



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO – SANIDADE ANIMAL**

**AVALIAÇÃO DAS LESÕES DE PELE E DO LEUCOGRAMA EM  
COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*) INFESTADOS  
EXPERIMENTALMENTE POR *Stomoxys calcitrans* (L)  
(Díptera:Muscidae)**

**WALKER NUNES CHAGAS**

*Sob a Orientação do Professor Dr.  
Avelino José Bittencourt*

*e Co-orientação do Professor Dr.  
Carlos Wilson Gomes Lopes*

Tese submetida como requisito  
parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Ciências**, no Curso  
de Pós-Graduação em Ciências  
Veterinárias, Área de Concentração  
Em Sanidade Animal

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2009

636.9322

C433a

T

Chagas, Walker Nunes, 1967-

Avaliação das lesões de pele e do leucograma em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) infestados experimentalmente por *Stomoxys calcitrans* (L) (Díptera: muscidae) / Walker Nunes Chagas - 2009.

51 f. : il.

Orientador: Avelino José Bittencourt.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Bibliografia: f. 35-35

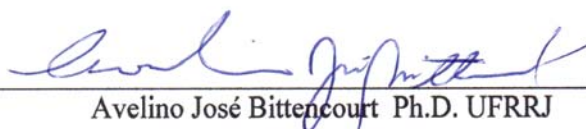
1. Coelho - Teses.
2. Dermatologia veterinária - Teses.
3. Leucose em animais - Teses.
4. Endocrinologia veterinária - Teses.
5. *Oryctolagus* - Teses. I. Bittencourt, Avelino José, 1961-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**WALKER NUNES CHAGAS**

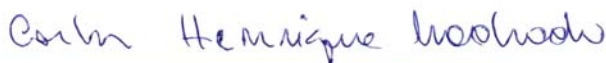
Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Sanidade Animal.

TESE APROVADA EM 27/02/2009



---

Avelino José Bittencourt Ph.D. UFRRJ  
(Orientador)




---

Carlos Henrique Machado Ph.D. UFRRJ



---

Vinicius Rezende Ribeiro Ph.D. UFRRJ



---

Nádja Regina Pereira Almosny Ph.D. UFF



---

Walker André Chagas L.D. UFF

*Dê-me Senhor,  
agudeza para entender,  
capacidade para reter,  
método e faculdade para aprender,  
sutileza para interpretar,  
graça e abundância para falar.*

*Dê-me Senhor,  
acerto ao começar,  
direção ao progredir  
e perfeição ao concluir.*

*São Tomás de Aquino*

*Dedico aos meus amados filhos  
Lívia, Iago e Pedro, que deram  
um novo sentido à minha vida*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo exemplo, pelo incentivo e pela disponibilidade ilimitada em me ajudar sempre.

À minha querida esposa Andréa pelo seu amor, companheirismo, paciência e apoio constantes.

Ao Prof. Avelino José Bittencourt, em primeiro lugar por ter aceitado me orientar, em segundo pela paciência e principalmente pela sua correção.

Ao prof. Carlos Wilson Gomes Lopes, pela valiosa orientação.

À Prof<sup>a</sup>. Marilene de Farias Brito Queiroz pelas importantes contribuições na parte histopatológica.

Ao Colégio Técnico da UFRRJ, nas pessoas dos funcionários Joaquim e Ronaldo e da Prof<sup>a</sup> Sônia, que viabilizaram a manutenção dos coelhos utilizados neste experimento.

À colega Ana Paula Rodrigues Moraes pela fundamental ajuda no desenvolvimento da parte experimental.

Ao colega Bruno Gomes de Castro pelo companheirismo e pela ajuda constante.

À Prof<sup>a</sup>. Miliane Moreira Soares pela ajuda na parte experimental.

Aos Profs. Walker Chagas, Flávia Liparisi e Élan Almeida, pela ajuda na avaliação das lâminas.

Ao Prof. Lauro Boechat pela imprescindível colaboração nas análises estatísticas. Como também ao Prof. Ivan Sampaio pela indicação das análises.

À Prof<sup>a</sup>. Úrsula Raquel Silva pela contribuição no processamento dos exames hematológicos.

À Prof<sup>a</sup>. Nádia Almosny pela contribuição na análise dos leucogramas.

À técnica Luciane Gonçalves Paulo pela confecção das lâminas histológicas.

À todos que diretamente ou indiretamente contribuíram e vibraram positivamente para conclusão deste trabalho.

## RESUMO

CHAGAS, Walker Nunes. **Avaliação das lesões de pele e do leucograma em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) infestados por *Stomoxys calcitrans* (L) (Díptera:Muscidae)**. 2008. 38p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

