

RAFAEL TORRES NETO

***AVALIAÇÃO DOS PADRÕES HISTOPATOLÓGICOS DA PELE E
IMUNOMARCAÇÃO DE CÉLULAS CD3+ E CD79a+ EM CÃES
INFECTADOS NATURALMENTE POR *Leishmania* spp.***

Botucatu – SP
2005

RAFAEL TORRES NETO

***AVALIAÇÃO DOS PADRÕES HISTOPATOLÓGICOS DA PELE E
IMUNOMARCAÇÃO DE CÉLULAS CD3+ E CD79a+ EM CÃES
INFECTADOS NATURALMENTE POR *Leishmania spp.****

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Departamento:
Clínica Veterinária

Área de Concentração:
Clínica Veterinária

Orientadora:
Profa. Ass. Dra. Sônia Regina Verde da Silva Franco

Botucatu – SP
2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Torres Neto, Rafael.

Avaliação dos padrões histopatológicos da pele e imunomarcção de células CD3+ e CD79a+ em cães infectados naturalmente por *Leishmania spp.*/ Rafael Torres Neto. – Botucatu : [s.n.], 2005.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2005.

Orientador: Profª. Drª. Sônia Regina Verde da Silva Franco.

Assunto CAPES: 50501062

1. Leishmaniose. 2. Cão – Doenças – Diagnóstico. 3. Pele – Doenças – Cão.

CDD 636.08960756

Palavras chave: Canino; CD3; CD79a; Dermatopatologia; Leishmaniose visceral.

DEDICATÓRIA

“O amor é antes de qualquer coisa, um sentimento muito subjetivo. Não existe uma fórmula equacional ou um conceito único, ele é interpretado de várias maneiras, o que importa é ter *amor*”

A minha mãe Maria Cecília Dario Torres pelo *amor*, carinho, dedicação que sempre cercaram nosso relacionamento e por todas as lições que moldaram minha educação.

Aos meus avós Raphael e Maria Rosa, duas pessoas que tiveram a oportunidade de sentir o *amor* de tantas pessoas. Saudades!

Ao meu pai Dirceu, meu eterno *amor* e gratidão.

A minhas irmãs, Carolina e Natália, pelo *amor* incondicional.

À minha orientadora, **Professora Sônia Regina Verde da Silva Franco**, não só pelas orientações e oportunidades na minha formação profissional, mas também pela amizade cultivada nesses dois anos, sempre cercada de boa convivência e tolerância.

À **Professora Renée Laufer Amorim**, que além de ter tido participação fundamental para a realização deste trabalho, me possibilitou constante aprendizado sob sua orientação e tornou-se um modelo não só de profissional, mas de pessoa.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES**, cuja bolsa concedida possibilitou dedicação exclusiva na realização deste projeto.

À **Fundação para o desenvolvimento da UNESP – FUNDUNESP**, pela concessão de auxílio pesquisa referente ao processo 00819/03-DEP.

Aos docentes da Clínica de Pequenos Animais, **Flávio Quaresma Moutinho, Helena Ferreira, Denise Saretta Schwartz e Michiko Sakate**, pelos ensinamentos, conselhos e incentivos durante a residência e a pós-graduação.

Ao **Professor Lissandro Gonçalves Conceição**, pela colaboração nas leituras dos padrões histopatológicos.

Ao **Professor Viciany Erique Fabris**, pela disponibilidade em esclarecer minhas dúvidas “dermatopatológicas”, o que para mim era sempre motivo de satisfação.

Aos **Professores Júlio Lopes Sequeira e Noeme Sousa Rocha**, funcionários **Maury Raul e Noel de Almeida Mello**, pós-graduandos e residentes do Serviço de Patologia Veterinária, pela receptividade, colaboração, ensinamentos e boa convivência durante a elaboração deste trabalho.

À minha prima **Elaine** pela máquina fotográfica, periódicos e palavras de incentivo.

À residente **Marcela M. P. Rodrigues** pelo processamento das biopsias de pele do trabalho.

Ao **Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba**, que está sempre de portas abertas para estudos científicos, que de uma maneira ou de outra, ao menos, diminua o sofrimento das pessoas e cães portadores da leishmaniose visceral, isto, fica evidente na colaboração e receptividade de seus médicos veterinários e funcionários.

À **Professora Maria do Socorro Pires e Cruz e o Laboratório de Sanidade Animal – LASAN**, da **Universidade Federal do Piauí** pela realização dos testes sorológicos.

À **Professora Maria Cecília Rui Luvizotto**, pela oportunidade da realização de parte deste trabalho.

À amizade de pessoas, algumas próximas e outras distantes, que me fazem, em momentos tristes e felizes, seguir sempre em frente.....**Ana, Fabiana, Flávia, Gastão, Gato, Glauber, Ivan, Julinho, Lili, Marcos, Mariana, Mauro, Palharim, Raquel, Ricardo, Serginho, Sônia, Vinão, Wildo**.....**AMIZADE**. [Do lat. vulg. **amicitate*.] S. f. Sentimento fiel de afeição, simpatia, estima ou ternura entre pessoas.....

A todos muito obrigado.

***O que sabemos é uma gota.
O que ignoramos é um oceano.***

Isaac Newton (1643-1727)

SUMÁRIO

	PÁGINAS
RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE ABREVIATURAS	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. Dos animais	31
3.2. Confirmação do diagnóstico de leishmaniose visceral	32
3.2.1. Exame parasitológico	32
3.2.2. Reação de imunofluorescência indireta	33
3.3. Do exame histopatológico	35
3.3.1. Colheita do material	35
3.3.2. Exame histológico	36
3.4. Do exame imunoistoquímico	36
3.4.1. Padronização da técnica de imunoistoquímica	36

3.5. Análise estatística	39
4. RESULTADOS	40
4.1. Dos animais	40
4.2. Do exame histopatológico	45
4.3. Do exame imunoistoquímico	57
5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÕES	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
8. ANEXOS	83

LISTA DE FIGURAS

	<i>Página</i>
FIGURA 1 - Leishmaniose visceral canina. Exame citológico: Fotomicrografia de formas amastigotas livres (setas vermelhas) e intracelulares (seta preta). Presença de macrófago vacuolado (A), plasmócitos (B) e linfócito (C). Giemsa, objetiva de 100x.	33
FIGURA 2 - Distribuição dos cães de acordo com as diluições da RIFI para o diagnóstico da leishmaniose.	34
FIGURA 3 - Padrão de dermatite descamativa. (A) Descamação seca intensa e alopecia em região tóraco-ventral; (B) Descamação seca intensa generalizada; (C) Descamação do tipo micácea (aproximação da figura anterior); (D) Região lombossacra em um cão com intensa descamação furfurácea; (E) Alopecia em região tóraco-ventral; (F) Alopecia e escamas em região cervical e tóraco-látero-ventral.	41
FIGURA 4 - Padrão de dermatite descamativa. Quatro cães apresentando alopecia em região periocular bilateral (“óculos”) e hiperqueratose em plano nasal.	42
FIGURA 5 - Padrão de dermatite ulcerativa. Região da articulação úmero-rádio-ulnar (cotovelo). (A) úlcera circular recoberta por crosta melicérica e outra com aspecto linear recoberta por crosta hemática; (B) duas úlceras circulares com superfície eritematosa; (C) úlcera linear com borda espessa; (D) úlceras ao redor de área hiperpigmentada (D); (E e F) úlceras com fundo eritematoso e granulações grosseiras com bordas recobertas por espessa crosta hemática.	44
FIGURA 6 - LVC. DD. (A) Dermatite perianexial, infiltrado inflamatório perifolicular, HE (objetiva de 5x); (B) Dermatite nodular, infiltrado inflamatório disposto em três formações nodulares HE (objetiva de 5x).	46

FIGURA 7 -	LVC. DD. (A) Dermatite liquenóide e perivascular superficial e profunda, HE (objetiva de 5x); (B) Dermatite perivascular superficial e perianexial com hiperqueratose ortoqueratótica, HE (objetiva 10x).	46
FIGURA 8 -	Distribuição dos padrões histopatológicos na dermatite descamativa de cães com leishmaniose visceral (n=15).	47
FIGURA 9 -	Distribuição da associação de padrões histopatológicos em um mesmo corte histológico na dermatite descamativa de cães com leishmaniose visceral (n=8).	47
FIGURA 10 -	LVC. DD. (A) Dermatite perianexial. Folículo piloso dilatado com ácaros <i>Demodex</i> , HE (objetiva de 20x); (B) Estruturas fúngicas (artroconídeos) no pêlo, PAS (640x); (A e B). Associação de leishmaniose, demodicose e dermatofitose.	48
FIGURA 11 -	LVC. DD. (A) Dermatite perivascular superficial com exocitose de células mononucleares, HE (objetiva de 20x); (B) Fragmento de ácaro em meio a uma hiperqueratose paraqueratótica, HE (objetiva de 40x).	49
FIGURA 12 -	LVC. DU. (A) Dermatite perivascular superficial e profunda e perianexial, com extensa ulceração recoberta por crosta fibrinoleucocitária, HE (objetiva de 5x); (B) Dermatite difusa recoberta por úlcera apresentando colônias de bactérias na superfície, HE (objetiva de 10x).	50
FIGURA 13 -	LVC. DU. (A) Dermatite perianexial, HE (objetiva de 5x); (B) Dermatite fibrosante e perianexial, HE (objetiva de 5x).	50
FIGURA 14 -	Distribuição dos padrões histopatológicos na dermatite ulcerativa de cães com leishmaniose visceral (n=15).	51
FIGURA 15 -	Distribuição da associação de padrões histopatológicos em um mesmo corte histológico na dermatite ulcerativa de cães com leishmaniose visceral (n=8).	51

FIGURA 16 -	Comparação da distribuição dos padrões histopatológicos entre as dermatites descamativas e ulcerativas de cães com leishmaniose visceral (n=30).	52
FIGURA 17 -	Lesões histológicas da epiderme nas dermatites descamativas (DD) e ulcerativas (DU) em cães com leishmaniose visceral (n=30)	53
FIGURA 18 -	Lesões histológicas da derme nas dermatites descamativas (DD) e ulcerativas (DU) em cães com leishmaniose visceral (n=30).	54
FIGURA 19 -	LVC. (A) DD. Inflamação granulomatosa, HE (objetiva de 100x); DU. Inflamação piogranulomatosa, HE (objetiva de 40x).	54
FIGURA 20 -	Lesões histológicas foliculares, glandulares e da vasculatura nas dermatites descamativas (DD) e ulcerativas (DU) em cães com leishmaniose visceral (n=30).	55
FIGURA 21 -	Presença de formas amastigotas na pele de cães com dermatite descamativa e ulcerativa.	56
FIGURA 22 -	LVC. (A) DD. Presença de várias formas amastigotas no interior de macrófagos e espalhadas na derme, HE (objetiva de 40x); (B) DU. Infiltrado histiolinfoplasmocitário e formas amastigotas, HE (objetiva de 100x).	56
FIGURA 23 -	LVC. DD. (A) células CD3 positivas com arranjo perivascular, (500x); (B) células CD3 positivas em meio à inflamação granulomatosa e restos de material sebáceo – adenite sebácea granulomatosa, (500x); (C) células CD3 positivas em arranjo perianexial (250x); (D) poucas células CD3 positivas, presença de várias formas amastigotas, (640x). ENVISION, Hematoxilina.	58
FIGURA 24 -	LVC. DU. (A) células CD3 positivas abaixo de região ulcerada, (250x); (B e C) células CD3 positivas com arranjo perivascular, (640x); (D) células CD3 positivas ao redor de macrófagos contendo formas amastigotas (640x). ENVISION, Hematoxilina.	59

FIGURA 25 - LVC. (A) DD. células CD79a positivas com arranjo perivascular, (400x); (B) DD. células CD79a positivas na derme superior, (640x); (C) DU. células CD79a positivas ao redor de glândulas sudoríparas (400x); (D) DU. células CD79a em dois arranjos nodulares, (50x). ENVISION, Hematoxilina.

60

FIGURA 26 - Relação dos anticorpos primários CD3 e CD79a nos padrões de dermatite descamativa (DD) e dermatite ulcerativa (DU).

61

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 - Localização das úlceras nos cães com dermatite ulcerativa.	43
TABELA 2 - Resultados dos valores máximo e mínimo e a mediana da contagem de células CD3 e CD79a positivas na derme de cães apresentando padrão dermatológico descamativo e ulcerativo.	57
TABELA 3 - Mediana e intervalo de confiança para a contagem de células CD3 e CD79 positivas na derme de cães apresentando padrão dermatológico descamativo e ulcerativo.	62
TABELA 4 - Coeficiente de correlação de Spearman segundo associação de interesse.	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

+	marcação imunoistoquímica positiva
CD	grupos de diferenciação (BACCHI et al., 1990)
CD3	marcador de linfócitos da linhagem T
CD4	marcador de linfócitos T auxiliares
CD79a	marcador de linfócitos da linhagem B
CD8	marcador linfócitos T citotóxicos
D Dif	dermatite difusa
D Fibros/Perianx	dermatite mista fibrosante e perianexial
D Interst	dermatite intersticial
D Interst/Perianx	dermatite mista intersticial e perianexial
D Interst/Pv sup e prof	dermatite mista intersticial e perivascular superficial e profunda
D Líquen/Pv sup e prof	dermatite mista liquenóide e perivascular superficial e profunda
D Nod	dermatite nodular
D Nod/Perianx	dermatite mista nodular e perianexial
D Perianx	dermatite perianexial
D Pv sup e prof/Perianx	dermatite mista perivascular superficial e profunda e perianexial
D Pvsup	dermatite perivascular superficial
D Pvsup e prof	dermatite perivascular superficial e profunda
D Pvsup/Perianx	dermatite mista perivascular superficial e perianexial
DD	padrão dermatológico de dermatite descamativa
DU	padrão dermatológico de dermatite ulcerativa
HE	coloração histoquímica hematoxilina e eosina
I.V.	intravenosa
kg	quilograma
LVC	leishmaniose visceral canina
mg	miligrama
ml	mililitro
°C	graus Celsius
P Misto	padrão histopatológico misto
PAS	coloração histoquímica ácido periódico de Schiff
r.p.m	rotações por minuto
RIFI	reação de imunofluorescência indireta
µm	micrômetro

TORRES NETO, R. *Avaliação dos padrões histopatológicos da pele e imunomarcação de células CD3+ e CD79a+ em cães infectados naturalmente por Leishmania spp.*, Botucatu, 2005. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Área de Concentração: Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

A leishmaniose visceral canina é uma zoonose considerada endêmica em algumas regiões do estado de São Paulo e outras localidades do país. Apesar de ser uma enfermidade sistêmica, no cão, os principais sinais clínicos são dermatológicos. Foram avaliados trinta cães com diagnóstico de leishmaniose pelos exames parasitológico e sorológico, divididos em dois grupos: grupo A com descamação cutânea e grupo B com ulceração cutânea. Os padrões histopatológicos encontrados nos animais pertencentes ao grupo A foram de dermatite perianexial (33,3%), perivascular superficial (6,6%), nodular (6,6%), e as mistas (53,3%), sendo, intersticial/perianexial (12,5%), liquenóide/perivascular superficial e profunda (12,5%), perivascular superficial e profunda/perianexial (12,5%) e perivascular superficial/perianexial (62,5%). Os cães do grupo B apresentaram quadros histopatológicos compatíveis com dermatite perivascular superficial e profunda (33,3%), difusa (20%), perianexial (13,3%), nodular (6,6%), e as mistas (26,6%), representadas por intersticial/perivascular superficial e profunda (25%), nodular/perianexial (25%), fibrosante/perianexial (25%) e perivascular superficial e profunda/perianexial (25%). A presença de formas amastigotas foi observada em 8 (53%) cães com descamação e 7 (47%) com ulceração. A presença de linfócitos T CD3+ foi maior em relação aos linfócitos B CD79a +, tanto nas lesões descamativas como nas ulcerativas (69,5/8,8 e 66,1/14,5, respectivamente). Houve diferença estatística entre a população de células CD3+ e CD79a+ dentro do mesmo padrão dermatológico, o mesmo ocorreu quando se comparou a população de células CD79a+ entre os padrões descamativos e ulcerativos ($p < 0,05$).

Palavras - chave: Canino; CD3; CD79a; Dermatopatologia; Leishmaniose visceral.

TORRES NETO, R. Skin histopathological patterns and CD3+ and CD79a+ cells immunolabelling of dogs infected naturally by *Leishmania spp.*, Botucatu, 2005. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Área de Concentração: Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

Canine leishmaniasis is an endemic zoonoses, in some São Paulo state regions and other Brazilian cities. Even though it is a systemic disease, in the dog, the main clinical sign is dermatological. Thirty dogs with positive results in serology and parasitological exam for leishmaniasis, were evaluated. They were divided in two groups, one with exfoliative lesions and other with cutaneous ulcers. Histopathological patterns in the first group were: periadnexial dermatitis (33.3%), superficial perivascular (6.6%), nodular (6.6%) and mixed (53.3%), interstitial/periadnexial (12.5%), lichenoid/perivascular superficial and deep (12.5%), perivascular superficial and deep/periadnexial (12.5%) and superficial perivascular/periadnexial (62.5%). In the ulcerative pattern, the histopathological patterns were: perivascular superficial and deep dermatitis (33.3%), diffuse dermatitis (20%), periadnexial dermatitis (13.3%), nodular dermatitis (6.6%) and mixed dermatitis (26.6%), including interstitial/perivascular superficial and deep (25%), nodular/periadnexial (25%), fibrosing/perianexial (25%) and perivascular superficial and deep/periadnexial. Parasites were found in 8 dogs (53%) with exfoliative pattern and 7 dogs (47%) with ulcerative pattern. CD3 positive cells (T lymphocytes) were predominant than CD79a positive cells (B lymphocytes), in both dermatological patterns of lesions (69,5/8,8 e 66,1/14,5, respectively). There was no statistical difference between CD3 positive and CD79a cell population concerning exfoliative and ulcerative patterns. There was statistical difference between CD3+ cells and CD79a+ cells, when the same dermatological pattern was considered. The same was observed when compared CD79a+ cells in exfoliative and ulcerative patterns ($p < 0,05$).

