

Imunomarcção de células CD3+ e CD79a+ nas lesões descamativas e ulcerativas de cães com leishmaniose¹

Expression of CD3 and CD79a cell markers in exfoliative and ulcerative skin lesions in dogs with leishmaniasis

Rafael Torres Neto^{2*}; Marcela Marcondes Pinto Rodrigues³;
Renée Laufer Amorim⁴; Lissandro Gonçalves Conceição⁵;
Maria Cecília Rui Luvizotto⁶; Sônia Regina Verde Silva Franco⁷

Resumo

A leishmaniose visceral canina é uma doença infecciosa crônica considerada endêmica em algumas regiões do estado de São Paulo e, apesar de ser uma enfermidade sistêmica, no cão, a maioria dos sinais clínicos são dermatológicos. Foram avaliados trinta cães com diagnóstico de leishmaniose, da região de Araçatuba, pelos exames parasitológico (punção aspirativa por agulha fina de linfonodos) e sorologia (IFI). Os cães apresentando unicamente sinais dermatológicos formam divididos em dois grupos: um grupo com descamação e outro com ulceração. Houve diferença estatística entre a população de células CD3+ e CD79a+ dentro do mesmo padrão dermatológico, o mesmo ocorreu com a população de CD79a+ entre os padrões descamativo e ulcerativo ($p < 0,05$).

Palavras-chave: Dermatite descamativa, dermatite ulcerativa, leishmaniose, imunoistoquímica, cão

Abstract

Canine visceral leishmaniasis is an endemic infectious disease in some regions from São Paulo state and even though it is a systemic disease, in the dog, the main clinical sign is dermatological. Thirty dogs with positive results in serology (IFI) and parasitological exams (fine needle aspiration) for leishmaniasis from Araçatuba city were evaluated. They only showed dermatological signs and were divided in two groups, one with exfoliative ($n=15$) and other with ulcerative ($n=15$) lesions. There was significant statistical difference between CD3 and CD79a population in the same dermatological pattern, and with CD79a population between exfoliative and ulcerative patterns ($p < 0,05$).

Key words: Exfoliative dermatitis, ulcerative dermatitis, leishmaniasis, immunohistochemistry, dog

¹ Apoio financeiro: FUNDUNESP.

² Aluno do programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (área de concentração: Clínica Veterinária, nível Doutorado), UNESP, Botucatu. E-mail: rphortres@yahoo.com.br.

³ Aluna do programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (área de concentração: Clínica Veterinária, nível Doutorado), UNESP, Botucatu.

⁴ Professora, Doutora, Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP.

⁵ Professor, Doutor, Departamento de Veterinária, UFV, Viçosa, MG.

⁶ Professora, Doutora, Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária, FOA, UNESP, Araçatuba, SP.

⁷ Professora, Doutora, Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP.

* Autor para correspondência

Introdução

A leishmaniose visceral americana (LVA) é uma doença infecciosa de evolução crônica causada pelo protozoário *Leishmania chagasi*, transmitido, principalmente, pelo vetor *Lutzomyia longipalpis*, conhecido popularmente como mosquito palha, birigui ou tatuquiras. Em algumas regiões da Colômbia e Venezuela, o vetor é o *Lutzomyia evansi* e, no Brasil, no estado do Mato Grosso, o *Lutzomyia cruzi* também foi incriminado como vetor da doença (SANTOS et al., 1998). A espécie canina é considerada o principal reservatório doméstico, constituindo parte do ciclo epidemiológico de transmissão ao homem (LAISON; SHAW, 1987). A leishmaniose canina (LC) e a leishmaniose visceral humana são endêmicas em muitos estados do Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil. (EVANS et al., 1990; COSTA et al., 1991) e um número crescente de casos tem ocorrido em algumas regiões do estado de São Paulo (FEITOSA et al., 2000).

Apesar da natureza viscerotrópica do protozoário, as lesões dermatológicas são as mais frequentes, podendo representar o único sinal clínico da doença (KOUTINAS et al., 1993, PAPADOGIANNAKIS et al., 2005). Ferrer et al. (1988) propuseram quatro padrões clínicos para as lesões dermatológicas na leishmaniose visceral canina: padrão alopecico-descamativo, ulcerativo, nodular e pustular estéril.