O presente experimento teve como objetivos avaliar as alterações macro e microscópicas na pele de coelhos, causadas pelas picadas da mosca *Stomoxys calcitrans*, em relação a diferentes intensidades de infestação, a re-infestação e a animais não parasitados, bem como analisar e descrever a resposta leucocitária sangüínea, nos animais dos diferentes grupos. O Experimento foi conduzido no Colégio Técnico da UFRRJ, no município de Seropédica (RJ). Trinta coelhos machos, Nova Zelândia brancos, com idade entre 96 e 105 dias, foram divididos em cinco grupos, com seis animais cada e submetidos às infestações experimentais por *S. calcitrans* em uma das orelhas, com três, sete e quatorze moscas respectivamente. Um outro grupo foi submetido à reinfestação, quinze dias após, com quatorze moscas e no quinto grupo os coelhos não foram submetidos às picadas (controle). Quarenta e oito horas após a infestação, foram realizadas a coleta de fragmentos de pele para avaliação histopatológica e punção venosa, com realização de esfregaço sangüíneo para leucocitoscopia. No momento da realização das biópsias não foram observadas alterações macroscópicas significativas e os achados histopatológicos indicaram que as infestações nos animais deste experimento determinaram o desenvolvimento de dermatites do tipo perivascular e intersticial. Microscopicamente, dezenove animais (79,2%) apresentaram hiperqueratose ortoceratótica compacta. Três apresentaram acantose e crostas serocelulares (exudativas), com hemácias e debris celulares. Um destes coelhos apresentou lesão erosiva associada à crosta e discreta espongirose. O edema intersticial, classificado como discreto a moderado, estava presente em 18 animais (75%). Foi evidenciada linfangectasia em 15 coelhos (62,5%). Onze coelhos do grupo experimental apresentaram hemorragia intersticial (45,8%). Vinte e dois coelhos do grupo experimental (91,7%) apresentaram congestão dos vasos sangüíneos. Algum tipo de infiltrado inflamatório foi observado em 15 coelhos (62,5%) dos grupos experimentais, enquanto que nenhum coelho do grupo controle apresentou esta alteração. Treze coelhos (54,2%) apresentaram infiltrado inflamatório de polimorfonucleares, predominantemente eosinofílico e 14 (58,3%) de mononucleares, predominantemente histiocítico, onde não foi evidenciada a presença de mastócitos. Os animais submetidos à reinfestação apresentaram leucopenia e nos demais grupos experimentais foi observado linfocitopenia, eosinopenia, e heterofilia e monocitose. Os achados histopatológicos são compatíveis com as reações de hipersensibilidade do tipo I. Os coelhos infestados por mais moscas apresentaram resposta inflamatória mais intensa e nos animais submetidos à reinfestação as alterações teciduais se apresentam com maior intensidade. A infestação por *S. calcitrans* e a intensidade desta, determina alterações no leucograma dos coelhos. Na reinfestação por *S. calcitrans*, o leucograma é compatível com o de uma reação crônica.

**Palavras-chave:** *Stomoxys calcitrans*. Lesões de pele. Leucograma.

## ABSTRACT

CHAGAS, Walker Nunes. **Evaluation of skin lesions and hematology changes in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) caused by *Stomoxys calcitrans* (L) (Diptera:Muscidae)** 2008. 38p. Thesis (Doctor in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

This experiment aimed to evaluate and compare the macro and microscopic changes in the skin of rabbits caused by the bites of *Stomoxys calcitrans*, for different levels, repeat attacked and not attacked animals. The profile of leukocyte expression in circulating blood also was analyzed. The experiment was conducted at the Technical College UFRRJ, in the municipality of Seropédica (RJ). Thirty male New Zealand White rabbits, with 96 to 105 days of age, were divided into five groups, each with six animals and subjected to bites of *S. calcitrans* in one ear, with three, seven and 14 flies respectively. Another group was submitted to repeat bites of 14 flies, and the fifth group was not submitted to *S. calcitrans* (control). Forty-eight hours after the attack, fragments of skin were collected for histopathological. Blood samples also were collected for hematology. The macroscopic histopathological findings indicate that the bites led to the development dermatitis. Microscopically, 19 rabbits (79,2%) developed hyperkeratosis. Three animals evidenced acanthosis. Also in three animals were observed crusts of exudation with red blood cells and cellular debris. One of these rabbits showed erosive lesions associated with the crust and slight spongiosis. The interstitial edema, classified as slight to moderate, was present in 18 animals (75%). Dilated lymphatic vessels were found in 15 rabbits (62.5%). Eleven attacked rabbits showed interstitial hemorrhage (45.8%). Twenty-two rabbits in the experimental group (91.7%) showed congestion of blood vessels. Some kind of inflammatory infiltration was observed in 15 attacked rabbits (62.5%), whilst no rabbit in the control group showed this change. Thirteen rabbits (54.2%) showed inflammatory infiltrates of predominantly polymorphonuclear and eosinophilic cells, and 14 rabbits (58.3%) evidenced of mononuclear cells, predominantly histiocytes, but not mast cells. The animals submitted to repeat bites showed reduction of leukocytes. The other attacked animals showed reduction of lymphocytes and eosinophils and increase to neutrophils and monocytes.

