UNIJUI.

A segunda parte foi a análise macroscópica dos linfonodos, sendo avaliados a cor, a consistência, tamanho e aspecto dos linfonodos coletados, além de lesões ou achados post-mortem, sendo necessária essa etapa logo após a coleta para preservar as características da amostra. Após a análise macroscópica e identificação do linfonodo, cada amostra foi colocada individualmente em um recipiente contendo formol a 10% (uma parte de formol concentrado para nove partes de água) para preservação através da fixação dos tecidos.

Passadas 48 horas, as amostras já fixadas foram clivadas em 3mm de espessura máxima. Os fragmentos de cada linfonodo foram colocados em cassetes histológicos (forma plástica para processamento de amostras de tecidos), e passaram pelo processamento em aparelho denominado histotécnico. Após completo o ciclo histotécnico, as amostras foram retiradas do equipamento e colocadas sobre placa aquecida, onde foram aquecidas entre 65 e 70 °C e logo passavam para o próximo processo, no qual foi utilizado um dispensador de parafina para preencher moldes de aço com parafina líquida, formando um bloco de parafina contendo a amostra de tecido em seu interior. Os blocos foram resfriados até temperatura ambiente, sendo então resfriados em geladeira e após no congelador, passando para o processo de corte com a utilização do micrótomo, onde foram retiradas fitas de parafina contendo a amostra de tecido do bloco, e neste caso o corte tinha exatamente 3 micrômetros de espessura. As fitas eram colocadas em água quente em banho-maria histológico, a 48°C e então coletadas com lâmina de vidro de ponta fosca, que descansava em temperatura ambiente por 30 minutos, e após era colocada em estufa a 60°C para secar, derreter a parafina e retirar o excesso desta. Após secagem, as lâminas foram coradas com H&E (Hematoxilina e Eosina), que consistiu de diferentes banhos de xilol, álcool e água antes e depois

Evento: XXV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

de passar pelos corantes tendo duração de 1 minuto nos banhos, 2 minutos na Hematoxilina e 30 segundos na Eosina. Finalizando esta etapa as lâminas recebiam uma lamínula colada com adesivo sintético. Após este processo, as lâminas estavam prontas para a terceira etapa, análise em microscópio de luz.

RESULTADOS

Na análise macroscópica dos linfonodos, 70% das amostras apresentaram aumento da camada cortical que invadia a camada medular, além de outros achados macroscópicos. As alterações encontradas nos linfonodos de cada categoria estão descritas no quadro 1 (Quadro 1).

As proliferações encontradas foram possíveis de evidenciar ao corte dos LN, e eram de cor clara, algumas coalescentes, salientes a ponto de comprimir a camada medular adjacente, que invadiam e ocupavam grande espaço da camada medular, na maioria dos casos.

Quadro 1: Alterações macroscópicas dos linfonodos de bovinos leiteiros abatidos em frigorífico sob inspeção estadual.

Alterações macroscópicas	Intramamário	Pré-escapular	Submandibular
Proliferação da camada cortical	15	14	3
Espessamento cortical	3	15	8
Bordas arredondadas	12	2	2
Coloração Acinzentada	7	3	3
Coloração amarelada	1	5	2
Presença de Nódulo hemolinfoide	2	2	5
Hemorragias	6	8	5
Formato arredondado	5	3	1
Linfonodos sem alterações	0	0	3

Quadro 2 - Alterações microscópicas observadas em análise histopatológica

Alterações microscópicas	Intramamário	Pré-escapular	Submandibular
Hiperplasia linfoide			
Ausente	0	0	4
Leve	6	1	2
Moderada	4	9	5
Acentuada	6	6	3
Em região Cortical	17	16	10
Em região Paracortical	11	8	8
Preenchimento do seio medular			
Fisiológico	7	11	9
Moderado	8	3	5
Acentuado	2	2	0

Evento: XXV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

Na avaliação microscópica das amostras coletadas, a principal alteração observada foi a hiperplasia linfoide, que ocorreu nos linfonodos pré-escapular e intramamário, mas somente em algumas amostras de linfonodos submandibulares. As alterações observadas estão descritas e quantificadas no quadro 2 (Quadro 2).

O preenchimento do seio medular foi avaliado, sendo que em muitos casos o mesmo estava normal (fisiológico), mas em outros casos a celularidade do seio era elevada, apresentando as seguintes células: linfócitos, macrófagos, plasmócitos, macrófagos ativados e eosinófilos.

Foram encontrados macrófagos ativados sendo que o nível do mesmo variou de raros a acentuados. Também foram observadas em algumas amostras presença de eosinófilos, variando de nível raro a acentuado, não somente no seio medular, mas também na capsula do linfonodo, sendo este um achado microscópico inespecífico.

DISCUSSÃO

Os linfonodos são estruturas discoides a ovoides e que variam de tamanho de animal para animal e também de acordo com a espécie. Sua estrutura consiste de uma camada cortical externa e outra interna (Paracortical) e outra camada medular, onde encontram-se os seios medulares e as trabéculas. Estas camadas são revestidas por uma cápsula de tecido conjuntivo denso que se ramifica em direção ao seio medular formando trabéculas onde vasos linfáticos vão depositar a linfa direto no seio medular (FIGHERA e GRAÇA, 2010).