Esta variação na manifestação clínica da leishmaniose canina se deve a vários mecanismos patológicos da doença e a diversidade de respostas imunológicas do hospedeiro (BRACHELENTE et al., 2005; PAPADOGIANNAKIS et al., 2005; SOLANO-GALLEGO et al., 2004). A resposta imune à infecção por *Leishmania*, no cão, pode ser tanto predominantemente celular como humoral (SLAPPENDEL; FERRER, 1998). Muitos estudos em cães e animais de laboratório e no homem têm demonstrado, que uma resposta imune predominantemente mediada por linfócito T auxiliar do tipo 1 (T_H1) está associada a uma imunidade protetora, enquanto que um predomínio na produção

de anticorpos e ausência de imunidade celular mediada está associada a susceptibilidade à doença (PINELLI et al., 1994a e 1994b). Lesões alopecicas e descamativas, em cães com leishmaniose visceral, caracterizadas por imunoistoquímica, demonstraram na epiderme células de Langerhans e queratinócitos expressando complexo de histocompatibilidade maior de classe II e na derme um infiltrado inflamatório com predomínio de células T. Estas lesões apresentaram baixo número de formas amastigotas dentro dos macrófagos, indicando uma boa resposta imune frente ao agente (FONDEVILA; VILAFRANCA; FERRER, 1997; PAPADOGIANNAKIS et al., 2005).

O objetivo deste trabalho foi quantificar as células CD3+ (linfócitos T) e CD79a+ (linfócitos B) por imunoistoquímica em cães naturalmente infectados por *Leishmania* com lesões dermatológicas descamativas e ulcerativas.

Material e Métodos

Animais

Foram utilizados trinta cães, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses do município de Araçatuba, região endêmica para a leishmaniose visceral. A confirmação do diagnóstico foi realizada pela detecção do parasita em esfregaços citopatológicos de punção aspirativa por agulha fina de linfonodo poplíteo, corados pelo Giemsa (MOREIRA et al., 2002) bem como, pela reação de imunofluorescência indireta (IFI) de amostras de soro obtidas do sangue coletado por punção veno-jugular. Este último exame foi realizado pelo Laboratório de Sanidade Animal, da Universidade Federal do Piauí, na qual todas as amostras resultaram-se acima do ponto de corte positivo (1:40) (EVANS et al., 1990).

Os animais com diagnóstico confirmado foram divididos em dois grupos de acordo com o padrão dermatológico descamativo (DD) (n=15) e ulcerativo (DU) (n=15). Os cães incluídos nos dois grupos não apresentavam sinais de alteração sistêmica da doença.

Exame histopatológico, imunoistoquímica e contagem celular

Fragmentos de pele foram colhidos de áreas com descamação e ulceração, após a eutanásia dos animais. A eutanásia dos cães é uma norma para o controle da leishmaniose visceral americana no Brasil (BRASIL, 2003) e foi aprovado pelo comitê de Ética e Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp, Botucatu, São Paulo. Após a coleta, as amostras foram fixadas em formol tamponado a 10% e processadas rotineiramente para histologia. Para cada caso foram preparados cortes seriados de 4 µm, sendo uma lâmina para avaliação dos padrões histopatológicos e duas lâminas preparadas com cola (POLY-L-LYSINE SOLUTION cod P8920 – Sigma-Aldrich), cuja finalidade é manter a aderência do corte histológico na lâmina, para realização do exame imunoistoquímico.

Os anticorpos primários utilizados para a reação de imunoistoquímica foram o anti-CD3, na diluição de 1:25 (anticorpo primário anti-molécula CD3, que está associado ao TCR, cedido pelo Dr. Peter F. Moore, Davis, Califórnia-USA) e o anti-CD79a, na diluição de 1:50 (anticorpo monoclonal anti-humano, DakoCytomation cod. M7051) que reconhece a molécula Ig alfa do receptor de células B.

Após a desparafinização e hidratação dos cortes foi realizada a recuperação antigênica com uma solução pré-aquecida de EDTA 10 mM, pH 8,0, em banho-maria a 96°C durante 25 minutos. Em seguida o material foi resfriado a temperatura ambiente por 20 minutos e submetido ao bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 3% por 30 minutos. Depois da incubação com os anticorpos primários (18 horas a 4°C) e dois banhos em solução de TRIS pH 7,4 (TRIZMA BASE, Sigma-Aldrich cod. D5637) foi utilizado o sistema de detecção ENVISION (ENVISION+DUAL LINK SYSTEM, Peroxidase, DakoCytomation cod.K4061) por 1 hora, em temperatura ambiente. Após dois banhos em solução de TRIS, a reação foi visualizada com a

utilização do substrato cromógeno DAB (LIQUID DAB LARGE VOLUME SUBSTRATE CHROMOGEN SYSTEM, DakoCytomation cod.K3466) e contra-coloração com hematoxilina de Mayer e, por fim, a desidratação e montagem das lâminas que foram levadas à microscopia óptica para ser avaliada a imunomarcção.

