

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS E HEMATOLÓGICAS CAUSADAS EM COELHOS INFESTADOS EXPERIMENTALMENTE COM *Stomoxys calcitrans**

HISTOPATHOLOGIC AND HEMATHOLOGIC CHANGES IN EXPERIMENTALLY INFESTED RABBITS BY Stomoxys calcitrans.

Walker Nunes Chagas¹, Ana Paula Rodrigues Moraes², Carlos Wilson Gomes Lopes³ e Avelino José Bittencourt⁴

ABSTRACT. Chagas W.N., Moraes A.P.R., Lopes C.W.G. & Bittencourt A.J. [**Histopathologic and hemathologic changes in experimentally infested rabbits by *Stomoxys calcitrans***]. Alterações histopatológicas e hematológicas causadas por *Stomoxys calcitrans* em coelhos infestados experimentalmente. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 33(3):165-170, 2011. Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: bittenc@ufrj.br

This study aimed to evaluate the macro and microscopic alterations in the skin of rabbits, as well as to evaluate the leukocyte response of these animals against different levels of infestation and reinfestation by stable fly, *Stomoxys calcitrans* (L., 1758). The histopathological findings indicated that the infestation led to the development of perivascular and interstitial dermatitis, and was compatible with hypersensitivity reaction of type I. The leukocyte count showed an increase in neutrophils and monocytes, which were associated to the specific inflammatory response. The animals underwent re-exposure showed a reduction of leukocytes and other changes in leukocyte counts that were compatible with chronic response. The histopathologic and leukocyte counts verified in this study were related to changes as being responsible for the symptoms and behavioral changes described in animals infested by the stable fly *S. calcitrans* previously.

KEY WORDS. *Stomoxys calcitrans*, rabbits, leukometry, dermatitis.

RESUMO. O presente estudo teve como objetivos, avaliar as alterações macro e microscópicas na pele de coelhos, como também, avaliar a resposta leucocitária destes animais, frente a diferentes níveis de infestação e reinfestação pela mosca *Stomoxys calcitrans* (L., 1758). Os achados histopatológicos indicaram que a infestação determinou o desenvolvimento de dermatites perivascular e intersticial, sendo compatível com reação de hipersensibilidade

do tipo I. A leucometria revelou aumento de neutrófilos e monócitos, que pode estar relacionado a essa resposta inflamatória específica. Os animais submetidos à re-exposição mostraram redução de leucócitos e outras alterações na leucometria que foram compatíveis com respostas crônicas. Os achados histopatológicos e leucocitários verificados no presente estudo estão relacionados com as alterações citadas por outros autores, como sendo responsá-

* Recebido em 20 de outubro de 2010.

Aceito para publicação em 22 de maio de 2011.

¹ Médico-veterinário, *Dr.CsVs*. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23.890-000, Brasil.

² Médica-veterinária, *M.CsVs*. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, IV, UFRRJ, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23.890-000. E-mail: bittenc@ufrj.br

³ Médico-veterinário, PhD, LD. Departamento de Parasitologia Animal, IV, UFRRJ, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: lo-pescwg@ufrj.br

⁴ Médico-veterinário, *Dr.CsVs*. Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, IV, UFRRJ, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: bittenc@ufrj.br

veis pelos sintomas e alterações comportamentais descritas nos animais infestados pela mosca *S. calcitrans*.

PALAVRAS-CHAVE. *Stomoxys calcitrans*, coelhos, lesões cutâneas, leucometria.

INTRODUÇÃO

A mosca dos estábulos (*Stomoxys calcitrans*) é responsável por significativa diminuição da produtividade animal, principalmente em bovinos e equinos. As perdas econômicas ocorrem devido a dor, causada pelo grande número de moscas ao se alimentar nos animais. Isso ocasiona estresse, diminuição da ingestão de alimento, espoliação sanguínea e transmissão de agentes patogênicos. Quando ocorrem surtos, associados à alimentação interrompida nos animais ocorrem lesões traumáticas na pele dos animais infestados, que também predispõem ao aparecimento de infecções secundárias (Bittencourt 2002). O presente estudo avaliou as alterações macro e microscópicas da pele, bem como alterações na leucometria de coelhos experimentalmente infestados por *S. calcitrans*.