Nas amostras analisadas macroscopicamente, as mesmas apresentaram aumento de tamanho, espessamento cortical e múltiplas proliferações invadindo a camada medular, e em muitos casos, não sendo possível delimitar a separação entre as camadas do LN, semelhante ao descrito por FIGHERA e GRAÇA (2010), para leucose, assim como as massas coalescentes e nodulações esbranquiçadas descritas, que também foram observadas na maioria das amostras.

Histopatologicamente, os linfomas são classificados quanto ao seu tipo celular envolvido (Células B ou T, maturidade das células, tamanho dos núcleos), e apresentam desarranjo da arquitetura do tecido do linfonodo. Em alguns casos, quando o linfoma apresenta forma folicular, se assemelha a hiperplasia linfoide folicular pelo aumento do número de folículos, porém a diferença principalmente do núcleo das células neoplásicas permite sua diferenciação (KIUPEL, 2015; VALLI, et. al. 2017).

Nas amostras avaliadas, a organização celular do tecido linfoide não estava obliterada, mas hiperplásica. A alteração proliferativa mais frequente vista em linfonodos é a hiperplasia folicular, sendo que a mesma ocorre com frequência em doenças virais ou outros agentes patogênicos como protozoários ou bactérias. Microscopicamente, a hiperplasia é o aumento do número e tamanhos dos folículos linfoides e centros germinativos, que ficam bem evidentes, denominada então de hiperplasia linfoide folicular, ou ainda, como proliferação linfocitoplasmocitária da zona paracortical - Hiperplasia linfoide Paracortical (FIGHERA e GRAÇA, 2010; KIUPEL, 2015).

A hiperplasia folicular ocorre quando um antígeno é apresentado ao linfonodo, ficando o mesmo reativo e fazendo a hiperplasia linfoide folicular tanto das porções corticais quanto paracorticais (FIGHERA e GRAÇA, 2010; KIUPEL, 2015). Dependendo do tipo de material encontrado na linfa que é drenada ao linfonodo, o grau de hiperplasia pode variar, alterando o linfonodo regional que drena o material, e o tipo celular encontrado é diferente, como em casos de alta fagocitose de células (como na alta descamação por mastite por exemplo), haverá mais macrófagos presentes, já em casos onde há drenagem de lesões supurativas, haverá maior quantidade de neutrófilos

Evento: XXV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

(KIUPEL, 2015; VALLI, et. al. 2017).

Em alguns casos, a hiperplasia folicular é permanente, sendo algumas doenças como: rangeliose, erliquiose, teileriose, doença das martas aleutianas, doenças de membrana e febre catarral maligna, que fazem a estimulação permanente dos linfonodos (FIGHERA e GRAÇA, 2010).

CONCLUSÃO

As alterações macroscópicas encontradas nos linfonodos coletados durante o abate foram, em alguns casos, semelhantes as observadas de casos de leucose. Entretanto, a análise histopatológica permitiu diferenciar com clareza que as amostras coletadas apresentavam hiperplasia folicular linfoide. No presente estudo não foram observados casos de leucose bovina, sendo necessário continuar a pesquisa de incidência para considerar a região como livre.

Palavras-chave: Leucose, linfonodos, bovinos leiteiros, histopatologia

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARROS, I. R. F. et. al. Prevalência da leucose enzoótica em bovinos leiteiros criados na região metropolitana de Curitiba - Paraná. *Ciência Animal Brasileira* (2009): 513-518.
- BIRGEL, E. H. J. et. al. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos em animais da raça simental, criados no estado de são paulo. *Ars veterinaria*, Jaboticabal, SP, Vol. 22, nº2, 122-129, 2006.
- DA, Y. et. al. Milk and fat yields decline in bovine leukemia virus-infected Holstein cattle with persistent lymphocytosis. *Agricultural Sciences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 90, pp. 6538-6541, July 1993.
- FIGHERA, R. A. ; GRAÇA, D. L. Sistema Hematopoiético. In: SANTOS, R. L. ; ALESSI, A. C. *Patologia Veterinária*. 1. ed. São Paulo: Roca, 2010. cap. 6, pg. 342, 361 - 366.
- KIUPEL, M. et. al. Hematopoietic System. In: JUBB, K. V. F. ; KENNEDY, P. C. ; PALMER, N. C. *Pathology of Domestic Animals*. 6. ed. Canada: Elsevier, 2015, V. 3, cap. 2, pg 203 - 208, 234-238.
- LAAN, C. W. V. D. et. al. Leucose enzoótica bovina em bovinos produtores de leite importados do uruguai. *Pesqui. Agropecu. Gaúcha* 5.1 (1999): 139-141.
- PEREIRA, A. L. M. et. al. Soroprevalência da leucose enzoótica bovina. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v. 23, n. 1, p. 1-19, 2013.
- RICHTER, D. L., et al. Relato de caso de leucose enzoótica bovina em uma propriedade no município de pejuçara. *Salão do Conhecimento* 1.1 (2015).
- SILVA, P. L. Avaliação de alternativas de controle de Leucose Enzoótica Bovina em Rebanho Bovino de Leite. *Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais*. Minas Gerais, 1988.
- SOUZA, F. N. et. al. Proliferação de linfócitos e apoptose de células CD5+ de bovinos infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* vol.63 no.5 Belo Horizonte Oct. 2011.
- VALLI, V. E. et. al. Tumor of the Hemolymphatic System. In: MEUTEN, J. D. *Tumors in Domestic animals*. 5. ed. USA: Wiley Blackwell, 2017, cap.5, pg 234-235.