A contagem das células positivas para CD3 e CD79a foi realizada com a objetiva de 40 vezes em dez campos escolhidos aleatoriamente na lâmina contendo a derme dos cães com dermatite descamativa (n=15) e dermatite ulcerativa (n=15), que representa o número absoluto de células contadas nestes campos, utilizando um microscópio óptico (Leica DMLD) acoplado a uma câmera Sony (Sony Hyper HAD, CCD – IRIS/RGB Color video câmera) a imagem foi capturada e analisada pelo programa KS 300, v.3.0.

Análise estatística

Utilizou-se o delineamento experimental por meio do procedimento “PROC GLM” do software SAS versão 8.2 (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, 1999). Os dados expressos em valores reais, foram analisados a partir de transformação logarítmica (Log de X na base 3), devido aos elevados valores dos coeficientes de variação das amostras estudadas (SAMPAIO, 2002). A comparação entre os valores de células CD3+ e células CD79a+ dentro de um mesmo padrão dermatológico descamativo ou ulcerativo e entre padrões foi realizada com o teste de Tukey (p<0,05).

Resultados

Diagnóstico, lesões cutâneas e histopatologia

Os títulos sorológicos obtidos pela IFI foram 80 (dois cães 2/30), 160 (cinco cães 5/30), 320 (quatorze cães 14/30), 640 (cinco cães 5/30) e 1280 (quatro cães 4/30). Todos os animais apresentaram formas amastigotas no exame citopatológico de linfonodo poplíteo.

Os cães com padrão dermatológico descamativo (n=15) apresentavam distribuição generalizada com escamas secas do tipo micácea e furfurácea, de cor branca a prateada (100%).

Todos os cães com padrão dermatológico ulcerativo apresentavam úlceras na região úmero-rádio-ulnar (100%); região do calcâneo (86,6%); da tuberosidade isquiática (80%); da superfície metatarso-tarsiana (60%); pavilhão auricular (20%); da superfície metacarpo-carpiana (13,3%) e regiões da narina, face, lábio, periocular, tóraco-ventral e lombossacra (6,6%). Três cães deste grupo apresentavam discreta descamação. Hipotricose e alopecia não foram observadas neste grupo, inclusive na região periocular.

Ao exame histopatológico do grupo DD observou-se infiltrado inflamatório granulomatoso (86,6%) e piogranulomatoso (13,3%), já nos cães com DU foi observado infiltrado piogranulomatoso (53,3%) e granulomatoso (46,6%).

Os padrões histopatológicos encontrados nos cães com DD foram: dermatite perianexial (33,3%), dermatite perivascular superficial (6,6%), dermatite nodular (6,6%), e as dermatites mistas, onde houve associação de dois padrões histopatológicos no mesmo corte (53,3%), sendo, dermatite intersticial/perianexial (12,5%), dermatite liquenóide/perivascular superficial e profunda (12,5%), dermatite perivascular superficial e profunda/perianexial (12,5%) e dermatite perivascular superficial/perianexial (62,5%). A presença de formas amastigotas foi observada em 53,3% dos cães.

Os padrões histopatológicos nos cães com DU foram: dermatite perivascular superficial e profunda (33,3%), dermatite difusa (20%), dermatite perianexial (13,3%), dermatite nodular (6,6%), e as mistas (26,6%), representadas por dermatite intersticial/perivascular

superficial e profunda (25%), dermatite nodular/perianexial (25%), dermatite fibrosante/perianexial (25%) e dermatite perivascular superficial e profunda/perianexial (25%). A presença de formas amastigotas foi observada em 46,6% dos cães.