MATERIAL E MÉTODOS

Para realização do experimento, trinta coelhos machos da raça Nova Zelândia, de pelagem branca e com 96-105 dias de vida foram divididos em cinco grupos de seis animais e submetidos à infestação experimental com *S. calcitrans* por cinco minutos. As moscas foram obtidas da colônia mantida no Laboratório de Pesquisa em Dípteros Hematófagos, localizado na Estação para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz, Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária da UFRRJ, de acordo com metodologia descrita por Moraes (2007). Cada coelho teve uma das orelhas expostas a picadas por três (grupo I), sete (grupo II) e 14 moscas (grupo III); ou submetidos a re-infestação com 14 moscas, 15 dias após a primeira exposição (grupo IV). Os animais do grupo controle (grupo V) foram expostos a sete moscas com aparelho bucal extirpado. De acordo com o grupo, as moscas foram distribuídas em tubos de vidro cobertos com uma tela fina para que se alimentassem nos coelhos. Após 48 horas, os coelhos foram anestesiados com a associação de cloridrato de cetamina (40mg/kg) e xilazina (10mg/kg) - IM, (Quesenberry 1998) para a realização das biópsias das áreas da pele onde as moscas se alimentaram, mediante a utilização de saca bocado com diâmetro de 5mm. As amostras de pele foram fixadas em for-

mol a 10%, processadas para inclusão em parafina (5 µm) e coradas por hematoxilina-eosina, azul de toluidina e Giemsa conforme Luna (1968).

Na análise histopatológica, foram avaliadas a presença e intensidade de edema, hemorragia, congestão, infiltrado inflamatório, linfangiectasia e alterações epidérmicas.

A coleta de sangue para leucometria global foi realizada 48 horas após a realização das biópsias de pele em todos os coelhos utilizados no estudo. As amostras foram coletadas por venipunção auricular da orelha não utilizada para biópsia com seringas lavadas anteriormente com anticoagulante (EDTA). Também foram realizados esfregaços sanguíneos corados pelo Giemsa para contagem diferencial de leucócitos (Feldman et al. 2000). Os resultados obtidos foram analisados, utilizando o teste de Kruskal-Wallis, teste *t* de Student e teste Exato de Fisher ($\alpha = 0,05$) de acordo com Sampaio (1998).

RESULTADOS

Após as infestações não foi observado prurido auricular nos coelhos de todos os grupos. Macroscopicamente foram observadas pequenas manchas hemorrágicas (Figura 1a) circulares e hematomas subcutâneos nos animais dos grupos I a IV (Figura 1b). Os resultados da avaliação microscópica podem ser observados na Tabela 1. No grupo V, não foram observadas alterações microscópicas, exceto para dois animais que apresentaram congestão discreta. A avaliação histopatológica dos grupos expostos às picadas revelou edema intersticial associado à linfangiectasia (Figura 2a), hemorragia e hiperqueratose (Figura 2b), infiltrado inflamatório de polimorfos e colagenólise (Figura. 3a), infiltrado mononuclear e acantose (Figura. 3b) e congestão. A intensidade da maioria das lesões variou de discreta a moderada, com exceção de um animal do grupo IV, que apresentou intenso infiltrado mononuclear (Figura 3b). Os grupos expostos às picadas apresentaram hiperqueratose ortoqueratótica compacta, bem como crostas serocelulares associadas com acantose (Figura 3b). Não houve diferença estatística significativa nos achados histopatológicos entre os grupos I a IV. Em contraste, o grupo V diferiu dos demais ($p < 0,05$). Com relação aos infiltrados inflamatórios, os eosinófilos foram os principais polimorfonucleares associados à cola-