Key Words: Canine; CD3; CD79a; Dermatopathology; Visceral Leishmaniasis

Introdução

1. Introdução

As leishmanioses, entre elas, o calazar, conhecida como leishmaniose visceral, compreendem uma das sete endemias mundiais de prioridade absoluta da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2002).

Nas Américas, o calazar é conhecido como leishmaniose visceral americana e tem como agente etiológico o protozoário *Leishmania (L.) chagasi* (BRASIL, 2003).

A leishmaniose visceral acomete diversas espécies de animais domésticos e silvestres e também o homem. O cão é o principal reservatório da doença (SLAPPENDEL e FERRER, 1998).

A transmissão entre os hospedeiros vertebrados ocorre com a participação de insetos flebotomíneos contendo a forma promastigota da *Leishmania* (LAINSON e SHAW, 1987).

O cão possui grande importância epidemiológica, pelo fato da prevalência canina ser alta em áreas endêmicas, bem como a doença no cão proceder a ocorrência de casos humanos (MARZOCHI et al., 1985).

Os principais sinais sistêmicos da leishmaniose visceral canina são linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, hipertermia e alterações renais, no entanto, são as lesões dermatológicas as mais frequentes, mesmo na ausência de outros sinais clínicos (CIARAMELLA et al., 1997).

Os quadros dermatológicos podem apresentar padrões variados, incluindo uma descamação acentuada, pelame seco e quebradiço,

alopecia, úlceras, nódulos, hiperqueratose, hiperpigmentação, liquenificação e onicogribose (FERRER et al., 1988).

O padrão dermatológico descamativo da leishmaniose visceral canina é o mais comum e está relacionado analogamente a forma localizada ou difusa da leishmaniose tegumentar no homem. Nesta forma cutânea da leishmaniose no homem, pode haver a possibilidade de regressão espontânea da doença (TAPIA et al., 1994, PAPADOGIANNAKIS et al., 2001).

Pouco se sabe sobre os mecanismos de controle da leishmaniose visceral canina localizados na pele e diante do que foi exposto, este trabalho teve como principais objetivos:

- Avaliar os padrões histopatológicos da pele de cães com alterações descamativas e ulcerativas.
- Quantificar a população de linfócitos T e B, CD3+ e CD79a+, respectivamente, nas lesões de pele descamativas ulcerativas.

Revisão de literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. AS LEISHMANIOSES

As leishmanioses são infecções zoonóticas, constituindo um complexo de enfermidades, causada por um protozoário do gênero *Leishmania*, que apresenta várias espécies e subespécies, da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (LAINSON e SHAW, 1987).

Acomete diversos animais, entre eles, os roedores, cães, raposas, gatos, marsupias, ungulados e o homem (SLAPPENDEL e FERRER, 1998; BADARÓ e DUARTE, 2002).

O gênero *Leishmania* pode ser definido como um parasito unicelular, relacionado aos tripanossomas, incluído entre os organismos hemoflagelados. É um parasito digenético, isto é, seu ciclo de vida é completado em dois diferentes hospedeiros, neste caso um vertebrado e um invertebrado, multiplicando-se por divisão binária (LAINSON e SHAW, 1987).

Os parasitos apresentam-se sob duas formas principais, a forma amastigota, encontrada nos tecidos e no interior de macrófagos, e a promastigota, observada no tubo digestivo do inseto vetor (LAINSON e SHAW, 1987; BARBOSA e BARBOSA, 1994).

Em geral, as várias espécies de *Leishmania* que parasitam o homem induzem a uma variedade de manifestações clínicas, entre elas estão duas categorias amplas, a leishmaniose visceral e a tegumentar,

esta última manifestando-se da forma cutânea localizada, difusa ou mucocutânea. Estas infecções comportam-se similarmente, mas com relação às alterações clínicas e patológicas existem características típicas e específicas do parasito, tais como sítio de infecção, severidade, capacidade de cura ou disseminação (BADARÓ e DUARTE, 2002).

A transmissão da doença ocorre entre os hospedeiros com a participação de insetos vetores pertencentes a família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. O principal vetor da leishmaniose visceral, nas Américas, é um flebótomo sugador de sangue chamado *Lutzomyia longipalpis*, e no Brasil, esse inseto é conhecido popularmente como mosquito palha, birigui ou tatuquiras (YOUNG e ARIAS, 1992).

2.2. IMPORTÂNCIA NA SAÚDE PÚBLICA

O parasito é responsável por um grande espectro de morbidade, em mais de 12 milhões de pessoas. Estima-se que mais de 350 milhões de pessoas estejam na faixa de risco, em 88 países, em quaisquer das suas formas. A Organização Mundial de Saúde estima uma incidência anual de 500 mil casos reportados da forma visceral (FRANCO, 1997; WHO, 2002).

As leishmanioses representam um impacto negativo para a saúde pública, quer pela sua mortalidade na forma visceral ou pelos aspectos mutilantes na forma cutâneo-mucosa (BRASIL, 2003).

A forma sistêmica da doença, leishmaniose visceral americana ou calazar, como também é conhecida, é a mais grave e atualmente é considerada uma disfunção imunológica específica, resultante do parasitismo das formas amastigotas nos macrófagos, produzindo várias manifestações clínicas e imunológicas, reversíveis com o tratamento específico, ou de forma espontânea, nos indivíduos imunologicamente competentes (BARBOSA e BARBOSA, 1994; BADARÓ e DUARTE, 2002; BRASIL, 2003).

Esta enfermidade é uma protozoonose sistêmica que compromete o sistema hematopoiético e dele, principalmente, o sistema fagocítico mononuclear, com intensidade variável, comportando-se como uma simples infecção assintomática, oligossintomática ou como doença sintomática, quase sempre grave (BARBOSA e BARBOSA, 1994; BADARÓ e DUARTE, 2002).

A *Leishmania (L.) chagasi* é a que assume o papel de agente etiológico da doença no Brasil. A principal espécie que infecta o homem na Europa, principalmente na bacia do mediterrâneo é a *L. (L.) infantum* (LAINSON e SHAW, 1987; BADARÓ e DUARTE, 2002, KOUTINAS e SARIDOMICHELAKIS, 2004).

Com base no perfil isoenzimático, a *Leishmania (L.) chagasi* é considerada idêntica a *L. (L.) infantum* (BRASIL, 2003).

A forma visceral da doença no homem cursa com uma febre irregular de longa duração, acentuado emagrecimento, intensa palidez

mucocutânea, conferindo um aspecto escurecido da pele nos indivíduos caucasianos, associando-se a severa hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia e trombocitopenia (BADARÓ e DUARTE, 2002).

É uma enfermidade de evolução crônica, na maioria das vezes fatal, nos casos não tratados adequadamente. Acomete preferencialmente crianças, especialmente as subnutridas, e também os idosos. Com o aumento de pessoas portadoras do vírus da imunodeficiência e outras formas de imunossupressões, como, por exemplo, pacientes submetidos à quimioterapia, a infecção oportunista pela leishmaniose é cada vez mais comum (BARBOSA e BARBOSA, 1994; BADARÓ e DUARTE, 2002).

2.3. LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

2.3.1. ASPECTO EPIDEMIOLÓGICO

Em vários estados brasileiros, a leishmaniose visceral tem acometido os cães e o homem, sendo considerada uma endemia. Esta zoonose era reportada como uma doença rural, entretanto, nos últimos anos, tem aumentado sua prevalência em áreas urbanas de grandes cidades como Belo Horizonte e Rio de Janeiro (ARIAS et al., 1996).

No estado de São Paulo a leishmaniose visceral era conhecida apenas por casos trazidos de outras regiões. Em 1998, na cidade de Araçatuba, foram detectados cães com suspeita da doença, onde se verificou a presença de *Leishmania spp* em exame parasitológico

(LUVIZOTTO et al., 1999). Este fato, associado à presença do inseto vetor *Lutzomyia longipalpis* no município, desencadeou uma investigação epidemiológica que levou a identificação de *Leishmania (L.) chagasi* como agente causal, confirmando a transmissão autóctone da leishmaniose visceral canina na área urbana e, posteriormente, em outros municípios vizinhos. Desde então, a incidência de cães com sorologia positiva vem aumentando, principalmente nas regiões dos municípios de Araçatuba e Bauru, onde ocorreram casos fatais em humanos (CVE, 2004).

2.3.2. ASPECTO ZOONÓTICO

A espécie canina é um reservatório animal importante, pois, além de existir em grande número, apresenta um contingente de animais sem sinais clínicos com a presença do parasito na pele, agindo como mantenedores do ciclo da doença e, provavelmente, na manutenção da cadeia de transmissão (MARZOCHI et al., 1985; ABRANCHES et al., 1991; VEXENAT et al., 1993; REITHINGER e DAVIES, 1999).

Entre as medidas de controle da doença no Brasil, até o momento, é a eliminação dos reservatórios a mais difundida (BRASIL, 2003).

2.3.3. ASPECTO CLÍNICO

O vetor, que possui hábitos peridomésticos e domésticos, pode adquirir *Leishmania (L.) chagasi* por meio da picada em cães e outros

hospedeiros, tendo atuação, principalmente no período noturno, cerca de uma hora após o crepúsculo (YOUNG e ARIAS, 1992; CASTRO, 1996).

A transmissão da doença se dá pela inoculação do parasito na pele do cão, este se multiplica em células do sistema mononuclear fagocitário podendo o animal apresentar as seguintes alterações: linfadenomegalia localizada ou generalizada; esplenomegalia; hepatomegalia; perda de apetite; anemia, fraqueza, emagrecimento e caquexia; hipertermia; glomerulonefrite; estomatite ulcerativa; oftalmopatias, como ceratoconjuntivite, blefaroconjuntivite, uveíte e panofalmitite; atrofia da musculatura temporal; polimiosite; rinite e pneumonia; miocardite; poliartrite; hematoquesia; epistaxe e também alterações neurológicas (FONT et al., 1996; CIARAMELLA et al., 1997; SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997; SLAPPENDEL e FERRER, 1998; KOUTINAS et al., 1999; FEITOSA et al., 2000, BLAVIER et al., 2001).

Entre os patógenos comumente associados à infecção por *Leishmania* estão o *Neospora*, *Ehrlichia*, *Hepatozoon*, *Bartonella*, *Babesia*, *Dirofilaria*, ácaros e fungos (CIARAMELLA et al., 1997; MOZOS et al., 1999; KOUTINAS et al., 1999; FERRER, 2004).

2.3.4. ASPECTO DERMATOPATOLÓGICO

Apesar da natureza viscerotrópica do protozoário, no entanto, são as lesões dermatológicas as mais freqüentes (KOUTINAS et al., 1993;

CIARAMELLA et al., 1997; SLAPPENDEL e FERRER, 1998; FEITOSA et al., 2000; BLAVIER et al., 2001, SOLANO-GALLEGO et al., 2004).

Ferrer et al. (1988) propuseram quatro padrões dermatológicos para a leishmaniose visceral canina:

Padrão alopécico-descamativo: cães apresentando alopecia, de distribuição simétrica, com evolução inicial na cabeça e pavilhões auriculares, se espalhando pela região cervical, tronco e extremidades dos membros, associado à descamação furfurácea ou micácea de coloração prateada de intensidade variável. Alopecia periocular bilateral foi um achado freqüente neste padrão dermatológico.

As alterações histológicas compreendiam hiperqueratose ortoqueratótica, dermatite difusa não supurativa, com infiltrado inflamatório contendo macrófagos, linfócitos e plasmócitos, também presentes na hipoderme. As formas amastigotas foram visualizadas dentro de macrófagos e alguns fibroblastos.

Padrão ulcerativo: cães com úlceras indolentes, principalmente em áreas de apoio (articulação do cotovelo, carpo e tarso), circunscritas e com bordas elevadas.

Alterações histológicas compreendiam ulcerações em meio a uma epiderme hiperplásica e com exocitose, dermatite difusa ou superficial e profunda, com infiltrado inflamatório contendo neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e linfócitos. Poucas formas amastigotas foram observadas neste padrão.

Padrão nodular: cães apresentando lesões nodulares generalizadas, indolores e não pruriginosas de tamanhos variados, com alguns milímetros até dez centímetros de diâmetro, sendo mais freqüente em cães da raça Boxer.

Alterações histológicas compreendiam formações nodulares contendo acúmulo de macrófagos, células gigantes multinucleadas e alguns linfócitos e plasmócitos. Neste padrão havia grande quantidade de formas amastigotas.

Padrão pustular: cães com presença de pústulas no tronco, abdômen, regiões axilares e inguinais.

Alterações histológicas compreendiam a presença de pústulas neutrofílicas sem células acantolíticas, exocitose e uma dermatite moderadamente difusa não supurativa. Nas lesões pustulares não foram observadas bactérias e nem formas amastigotas.

Outras alterações tegumentares freqüentemente encontradas são hiperpigmentação, liquenificação, hiperqueratose nasodigital e onicogribose (KOUTINAS et al., 1993; CIARAMELLA et al., 1997, SCOTT et al., 2001).

A onicogribose, lesão freqüente, provavelmente está associada à presença do parasito estimulando a matriz ungueal (NOLI, 1999).

Lesões lúpus-símile com despigmentação do espelho nasal com ou sem crostas, erosões e úlceras também podem ser observadas (FONDATI, 2004).

O diagnóstico diferencial, entre as dermatoses relacionadas à leishmaniose visceral canina, é amplo, englobando piodermite, dermatofitose, demodicose, escabiose, complexo pêfigo, lúpus eritematoso discóide e sistêmico, farmacodermias, adenite sebácea granulomatosa idiopática, dermatite hipozincêmica, seborréia primária, linfoma epiteliotrópico, dermatite de contato, dermatite acral por lambedura, granulomas infecciosos, dermatite pustular subcorneal, dermatite eosinofílica estéril, dermatite linear por IgA, carcinomas espino e baso celulares e mastocitoma (KOUTINAS et al., 1993, SCOTT et al., 2001 BLAVIER et al., 2001).

O exame histopatológico da pele é reconhecidamente um recurso diagnóstico valioso na dermatologia e uma das indicações específicas para a realização de biopsia de pele é, justamente, a presença de ulcerações persistentes, este, um achado freqüente na leishmaniose visceral canina (GROSS et al., 1992; SCOTT et al., 2001; CONCEIÇÃO et al., 2004).

Utilizando o modelo de padrões histopatológicos de alterações inflamatórias da pele, propostos por Ackerman (1978) e modificados para a adaptação na medicina veterinária por Yager e Scott (1993) foram encontrados na leishmaniose visceral (KOUTINAS et al., 1993):

1. perifoliculite granulomatosa
2. dermatite intersticial
3. dermatite perivascular superficial e profunda
4. dermatite perivascular superficial
5. dermatite liquenóide de interface
6. dermatite nodular
7. paniculite lobular
8. foliculite supurativa
9. dermatite pustular intraepitelial

O achado histológico mais consistente é uma inflamação granulomatosa a piogranulomatosa com variável número de plasmócitos e formas amastigotas na derme (GROSS et al., 1992; SLAPPENDEL e FERRER, 1998).

Os eosinófilos e mastócitos são escassos e ocasionalmente células gigantes multinucleadas são observadas (GROSS et al., 1992).

Furunculose e numerosos neutrófilos são observados em cães com infecções bacterianas, fúngicas e parasitárias associadas (KOUTINAS et al., 1993).

Perifoliculite, ao redor do istmo folicular, com ou sem destruição das glândulas sebáceas e sudoríparas, pústulas neutrofílicas subcorneais, vasculite, também podem ser encontrados em biopsias de pele de cães com leishmaniose visceral (FONDATI, 2004).

A técnica de imunoistoquímica aumenta a possibilidade do encontro do parasito, quando o número destes é baixo nos tecidos avaliados (FERRER, et al., 1988b; BOURDOISEAU et al., 1997).

A descamação seca, com escamas de coloração prateada, é a alteração mais comum no cão com leishmaniose visceral, apresentando quadro histológico caracterizado por dermatite granulomatosa ou piogranulomatosa, acompanhada por adenite sebácea. Variado número de formas amastigotas, dependendo da progressão da doença, podem ser encontrados neste padrão dermatológico (PAPADOGIANNAKIS et al., 2000).

2.3.5. ASPECTO IMUNOLÓGICO

A leishmaniose visceral canina pode se desenvolver em uma infecção aguda ou crônica dependendo das características individuais do parasito e do hospedeiro. Ainda, uma latência, e até mesmo a cura espontânea pode ocorrer (PINELLI et al., 1999).

A resposta imune frente à infecção pode se dar por meio da formação de anticorpos, resposta humoral, ou por células efectoras do sistema fagocítico mononuclear, resposta celular (TIZARD, 2000).

Anticorpos específicos são verificados entre um mês e meio a cinco meses após a infecção experimental e seus níveis podem estar elevados bem antes da manifestação de sinais clínicos (RUITENBERG, 1994; FERRER et al; 1995). Entretanto, são os macrófagos que desempenham

papel central no resultado da infecção, uma vez que sua ativação por citocinas parece ser o mecanismo principal para a eliminação dos parasitos (PINELLI et al., 1994b).

As características genéticas podem determinar diferentes respostas imunológicas na espécie canina, sendo que algumas raças têm uma resposta mais efetiva do que outras (SOLANO-GALLEG0 et al., 2000).

Há duas subpopulações de linfócitos T auxiliares CD4+, os linfócitos auxiliares do tipo 1 (Ta1) e 2 (Ta2). As células Ta1 secretam interleucina-2 e 12, interferon gama e fator de necrose tumoral que desencadeiam uma resposta imunocelular protetora, conduzindo a resistência à doença. Em contrapartida, as células Ta2 desencadeiam a proliferação de linfócitos B e uma resposta imune-humoral não protetora (QUINNELL et al., 2001). Esta resposta causa uma exacerbação da infecção, sendo demonstrada pela hipergamaglobulinemia e por altos títulos de anticorpos produzidos pelos cães. A produção exagerada de anticorpos produz imunocomplexos circulantes, podendo levar aos quadros de vasculite, uveíte, poliartrite e glomerulonefrite (ABRANCHES et al., 1991; RUITENBERG, 1994; SLAPPENDEL e FERRER, 1998; PINELLI et al., 1999).