Imunoistoquímica

Os resultados da média da contagem do número de células CD3 e CD79a positivas na derme dos cães com lesões descamativas (n=15) e ulcerativas (n=15) estão descritos na tabela 1. A positividade das células CD3 (Figura 1) foi maior do que a positividade das células CD79a (Figura 2) em vinte e nove amostras, excetuando-se em um cão com padrão dermatológico ulcerativo e respectivo padrão histopatológico perianexial. Houve diferença estatística na contagem de células CD3+ entre os padrões dermatológicos descamativos e ulcerativos e as células CD79a+ foram mais frequentes na dermatite ulcerativa do que na dermatite descamativa, havendo diferença estatística entre elas (tabela 2). A relação CD3/CD79a nos padrões histopatológicos dos cães com lesões descamativas (n=15) foi 3,39 na dermatite perianexial (n=5); 8,37 na dermatite perivascular superficial (n=1); 9,46 na dermatite nodular (n=1); 6,00 na dermatite intersticial/perianexial (n=1); 8,64 na dermatite liquenóide/perivascular superficial e profunda (n=1); 21,94 na dermatite perivascular superficial e profunda/perianexial (n=1) e 6,57 na dermatite perivascular superficial/perianexial (n=5). A relação CD3/CD79a nos cães com lesões ulcerativas (n=15) foi 1,96 na dermatite perivascular superficial e profunda (n=5); 7,38 na dermatite difusa (n=3); 1,59 na dermatite perianexial (n=2); 10,81 na dermatite nodular (n=1); 5,7 na dermatite intersticial/perivascular superficial e profunda (n=1); 7,32 na dermatite nodular/perianexial (n=1); 1,71 na dermatite fibrosante/perianexial (n=1) e 3,05 na dermatite perivascular superficial e profunda/perianexial (n=1).

Tabela 1. Média do resultado da contagem total de células CD3 e CD79a nos padrões histopatológicos dos cães com lesões descamativas (n=15) e ulcerativas (n=15).

Padrão histopatológico	Dermatite descamativa		Dermatite ulcerativa	
	CD3	CD79a	CD3	CD79a
misto intersticial+perianexial	75,7 ^a (n=1)	12,6 ^a (n=1)	-	-
misto intersticial+perivascular (superficial) e (profundo)	-	-	62,7 ^b (n=2)	11 ^b (n=2)
misto pv (s)+perianx	80,3 (n=5)	12,2 (n=5)	-	-
misto pv (s) e (p)+perianx	37,3 ^a (n=1)	1,7 ^a (n=1)	47,7 ^b (n=1)	15,6 ^b (n=1)
misto líquen+ pv (s) e (p)	166,9 ^a (n=1)	19,3 ^a (n=1)	-	-
misto nod+perianx	-	-	85 ^b (n=1)	11,6 ^b (n=1)
misto fibros+perianex	-	-	25,1 ^b (n=1)	14,6 ^b (n=1)
Dermatite (D) pv (s)	69,5 ^a (n=1)	8,3 ^a (n=1)	-	-
D pv (s) e (p)	-	-	80,2 (n=5)	40,7 (n=5)
D perianx	55,8 (n=5)	16,4 (n=5)	128,7 (n=2)	80,5 (n=2)
D nod	19,3 ^a (n=1)	20,4 ^a (n=1)	64,9 ^b (n=1)	6 ^b (n=1)
D dif	-	-	77,1 (n=3)	10,4 (n=3)

Médias na mesma coluna seguidas por letras diferentes (a, b), diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05)