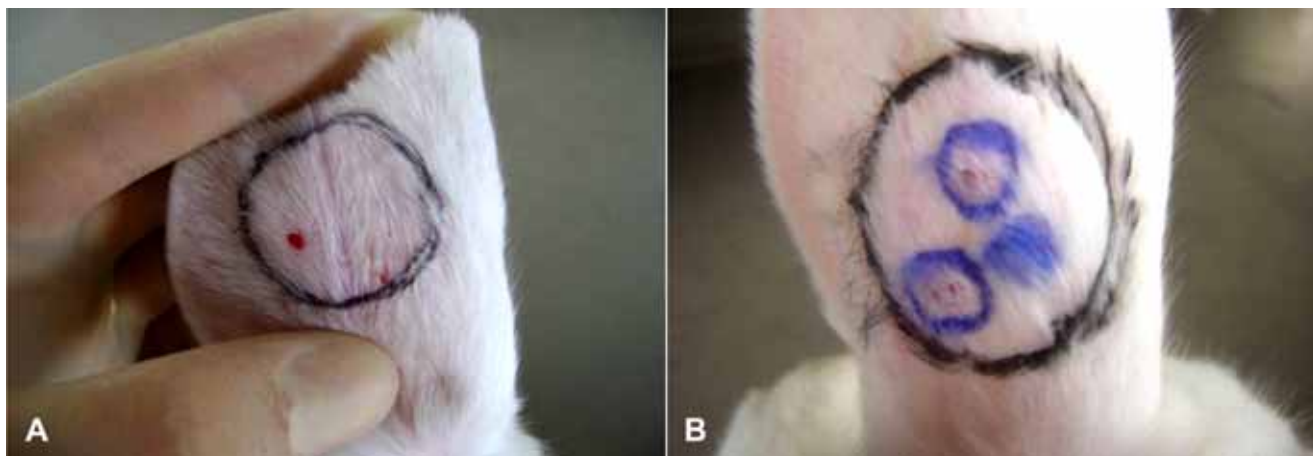


Figura 1. Manchas hemorrágicas (A) e hematomas na pele de coelhos experimentalmente infestados por *Stomoxys calcitrans* (B).

Tabela 1. Alterações microscópicas na pele de coelhos experimentalmente infestados com diferentes níveis de infestação de *Stomoxys calcitrans*.

Grupos (n=6)	Edema (%)	Hemorragia (%)	Congestão (%)	PMN (%)	MN (%)	Linfangiectasia (%)	Epiderme (%)
I	+ (50)	+ (66,66)	+ (83,33)	+ (66,66)	+ (66,66)	(50)	Hiperq.(83,33)
II	+ (50)	+ (33,34) ++ (16,67)	+ (66,66) ++ (16,67)	+ (50)	+ (33,34) ++ (16,67)	(50)	Hiperq.(83,33) Acant.(16,67)
III	+ (83,33) ++ (16,67)	+ (16,67)	+ (83,33) ++ (16,67)	+ (33,34) ++ (16,67)	+ (16,67) ++ (50)	(50)	Hiperq.(83,33)
IV	+ (66,66) ++ (33,34)	+ (33,34) ++ (16,67)	+ (100)	++ (50)	+ (16,67) ++ (16,67) +++ (16,67)	(100)	Hiperq.(66,66) Acant.(33,34)
V	-	-	+ (33,33)	-	-	-	-

- ausente; + discreto; ++ moderado; +++ intenso; PMN= infiltrado polimorfonuclear; MN= infiltrado mononuclear; Hiperq.= hiperqueratose; Acant.= acantose.