Os linfócitos T citotóxicos CD8+ também contribuem com a produção de interferon gama, levando a lise direta de macrófagos

infectados (PINELLI et al., 1994; DA-Cruz et al., 1994, PAPADOGIANNAKIS et al., 2000, QUINNELL et al., 2001; DAY, 2004).

Após quase dez anos da pesquisa de Ferrer et al. (1988), Fondevila et al. (1997) utilizando os mesmos padrões dermatológicos, exceto o pustular, investigaram pela técnica de imunoistoquímica, a presença de células apresentadoras de antígeno, macrófagos, linfócitos T e formas amastigotas em grupos de cães infectados naturalmente, como forma de avaliar a imunocompetência tegumentar. O padrão descamativo, segundo o estudo, estava associado a um controle efetivo da infecção, ao passo que os animais com lesões nodulares desenvolveram uma resposta imune fraca e os cães com úlceras uma resposta intermediária. As lesões alopecicas e descamativas caracterizaram-se pela expressão do complexo de histocompatibilidade maior classe II nas células de Langerhans e queratinócitos, pela presença de um infiltrado inflamatório com predomínio de células T e baixo número de formas amastigotas dentro dos macrófagos. Em contraste, as lesões nodulares apresentam uma dermatite francamente granulomatosa com várias formas amastigotas e um baixo número de células T infiltradas na derme.

Papadogiannakis et al. (2000) utilizando apenas cães com padrão clínico descamativo, observaram uma relação CD4:CD8 próxima a um.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. DOS ANIMAIS

Foram utilizados trinta cães, que tinham diagnóstico prévio de leishmaniose visceral, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses do município de Araçatuba, região endêmica para a doença. Os animais foram divididos em dois grupos:

Grupo A: 15 cães, adultos, sem destinação de sexo, apresentando como alteração dermatológica principal descamação de moderada a acentuada, sem que houvessem lesões ulceradas. Foi determinada para este padrão dermatológico a nomenclatura de **dermatite descamativa (DD)**.

Grupo B: 15 cães, adultos, sem distinção de sexo, apresentando úlceras como alteração cutânea predominante. Foi determinada para este padrão dermatológico a nomenclatura de **dermatite ulcerativa (DU)**.

Após a escolha dos grupos, os animais eram submetidos a uma avaliação mais detalhada das lesões dermatológicas. Ao término dessa avaliação, os cães foram anestesiados por via intravenosa com tiopental sódico¹, na dose de 25 mg/kg e em seguida eram eutanasiados com cloreto de potássio a 19,1% na dose de 1 ml/kg I.V. A eutanásia dos cães

¹ THIONEMBUTAL®

é uma norma da Secretaria de Saúde e Higiene Pública do município de Araçatuba (BRASIL, 2003), devido o caráter endêmico da doença, na região, sendo realizada pelos veterinários do Centro de Controle de Zoonoses.

3.2. CONFIRMAÇÃO DO DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL

A confirmação do diagnóstico de leishmaniose visceral dos cães foi feita empregando-se dois exames complementares:

3.2.1. Exame parasitológico

O linfonodo poplíteo era retirado e realizado exame citológico pela técnica de esfoliação (impressão), conforme descrito por Baker e Lumsden (2000). As amostras obtidas foram coradas pelo Romanowsky (Giemsa) e observadas em microscopia óptica, com as objetivas de 40 e 100 vezes, avaliando-se a presença de formas amastigotas nas amostras.

Somente os cães que apresentavam as formas amastigotas típicas, eram incluídos nos grupos dos cães com dermatite descamativa e ulcerativa.

A figura abaixo representa um exame citológico com a presença das formas amastigotas (Figura 1).

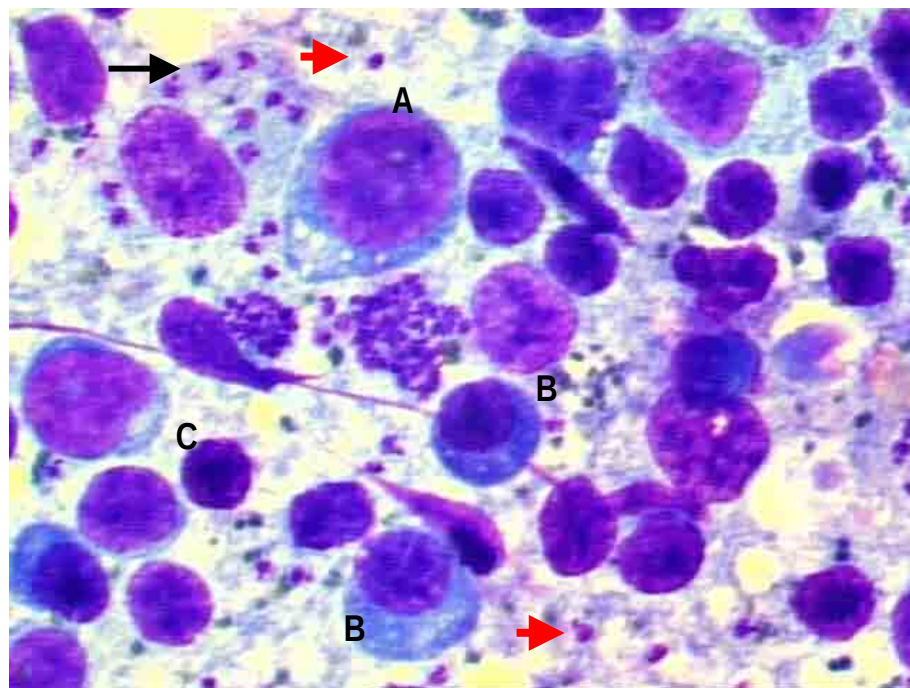


FIGURA 1. *Leishmaniose visceral canina. Exame citológico: Fotomicrografia de formas amastigotas livres (setas vermelhas) e intracelulares (seta preta). Presença de macrófago vacuolado (A), plasmócitos (B) e linfócito (C). Giemsa, objetiva de 100x.*

3.2.2. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

As amostras dos soros foram coletadas dos trinta cães por punção veno-jugular, as quais foram obtidas após formação do coágulo, e centrifugação por dez minutos a 3.000 r.p.m, aliquotando-se em frascos tipo Eppendorf de 1,5 ml e mantidos a -20°C até o momento da análise. O teste foi realizado no Laboratório de Sanidade Animal – LASAN, da Universidade Federal do Piauí. As amostras foram diluídas inicialmente a

1:40 como ponto de corte positivo (EVANS et al., 1990) seguindo-se por diluições padronizadas pelo LASAN.

Na figura 2 encontra-se a distribuição dos cães de acordo com as diluições da reação de imunofluorescência indireta para o diagnóstico da leishmaniose.

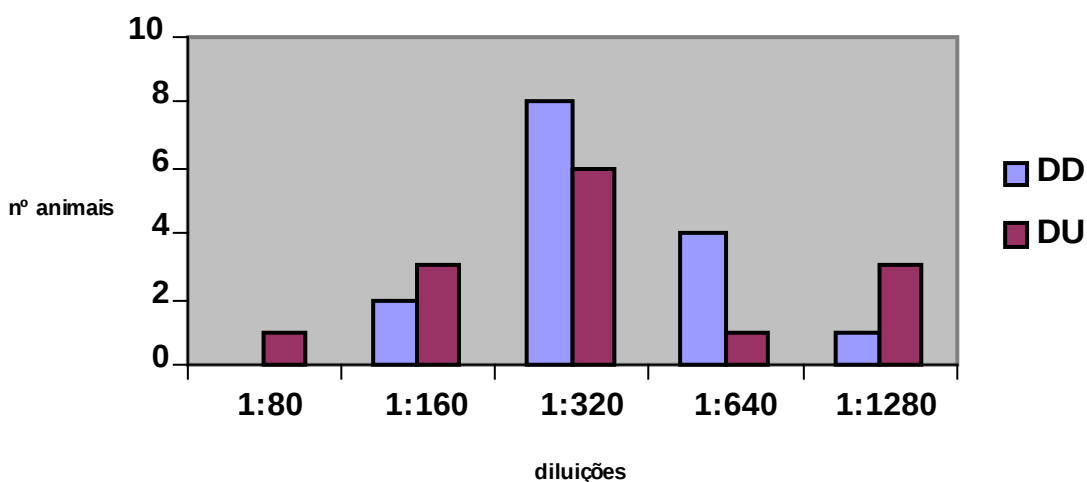


Figura 2. Distribuição dos cães de acordo com as diluições da RIFI para o diagnóstico da leishmaniose.

Um cão apresentou título abaixo de 1:40, sendo considerado negativo para a infecção, por este exame, porém o animal, que apresentava dermatite ulcerativa não foi excluído, pois o exame citológico confirmou a presença de formas amastigotas.

Assim a RIFI juntamente com o exame parasitológico e, epidemiologicamente, sendo a região de Araçatuba endêmica para a infecção por *Leishmania (L.) chagasi* foi estabelecido o diagnóstico de leishmaniose visceral para os cães com dermatite descamativa e ulcerativa.

3.3. DO EXAME HISTOPATOLÓGICO

3.3.1. Colheita do material

Para o processamento histopatológico, as amostras foram obtidas através de biopsia excisional de pele de acordo com GROSS et al. (1992) de lesões descamativas, do grupo A, e de lesões ulceradas, do grupo B.

Convencionou-se a biopsia na região frontal da cabeça para os cães com dermatite descamativa e a região úmero-radio-ulnar (cotovelo) para os animais com dermatite ulcerativa. Após a colheita as amostras foram fixadas em formalina tamponada a 10%, por um período de 48 a 72 horas, enviadas ao Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu, e submetidas às técnicas usuais para inclusão em parafina.

Seções histológicas dos blocos de parafina dos trinta casos foram feitas com espessura de 4 µm e coradas pelo método de hematoxilina e eosina (HE). A coloração pelo ácido periódico de Schiff (PAS) foi realizada para pesquisa de fungos em todos os casos. Para cada caso foram preparadas, em cortes seriados, uma lâmina para coloração HE, uma para PAS e uma preparada com cola², cuja finalidade é manter a aderência do corte na lâmina, para realização do exame imunoistoquímico.

² POLY-L-LYSINE SOLUTION cod P8920 – Sigma-Aldrich®

3.3.2. Exame histológico

Todos os cortes foram examinados à luz da microscopia óptica para identificação dos padrões histopatológicos e demais lesões relevantes, utilizando-se ou os critérios estabelecidos por Ackerman (1978) e adaptados para a medicina veterinária por Yager e Scott (1993).

3.4. DO EXAME IMUNOISTOQUÍMICO

3.4.1. Padronização da técnica de imunoistoquímica

Para a reação de imunoistoquímica empregou-se o sistema ENVISION³. Foram feitas algumas modificações do protocolo proposto por HSU et al. (1981), descritas a seguir:

Cortes de 4 µm dos blocos, dos trinta cães, foram obtidos e após a desparafinização as lâminas foram colocadas em uma cuba de vidro com xilol e incubadas à temperatura de 54°C por 30 minutos, em seguida o xilol foi trocado e mantido à temperatura ambiente por 20 minutos.

As lâminas foram lavadas com uma passagem em álcool 95% e prosseguiu-se com a hidratação do material, incubando-o em três banhos de álcool absoluto, um de álcool 95% e um de álcool 85%. A fim de retirar os pigmentos de formol, o material foi mantido em uma solução de álcool amoniacal a 95%, por 10 minutos.

O material foi lavado em água destilada e em seguida foi realizada a recuperação antigênica.

³ ENVISION+DUAL LINK SYSTEM, Peroxidase, cod K4061 – DakoCytomation

Recuperação antigênica

Objetivando liberar os epítomos antigênicos do tecido, bloqueados pela solução fixadora, a recuperação foi realizada com uma solução pré-aquecida de EDTA⁴ 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.

Bloqueio da peroxidase endógena

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado utilizando água oxigenada 10 volumes durante 30 minutos.

Reação com os anticorpos primários e sistema de detecção

Anticorpos primários

Os anticorpos utilizados para o estudo imunoistoquímico foram do grupo que utilizam a nomenclatura CD (BACCHI et al., 1990; COBBOLD e METCALFE, 1994), sendo eles o CD3 visando a marcação de linfócitos da linhagem T e o CD79a para linfócitos da linhagem B. Para cada cão com padrão de dermatite descamativa e ulcerativa foram realizadas a imunomarcação para os dois anticorpos primários, a fim de se verificar a diferença entre a população de células positivas CD3 e CD79a, e correlacioná-las com o tipo de resposta imune predominante, celular ou humoral.

CD3 – diluição 1:25. Anticorpo monoclonal anti-cão, “Leukocyte Antigen Biology Laboratory”; serviço do Dr. Peter F. Moore, Davis,

⁴ EDTA-ácido etilenodiaminotetra acético sal dissódico – P.M. 372,24 Synth[®]

Califórnia (USA) que reconhece uma molécula CD3ε ligada às células T maduras.

CD79a (DakoCytomation M7051) – diluição 1:50. Anticorpo monoclonal humano que reconhece um polipeptídeo que faz parte do complexo receptor das células B e persiste até o estágio de plasmócitos.

CD4 e CD8 (Anexo 1 e 2)

Cada anticorpo foi diluído em solução de 1% de albumina sérica bovina e solução tampão de TRIS⁵. As lâminas, incubadas com os anticorpos, ficaram em câmara úmida, por 18 horas à 4°C, depois lavadas em solução de TRIS e após foi utilizado o sistema de detecção ENVISION por 1 hora, em temperatura ambiente.

Revelação

A reação foi visualizada com a utilização do substrato cromógeno DAB⁶ 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 imunomarcação.

A contagem das células positivas para CD3 e CD79a foi realizada com a objetiva de 40 vezes em dez campos escolhidos aleatoriamente na derme dos cães com dermatite descamativa (n=15) e dermatite ulcerativa (n=15), utilizando o programa de análise de imagens KS 300 v.3.0 (Zeiss), que compreende uma câmara (Sony Hyper HAD, CCD – IRIS/RGB Color

⁵ TRIZMA BASE cod. D5637 – Sigma-Aldrich®

⁶ LIQUID DAB LARGE VOLUME SUBSTRATE CHROMOGEN SYSTEM (3,3'-diaminobenzidina) cod.K3466 – DakoCytomation®

video câmera) acoplada ao microscópio óptico (Leica DMLD), que envia a imagem para o computador.

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizou a estatística descritiva para as alterações dermatológicas e histopatológicas, os testes de Mann-Whitney e correlação de Spearman, para a verificação de diferença entre a população de células positivas CD3 e CD79a.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. DOS ANIMAIS

Grupo A: padrão de dermatite descamativa – DD (n=15)

Os cães deste grupo apresentavam os seguintes sinais dermatológicos predominantes (Figura 3 e 4):

- Descamação seca generalizada (100%).
- Pelame sem brilho e frágil (100%).
- Alopecia com distribuição simétrica em regiões de pavilhão auricular, cervical, tóraco-ventral e de proeminências ósseas (86,6%).
- Alopecia periocular bilateral (66,6%).
- Onicogrifose (40%).
- Hiperqueratose nasal (40%).
- Nenhum animal deste grupo apresentou lesão erodido-ulcerada.

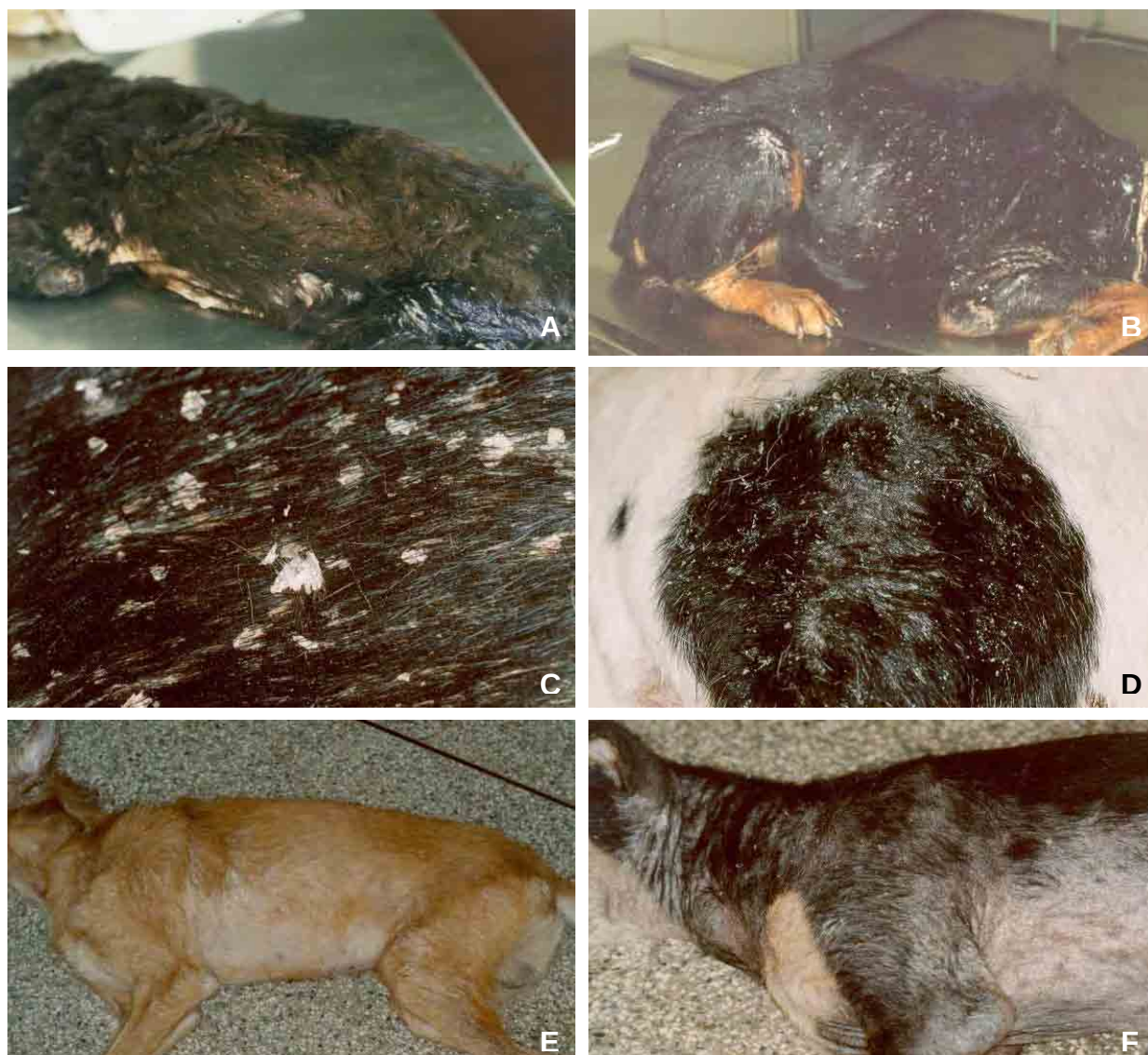


Figura 3. Padrão de dermatite descamativa. (A) Descamação seca intensa e alopecia em região tóraco-ventral; (B) Descamação seca intensa generalizada; (C) Descamação do tipo micácea (aproximação da figura anterior); (D) Região lombossacra em um cão com intensa descamação furfurácea; (E) Alopecia em região tóraco-ventral; (F) Alopecia e escamas em região cervical e tóraco-látero-ventral.