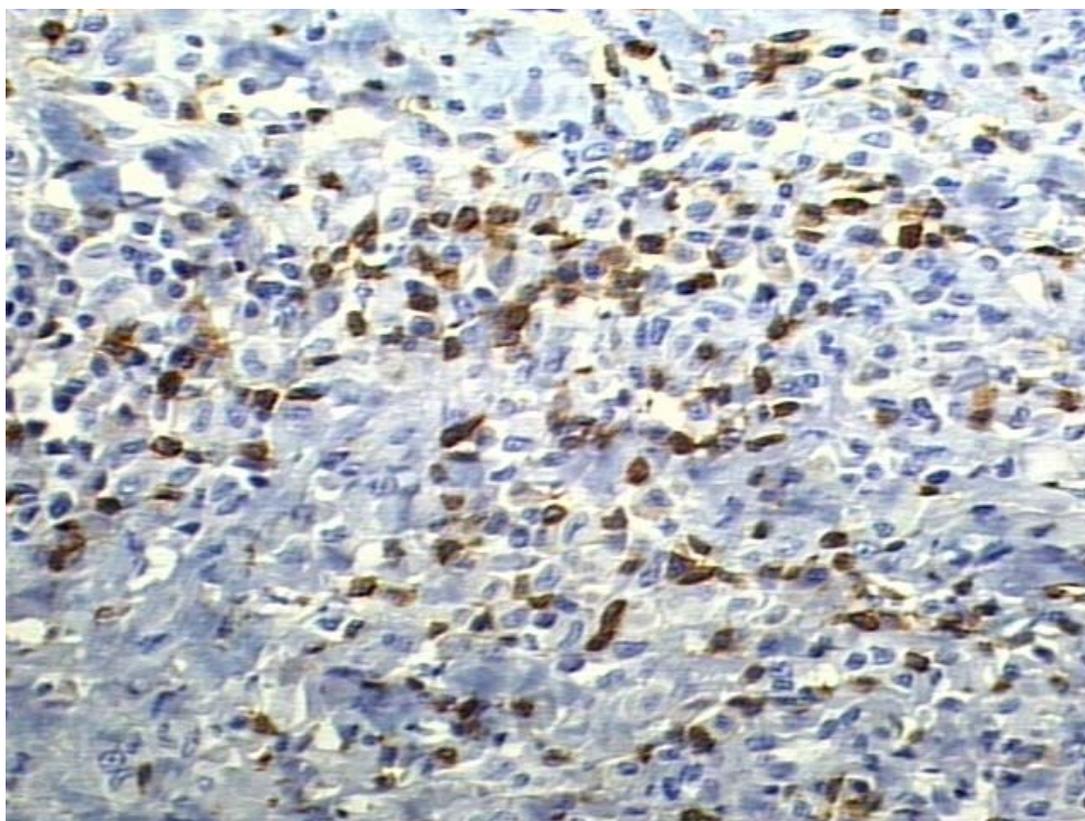


Figura 1. Reação de imunistoquímica em lesão de pele do tipo descamativa, em cão com leishmaniose visceral. Positividade para o anticorpo anti-CD3, objetiva de 40x, Envision, DAB e contra-coloração Hematoxilina.

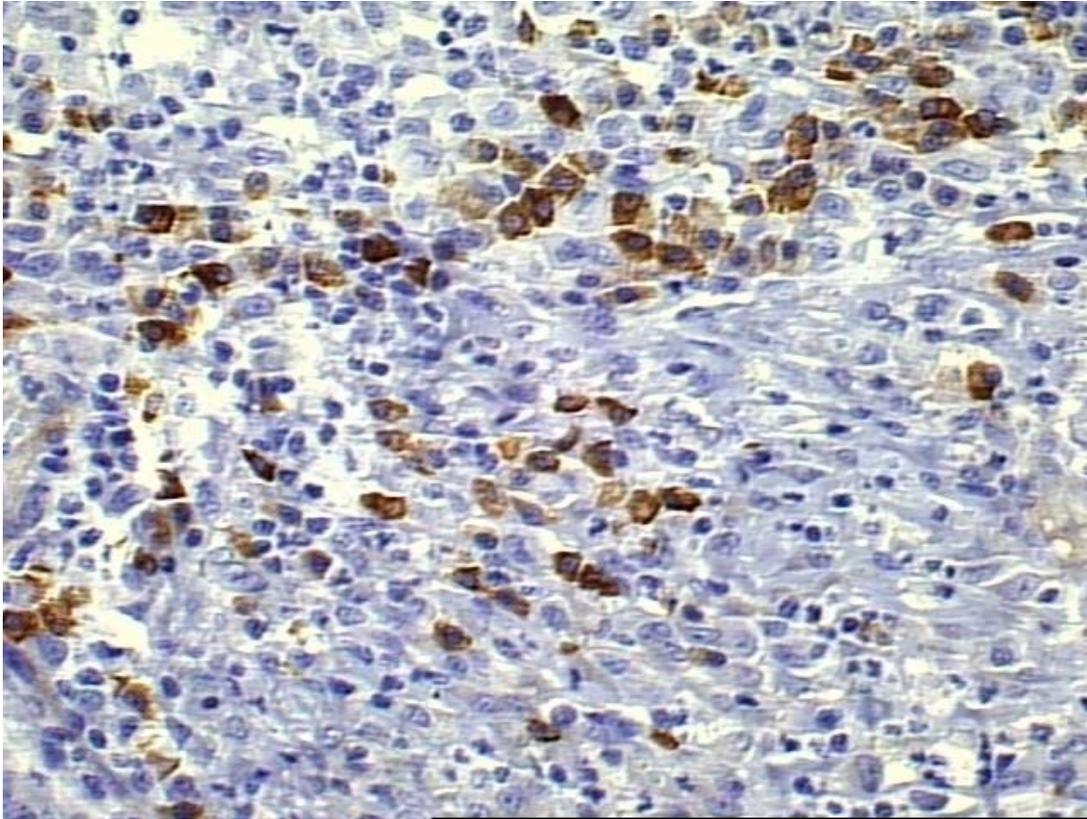


Figura 2. Reação de imunistoquímica em lesão de pele do tipo ulcerativa, em cão com leishmaniose visceral. Positividade para o anticorpo anti-CD79a, objetiva de 40x, Envision, DAB e contra-coloração Hematoxilina.