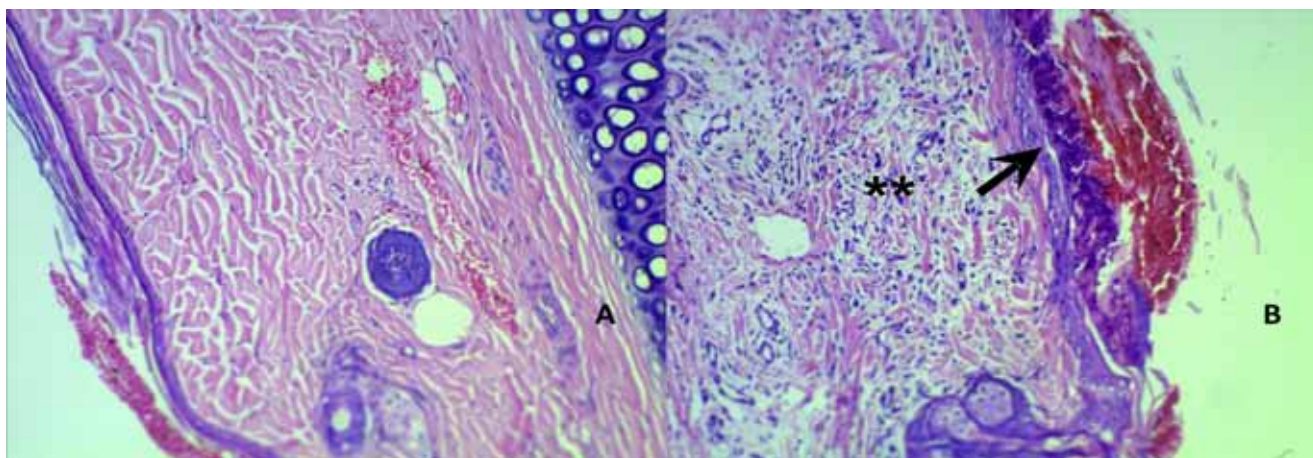


Figura 2. Fotomicrografias de pele: (A) Hiperqueratose ortoceratótica compacta (seta) com hemorragia discreta na derme profunda (*); (B) Epiderme com acantose e crosta associada (seta). Intenso infiltrado mononuclear histiocítico intersticial (**). HE, obj.40X.

genólise com *figuras em chama* (Figura 3a). Os histiócitos foram os infiltrados mononucleares predominantes, enquanto os mastócitos não foram observados (Figura 3b). Os achados histopa-

tológicos indicam que as infestações determinaram a formação e desenvolvimento de dermatites perivasculares e intersticiais, sendo compatível com reação de hipersensibilidade do tipo 1.