**Key words:** *Stomoxys calcitrans* . Skin lesions. Leukometry.



## LISTA DE TABELAS

	<b>Págs.</b>
<b>Tabela 1.</b> Resultados da avaliação histopatológica nos coelhos não infestados (controle) por <i>Stomoxys calcitrans</i> .....	22
<b>Tabela 2.</b> Resultados da avaliação histopatológica nos coelhos infestados por 3 moscas.....	22
<b>Tabela 3.</b> Resultados da avaliação histopatológica nos coelhos infestados por 7 moscas.....	22
<b>Tabela 4.</b> Resultados da avaliação histopatológica nos coelhos infestados por 14 moscas.....	23
<b>Tabela 5.</b> Resultados da avaliação histopatológica nos coelhos reinfestados por 14 moscas.....	23
<b>Tabela 6.</b> Valores de Leucometria Global por mm <sup>3</sup> no sangue dos coelhos nos diferentes grupos .....	23
<b>Tabela 7.</b> Valores absolutos de Basófilos por mm <sup>3</sup> de sangue dos coelhos nos diferentes grupos .....	25
<b>Tabela 8.</b> Valores absolutos de eosinófilos por mm <sup>3</sup> de sangue dos coelhos nos diferentes grupos .....	26
<b>Tabela 9.</b> Valores absolutos de Heterófilos por mm <sup>3</sup> de sangue dos coelhos nos diferentes grupos.....	27
<b>Tabela 10.</b> Valores absolutos de Linfócitos por mm <sup>3</sup> de sangue dos coelhos nos diferentes grupos.....	28
<b>Tabela 11.</b> Valores absolutos de Monócitos por mm <sup>3</sup> de sangue dos coelhos nos diferentes grupos.....	30
<b>Tabela 12.</b> Média dos valores relativos (%) dos diferentes tipos de leucócitos nos grupos e valores de referência (FELDMAN, 2000).....	31
<b>Tabela 13.</b> Médias da Leucometria Global e dos valores absolutos dos diferentes tipos de leucócitos nos grupos com valores de referência (FELDMAN, 2000).....	32
<b>Tabela 14.</b> Valores absolutos, relativos e de leucometria global e específica dos coelhos do grupo I (3 moscas) .....	32

	<b>Págs.</b>
<b>Tabela 15.</b> Valores absolutos, relativos e de leucometria global e específica dos coelhos do grupo II (7 moscas) .....	32
<b>Tabela 16.</b> Valores absolutos, relativos e de leucometria global e específica dos coelhos do grupo III (14 moscas) .....	33
<b>Tabela 17.</b> Valores absolutos, relativos e de leucometria global e específica dos coelhos do grupo IV (reinfestação com 14 moscas).....	33
<b>Tabela 18.</b> Valores absolutos, relativos e de leucometria global e específica dos coelhos do grupo V (Controle) .....	33

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Págs.</b>
<b>Figura 1.</b> Infestação experimental por <i>Stomoxys calcitrans</i> em orelha de coelho .....	10
<b>Figura 2.</b> <i>Stomoxys calcitrans</i> acondicionadas em tubo para a realização da infestação experimental em coelhos.....	10
<b>Figura 3.</b> Orelha do coelho após a coleta de biópsia e já com o tratamento tópico .....	11
<b>Figura 4.</b> Coleta de fragmento de pele da orelha de coelho acometida por <i>Stomoxys calcitrans</i> , com a utilização de saca bocado de 5mm .....	11
<b>Figura 5.</b> Punção venosa na orelha de coelho com seringa rinsada com anticoagulante EDTA (ácido etileno diamino tetracético).....	12
<b>Figura 6.</b> Pontos hemorrágicos na pele de coelho imediatamente após a infestação por <i>Stomoxys calcitrans</i> .....	14
<b>Figura 7.</b> Hematomas circulares subcutâneos em pele de coelho após a infestação por <i>Stomoxys calcitrans</i> .....	14
<b>Figura 8.</b> Fotomicrografia de pele normal (Coelho 4, Grupo controle). HE, obj.10x.....	16
<b>Figura 9.</b> Fotomicrografia de pele com Hiperqueratose ortoceratótica compacta (seta) Hemorragia discreta na derme profunda (A). (Coelho 1, Grupo IV). HE, obj.40x. ....	17
<b>Figura 10.</b> Fotomicrografia de epiderme com lesão erosiva e crosta serocelular com hemácias e restos celulares associados (seta). Intenso infiltrado mononuclear histiocítico intersticial (A). (Coelho 5, Grupo IV). HE, obj.40x.....	17
<b>Figura 11.</b> Fotomicrografia de pele com edema moderado (A) e linfangectasia (setas). Infiltrado inflamatório mononuclear histiocítico moderado. (Coelho 6, Grupo IV). HE, obj.40x.....	18
<b>Figura 12.</b> Fotomicrografia de vasos sanguíneos com congestão moderada (setas). (Coelho 3, Grupo III). HE, obj.10x.....	19
<b>Figura 13.</b> Fotomicrografia de infiltrado intersticial moderado de polimorfonucleares (setas) com colagenólise – “figuras em chamas” (cabeças de seta) e edema moderado (Coelho 1, Grupo III). HE, obj. 40x .....	21
<b>Figura 14.</b> Orelha de coelho quinze dias após a realização da coleta de fragmento para biópsia, evidenciando a quase completa cicatrização.....	21
<b>Figura 15.</b> Associação dos coelhos, nos grupos controle e experimental, com valores de referência para a leucometria global,.....	24