Tabela 2. Média e desvio padrão da imunomarcção de CD3 e CD79a nas lesões cutâneas de cães com leishmaniose visceral.

Grupos dermatológicos	CD3+	CD79a+
descamativo	81.55 ± 53.41 ^a	13.70 ± 13.95 ^a
ulcerativo	78.35 ± 40.09 ^b	30.32 ± 37.44 ^b

Médias na mesma coluna seguidas por letras diferentes (a, b), diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Discussão

Os linfócitos expressam um grande número de moléculas diferentes, ou “imunomarcadores”, em suas membranas, que podem ser utilizados para distinguir várias subpopulações celulares (BACCHI; BACCHI; WARNKE, 1990). Estas moléculas atualmente podem ser identificadas com o emprego de anticorpos monoclonais e policlonais em tecidos incluídos em parafina (BACCHI; BACCHI, 1990). O sistema CD, cujo termo significa grupo de

diferenciação, é uma nomenclatura que se refere a grupos de anticorpos que se ligam especificamente a uma determinada molécula. O sistema CD surgiu a partir de análises de anticorpos monoclonais, produzidos principalmente em camundongos contra antígenos leucocitários humanos (BACCHI; BACCHI; WARNKE, 1990).

Na medicina veterinária, estudos foram desenvolvidos em vários laboratórios e, um Simpósio Internacional em 1994 determinou não só os padrões

de ligação dos anticorpos monoclonais às diferentes populações de linfócitos caninos como também os pesos moleculares destes marcadores, de modo semelhante ao modelo humano (GEBHARD; CARTER, 1992; CHABANNE et al., 1994; COBBOLD; METCALFE, 1994). Estudos posteriores também caracterizaram anticorpos monoclonais específicos contra os leucócitos caninos (RABANAL; FERRER; ELSE, 1995; RIVAS et al., 1996; WILLIAMS, 1997). Muitos anticorpos de uso humano são validados para a utilização em imunistoquímica em tecidos caninos (HAINES; CHELACK, 1991; CHABANNE et al., 1994).

A molécula CD3 está associada à molécula do complexo de receptor de células T (TCR), sendo expresso sobre a superfície de linfócitos T (TIZARD 2002). Essas proteínas são variáveis e estão envolvidas na transdução de sinais após a ligação antigênica às células T. Existem dois tipos de receptores de células T: $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$, cada qual associado ao complexo CD3. A expressão do componente CD3 é limitado às células T maduras, embora células NK ativadas podem expressá-la no seu citoplasma (MOORE et al., 1998).

O receptor de células B (BCR) consiste de imunoglobulinas de superfície ligadas a duas moléculas que possuem função de transmitir sinal de transdução, sendo designados como CD79a e CD79b. O CD79a é expresso em todas as fases do desenvolvimento dos linfócitos B e persiste até o estágio de plasmócitos (MOORE et al., 1998).

A leishmaniose visceral canina pode se desenvolver em uma infecção aguda ou crônica dependendo das características individuais do parasito e do sistema imunológico do hospedeiro (PINELLI et al., 1994a). Ainda, uma latência, e até mesmo a cura espontânea pode ocorrer (SLAPPENDEL; FERRER, 1998). A resposta imune frente à infecção pode se dar por meio da formação de anticorpos (células CD79a+), sendo esta uma resposta imunológica humoral, ou por células efetoras (células CD3+), sendo esta uma resposta imunológica celular (TIZARD, 2002).

Em nosso estudo, tanto nos cães com padrão dermatológico descamativo quanto o ulcerativo foi observado uma maior contagem de células CD3+, demonstrando um predomínio de uma resposta imune celular sob a humoral. A exceção ocorreu em um caso de um cão com dermatite ulcerativa e respectivo padrão histopatológico perianexial. Neste animal, na histologia, também foram encontrados ácaros do gênero *Demodex*, o que hipoteticamente pode-se relacionar a um quadro imunossupressivo de caráter genético em relação ao ácaro ou adquirido devido a infecção por *Leishmania* (MOZOS et al., 1999).

No padrão dermatológico descamativo de cães com leishmaniose visceral pode ocorrer a eliminação do agente na derme devido uma efetiva apresentação antigênica e ativação macrofágica (FONDEVILLA; VILAFRANCA; FERRER, 1997; PAPADOGIANNAKIS et al. 2005). Em nosso estudo não foi possível detectar as formas amastigotas em 7/15 (46,7%) cães com descamação. Nos cães com padrão dermatológico ulcerativo não foi possível encontrar o agente em 8/15 casos (53,3%). FERRER et al. (1988) relataram uma maior dificuldade em encontrar as leishmânias em lesões ulcerativas, porém não correlacionaram este achado com um padrão de resposta imunológica.