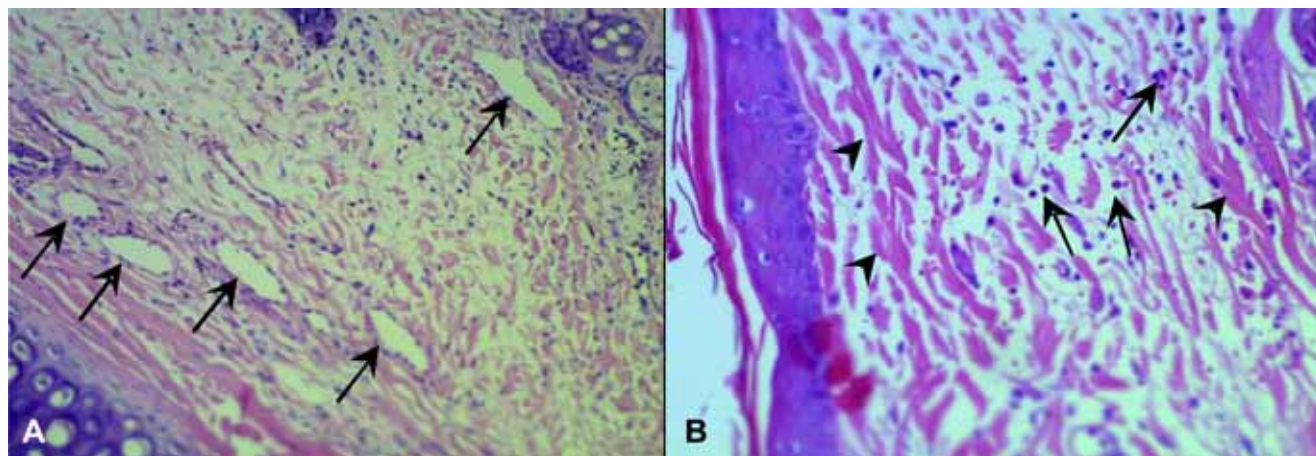


Figura 3. Fotomicrografias de pele: (A) Edema moderado e linfangectasia (setas). Infiltrado polimorfonuclear (setas); colagenólise - "figuras em chamas" (cabeças de seta) e edema moderado (B). HE, obj. 40X.

Tabela 2. Referência* e valores médios absolutos e relativos (%) da leucometria global e específica de coelhos experimentalmente infestados por *Stomoxys calcitrans*.

Celulas/Grupos	Referência Absoluta (%)	Controle Absoluta (%)	G I Absoluta (%)	G II Absoluta (%)	G III Absoluta (%)	G IV Absoluta (%)
Leucometria Global	6400 - 13000	6166	10450	8500	9600	4383
Basófilos	198.5 - 403 (3.1)	104.50 (1.69)	128.67 (1.23)	38.0 (0.45)	280.80 (2.93)	80.50 (1.84)
Eosinófilos	64 - 130 (1.0)	55.17 (0.89)	34.50 (0.33)	21.50 (0.25)	107.0 (1.11)	6.00 (0.14)
Heterófilos	1920 - 3900 (30.0)	2714.50 (44.02)	5313.33 (50.85)	5189.00 (61.05)	5835.60 (60.79)	1953.47 (44.56)
Linfócitos	3840 - 7800 (60.0)	2943.17 (47.73)	4396.17 (42.07)	2639.33 (31.05)	2601.40 (27.10)	1897.00 (43.28)
Monócitos	198.5 - 403 (3.1)	336.67 (5.46)	568.50 (5.44)	612.17 (7.20)	775.20 (8.08)	413.67 (9.44)

*Feldman et al. (2000)

A análise dos leucogramas evidenciou que os animais expostos às picadas apresentaram heterofilia e monocitose, bem como eosinopenia e linfopenia. Essas alterações foram significativas ($p < 0,05$) em relação à intensidade da infestação. Leucopenia e monocitose apresentados no grupo IV foram compatíveis com um quadro de resposta inflamatória crônica (Tabela 2).

DISCUSSÃO

A ausência de prurido diferiu dos resultados apresentados por Perris (1995), onde relatou que a hipersensibilidade induzida pela picada de insetos é uma das principais causas de prurido. Entretanto este sintoma pode não ter sido observado no presente estudo, em consequência da anestesia realizada nos animais. A observação de hemorragia e hematomas nas biopsias de pele está de acordo com o verificado por Jubb et al. (2007) em estudo de lesões associadas às picadas de insetos. No entanto, como

foi realizada uma infestação, ou ainda, apenas uma re-infestação, não foram observadas lesões com áreas de necrose focal e ulcerações como ocorre em infestações prolongadas (Yeruham & Braverman 1995). A exemplo do que foi observado no presente estudo, Souza et al. (2005) também observaram hiperqueratose ortoceratótica e paraceratose, devido à repetidas infestações de ovinos com *Ceratopogonídeos* (*Culicoides* sp.). McGavin & Zachary (2007) e Cotran et al. (1999) relataram a presença de espongirose, vesículas intra-epidérmicas, hiperplasia, paraqueratose e hiperqueratose causadas por picadas de insetos, que podem ser associadas com o trauma causado pelo animal em decorrência do prurido.