<b>Figura 16.</b> Associação dos coelhos, nos grupos controle e experimental, com valores de referência para contagem de basófilos por $\text{mm}^3$ de sangue.....	25
<b>Figura 17.</b> Associação dos coelhos, nos grupos controle e experimental, com valores de referência para contagem de Eosinófilos por $\text{mm}^3$ de sangue.....	26
<b>Figura 18.</b> Associação dos coelhos, nos grupos controle e experimental, com valores de referência para contagem de Heterófilos por $\text{mm}^3$ de sangue.....	28
<b>Figura 19.</b> Associação dos coelhos, nos grupos controle e experimental, com valores de referência para contagem de linfócitos por $\text{mm}^3$ de sangue.....	29
<b>Figura 20.</b> Associação dos coelhos, nos grupos controle e experimental, com valores de referência para contagem de Monócitos por $\text{mm}^3$ de sangue.....	30

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>02</b>
2.1 Alterações Anátomo-histopatológicas.....	03
2.2 Perfil Leucocitário Sanguíneo.....	06
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>08</b>
3.1 Localização do experimento.....	08
3.2 Obtenção e manutenção de <i>S. calcitrans</i> .....	08
3.3 Animais do experimento.....	08
3.4 Delineamento experimental.....	08
3.4.1 Amostragem.....	08
3.4.2 Preparação dos animais.....	08
3.4.3 Biópsia cutânea e punção venosa.....	09
3.4.4 Processamento das amostras.....	09
3.4.4.1 Pele.....	09
3.4.4.2 Sangue.....	09
3.5 Metodologia estatística.....	09
3.5.1 Coleta e apresentação dos dados.....	09
3.5.2 Nível de significância.....	09
3.5.3 Análises Estatísticas.....	09

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>13</b>
4.1 Alterações Anátomo-histopatológicas.....	13
4.2 Perfil Leucocitário Sanguíneo.....	23
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>34</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>35</b>

# 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da produção animal sempre teve nas parasitoses um dos seus principais entraves. Tanto pelo comprometimento da sanidade dos rebanhos e conseqüentemente da sua produtividade, quanto pelos altos custos envolvidos no controle dos endo e ectoparasitas. O impacto destas afecções pode se tornar ainda maior, quanto maior for a intensificação dos sistemas de criação. A partir desta realidade, diversos estudos para o desenvolvimento de produtos e sistemas de manejo vêm sendo empreendidos para minimizar os prejuízos causados por estes agentes.

Diferentes espécies de moscas se desenvolvem em associação aos seres humanos e animais domésticos e cujos ciclos biológicos resultam em uma série de perdas econômicas. Dentre estas moscas destaca-se *Stomoxys calcitrans*, espécie mais comum do gênero *Stomoxys*, que ocorre na maioria dos países do mundo e é comumente conhecida como mosca dos estábulos ou mosca doméstica picadora.

A mosca dos estábulos é um dos dípteros de maior importância para a pecuária nacional pelos prejuízos econômicos que determina (CAMPBELL et al., 2001; GRISI et al., 2002), uma vez que a dor e o desconforto decorrentes de suas picadas condicionam no hospedeiro uma situação de stress que leva à diminuição de ingestão de alimentos e aumenta a suscetibilidade a doenças, com reflexo direto na produtividade do rebanho, seja no ganho de peso e/ou produção de leite (BITTENCOURT, 2002).

A infestação por *S. calcitrans* pode causar sérios danos, seja pela espoliação sanguínea ou por seu papel como potencial vetor de vários agentes patogênicos aos animais domésticos, tais como protozoários, fungos, bactérias, riquetsias e vírus (GREENBERG, 1971). As lesões de pele causadas pelas picadas das moscas dos estábulos podem propiciar o aparecimento de infecções secundárias ou outras complicações, que por vezes comprometem seriamente o desempenho dos animais acometidos, além das reações sistêmicas que também podem advir. Nesta situação, faz-se necessária a utilização de fármacos e medidas higiênicas (BITTENCOURT, 2002), determinando a elevação no custo de produção.

A avaliação histopatológica das lesões de pele causadas por infestação experimental de *S. calcitrans*, bem como do perfil leucocitário propiciará um maior conhecimento do desenvolvimento da reação inflamatória causada pelas picadas da mosca dos estábulos, bem como dos mecanismos de resistência e/ou suscetibilidade à infestação destas moscas, por parte de seus hospedeiros.

Assim sendo, as questões que nortearam esta pesquisa remetem às alterações anátomo-histopatológicas na pele dos coelhos em relação à intensidade de infestação por *S. calcitrans*; ao fato da reação se apresentar de maneira local; às características do infiltrado inflamatório, e às alterações no perfil leucocitário sanguíneo.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivos:

- Avaliar as alterações macro e microscópicas na pele de coelhos, causadas pelas picadas de *S. calcitrans*, principalmente em relação à resposta inflamatória;
- Analisar a resposta leucocitária sanguínea de coelhos submetidos a diferentes intensidades de infestação e à reinfestação por *S. calcitrans*;
- Comparar as alterações anátomo-histopatológicas da pele, causadas pelas picadas de *S. calcitrans* em coelhos, em relação à diferentes intensidades de infestação e à reinfestação.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

*Stomoxys calcitrans*, espécie mais comum do gênero *Stomoxys*, ocorre na maioria dos países do mundo e é comumente conhecida como mosca dos estábulos ou mosca doméstica picadora, sendo de presença relativamente comum em países tropicais. No estado do Rio de Janeiro, em quinze propriedades visitadas no município de Quatis (RJ), a mosca dos estábulos só não foi observada em duas (PIRES et al., 2003).