Figura 4. Padrão de dermatite descamativa. Quatro cães apresentando alopecia em região periocular bilateral (“óculos”) e hiperqueratose em plano nasal.

Grupo B: padrão de dermatite ulcerativa – DU (n=15)

Observando a Tabela 1, constata-se que todos os cães apresentavam úlceras na região úmero-rádio-ulnar (100%) (Figura 5), e por isso foi estabelecida tal região para a biopsia, vindo a seguir as demais localizações das lesões ulceradas presentes nos animais deste grupo: regiões do calcâneo (86,6%); da tuberosidade isquiática (80%); da superfície metatarso-tarsiana (60%); digital do membro torácico e pavilhão auricular (20%), digital do membro pélvico, tóraco-lateral e da superfície metacarpo-carpiana (13,3%) e regiões da narina, face, lábio, periocular, tóraco-ventral e lombossacra (6,6%). Três cães deste grupo apresentavam descamação leve e alopecia não foi observada neste grupo, inclusive na região periocular. Onicogribose foi observado em sete cães.

TABELA 1 – Localização das úlceras nos cães com dermatite ulcerativa.

Região	Nº de animais
CEFÁLICA	
pavilhão auricular	3
narina*	1
Face	1
Lábio	1
Periocular	1
MEMBRO TORÁCICO	
Dígitos	3
superfície metacarpo-carpiana	2
articulação úmero-rádio-ulnar**	15
TORÁCICA	
Lateral	2
Ventral	1
MEMBROS PÉLVICOS	
Dígitos	2
superfície metatarso-tarsiana	9
superfície flexora do tarso***	13
POSTERIOR	
lombossacra	1
tuberosidade isquiática	12

* espelho nasal

** cotovelo

***calcâneo



Figura 5. Padrão de dermatite ulcerativa. Região da articulação úmero-rádio-ulnar (cotovelo). (A) úlcera circular recoberta por crosta melicérica e outra com aspecto linear recoberta por crosta hemática; (B) duas úlceras circulares com superfície eritematosa; (C) úlcera linear com borda espessa; (D) úlceras ao redor de área hiperpigmentada; (E e F) úlceras com fundo eritematoso e granulações grosseiras com bordas recobertas por espessa crosta hemática.

4.2. DO EXAME HISTOPATOLÓGICO

Diferentes padrões histopatológicos foram observados nos trinta cortes histológicos. O padrão misto, onde há associação de duas distribuições do infiltrado inflamatório, em um mesmo corte, foi o achado mais freqüente nos cães com descamação (DD), representando 53,3% dos casos. Ainda neste grupo foram observadas dermatite perianexial (33,3%), perivascular superficial (6,6%) e a nodular (6,6%). Os padrões mistos encontrados foram: dermatite intersticial/perianexial, dermatite liquenóide/perivascular superficial e profunda e dermatite perivascular superficial e profunda/perianexial (6,6%) e a dermatite perivascular superficial/perianexial representando 33,3% (Figuras 6, 7, 8 e 9).

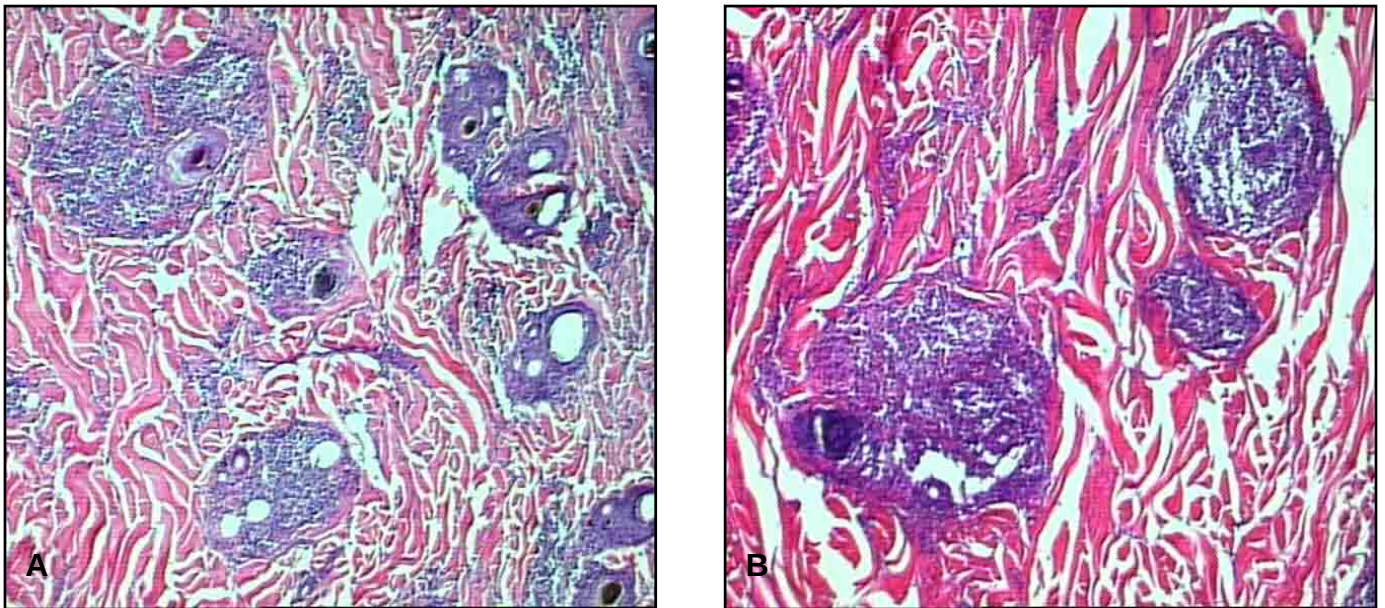


FIGURA 6. LVC. DD. (A) Dermate perianexial, infiltrado inflamatório perifolicular, HE (objetiva de 5x); (B) Dermate nodular, infiltrado inflamatório disposto em três formações nodulares HE (objetiva de 5x).

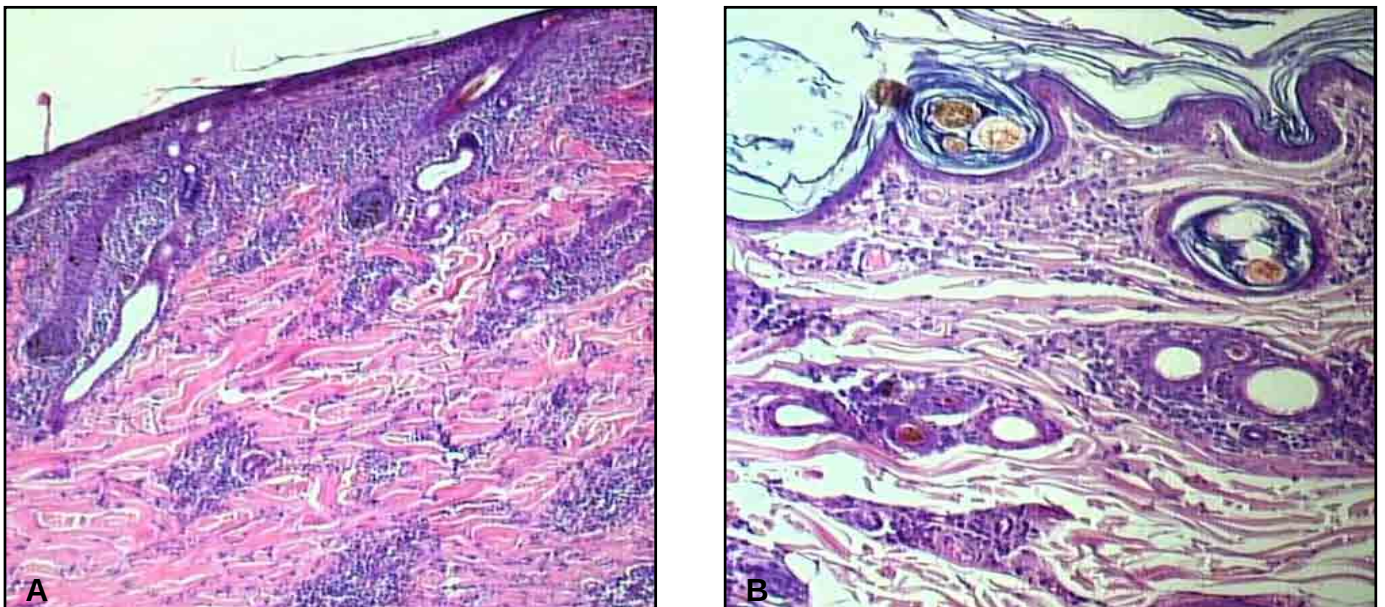


FIGURA 7. LVC. DD. (A) Dermate liquenóide e perivascular superficial e profunda, HE (objetiva de 5x); (B) Dermate perivascular superficial e perianexial com hiperqueratose ortoqueratótica, HE (objetiva 10x).

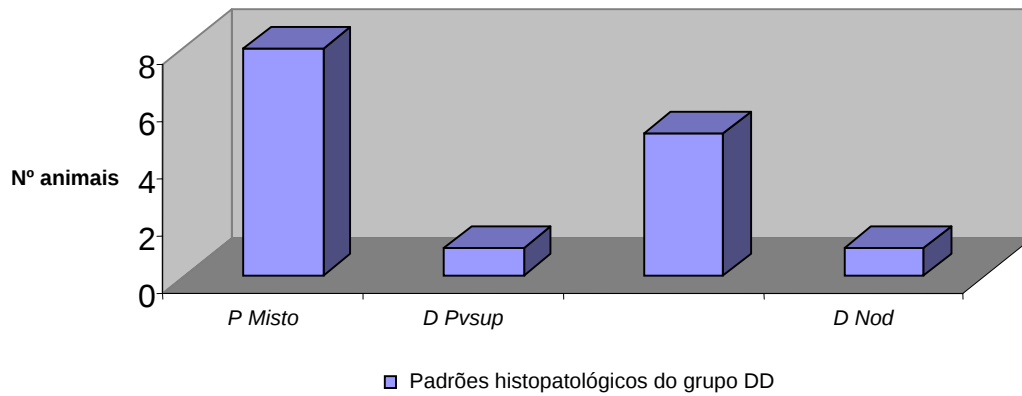


FIGURA 8. Distribuição dos padrões histopatológicos na dermatite descamativa de cães com leishmaniose visceral (n=15).

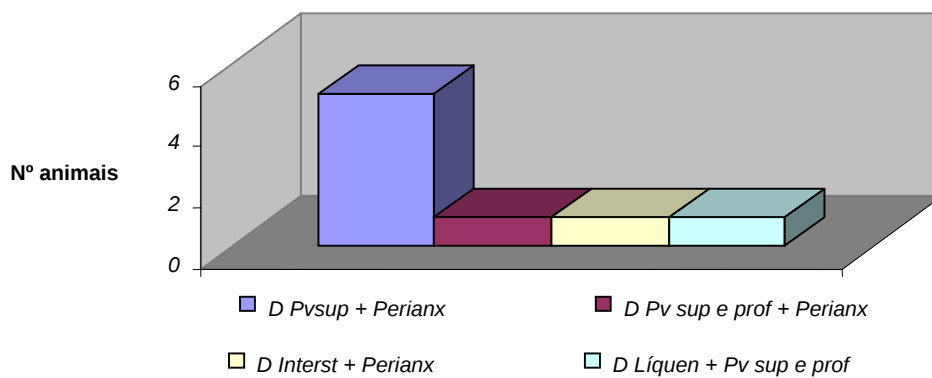


Figura 9. Distribuição da associação de padrões histopatológicos em um mesmo corte histológico na dermatite descamativa de cães com leishmaniose visceral (n=8).

Em um caso de dermatite descamativa, foram observados ácaros do gênero *Demodex* associado à presença de estruturas fúngicas na haste de pêlos (artroconídeos) que se coram positivamente para a coloração de PAS. O padrão encontrado neste caso foi o misto perivascular superficial e perianexial. Em outro caso deste grupo foram visualizados parasitos no interior de túneis intracórneos, suspeitando-se de escabiose. O padrão histopatológico também foi misto perivascular superficial perianexial com outras alterações decorrentes do ectoparasitismo, como espongiose, necrose focal da epiderme e exocitose linfocítica (Figuras 10 e 11).

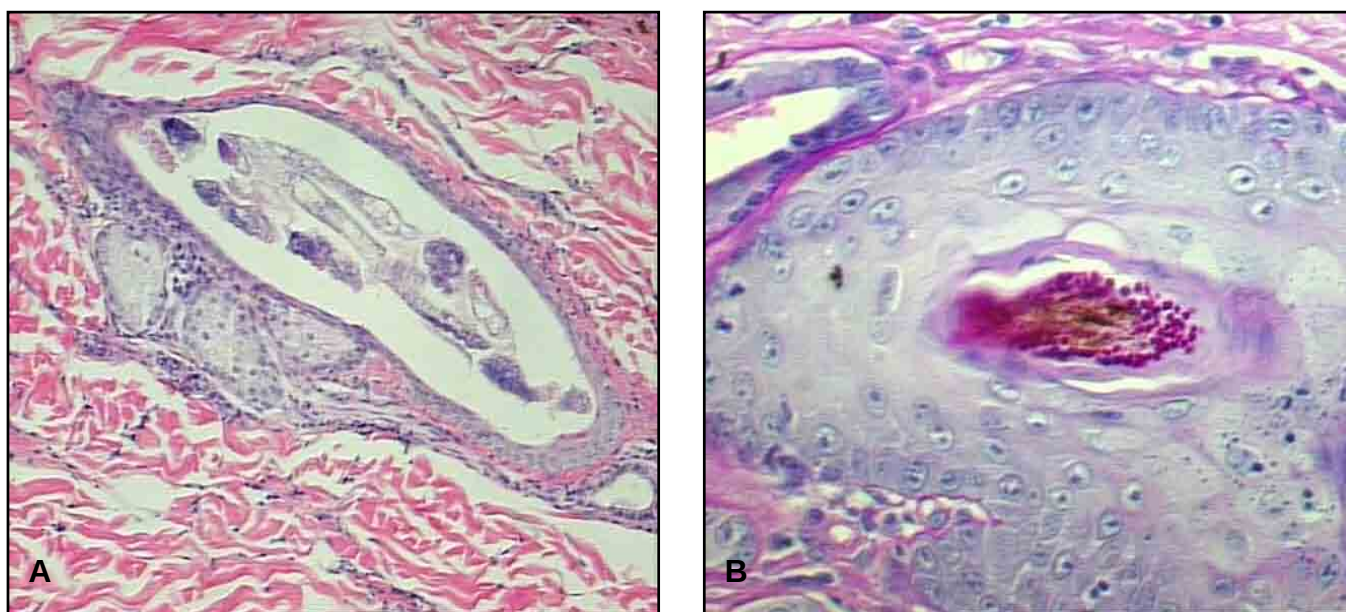


FIGURA 10. LVC. DD. (A) Dermatite perianexial. Folículo piloso dilatado com ácaros *Demodex*, HE (objetiva de 20x); (B) Estruturas fúngicas (artroconídeos) no pêlo, PAS (640x); (A e B). Associação de leishmaniose, demodicose e dermatofitose.

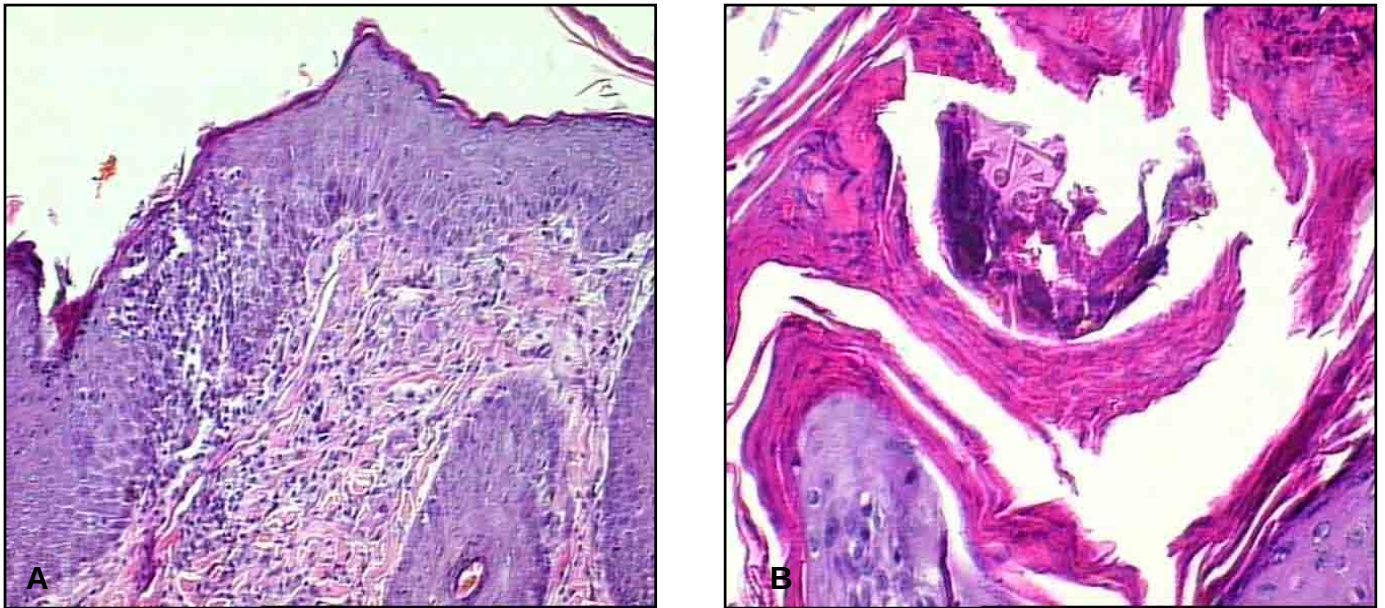


FIGURA 11. LVC. DD. (A) Dermatite perivascular superficial com exocitose de células mononucleares, HE (objetiva de 20x); (B) Fragmento de ácaro em meio a uma hiperqueratose paraqueratótica, HE (objetiva de 40x).