A hemorragia intersticial verificada no presente estudo, foi semelhante à relatada por Cotran et al. (1999), Jubb et al. (2007) e McGavin & Zachary (2007), que é causada em decorrência do tamanho da probóscida de *S. calcitrans* que atinge profundamente o plexo vascular localizado na derme (Perris

1995) e a presença de vasodilatação, hiperemia e edema com subsequente linfangiectasia observadas por Cotran et al. (1999) similares as observadas no presente estudo, onde estiveram associadas ao processo de agressão tissular decorrente da picada de *S. calcitrans*. Os infiltrados eosinofílicos foram classificados no presente estudo como discretos a moderados conforme relatados por Souza et al. (2005) e Jubb et al. (2007); entretanto, estes autores os classificaram como intensos. No caso do presente estudo, os infiltrados eosinofílicos que variaram de discretos a moderados, poderiam estar associados ao número de moscas utilizadas e ao tempo de permanência no processo de alimentação das moscas, que não devem ter sido suficientes para apresentar a mesma intensidade de reação descrita pelos Souza et al. (2005) e Jubb et al. (2007). Além disso, Souza et al. (2005) observaram vários eosinófilos degranulados associados à colagenólise formando *figuras em chamas*, como o descrito neste estudo. Diferindo de Cotran et al. (1999), não foram evidenciados mastócitos, porém histiócitos foi o infiltrado inflamatório predominante. A ausência de mastócitos intersticiais nas 48 horas após a infestação foi compatível com o padrão de reação de hipersensibilidade do tipo 1, bem como a presença de infiltrados eosinofílicos, que variou de discreta a moderada podem corroborar com esta afirmação (Cotran et al. 1999).

Os achados histopatológicos indicaram dermatite perivascular e intersticial, diferindo das lesões observadas na orelha de cães (dermatite necrótica) e nos membros de equinos (dermatite exsudativa) causadas pela infestação da mosca dos estábulos descritas por Yeruham & Braverman (1995). Esta diferença também poderia estar relacionada aos baixos níveis de infestação utilizados no atual estudo.

De acordo com Almosny & Monteiro (2007), doenças inflamatórias super agudas geralmente determinam leucopenia, devido à rápida mobilização de heterófilos para órgãos-alvo, contrastando com o presente estudo, onde foi relatada heterofilia. A leucopenia observada nos coelhos do grupo IV pode estar relacionada à linfocitose, que é determinada pela liberação de glicocorticóides, em resposta ao estresse ocasionado pela re-infestação. O aumento da contagem de heterófilos nos grupos I, II e III, também foi verificado no estudo de Gonçalves et al. (2007), que observaram aumento significativo na contagem de neutrófilos em ratazanas infestadas com larvas de *Dermatobia hominis*. A heterofilia também pode estar relacionada ao estresse, devido

à liberação de cortisol (Almosny & Monteiro 2007), como consequência da infestação por *S. calcitrans*. A observação de linfopenia coincidiu com os resultados verificados previamente por Oliveira et al. (2003), onde foi relacionada a diminuição de linfócitos circulantes ao estresse de coelhos submetidos a criação em condições de superlotação. Por outro lado, Swist et al. (2002) relataram a proliferação de linfócitos em bovinos expostos a extratos de glândula salivar de *S. calcitrans*. A linfocitose poderia estar relacionada a uma característica da espécie bovina ou ao fato de que a metodologia não expõe estes animais ao constante e repetitivo estresse decorrente das picadas da mosca, que estimulariam uma significativa liberação de glicocorticóides. Em todos os grupos foi observada monocitose, que contrasta com os resultados encontrados por Gonçalves et al. (2007), uma vez que foi verificada contagem inexpressiva de monócitos e basófilos. Deve-se ressaltar que os coelhos geralmente apresentam elevado número de monócitos e basófilos, quando comparados a outros mamíferos (Feldman et al. 2000) que pode estar relacionado a uma reação inflamatória específica. No grupo IV, a leucopenia associada à monocitose confirmou a caracterização de uma reação crônica, como é de se esperar em reinfestações, como descrito previamente por Almosny & Monteiro (2007).