A mosca dos estábulos possui o tamanho semelhante ao de *Musca domestica*, coloração cinza, com quatro listras escuras longitudinais no tórax, abdômen mais curto e mais largo apresentando três manchas escuras no segundo e terceiros segmentos abdominais. Ela pode ser prontamente reconhecida por sua probóscida pontiaguda, proeminente, direcionada para frente e localizada entre os palpos curtos (URQUWART et al., 1996).

As fêmeas de *S. calcitrans* podem ovipor lotes de 25 a 50 ovos, em matéria vegetal em decomposição, como feno e palha, principalmente contaminados por urina e esterco, além de cama de frango, restos de silagem e de alimentos que ficam ao redor dos cochos de alimentação. Nestes locais também ocorre o desenvolvimento de larvas e pupas. O ciclo evolutivo completo, desde o ovo até a mosca adulta pode levar de 12 a 60 dias, dependendo principalmente da temperatura e umidade, onde o clima tropical favorece a reprodução (BITTENCOURT; MOYA BORJA, 2000; URQUWART et al., 1996). Neste sentido, Bittencourt e Moya Borja (2000) observaram no município de Espírito Santo do Pinhal (SP), o maior número de moscas infestando bovinos e eqüinos, no período de outubro a dezembro. A partir deste período, a quantidade de moscas por animal começava a decrescer, provavelmente em virtude do aumento da pluviosidade (200 mm), que levando ao aumento excessivo da umidade poderia eliminar as larvas presentes no solo. Da mesma forma o número de moscas também diminuía quando a precipitação pluviométrica acumulada era inferior a 50 milímetros, onde as larvas provavelmente também eram afetadas pela baixa umidade.

A mosca dos estábulos ataca principalmente bovinos, eqüinos e em menor extensão os suínos, cães e o próprio homem (URQUWART et al., 1996; GUIMARÃES, 1984). Segundo Yeruham e Braverman (1995), a intensidade de infestação por *S. calcitrans* está relacionada ao odor e às reações dos hospedeiros ao ataque das moscas. Nos eqüinos, Bittencourt e Moya Borja (2000) constataram que 70% das moscas preferiam picar e sugar o sangue dos membros torácicos, concentrando-se nas regiões abaixo do joelho, principalmente na canela, apresentando uma média de três moscas infestando esta região nos períodos de menor incidência, e quinze moscas em média, nos períodos de maior infestação. Esta ocorrência está relacionada com a maior dificuldade de movimentação dos membros torácicos, com a abundante vascularização superficial e com um menor reflexo cutâneo (tremor), impossibilitando que as moscas fossem espantadas com eficiência nestas regiões. Todd (1964) relatou que a preferência de *S. calcitrans* por picar a superfície dos membros torácicos dos animais, poderia ser devida ao fato da pele ser mais fina e por possuir um grande número de capilares superficiais, o que facilitaria a ingestão de sangue.

Nos bovinos, os membros torácicos também são os mais acometidos, seguidos dos membros pélvicos e do tórax. A dificuldade na movimentação dos membros torácicos, uma vez que eles suportam de 60 a 65% do peso corporal, parece ser uma das principais causas para que estas áreas sejam as mais acometidas pela infestação de *S. calcitrans* (BITTENCOURT; MOYA BORJA, 2002). Pires et al. (2003) observaram preferência da infestação nos membros torácicos, seguidos do tórax, abdome, membros pélvicos e pescoço



em bovinos. A partir destas constatações, pode-se estimar a quantidade de moscas no corpo, tomando como base a quantidade de moscas nos membros torácicos.

Os cães também são acometidos por *S. calcitrans* geralmente na face ou nas orelhas. Muitas moscas são comumente encontradas nas pontas das orelhas ou na dobra da mesma, quando estas estão voltadas para baixo. (YERUHAM e BRAVERMAN, 1995; SCOTT et al., 1996).

## 2.1 Alterações Anátomo-histopatológicas

De um modo geral a maioria das picadas de insetos na pele dos animais apresenta inicialmente lesões circulares eritematosas, com 0.5 a 2.0 cm de diâmetro, que podem evoluir para áreas focais de necrose com ulcerações, alopecia e formação de crostas. Histologicamente, a área de necrose pode alcançar a derme profunda e as lesões recentes apresentam infiltrado inflamatório perivascular a difuso, com variado número de eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e macrófagos. Edema e hemorragia podem estar presentes. (JUBB et al., 2007). Para Yeruham e Braverman (1995), relativamente poucas informações estão disponíveis sobre a infestação de moscas dos estábulos como causa de lesões de pele em animais domésticos.

Para Cotran et al. (1999) e Mc Gavin e Zachary (2007), as reações às picadas de insetos são variadas e incluem irritação, anemia e hipersensibilidade, dentre outras. As lesões podem ocasionar queda de pelos, formação de crostas hemorrágicas, eritema e escoriações secundárias causadas pelo próprio animal ao se coçar, especialmente aqueles com hipersensibilidade às picadas de mosca. A lesão clássica da pele nos locais das picadas exibe um infiltrado perivascular em forma de cunha de linfócitos, histiócito e eosinófilos no interior da derme. Pode haver uma zona central de necrose epidérmica excessivamente focal, logo abaixo da qual podem ser encontradas partes bucais birrefringentes do inseto. Também podem ser observados hemorragia e edema da derme; áreas necróticas na epiderme; infiltrados perivasculars de linfócitos, mononucleares e eosinófilos, que também podem ser identificados na epiderme no caso de foliculites e furunculoses. Pode se observar a ocorrência de espongiose, resultando em bolhas intra-epidérmicas. A presença de hiperplasia, paraqueratose e hiperqueratose na epiderme, pode estar associada ao trauma ocasionado pelo próprio animal em função do prurido. .