Na leishmaniose visceral canina as subpopulações de linfócitos T auxiliares 1 secretam interleucina-2 e 12, interferon gama e fator de necrose tumoral que desencadeiam uma resposta imuno-celular protetora, conduzindo a resistência à doença (PINELLI et al., 1994a). Em contrapartida, as células Ta2 desencadeiam a proliferação de linfócitos B e uma resposta imune-humoral não protetora. Esta resposta causa uma exacerbação da infecção, sendo demonstrada pela hipergamaglobulinemia e por altos títulos de anticorpos produzidos pelos cães (SLAPPENDEL; FERRER, 1998). Em nosso estudo não obtivemos correlação estatística entre os cães que apresentavam uma grande quantidade de células CD79a+ e título alto na reação de imunofluorescência indireta. A produção exagerada de anticorpos produz

imunocomplexos circulantes, podendo levar aos quadros de vasculite, uveíte, poliartrite e glomerulonefrite (PINELLI et al., 1994a; SLAPPENDEL; FERRER, 1998). Na dermatite ulcerativa foi observado uma maior população de células CD79a+ em relação ao grupo de cães com dermatite descamativa e isto pode ser explicado devido a solução de continuidade na pele ulcerada e maior invasão bacteriana com conseqüente resposta imune-humoral contra estas bactérias (TIZARD, 2002).

Os linfócitos T citotóxicos também contribuem com a produção de interferon gama, levando a lise direta de macrófagos infectados (PINELLI et al., 1994b). No presente trabalho, não há subsídios suficientes para a hipótese de uma imunocompetência tegumentar mais específica no desenvolvimento das lesões descamativas ou ulcerativas, à medida que as populações de linfócitos CD4+, CD8+, a produção de citocinas e a capacidade linfoproliferativa não foram avaliadas (FONDEVILA; VILAFRANCA; FERRER, 1997; PAPADOGIANNAKIS et al., 2005; PINELLI et al., 1994a).

Conclusão

Os linfócitos T (CD3+) predominaram tanto nas lesões descamativas quanto nas lesões ulcerativas nos cães com leishmaniose, indicando um predomínio de resposta imunológica celular em relação a humoral.

Agradecimento

Ao Laboratório de Sanidade Animal, da Universidade Federal do Piauí e FUNDUNESP.

Referências

BACCHI, C. E.; BACCHI, M. M.; WARNKE, R. A. Nomenclatura CD. *Revista brasileira de cancerologia*, Rio de Janeiro, v. 36, p. 75-77, 1990.

BRACHELENTE, C.; MULLER, N.; DOHERR, M. G.; SATTLER, U.; WELLE, M. Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T helper-2-biased immune response. *Veterinary Pathology*, United States, v. 42, p. 166-175, 2005.

BRASIL - Ministério da Saúde. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

CHABANNE, L.; MARCHAL, T.; KAPIANSKI, C.; FOURNEL, C.; MAGNOL, J. P.; MONIER, D. R. Screening of 78 monoclonal antibodies direct against human leukocyte antigens for cross-reactivity with surface markers on canine lymphocytes. *Tissue Antigens*, Copenhagen, v. 43, p. 202-205, 1994.

COBBOLD, S.; METCALFE, S. Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: Summary of the first International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW). *Tissue Antigens*, Copenhagen, v. 43, p. 137-154, 1994.

COSTA, C. A., GENARO, O., LANA, M., MAGALHAES, P. A., DIAS, M., MICHALICK, S. M., MELO, M. N., COSTA, R.T., MAGALHAES ROCHA, N.M., MAYRINK, W. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inqueritos epidemiológicos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, v. 24, p. 21-25. 1991.

EVANS, T. G.; VASCONCELOS, I. A. B.; LIMA, J.W.O.; TEIXEIRA, M. J.; MCAULLIFE, I. T.; LOPES, U. G.; PEARSON, R. D., VASCONCELOS, A. W. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brasil: Assessment of serodiagnostic methods. *American journal of tropical medicine and hygiene*, Mclean, v.42, p. 118-123, 1990.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). *Clínica Veterinária*, São Paulo, v. 28, p. 36-44, 2000.

FERRER, L.; RABANAL, R.; FONDEVILA, D.; RAMOS, J. A.; DOMINGO, M. Skin lesion in canine leishmaniasis. *Journal of Small Animal Practice*, Oxford, v. 29, p. 381-388, 1988.