Os achados histopatológicos e hematológicos deixam evidente a relação das lesões e alterações verificadas no presente estudo, com os sintomas e modificações do comportamento observado em animais nas infestações pela mosca dos estábulos, a exemplo da dor decorrente das picadas na pele dos animais, que pode ser traduzida por tremores cutâneos, batidas das patas de encontro ao solo, movimentos da cabeça, orelhas e cauda para espantar as moscas (Bittencourt 2002, Mullens et al. 2006).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almosny N.R.P. & Monteiro A.O. Patologia Clínica, p.939-966. In: Cubas Z. S., Silva J. C. R. & Catão-Dias J. L. (Eds), *Tratado de Animais Selvagens*. Roca, São Paulo, 2007.
- Bittencourt A.J. *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758): importância econômica e estágio atual das pesquisas. *Hora Vet.*, 21:36-40, 2002.
- Cotran R.S., Kumar V. & Collins T. *Patologia Estrutural e Funcional*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999, p.174-178 e p.1083-1085.
- Feldman B.F., Zinkl J.G. & Jain N.C. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000, 1311p.
- Gonçalves J.M., Pereira M.C.T., Evangelista L.G. & Leite A.C.R. Expression of circulating leucocytes before, during

- and after myiasis by *Dermatobia hominis* in experimentally infected rats. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.*, 49:289-292, 2007.
- Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer N. *Pathology of Domestic Animals*. 5th ed., Saunders Elsevier, Philadelphia, 2007, 2340p.
- Luna L.G. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3rd ed., McGraw-Hill, New York, 1968, 258p.
- McGavin M.D & Zachary J.F. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 4th ed. Mosby Elsevier, St. Louis, 2007, 1476p.
- Moraes A.P.R. *Stomoxys calcitrans: estabelecimento de colônia e efeito de Metarhizium anisopliae sobre seus estágios imaturos*. Dissertação (Ciências Veterinárias), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007. 65p. (< <http://www.cvetenarias.ufrj.br/?acao=teses&por=D>>)
- Mullens B.A., Lii K.S., Mao Y., Meyer J.A., Peterson N.G. & Szijj C.E. Behavioural responses of dairy cattle to the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, in an open field environment. *Med. Vet. Entomol.*, 20:122-137, 2006.
- Oliveira M.C., Arantes U.M. & Alves J.A. Desempenho produtivo e contagem de linfócitos de coelhos sexados submetidos a duas densidades populacionais. *Cienc. Anim. Bras.*, 4:109-15, 2003.
- Perris E.E. Parasitic dermatoses that cause pruritus in horses. *Vet. Clin. N. Am.: Eq. Prac.*, 11:11-29, 1995.
- Quesenberry K.E. Coelhos, p.1503-1532. In: Birchard S.J. & Sherding R.G. (Eds), *Manual Saunders Clínica de Pequenos Animais*. Roca, São Paulo, 1998.
- Souza T.M., Figuera R.A., Piazer J.V., Barros C.S.L. & Irigoyen L.F. Dermatite alérgica sazonal em ovinos. *Ciênc. Rur.*, 35:475-477, 2005.
- Sampaio I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. FEPMVZ, Belo Horizonte, 1998. 221p.
- Swist S.L., Wilkerson M.J., Wyatt C.R., Broce A.B. & Kanost M.R. Modulation of bovine lymphocyte response by salivary gland extracts of the stable fly, *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *J. Med. Entomol.*, 39:900-907, 2002.
- Yeruham I. & Braverman Y. Skin lesions in dogs, horses and calves caused by the stable fly *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae). *Rev. Elev. Med. Vet. P. Trop.*, 48:347-349, 1995.