Segundo Perris (1995), a hipersensibilidade às picadas de insetos é uma das principais causas de prurido e dermatites em eqüinos e os insetos mais freqüentemente envolvidos são *Culicoides sp.*, *S. calcitrans* e *Haematobia irritans*. Antígenos presentes na saliva destes insetos desencadeiam uma resposta imunológica com a produção de Imunoglobulina E (IgE), que uma vez ligada aos receptores de membrana de mastócitos e basófilos, determinam a degranulação de mediadores inflamatórios e substâncias vasoativas, resultando na vasodilatação e edema observados na pele dos animais afetados.

Segundo Cotran et al. (1999), a resposta imune que pode advir destes antígenos exógenos assume diferentes formas, desde um prurido de pele a uma reação anafilática, potencialmente fatal em casos extremos. As diferentes reações observadas são denominadas reações de hipersensibilidade e podem ser desencadeadas pela interação destes antígenos com suas respectivas imunoglobulinas ou por mecanismos imunes mediados por células. Estas reações de hipersensibilidade são classificadas, nos processos imunológicos, em quatro tipos, a saber:

Tipo I – se desenvolve rapidamente, a partir da liberação de substâncias vasoativas e citocinas quimiotáticas para células inflamatórias;

Tipo II – mediada por imunoglobulinas dirigidas contra antígenos presentes na superfície de células e outros componentes teciduais;

Tipo III – induzida por imunocomplexos (antígeno-anticorpo), que produzem lesão tecidual em consequência da ativação do sistema complemento;

Tipo IV – mediada por linfócitos T, incluindo as reações do tipo tardio clássico (células T CD4) e a citotoxicidade direta (células T CD8).

Tizard (2002) relata que *S. calcitrans* está envolvida na hipersensibilidade tipo I em bovinos e eqüinos. Se os animais forem alérgicos aos antígenos da saliva desses insetos, as picadas resultam no desenvolvimento de uma urticária acompanhada por um prurido intenso. Entretanto nem todos os animais respondem desta maneira aos alérgenos dos artrópodos, uma vez que cerca de 30% dos animais acometidos podem mostrar uma reação retardada (tipo IV) em 24 a 48 horas.

Diversas reações de hipersensibilidade do tipo I apresentam duas etapas bem definidas. Na primeira etapa, inicial, observa-se vasodilatação, extravasamento vascular e espasmo de músculo liso ou secreções glandulares. A segunda etapa inicia-se 2 a 8 horas após a exposição inicial e pode durar vários dias. Esta reação mais tardia se caracteriza por um infiltrado tecidual mais intenso com eosinófilos, neutrófilos, mastócitos, basófilos, monócitos e linfócitos. Neste tipo de reação, os mastócitos e basófilos têm um papel destacado (COTRAN et al., 1999).

Os mastócitos localizam-se próximos a vasos sanguíneos, abaixo do revestimento epitelial, onde as reações do tipo I costumam acontecer. São células arredondadas, com núcleo esférico e central e o citoplasma rico em grânulos basófilos. Sua membrana apresenta receptores de Fc para IgE e cuja ligação determina a degranulação de mediadores primários, como a histamina, envolvidos na resposta aguda. Também são liberados os mediadores secundários, envolvidos na fase tardia da resposta do tipo I, recrutando mais leucócitos, principalmente eosinófilos. Esta resposta inflamatória da fase tardia está diretamente envolvida nos sintomas da hipersensibilidade do tipo I (COTRAN et al., 1999).

Souza et al. (2005) descreveram um surto de dermatite alérgica sazonal em ovinos, associada à picada de mosquitos, observaram que as lesões ocorriam principalmente nas orelhas e ao redor dos olhos, focinho e lábios. Identificaram dois padrões de lesão: no padrão agudo havia acentuado eritema, associado à grande quantidade de pápulas, pústulas, colaretos epidérmicos e crostas. No padrão crônico, áreas liquenificadas, ulceradas, exsudativas, crostosas, alopecias e, por vezes, hemorrágicas. Microscopicamente, em ambos os padrões de lesão havia acentuada hiperqueratose paraceratótica laminada e ortoceratótica compacta associada a intensa acantose irregular e hipergranulose. A principal diferença entre os dois padrões de lesão consistia no infiltrado inflamatório. Os ovinos recentemente afetados apresentavam infiltrado perivascular superficial rico em eosinófilos. Muitos desses eosinófilos estavam degranulados e podiam ser observados na derme em íntima associação com fibras colágenas hialinizadas e de aspecto flocular. Em algumas áreas, os eosinófilos infiltravam a epiderme formando pústulas. Nas lesões crônicas, o infiltrado de eosinófilos era escasso e havia predomínio de linfócitos, plasmócitos e macrófagos.