Na dermatite ulcerativa o padrão histopatológico predominante foi a dermatite perivascular superficial e profunda (33,3%), seguido pelo padrão misto (26,6%), dermatite difusa (20%), dermatite perianexial (13,3%) e dermatite nodular (6,6%). Os padrões mistos observados em igual frequência foram a dermatite intersticial/perivascular superficial e profunda (25%), nodular/perianexial (25%), perivascular superficial e profunda/perianexial (25%) e fibrosante/perianexial (25%) (Figuras 12, 13, 14 e 15).

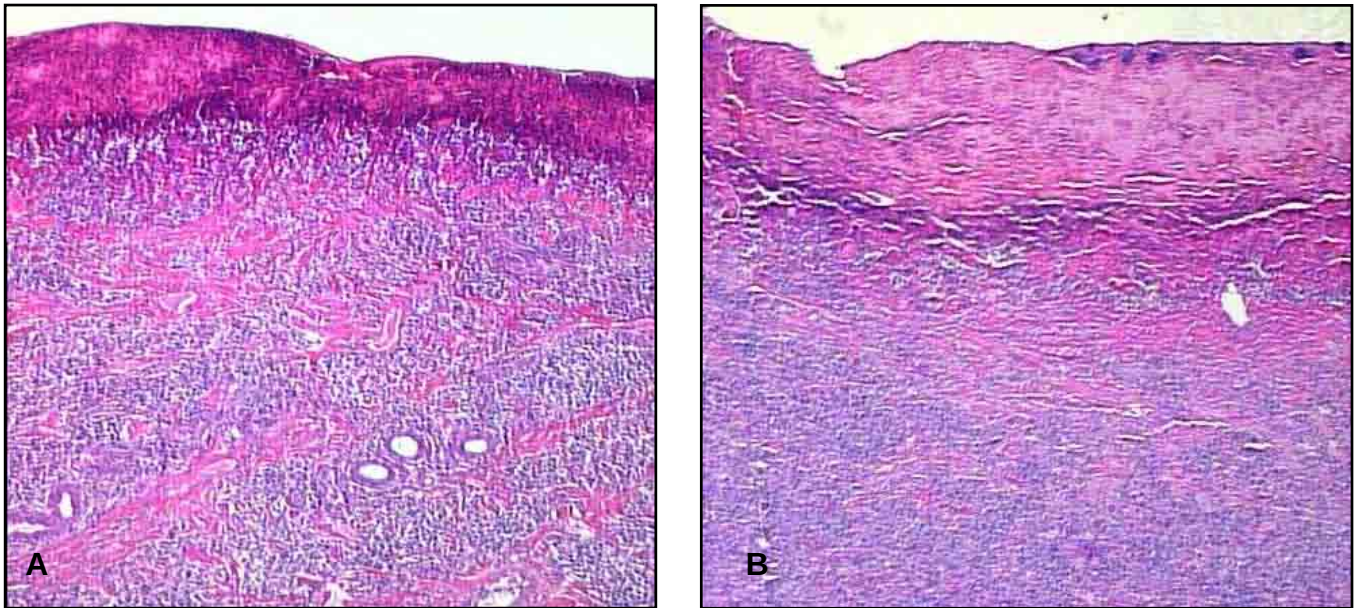


FIGURA 12. LVC. DU. (A) Dermatite perivascular superficial e profunda e perianexial, com extensa ulceração recoberta por crosta fibrinoleucocitária, HE (objetiva de 5x); (B) Dermatite difusa recoberta por úlcera apresentando colônias de bactérias na superfície, HE (objetiva de 10x).

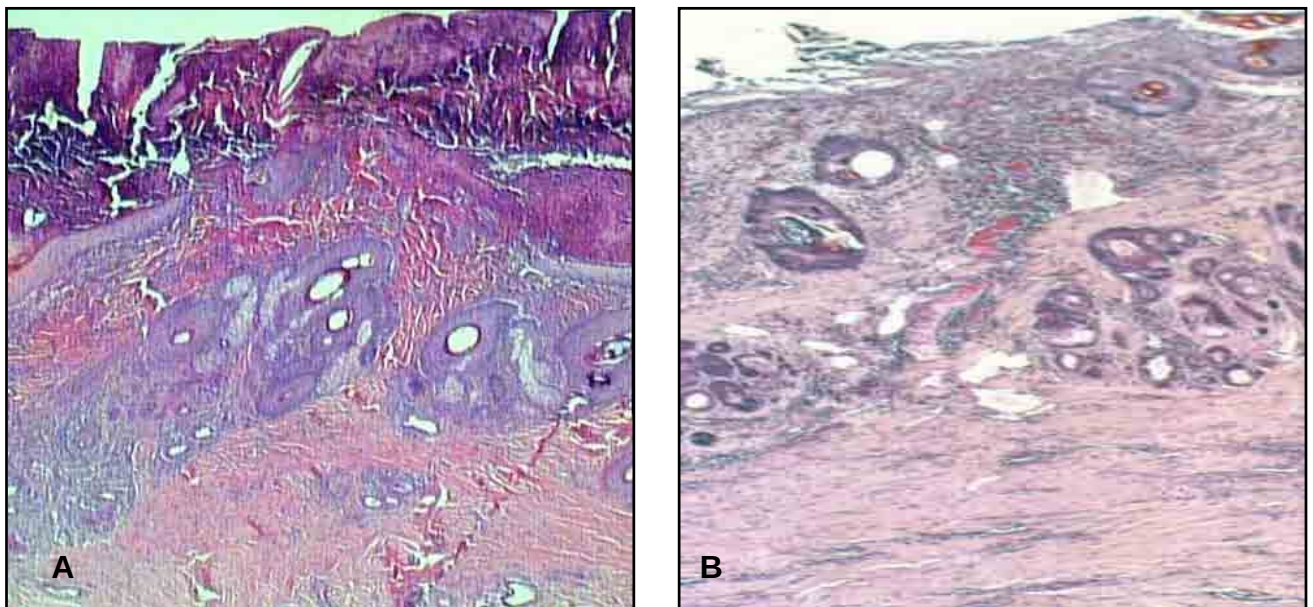


FIGURA 13. LVC. DU. (A) Dermatite perianexial, HE (objetiva de 5x); (B) Dermatite fibrosante e perianexial, HE (objetiva de 5x).

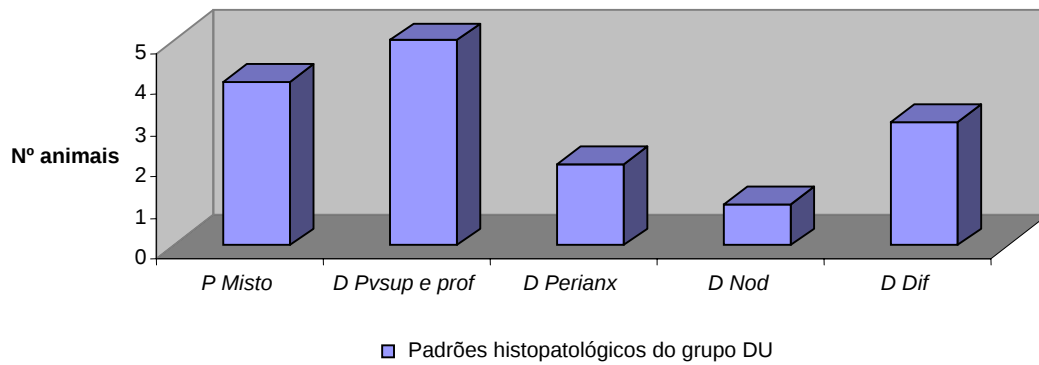


FIGURA 14. Distribuição dos padrões histopatológicos na dermatite ulcerativa de cães com leishmaniose visceral (n=15).

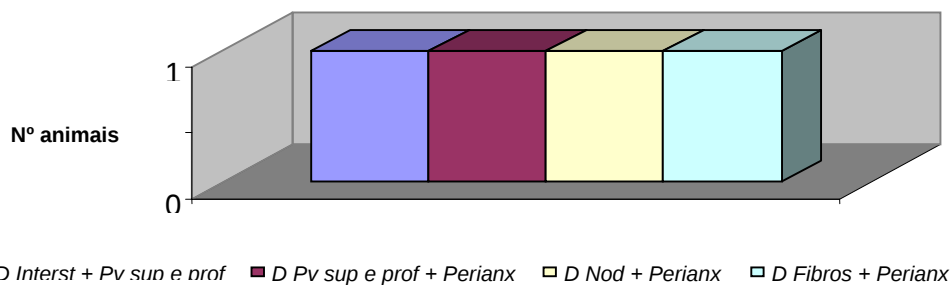


FIGURA 15. Distribuição da associação de padrões histopatológicos em um mesmo corte histológico na dermatite ulcerativa de cães com leishmaniose visceral (n=8).

O padrão histopatológico observado na mesma proporção nos dois grupos foi a dermatite nodular. Já o padrão perianexial nos cães com descamação e dermatite perivascular superficial e profunda nos cães com úlceras apresentaram o mesmo número de casos, como mostra o gráfico abaixo (Figura 16).

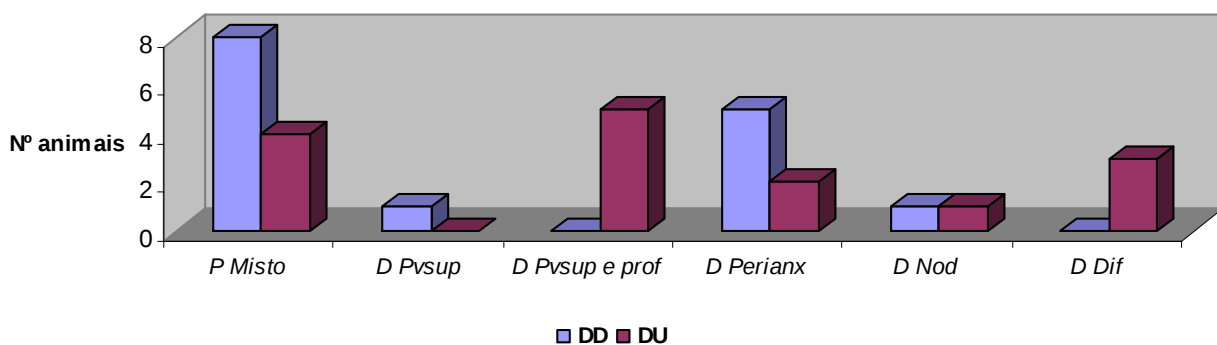


FIGURA 16. Comparação da distribuição dos padrões histopatológicos entre as dermatites descamativas e ulcerativas de cães com leishmaniose visceral (n=30).

As alterações observadas na epiderme, derme, folículos pilosos, glândulas e vasos, das biopsias obtidas dos cães com dermatite descamativa e ulcerativa estão representadas nas figuras 17, 18, 19 e 20.

No caso dos cães com DU, pela ulceração, somente foram apresentadas como lesões epidérmicas as crostas e a presença de estruturas cocóides em colônias.

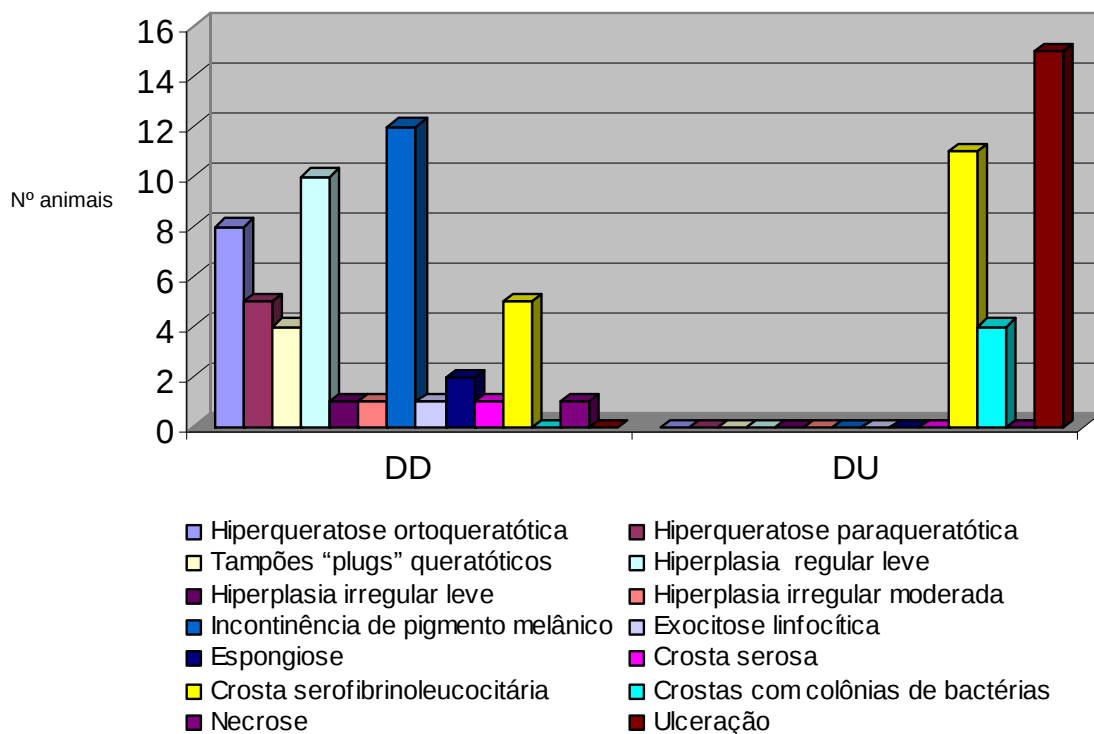


FIGURA 17. Lesões histológicas da epiderme nas dermatites descamativas (DD) e ulcerativas (DU) em cães com leishmaniose visceral (n=30)

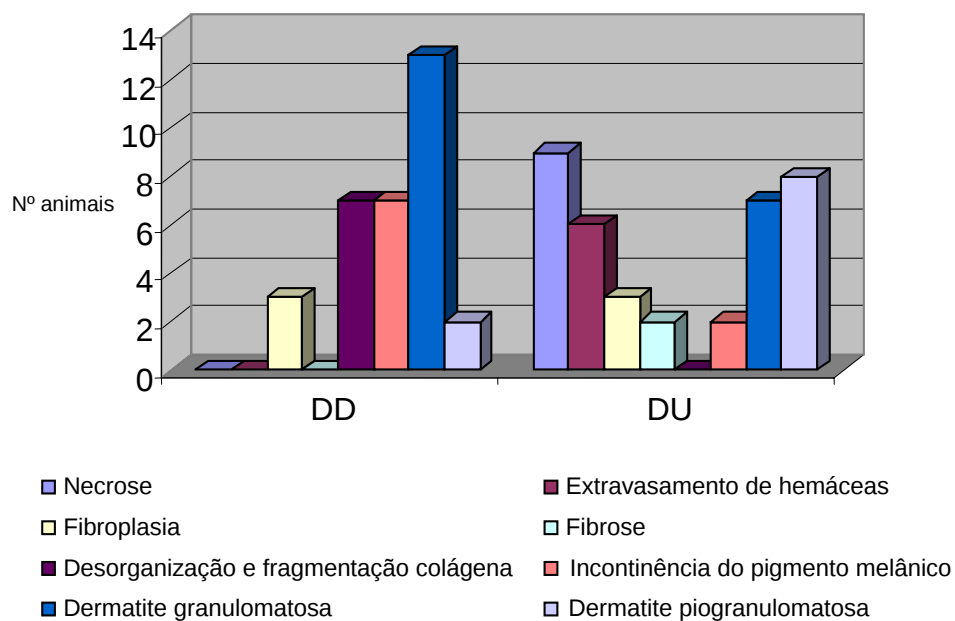


Figura 18. Lesões histológicas da derme nas dermatites descamativas (DD) e ulcerativas (DU) em cães com leishmaniose visceral (n=30).