FONDEVILA, D.; VILAFRANCA, M.; FERRER, L. Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. *Veterinary immunology and immunopathology*, Amsterdam, v. 56, p. 319-327, 1997.

GEBHARD, D. H.; CARTER, P. B.; Identification of canine T-lymphocyte subsets with monoclonal antibodies. *Veterinary immunology and immunopathology*, Amsterdam, v. 33, p. 187-199, 1992.

- HAINES, D. M.; CHELACK, B. J. technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, Columbia, v. 3, p. 101-112, 1991.
- KOUTINAS, A. F.; SCOTT, D.W.; KONTOS, V.; LEKKAS, S. Skin lesions in canine leishmaniasis (Kala-Azar): a clinical and histopathological study on 22 spontaneous cases in Greece. *Veterinary dermatology*, Oxford, v. 3, p. 121-130, 1993.
- LAISON, R., SHAW, J. J. Ecology and epidemiology: new world. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.). *The leishmaniasis in biology and medicine*. London: Academic Press, 1987. v. 1, p. 291-363.
- MOORE, P.F.; AFFOLTER, V.K.; OLIVRY, T.; SCHRENZEL, M. D. The use of immunological reagents in defining the pathogenesis of canine skin diseases involving proliferation of leukocytes. In: KWOCKHA, K. W.; WILLEMSE, T.; VON TSCHARNER, C. *Advances in veterinary dermatology*. Oxford: Butterworth Heinemann, 1998, v. 3, p. 77-94.
- MOREIRA, M. A. B.; LUVIZOTTO, M. C. R.; NUNES, C. M.; SILVA, T. C. C.; LAURENTI, M. D.; CORBERTT, C. E. P. Application of direct immunofluorescence technic for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in lymph nodes aspirates. *Brazilian journal of veterinary research and animal science*, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 103-106, 2002.
- MOZOS, E.; PEREZ, J.; DAY, M. J.; LUCENA, R.; GINEL, P. J. Leishmaniosis and generalized demodicosis in three dogs: a clinicopathological and immunohistochemical study. *Journal of comparative pathology*, Edinburgh, v. 120, p. 257-268, 1999.
- PAPADOGIANNAKIS, E. I.; KOUTINAS, A. F.; SARIDOMICHELAKIS, M.; VLEMMAS, J.; LEKKAS, S.; KARAMERIS, A.; FYTIANOU, A. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *Veterinary immunology and immunopathology*, Amsterdam, v. 104, p. 227-237, 2005.
- PINELLI, E.; BOOG, C. J. P.; RUTTEN, V. P. M. G.; VAN DIJK, B.; BERNADINA, W. E.; RUITENBERG, E. J. A canine CD8+ cytotoxic T-cell line specific for *Leishmania infantum* infected macrophages. *Tissue Antigens*, Copenhagen, v. 43, p. 189-192, 1994b.
- PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infection and immunity*, Bethesda, v. 62, p. 229-235, 1994a.
- RABANAL, R. M.; FERRER, L.; ELSE, R. W.; Immunohistochemical detection of canine leucocyte antigens by specific monoclonal antibodies in canine normal tissues. *Veterinary immunology and immunopathology*, Amsterdam, v. 47, p. 13-23, 1995.
- RIVAS, A. L.; RETWIN, B.; GREENLEE, P.; LÓPEZ, J.; FADDEN, M.; QUIMBY, F. Characterization of monoclonal antibodies direct to canine T lymphocyte markers expressed during development. *Veterinary immunology and immunopathology*, Amsterdam, v. 51, p. 1-11, 1996.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. 2.ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2002.
- SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. A.; HOFFMANN, M. P.; FREITAS, R. A.; MALACCO, M. A. F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. *Medical and veterinary entomology*, Oxford, v. 12, p. 315-317, 1998.
- SLAPPENDEL, R. J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. (Ed.). *Infectious diseases of the dog and cat*. Philadelphia: Saunders, 1998. p.450-458.
- SOLANO-GALLEGO, L.; FERNÁNDEZ-BELLON, H.; MORELL, P.; FONDEVILLA, D.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *Journal of comparative pathology*, Edinburgh, v. 130, p. 7-12, 2004.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. *User's Guide: basic and statistical*. Cary: SAS, 1999.
- TIZARD, I. R. *Imunologia Veterinária*. 6.ed. Roca: São Paulo, 2002.
- WILLIAMS, D. L. Studies of canine leucocyte antigens: a significant advance in canine immunology. *The Veterinary journal*, London, v. 153, p. 31-39, 1997.