As picadas de *S. calcitrans* são dolorosas e sangram inicialmente, determinando lesões na pele dos animais acometidos, como dermatite necrótica nas orelhas de cães, dermatite exudativa nos membros de eqüinos e dermatites em bezerros (YERUHAM e BRAVERMAN, 1995). Quinn et al. (1983) e James e Moon (1998), observaram que após a injeção subcutânea com extrato de *Stomoxys* as reações clínicas mais intensas eram mais evidentes nas primeiras 24 horas, mas as alterações podiam ainda ser observadas por até 72 horas ou mais.

Moorhouse (1972) estudando as lesões causadas pela mosca dos estábulos, verificou ao longo de três anos que os bovinos apresentavam reação de hipersensibilidade à picadas desta mosca, que por sua vez levaram a formação de lesões cutâneas nos membros torácicos, associado a um edema acentuado, principalmente ao redor dos joelhos. Stork (1979) também citou que as picadas poderiam causar reação de hipersensibilidade com formação de

vesículas na epiderme dos animais. Guglielmone et al. (1999), estudando lesões de pele causadas por picadas de *H. irritans* e *S. calcitrans* em vacas Holandesas, observaram hiperemia além de infiltrados inflamatórios com predominância de mononucleares e eosinófilos.

Num estudo realizado com eqüinos infestados por *S. calcitrans*, verificou-se que estes animais apresentaram pápulas com mais de 4 mm de diâmetro, além da queda e eriçamento de pelos como também a formação de crostas. A análise histopatológica da biópsia da pele evidenciou uma dermatite perivascular superficial e profunda, com eosinófilos e mononucleares (PERRIS, 1995). Baker e Quinn (1978) também observaram edema cutâneo e marcada eosinofilia, com vasos sanguíneos tortuosos e dilatados em biópsias de pele de eqüinos infestados por *Culicoides* sp. e *S. calcitrans*.

Jubb et al. (2007) relatam que a hipersensibilidade eqüina à infestação por *Culicoides* se desenvolve pelo padrão do tipo I, como também pelo padrão do tipo IV. Na reação imediata (tipo I) formam-se pápulas, com intenso prurido, que pode causar auto-mutilação por parte dos animais acometidos, mascarando as lesões primárias e resultando em escoriações, úlceras, crostas e alopecia, que na cauda, determina o típico “rabo de rato”. Histologicamente observa-se dermatite perivascular superficial ou profunda, com infiltrados de eosinófilos e linfócitos. Acantose, espongiose, hiperqueratose e focos necróticos podem estar presentes na epiderme. Erosões e ulcerações associadas à inflamação neutrofílica, são resultantes da auto-mutilação. A derme apresenta variado edema e aumento de mastócitos, que podem estar degranulados. Em alguns casos, infiltrado eosinofílico difuso, com degeneração de colágeno ou foliculite podem ser observados.

O granuloma eosinofílico em eqüino, que se apresenta com pápulas arredondadas, firmes, não alopecicas, tem etiologia desconhecida, mas há suspeitas de que está relacionado com reações de hipersensibilidade à picada de insetos. Microscopicamente observam-se focos eosinofílicos irregulares, variando de pequenos a grandes, compostos de eosinófilos degranulados e colágeno degenerado. Os focos de colagenólise podem formar estruturas chamadas de “figuras em chamas”, que são geralmente rodeadas por um infiltrado eosinofílico intenso, acompanhado de reação granulomatosa composta de macrófagos e às vezes células gigantes (GROSS et al., 2005; JUBB, et al., 2007 apud TEIXEIRA e AMORIM, 2006). Veríssimo et al. (2002) observaram um maior número de mastócitos nas dermes superficial e profunda em vacas da raça Nelore, mas os números não foram estatisticamente diferentes dos achados nas raças Holandesa (PO) e Pardo-Suíça. Estes resultados sugerem que o número de mastócitos encontrados nas dermes superficial e profunda de bovinos europeus, zebuínos e mestiços, pode estar relacionado com o tipo e intensidade da reação inflamatória, como também com a resistência destes animais aos ectoparasitas.

Nos cães, as picadas resultam em exsudação de soro e sangue que ocasionam eritemas e crostas hemorrágicas, com prurido variável de médio a grave, presumivelmente refletindo a ausência ou a presença de sensibilização (YERUHAM e BRAVERMAN, 1995; SCOTT et al., 1996).

Na hipersensibilidade felina a picadas de insetos, os achados histopatológicos demonstram moderada acantose e espongiose, com variável erosão, ulceração e exudação. A derme apresenta intensa inflamação eosinofílica perivascular e perifolicular, com alguma degranulação que determina colagenólise e as “figuras em chamas”. Edema e algumas vezes hemorragia, estão presentes (GROSS et al., 2005).

## 2.2 Perfil Leucocitário Sanguíneo

Os diferentes tipos de leucócitos são as células de defesa do sangue que possuem características e funções específicas. Eles se subdividem em leucócitos granulócitos e agranulócitos, em função da presença ou não de grânulos específicos no citoplasma. Os leucócitos granulócitos são os neutrófilos, eosinófilos e basófilos; enquanto que os agranulócitos se subdividem em linfócitos e monócitos. A morfologia dos leucócitos é, geralmente, semelhante em todos os mamíferos. Alguns animais, entretanto, não possuem neutrófilos como os lagomorfos e várias espécies de roedores, como a capivara. Para cumprir as funções dos neutrófilos, esses animais possuem uma célula que apresenta características tintoriais semelhantes ao eosinófilo, chamada de heterófilo. Os heterófilos dos lagomorfos são células grandes com núcleo multilobulado, excêntrico e grânulos intracitoplasmáticos eosinofílicos alongados. (JAIN, 1986; FELDMAN et al., 2000; CAMPBELL, 2004; ALMOSNY e MONTEIRO, 2007).