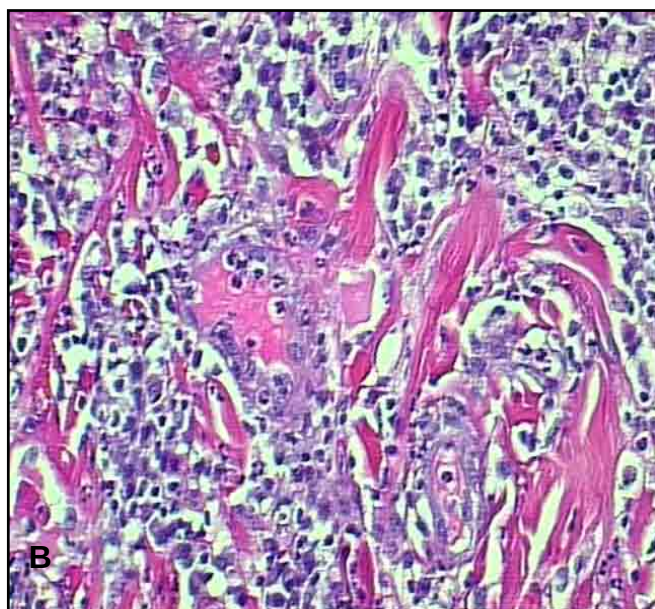
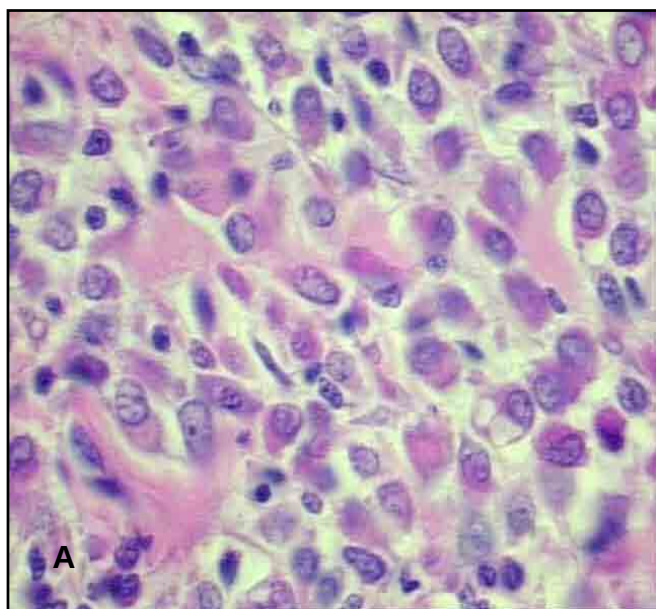


Figura 19. LVC. (A) DD. Inflamação granulomatosa, HE (objetiva de 100x); (B) DU. Inflamação piogranulomatosa, HE (objetiva de 40x).

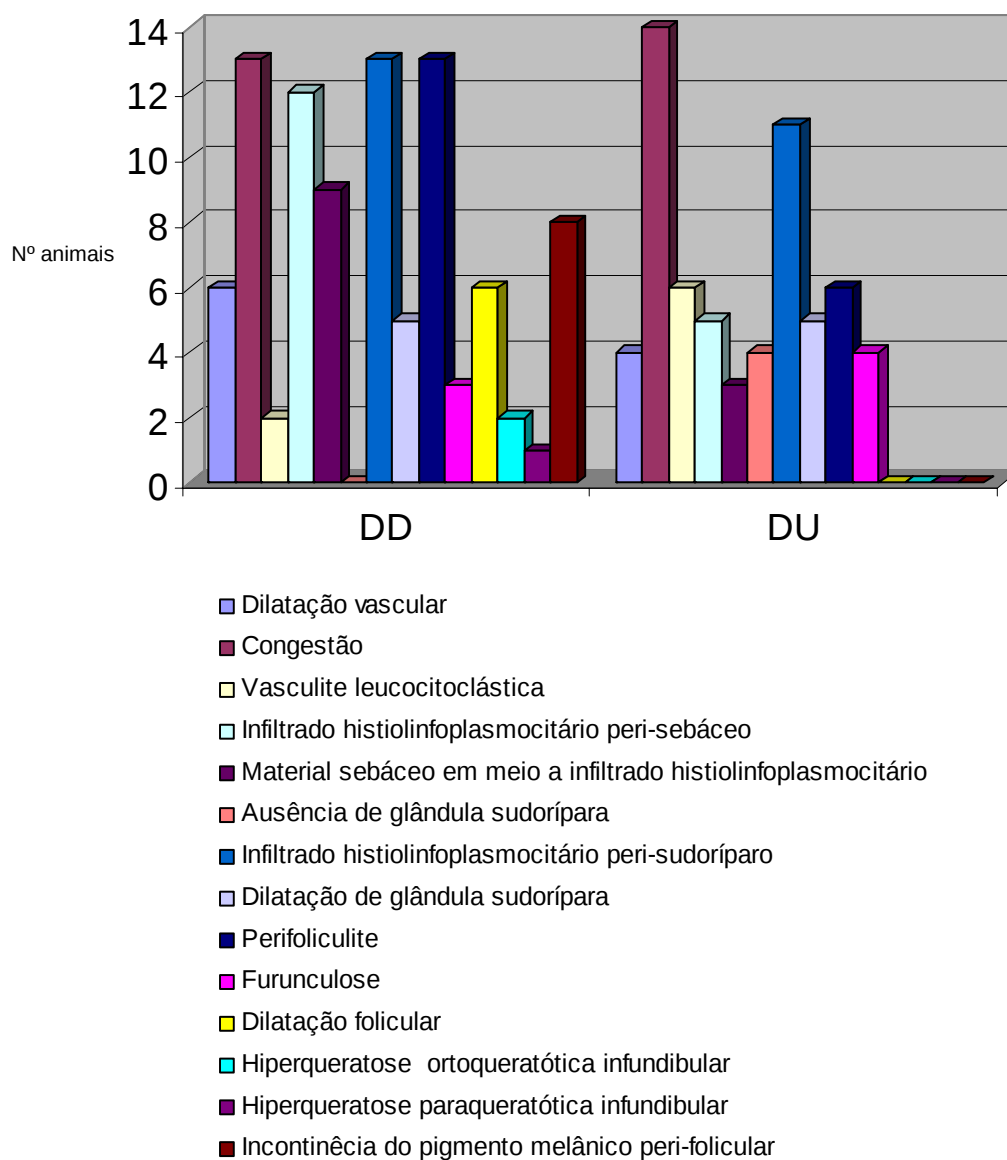


Figura 20. Lesões histológicas foliculares, glandulares e da vasculatura nas dermatites descamativas (DD) e ulcerativas (DU) em cães com leishmaniose visceral (n=30).

A presença de formas amastigotas foi observada praticamente em igual proporção nos dois grupos (Figuras 21 e 22).

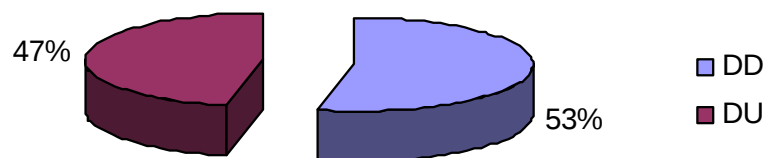


FIGURA 21. Presença de formas amastigotas na pele de cães com dermatite descamativa e ulcerativa.

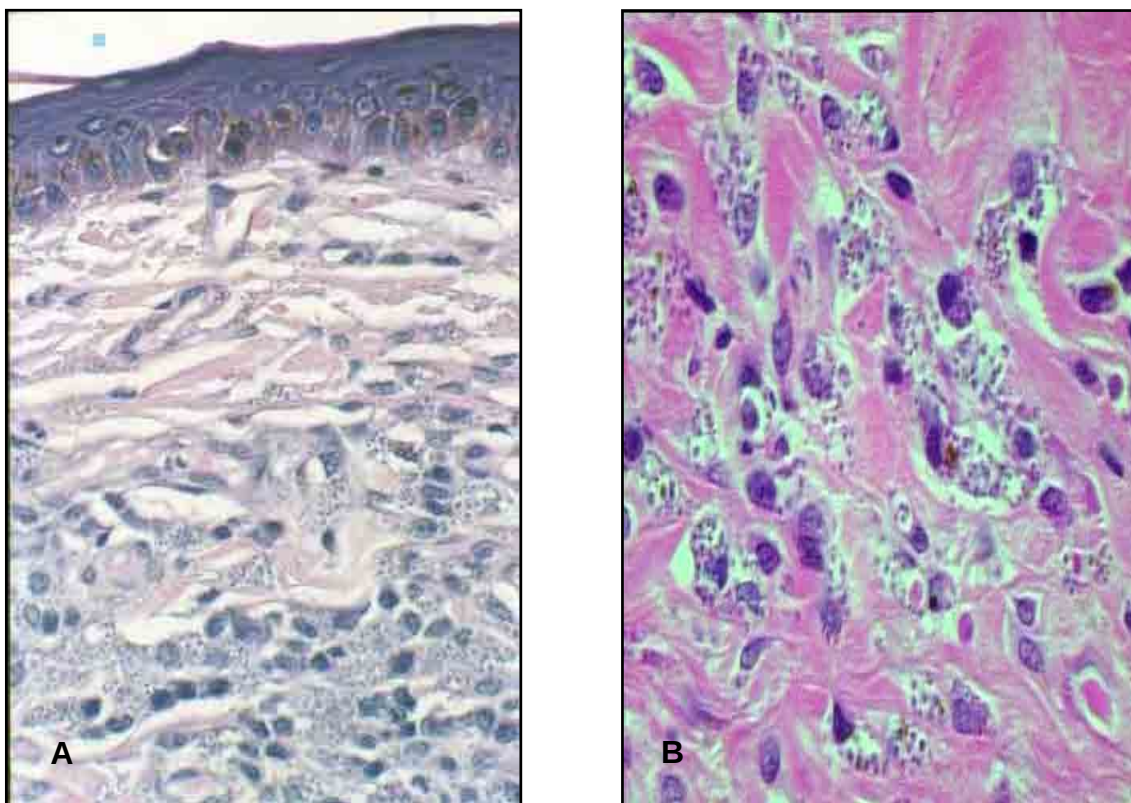


Figura 22. LVC. (A) DD. Presença de várias formas amastigotas no interior de macrófagos e espalhadas na derme, HE (objetiva de 40x); (B) DU. Infiltrado histiolinfoplasmocitário e formas amastigotas, HE (objetiva de 100x).

4.3. DO EXAME IMUNOISTOQUÍMICO

Os valores máximos e mínimos e a mediana da contagem de células CD3 positivas e CD79 positivas na derme dos cães com leishmaniose visceral encontram-se na tabela 2.

TABELA 2 – Resultados dos valores máximo e mínimo e a mediana da contagem de células CD3 e CD79a positivas na derme de cães apresentando padrão dermatológico descamativo e ulcerativo.

	valor máximo	valor mínimo	mediana
CD3+			
Dermatite descamativa (n=15)	295	5	69,5
CD3+			
Dermatite ulcerativa (n=15)	245	7	66,10
CD79a+			
Dermatite descamativa (n=15)	101	0	8,80
CD79a+			
Dermatite ulcerativa (n=15)	277	1	14,50

* Contagem das células em 10 campos selecionados aleatoriamente (objetiva de 40x).

As figuras 23, 24 e 25 ilustram as reações imunoistoquímicas positivas para o CD3 e CD79a.

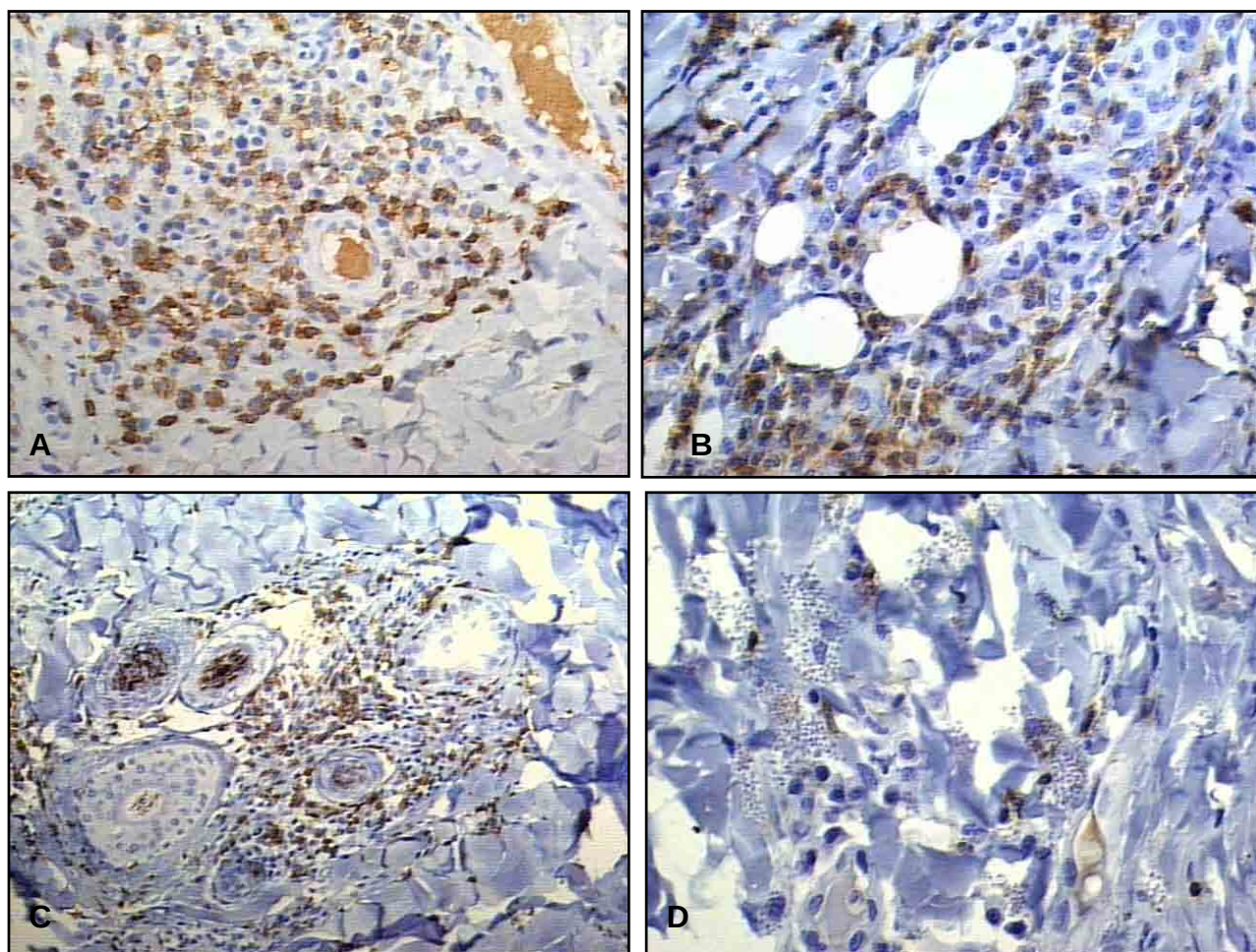


FIGURA 23. LVC. DD. (A) células CD3 positivas com arranjo perivascular, (500x); (B) células CD3 positivas em meio à inflamação granulomatosa e restos de material sebáceo – adenite sebácea granulomatosa, (500x); (C) células CD3 positivas em arranjo perianexial (250x); (D) poucas células CD3 positivas, presença de várias formas amastigotas, (640x). ENVISION, Hematoxilina.

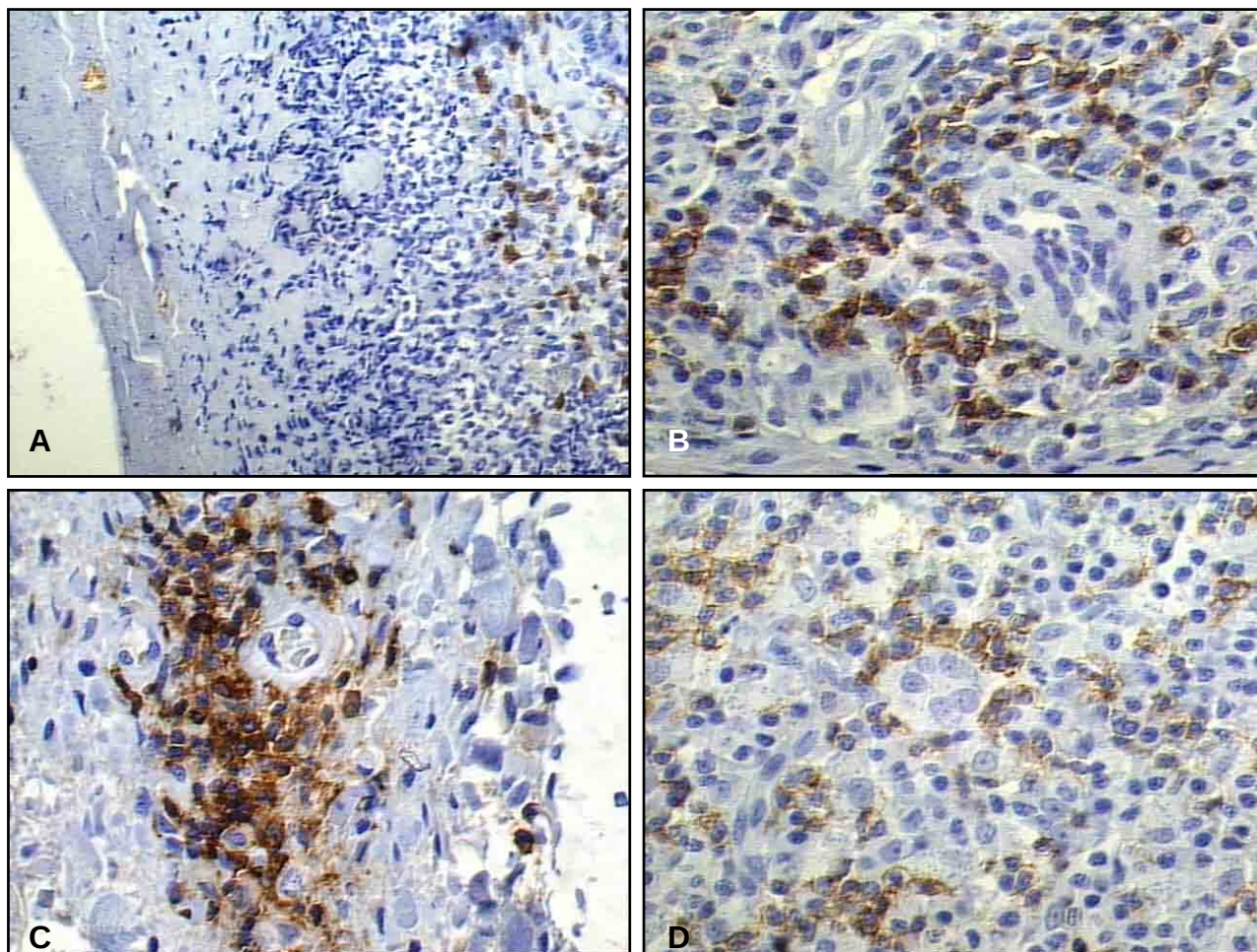


FIGURA 24. LVC. DU. (A) células CD3 positivas abaixo de região ulcerada, (250x); (B e C) células CD3 positivas com arranjo perivascular, (640x); (D) células CD3 positivas ao redor de macrófagos contendo formas amastigotas (640x). ENVISION, Hematoxilina.

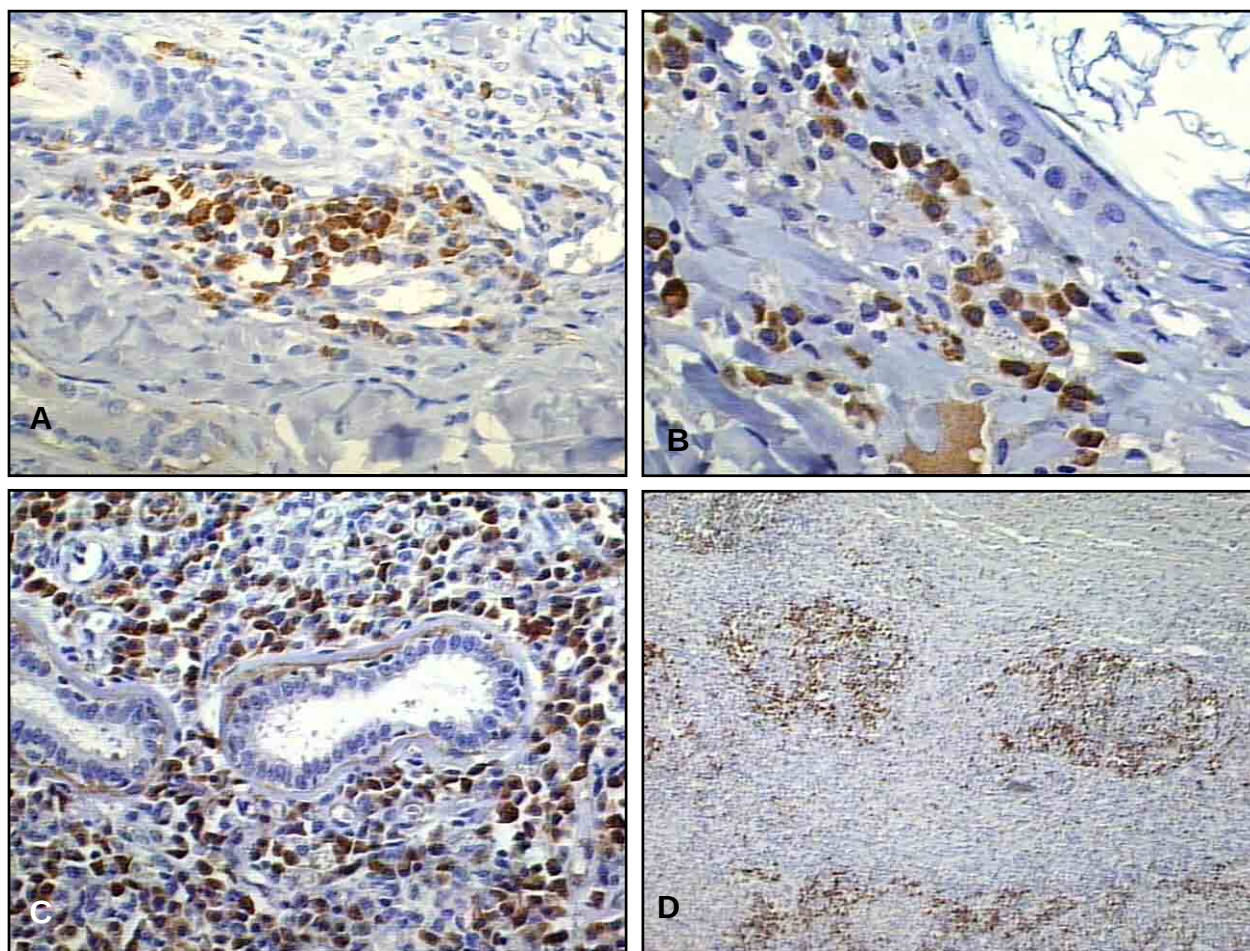


FIGURA 25. LVC. (A) DD. células CD79a positivas com arranjo perivascular, (400x); (B) DD. células CD79a positivas na derme superior, (640x); (C) DU. células CD79a positivas ao redor de glândulas sudoríparas (400x); (D) DU. células CD79a em dois arranjos nodulares, (50x). ENVISION, Hematoxilina.

A relação CD3/CD79a foi maior na dermatite descamativa, correspondendo uma positividade para CD3 em relação a CD79a de 7,8 (Figura 26).

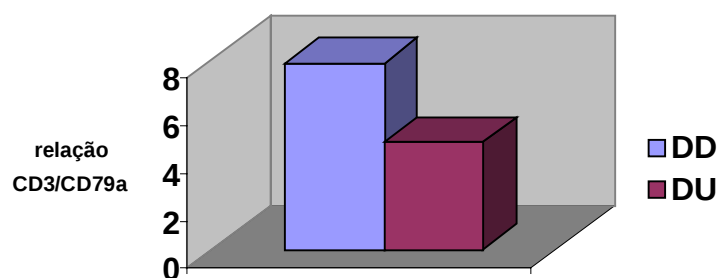


FIGURA 26. Relação dos anticorpos primários CD3/CD79a nos padrões de dermatite descamativa (DD) e dermatite ulcerativa (DU).

Quando se comparou a população de linfócitos T e B, dentro do mesmo padrão dermatológico, verificou-se que houve diferença estatística na resposta celular de CD3 e CD79a, predominando, tanto na dermatite descamativa quanto na ulcerativa, o padrão de linfócitos T.

Houve diferença estatística entre a população de células CD3+ e CD79a+ dentro do mesmo padrão dermatológico, o mesmo ocorreu quando se comparou a população de células CD79a+ entre os padrões descamativo e ulcerativo (Tabela 3).

Tabela 3 – Mediana e intervalo de confiança para a contagem de células CD3 e CD79 positivas na derme de cães apresentando padrão dermatológico descamativo e ulcerativo.

Anticorpos	Dermatite descamativa (n=15)	Dermatite ulcerativa (n=15)
CD3+	69,5 ^{A, a} (37,42-108,97)	66,10 ^{A, a} (62,70-86,95)
CD79a+	8,8 ^{B, a} (5,45-17,62)	14,5 ^{B, b} (11,15-33,90)

Teste Mann-Whitney

- Letras maiúsculas diferentes significam diferença estatística entre os anticorpos primários utilizados no mesmo padrão clínico ($p < 0,001$).
- Letras minúsculas diferentes significam diferença estatística entre os padrões clínicos, com o mesmo anticorpo primário ($p < 0,001$).

No padrão de dermatite ulcerativa, quando aumentava a positividade para CD3, diminuía para CD79a, porém sem diferença estatística (coeficiente de correlação de Spearman negativo, porém com $p>0,05$). Já nas lesões descamativas quando aumentava a marcação para CD3, o mesmo ocorria para CD79a, sendo estatisticamente significativa a correlação destas variáveis (coeficiente de correlação de Spearman positivo, com $p<0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4 – Coeficiente de correlação de Spearman segundo associação de interesse.

	CD79a Dermatite descamativa	CD3 Dermatite ulcerativa	CD79a Dermatite ulcerativa
CD3 Dermatite descamativa	0,824* ($p<0,05$)	0,141 ($p>0,05$)	-0,0286 ($p>0,05$)
CD79a Dermatite descamativa		-0,08 ($p>0,05$)	-0,0661 ($p>0,05$)
CD3 Dermatite ulcerativa			-0,116 ($p>0,05$)

- *Coeficiente de correlação positiva com $p<0,05$ tende a aumentar juntas.
- $p>0,05$ sem diferença estatística.

Discussão

5. DISCUSSÃO

A formação dos grupos baseou-se nos trabalhos de Ferrer et al. (1988), Koutinas et al. (1993) e Ciaramella et al. (1997), na qual as alterações mais observadas em cães com leishmaniose visceral foram descamação e ulceração cutânea.

Devido o caráter endêmico da leishmaniose na região onde se procedeu à colheita das amostras, o número de cães recebidos diariamente pelo Centro de Controle de Zoonoses do município de Araçatuba, permitiu que houvesse a formação de dois grupos homogêneos com alterações descamativas e ulcerativas.

Padrões com lesões predominantemente nodulares e pustulares como descritos por Ferrer et al. (1988) não foram observados.

Animais apresentando algum sinal sistêmico grave da doença, como por exemplo, icterícia, mucosas pálidas, epistaxe, eram excluídos dos grupos, de modo que permaneciam somente cães com alterações unicamente dermatológicas. Ainda vale salientar que os animais que chegavam ao Centro de Controle de Zoonoses não tinham uma história clínica detalhada e estes podiam permanecer no máximo dois dias no local, sendo logo realizada a eutanásia dos mesmos.

A descamação observada, nos cães do grupo A, foi do tipo seca furfurácea ou micácea e a alopecia, localizada em regiões de pavilhão auricular, cervical, torácica e de proeminências ósseas, de acordo com as documentadas na literatura (FERRER et al., 1988; KOUTINAS et al. 1993;

CIARAMELLA et al., 1997; FEITOSA et al., 2000). A alopecia periocular bilateral, um aspecto dermatológico interessante, também foi observado no trabalho com frequência, como relatado na Europa (FERRER et al., 1988; KOUTINAS et al. 1993, CIARAMELLA et al., 1997) e no Brasil (SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997; FEITOSA et al., 2000).

Os cães com dermatite ulcerativa apresentavam úlceras na articulação úmero-rádio-ulnar, bem como em outras regiões do corpo. Ao contrário do observado por Ferrer et al. (1988), no presente estudo, nenhum cão apresentava áreas de alopecia, quando categorizados neste padrão dermatológico.

A onicogribose foi observada em pouco menos da metade dos cães nos dois grupos (seis cães com dermatite descamativa e sete com dermatite ulcerativa). Tal achado se deve a matriz ungueal ser estimulada pela presença do parasito (NOLI, 1999).

Para confirmar o diagnóstico de leishmaniose foram realizados dois exames preconizados pelo Ministério da Saúde, o exame parasitológico através de citologia e o sorológico pela reação de imunofluorescência indireta. O resultado positivo na RIFI associados à presença de sinais clínicos da doença em área endêmica é o requisito básico para que os cães sejam considerados portadores da enfermidade (BRASIL, 2003). Isto, porém é muito discutido pela comunidade científica, pois a ocorrência de reações cruzadas com outras infecções é freqüente (ARAUJO, 2002).

Mesmo tendo a confirmação do diagnóstico de leishmaniose em todos os animais pelo do exame parasitológico, também foi realizada a reação de imunofluorescência indireta. Um cão apresentou título abaixo de 1:40, sendo considerado negativo para a infecção (EVANS et al., 1990). Este cão pertencia ao grupo com dermatite ulcerativa e não foi excluído, pois os exames citológicos e histológicos confirmaram a presença de formas amastigotas. Tal fato pode ser explicado considerando que os animais infectados demoram algum tempo para a produção de anticorpos (PINELLI et al., 1994b; RUITENBERG, 1994; FERRER, et al, 1995; TIZARD, 2000).

Controversamente, os achados da citologia aspirativa e biopsia de pele, demonstrando a presença de inúmeras formas amastigotas e plasmócitos, poderiam sugerir uma infecção crônica, com a produção de anticorpos. Talvez, a velocidade de produção de anticorpos não retrate a disseminação do parasito na pele e nos linfonodos, mesmo com a presença de plasmócitos apresentando Corpúsculos de Russel.

O local escolhido para a realização das biopsias em todos os cães com dermatite descamativa foi a região cefálica, uma vez que os flebotomíneos picam mais a região cefálica do cão (KILLICK-KENDRICK e KILLICK-KENDRICK, 1999). Nos cães com dermatite ulcerativa padronizou-se a coleta de fragmentos de pele ulcerada do cotovelo, a fim de minimizar as possíveis diferenças histopatológicas em virtude da localização e correlacioná-las com a marcação de linfócitos T e B.

Considerando a metodologia diagnóstica de padrões histopatológicos postulados por Ackerman (1978) e adaptadas por Yager e Scott (1993), diferentes alterações foram encontradas nas lesões descamativas e ulcerativas.

Nos cães com dermatite descamativa os padrões histopatológicos mistos foram os mais observados, seguidos da dermatite perianexial, perivascular superficial e nodular.

Os padrões que coexistem em uma mesma lâmina histológica podem representar a evolução da leishmaniose ou sua associação com outra dermatose (GROSS et al., 1992, KOUTINAS et al., 1993).

Em um animal com dermatite descamativa foi observado ácaros do gênero *Demodex* associado à presença de muitas formas amastigotas e estruturas fúngicas na haste de pêlos (artroconídeos) que se coravam positivamente para o PAS. O mesmo foi relatado por Mozos et al. (1999), porém sem a presença de fungos, a concomitância destas afecções sugere um quadro de imunossupressão.

Yager e Scott (1993) citam a furunculose, a causa mais comum de dermatite nodular/difusa piogranulomatosa. No presente trabalho, nem todos os casos de dermatite nodular havia evidência de ruptura folicular.

Na dermatite perianexial, o infiltrado inflamatório era mais freqüente ao redor das glândulas do que dos folículos pilosos, concordando com Koutinas et al. (1993) e Papadogiannakis et al. (2000).

Entre outras alterações glandulares freqüentes estavam a presença de restos de material sebáceo em meio a um infiltrado inflamatório granulomatoso e a dilatação de glândulas sudoríparas.

Papadogiannakis et al. (2001) citam a alteração sebácea como uma adenite sebácea granulomatosa, tal descrição tem que ser cuidadosamente avaliada pelo clínico, principalmente no diagnóstico diferencial da adenite sebácea granulomatosa idiopática, que acomete Poodles e Akitas.

O padrão descamativo da leishmaniose pode ser facilmente diferenciado dos distúrbios seborréicos primários pela presença de uma dermatite granulomatosa e piogranulomatosa (GROSS et al., 1992; KOUTINAS et al., 1993). A inflamação da glândula sebácea observada em doze animais com descamação, levando alterações na quantidade e qualidade dos lipídeos na epiderme, não pode ser a única explicação para a excessiva descamação encontrada nestes animais, pois três cães com descamação não apresentavam evidência de adenite sebácea. Rosser (1993) descreve que uma das causas de distúrbio de queratinização é a quantidade de secreção sebácea estimulada por inflamação, o que não parece ocorrer nos quadros descamativos de dermatite por leishmaniose.

No grupo A, dos quinze animais estudados foi possível a identificação de formas amastigotas em oito casos, nos demais algumas estruturas basofílicas, espalhadas na derme, assemelhavam-se ao parasito, mas a confirmação somente poderia ser realizada com a técnica

de imunoistoquímica (FERRER et al., 1988b; BOURDOISEAU et al., 1997).

Muitas úlceras presentes nos cães do grupo B apresentavam os mesmos aspectos da leishmaniose tegumentar americana. As lesões eram arredondadas com bordas elevadas e fundo granuloso de cor vermelho-vivo, recoberta ou não por exsudato seroso e serossanguinolento. Porém, as bordas infiltrativas, presentes no homem, que dão um aspecto chamado “em moldura de quadro” não foi observado (SAMPAIO e RIVITTI, 2001).

É importante lembrar que na patogenia das lesões da leishmaniose tegumentar, o processo inflamatório e as formas amastigotas ficam confinados à pele e não se disseminam, ao contrário da variante visceral nos cães, onde as lesões não se restringem à pele (FERRER et al. 1988; MARTINEZ-ARENDS et al., 1991; CÁCERES-DITTMAR, et al. 1992, COUTINHO et al., 1998).

O padrão histopatológico mais observados nos cães com dermatite ulcerativa foi o perivascular superficial e profundo.

De acordo com Ridley e Ridley (1983), as ulcerações são conseqüências da liberação do parasito dos macrófagos pela derme levando uma intensa inflamação e vasculite.

Ackerman (1978) relata que as vasculites, causando isquemia, seriam as principais causas das úlceras. Neste estudo, seis cães com dermatite ulcerativa apresentavam vasculite leucocitoclástica, além da

presença de formas amastigotas, o que de forma isolada poderia ser a causa de úlceras (RIDLEY, 1983). A presença exagerada de imunocomplexos circulantes, decorrente da infecção pela *Leishmania* poderia ser a causa destas vasculites leucocitoclásticas.

Dermatite difusa, onde agregados celulares e a morfologia normal da derme não são visualizados, foi observada em três cães com dermatite ulcerativa e em nenhum com dermatite descamativa, confirmando a ocorrência de uma maior reação tecidual neste padrão, atingindo áreas mais profundas.

Uma das principais causas de dermatite fibrosante é a furunculose (YAGER e SCOTT, 1993). No grupo de cães com ulcerações foi observado este padrão juntamente com evidência de ruptura folicular, o mesmo ocorreu em outros três cães, porém sem que houvesse predominância de fibrose.

Nos cães com dermatite ulcerativa as formas amastigotas foram encontradas em sete cães, um a menos do encontrado no grupo A, discordando com Ferrer et al. (1988), onde em lesões ulceradas a dificuldade de encontrar parasito é maior que nas lesões descamativas.

No presente trabalho, não há subsídios suficientes para a hipótese de uma imunocompetência tegumentar 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 (MARTINEZ-ARENDIS et al.,1991; DA-CRUZ et al.

1994; PINELLI et al. 1994; KEMP et al. 1996; FONDEVILA et al. 1997; PAPADOGIANNAKIS et al. 2001; QUINNELL et al. 2001). Porém, fica evidente que devido a maior imunomarcagem das células CD3 em relação as células CD79a, a resposta imune celular predomina sobre a resposta humoral nas lesões descamativas e ulcerativas.

Não foi possível a padronização da técnica de imunoistoquímica com os marcadores CD4 e CD8 neste trabalho, pois o processamento das amostras utilizou o formol tamponado a 10% e não o nitrogênio líquido como agente fixador do tecido, independente do protocolo utilizado.

Sabe-se que lesões alopecicas e descamativas, nos cães com leishmaniose visceral, são caracterizadas pela expressão do complexo de histocompatibilidade maior classe II por células de Langerhans e queratinócitos, presença de um infiltrado inflamatório com predomínio de células T e baixo número de formas amastigotas dentro dos macrófagos. Em contraste, as lesões nodulares apresentam uma dermatite granulomatosa com várias formas amastigotas e um baixo número de células T infiltradas na derme (FONDEVILA et al., 1997; MOZOS et al. 1999, PAPADOGIANNAKIS et al., 2000).

Conclusões

Nas condições em que foi realizado o presente trabalho, foi possível concluir-se que:

1. Alterações cutâneas predominantemente descamativas e ulcerativas são alterações comuns em cães com leishmaniose visceral.
2. Diferentes padrões histopatológicos ocorrem nas lesões descamativas, sendo a dermatite perianexial, com infiltrado inflamatório predominantemente ao redor das glândulas, a mais freqüente.
3. Vários padrões histopatológicos podem coexistir nas lesões descamativas, sendo o mais freqüente o perivascular superficial/perianexial.
4. Diferentes padrões histopatológicos ocorrem nas lesões ulcerativas, sendo a dermatite perivascular superficial e profunda a mais freqüente.
5. A população de linfócitos T é maior do que de linfócitos B, tanto na dermatite descamativa quanto na ulcerativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M.C.D.; CONCEICAO-SILVA, F.M.; SANTOS-GOMES, G.M.; JANZ, J.G. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **J. Parasitol.**, v.77, p.557-561, 1991.

ACKERMAN, A.B. **Histologic diagnosis of inflammatory skin diseases.** a method by pattern analysis. Philadelphia:Lea & Febiger, 1978. p.863.

ARAÚJO, W.N. **Estudo comparativo entre a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), o imunoensaio enzimático indireto (ELISA) e a técnica gelificação sérica ao formol a 40% para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.** 2002. 94f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ARIAS, J. R.; MONTEIRO, P; ZICKER, F. The re-emergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerg. Infec. Dis.**, v. 2, p. 145-146, 1996.

BACCHI, C.E.; BACCHI, M.M.; WARNKE, R.A. Nomenclatura CD. **Rev. Bras. Cancerol.**, v.36, p75-77, 1990.

BADARÓ, R.; DUARTE, M.I.S. Leishmaniose visceral. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (Eds.). **Tratado de infectologia.** São Paulo: Atheneu, 2002. p.1254-1279.

BAKER, R.; LUMSDEN, J.H. **Color Atlas of cytology of the dog and cat.** St. Louis: Mosby, 2000. p.288.

*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NRB 6023: informação e documentação – Referências – Elaboração.* Rio de Janeiro, 2002. 24p.
BIOSIS. *Serial sources for the BIOSIS preview database.* Philadelphia, 1996. 468p.

BARBOSA, W.; BARBOSA, G.L. **Leishmaniose visceral**. In: CASTRO, L.P.; CUNHA, A.S.; REZENDE, J.M. **Protozoonoses Humanas**. São Paulo: BYK, 1994. 226p.

BLAVIER, A.; KEROACK, S.; DENEROLLE, P.; GOY-THOLLOT, I.; CHABANNE, L.; CADORÉ, J.L.; BOURDOISEAU, G. Atypical forms of canine leishmaniosis. **Vet. J.**, v.162, p.108-120, 2001.

BOURDOISEAU, G.; MARCHAL, T.; MARCHAL, T.; MAGNOL, J.P. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. **J. Vet. Diag. Invest.**, v.9, p.439-440, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2003. 124p.

CÁCERES-DITTMAR, G.; SÁNCHEZ, M.A.; ORIOL, O.; KRAAL, G.; TAPIA, F.J. Epidermal compromise in American cutaneous leishmaniasis. **J. Invest. Dermatol.**, v. 99, p.95S-98S, 1992.

CASTRO, A.G. **Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (Calazar)**: Normas Técnicas. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1996. 86p.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; DE LUNA, R.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet. Rec.**, v.22, p.539-543, 1997.

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**, v.43, p.137-154, 1994.

CONCEIÇÃO, L.G.; LOURES, F.H.; CLEMENTE, J.T.; FABRIS, V.E. Biópsia e histopatologia da pele: um valioso recurso diagnóstico na dermatologia – revisão – parte 1. **Clín. Vet.**, v.9, n.51, p.36-43, 2004.

COUTINHO, S.G.; DA-CRUZ, A.M.; BERTHO, A.L.; SANTIAGO, M.A.; DE-LUCA, P. Immunologic patterns associated with cure in human american cutaneous leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.31, p.139-142, 1998.

CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica. **Situação da leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo.** Disponível em:< <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/Leishvis.htm>>. Acesso em: 10 dez. 2004.

DA-CRUZ, A.M.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; BERTHO, A.L.; COUTINHO, S.G. Leishmania-reactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. **Infect. Immun.**, v.62, p.2614-2618, 1994.

DAY, M.J. Implications of the immune system during infection by leishmania organism. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, Napoles, Italy. **Proceedings...** Napoles, 2004. p.21-28.

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. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.42, p118-123, 1990.

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

FERRER, L. Simultaneous presentation of leishmaniosis and other infectious diseases: clinical approach and mechanisms. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, Napoles, Italy. **Proceedings...** Napoles, 2004. p.37-38.

FERRER, L.; FONDEVILA, D.; RABANAL, R.; RAMIS, A. Detection of T lymphocytes in canine tissue embedded in paraffin wax by means of antibody to CD3 antigen. **J. Comp. Pathol.**, v. 106, p. 311-314, 1992.

FERRER, L.; AISA, M. J.; ROURA, X.; PORTÚS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Vet. Rec.**, v. 136, n. 3, p. 514-516, 1995.

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

FERRER, L.; RABANAL, R.; DOMINGO, M.; RAMOS, J.A.; FONDEVILA, D. Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissue by immunoperoxidase staining. **Res. Vet. Sci.**, v.44, p.194-196, 1988b.

FONDATI, A. Dermatological aspects of canine leishmaniasis: clinical and histopathological cases. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, Napoles, Italy. **Proceedings...** Napoles, 2004. p.39-41.

FONDEVILA, D.; VILAFRANCA, M.; FERRER, L. Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.56, p.319-327, 1997.

FONT, A.; ROURA, X.; CLOSA, J.M.; MASCORT, J.; FERRER, L. Canine mucosal leishmaniasis. **J. Am. Hosp. Assoc.**, v.32, p.131-137, 1996.

FRANCO, A.M.R. First World Congress on Leishmaniasis-world Leish 1. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.92, p.867-870, 1997.

GROSS, T.L.; IHRKE, P.J.; WALDER, E.J. **Veterinary Dermatopathology: a macroscopic and microscopic evaluation of canine and feline skin disease**. St. Louis: Mosby, 1992. p.520.

HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J. Histochem. Cytochem.**, v.29, p.577-580, 1981.

KEMP, M.; THEANDER, T.G.; KHARAZMI, A. The contrasting roles of CD4+ T cells in intracellular infection in humans: leishmaniasis as an example. **Immunol. Today**, v.17, p.13-16, 1996.

KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK, M. Biology of sand fly vectors of Mediterranean canine leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona. **Proceedings...** Barcelona, 1999. p.26-31.

KOUTINAS, A.F.; SARIDOMICHELAKIS, M.N. Canine leishmaniasis in the Mediterranean area: epidemiological aspects. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 2004, Naples. **Proceedings...** Naples, 2004. p.45-50.

KOUTINAS, A.F.; SARIDOMICHELAKIS, M.N. Clinical aspects of canine leishmaniasis in Greece. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 2004, Napoles. **Proceedings...** Napoles, 2004. p.51-57.

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. **Vet. Dermatol.**, v.3, p.121-130, 1993.

KOUTINAS, A.F.; POLIZOPOULOU, Z.S.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; ARGYRIADIS, D.; FYTIANOU, A.; PLEVRAKI, K.G. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: A retrospective study of 158 cases (1989-1996). **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v.35, p.376-383, 1999.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILILLICK-KENDRICK, R. (Eds.). **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987. p.120.

LUVIZOTTO, M.C.R.; BIAZZONO, L.; EUGENIO, F.R.; ANDRADE, A.L. Leishmaniose visceral canina autóctone no município de Araçatuba-SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 20., 1999, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia, 1999. p.24-25.

MARTINEZ-ARENDTS, A.; TAPIA, F.J.; CACERES-DITTMAR, G.; MOSCA, W.; VALECILLOS, L.; CONVIT, J. Immunocytochemical characterization of immune cells in lesions of American cutaneous leishmaniasis using novel T cell markers. **Acta Trop.**, v.49, p.271-280, 1991.

MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SABROZA, P.C.; SOUZA, M.A.; SOUZA, P.P.; TOLEDO, L.M.; RANGEL FILHO, F.B. Leishmaniose visceral

canina no Rio de Janeiro – Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v.1, n.4, p.432-446, 1985.

MORGAN, L.W.; KERLIN, R.L.; DEBOER, D.J. Difficult dermatologic diagnosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.210, p.181-182, 1997.

MOZOS, E.; PÉREZ, J.; DAY, M.J.; LUCENA, R.; GINEL, P.J. Leishmaniosis and generalized demodicosis in three dogs: a clinicopathological and immunohistochemical study. **J. Comp. Pathol.**, v.120, p.257-268, 1999.

NOLI, C. Leishmaniosis canina. **Waltham Focus**, v.9, n.2, p.16-24, 1999.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; SANTOS, W.R.; FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA, R.T.; REIS, A.B.; PALATNIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.65, p.510-517, 2001.

PAPADOGIANNAKIS, E.I.; KOUTINAS, A.F.; KOUTINAS, C.K. Contemporary aspects on the immunopathogenesis of skin lesions in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). **J. Hell. Vet. Med. Soc.**, v.52, p.249-256, 2001.

PAPADOGIANNAKIS, E.I.; KOUTINAS, A.F.; SARIDOMICHELAKIS, M.; KARAMERIS, A. Histopathology and immunohistochemistry of exfoliative dermatitis in canine leishmaniasis: a comparative study between lesional and normal looking skin. **Vet. Dermatol.**, v.23, supl. 1, p.23, 2000.

PINELLI, E.; RUTTEN, V.P.M.G.; RUITENBERG, E.J. Cellular immune responses in canine leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona. **Proceedings...** Barcelona, 1999. p.60-4.

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**, v.43, p.189-192, 1994.

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. **Infect. Immun.**, v.62, p.229-235, 1994b.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; SHAW, M.A.; DAY, M.J.; GARCEZ, L.M.; DYE, C.; KAYE, M. tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p.1421-1424, 2001.

REITHINGER, R.; DAVIES, C.R. Is the domestic dog (Canis familiaris) a reservoir host of american cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.61, p.530-541, 1999.

RIDLEY, D.S.; RIDLEY, M. The evolution of lesions in cutaneous leishmaniasis. **J. Pathol.**, v.141, p.83-96, 1983.

ROSSER, E. I. Sebaceous adenitis. In: GRIFFIN, C.E.; KWOCHKA, K.W.; MCDONALD, J.D. (Eds.). **Current Veterinary Dermatology: the Science and Art of Therapy**. St. Louis: Mosby, 1993. p.211-214.

SAMPAIO, S.; RIVITTI, E.A. **Dermatologia**. 2.ed. Artes Médicas: São Paulo, 2001. p.1156.

SANTA ROSA, I.C.A.; OLIVEIRA, I.C.S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clín. Vet.**, v.11, p.24-28, 1997.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. **MULLER & KIRK' small animal dermatology**. 6 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001. p.1528.

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., FONDEVILA, D., ALBEROLA, J., RAMIS, A., FERRER, L. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. **J. Comp. Pathol.**, v.130, p.7-12, 2004.

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p.560-563, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L.; LLULL, J.; RAMOS, G.; RIERA, C.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, F. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Vet. Parasitol.**, v.90, p.37-45, 2000.

TAPIA, F.J.; CÁCERES-DITTMAR, G.; SANCHES, M.A. Inadequate epidermal homing leads to tissue damage in human cutaneous leishmaniasis. **Immunol. Today**, v.15, p.160-165, 1994.

TIZARD, I.R. **Veterinary immunology**. 6.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000. 482p.

VEXENAT, J.A.; FONSECA DE CASTRO, J.A.; CAVALCANTE, R.; DA SILVA, M.R.P.; BATISTA, W.H.; FURTADO CAMPOS, J.H.; ALVES PEREIRA, F.C.;

TAVARES, J.P.; MILES, M.A. Preliminary observations on the diagnosis and transmissibility of canine visceral leishmaniasis in Teresina, N.E. Brazil. **Archs. Inst. Pasteur**, v.70, p. 467-472, 1993.

WHO. **Communicable disease surveillance and response**. Geneva: World Health Organization, 2002. Disponível em: <
<http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>>. Acesso em: 10 set. 2002.

YAGER, A.J.; SCOTT, D.W. The skin and appendages. In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 4 ed. San Diego: Academic Press, 1993. p.531-738.

YOUNG, D.G.; ARIAS, J.R. **Flebotomos**: vectores de leishmaniasis en las Americas. Washington: OPAS, 1992. (Cuaderno Técnico, 33).

Anexos

Anexo 1 . Tabela referente aos protocolos utilizados na padronização dos anticorpos primários CD4 e CD8.

CD4 (Serotec®, clone CA13.1EA, monoclonal anti-canino, isotipo IgG1) CD8 (Serotec®, clone CA9.JD3, monoclonal anti-canino, isotipo IgG2a)							
Recuperação antigênica		Bloqueio da peroxidase endógena	Bloqueio da avidina e biotina endógena	Diluição e incubação do anticorpo primário	Tempo DAB	Complexo avidina e biotina	Resposta
Solução	Tempo	H ₂ O ₂ 20 volumes + H ₂ O destilada 2x 15'	Não	1:25/18 horas/4°C	3'	LSAB	negativo
TRIS/EDTA pH 9,0	banho-maria 40'		Não	1:25/18 horas/4°C	3'	LSAB	Marcação inespecífica
EDTA pH 8,0	banho-maria 40'		Não	1:25/18 horas/4°C	3'	LSAB	Negativo
Citrato pH 6,0	banho-maria 40'		Não	1:25/18 horas/4°C	3'	ABC	Negativo
Pepsina 2%	estufa 60°C/10' estufa 37°C/20'		Não	1:25/18 horas/4°C	3'	CSA	Marcação inespecífica
EDTA pH 8,0	banho-maria 40'		Não	1:10/18 horas/4°C	3'	CSA	Negativo
TRIS/EDTA pH 9,0	banho-maria 40'		Não	1:50/18 horas - CD4 1:100/18 horas - CD8 4°C	3'	CSA	Marcação inespecífica
EDTA pH 8,0	banho-maria 40'		Não	1:50/18 horas - CD4 1:100/18 horas - CD8 4°C	3'	CSA	Marcação inespecífica
EDTA pH 8,0	banho-maria 40'		2x 15'	1:50/18 horas - CD4 1:100/18 horas - CD8 4°C	15" 30" 1'	CSA	Marcação inespecífica
EDTA pH 8,0	banho-maria 40'		2x 15'	1:200/18 horas/4°C	15" 30" 1'	CSA	Marcação inespecífica
TRIS HCl pH 1,0	micro-ondas 15'		Sim 2x 15'	1:200/18 horas/4°C	15" 30"	CSA	Marcação inespecífica
EDTA pH 8,0	banho-maria 40'		2x 15'	1:20/18 horas/4°C	4'	ENVISION	Negativo
EDTA pH 8,0	banho-maria 40'		2x 15'	1:200/2 horas/ T° ambiente	1'	CSA	Positivo ^A

A. As células positivas para o CD4 e CD8 neste protocolo foram raras, não possibilitando a contagem de suas populações.

Anexo 2 . Tabela referente aos protocolos utilizados na padronização dos anticorpos primários CD4 e CD8.

CD4 (VMRD Inc, clone DH29A, monoclonal anti-canino, isotipo IgM)							
CD8 (VMRD Inc, clone CA046A, monoclonal anti-canino, isotipo IgG1)							
Recuperação antigênica		Bloqueio da peroxidase endógena ^A	Bloqueio da avidina e biotina endógena	Diluição e incubação do anticorpo primário	Tempo DAB	Complexo avidina e biotina	Resposta
EDTA pH 8,0	banho-maria 25'	H ₂ O ₂ 10 volumes 2x 15'	Sim 2x 15'	1:500/18 horas/4°C	30''	CSA	Marcação inespecífica
TRIS HCl pH 1,0	micro-ondas 15'		Sim 2x 15'	1:500/18 horas/4°	30''	CSA	Marcação inespecífica

Anexo 3. Produtos utilizados na realização da técnica de imunoistoquímica.

- **TRIZMA BASE** – P.M. 121,1 cod.T1503 Sigma-Aldrich
- **EDTA** (ácido etilenodiaminotetra acético sal dissodico) – P.M. 372,24 Synth
- **ÁCIDO CÍTRICO** anidro – P.M. 192,13 Dinâmica
- **PEPSINA** 1:10.000 Nuclear
- **TRIZMA HCl** – P.M. 157,6 cod.T7149 Sigma-Aldrich
- **BIOTIN BLOCKING SYSTEM** cod.X0590 DakoCytomation
- **LIQUID DAB LARGE VOLUME SUBSTRATE – CHROMOGEN SYSTEM**
(3,3'dimainobenzidina) cod.K3466 DakoCytomation
- **LSAB + SYSTEM**, HRP cod.K0690 DakoCytomation
- **STREPTABC COMPLEX**, HRP cod.0377 DakoCytomation
- **CATALYSED SIGNAL AMPLIFICATION (CSA) SYSTEM** cod. K150 DakoCytomation
- **ENVISION+™ DUAL LINK SYSTEM, PEROXIDASE** cod. K4061 DakoCytomation