Os basófilos são células arredondadas e que possuem grânulos também redondos de coloração geralmente escura. Os eosinófilos dos mamíferos possuem grânulos eosinofílicos. Em coloração citoquímica pelo método de Sudan Black B, observa-se que os grânulos do eosinófilo são grandes, redondos ou arredondados e se coram em verde oliva metálico. Os monócitos são geralmente as maiores células presentes no sangue. Possuem citoplasma de coloração cinza-azulada com granulações delgadas e freqüentes vacúolos. Possuem, geralmente, um único núcleo que pode variar em forma de ovóide a riniforme. Os linfócitos dos coelhos são pequenos, de formato redondo, com citoplasma basofílico, podendo apresentar grânulos azurofílicos. (JAIN, 1986; FELDMAN et al., 2000; CAMPBELL, 2004; ALMOSNY e MONTEIRO, 2007).

Os neutrófilos/heterófilos aumentam em infecções bacterianas agudas e estímulos fagocitários, como em hemólises e podem estar normais em infecções crônicas ou diminuem em infecções virais. Em infecções agudas os mamíferos podem apresentar Neutrófilos/heterófilos tóxicos, com o citoplasma basofílico (azulado), vacuolizado ou com corpúsculos de Döhle. Doenças infecciosas cavitárias determinam uma leucocitose neutrofílica de grande intensidade enquanto em choques sépticos, os animais costumam apresentar leucopenia devido a neutropenia/heteropenia, o que implica em prognóstico reservado a desfavorável. Tal fato pode estar associado à resposta medular deficiente (baixo estímulo quimiotáxico), mielodisplasia ou destruição periférica maior que a reposição medular. Redução dos valores da leucometria global sem melhora clínica do paciente poderá significar um prognóstico sombrio. Enterites bacterianas determinam leucocitose neutrofílica acompanhada de monocitose (ALMOSNY e MONTEIRO, 2007; CUBAS et al., 2007).

A monocitose, normalmente, está relacionada a afecções crônicas ou doenças infecciosas específicas e a neoplasias. Enquanto que a diminuição de monócitos (monocitopenia) pode ser de difícil caracterização, uma vez que os valores de normalidades mínimos são baixos, necessitando de exames sucessivos. No entanto, o significado clínico tem pouca importância. (WALLACH e BOEVER, 1983; ALMOSNY e SANTOS, 2000; ALMOSNY e MONTEIRO, 2007).

A função dos Basófilos ainda não está completamente esclarecida. Em alguns animais acompanham as eosinofilias ou estão relacionados à ocorrência de infecções/infestações parasitárias. Eosinofilias costumam estar relacionadas a processos alérgicos e parasitários. Nos casos de processos alérgicos superagudos, ocorrem grande redução no número dessas células (eosinopenia). A diminuição de eosinófilos pode ser de difícil caracterização, uma vez que os valores mínimos de normalidade são baixos, necessitando de exames sucessivos. A

eosinofilia também pode aparecer em processos crônicos, normalmente associada a outras alterações como neutrofilia/heterofilia, monocitose ou linfocitose. A função dos eosinófilos ainda não está completamente esclarecida nas aves e pode apresentar diferenças ao comparar com mamíferos. Entretanto, em casos de alergias e parasitoses, podemos observar a elevação do número dessas células (CAMPBELL, 2004; ALMOSNY e MONTEIRO, 2007).

Para Fowler (1986), a leucocitose de animais selvagens pode estar associada ao estresse e isso poderá interferir na análise do leucograma. Os processos infecciosos agudos, como os de origem bacteriana, normalmente estão acompanhados de leucocitose. Entretanto é importante observar que doenças inflamatórias superagudas costumam determinar leucopenia devido à rápida mobilização de neutrófilos (heterófilos) para os órgãos-alvo (WALLACH e BOEVER, 1983; CAMPBELL, 1991; ALMOSNY e MONTEIRO, 2007).

A linfocitose é uma característica de afecções virais ou de fase de resolução de infecções bacterianas e é relativamente freqüente em filhotes. O leucograma de convalescença normalmente está associado a valores normais dos demais leucócitos sangüíneos, e na infecção viral ativa pode haver neutropenia. Nas condições de estímulo imunológico prolongado, como em doenças autoimunes ou períodos vacinais repetidos, como pode ser observado nos filhotes, pode ocorrer linfocitose. A linfopenia pode estar associada à fase aguda da inflamação, associada à neutrofilia e eosinopenia. O uso de corticosteróides determina grave linfopenia, assim como o estresse prolongado que eleva os níveis endógenos de cortisol. Algumas doenças inflamatórias poderão determinar respostas intensas, bem como o aparecimento de atipias celulares. Essa reação pode acontecer em mamíferos, mas ocorre com mais freqüência em répteis e não deve ser confundida com desordens mielo ou linfoproliferativas. (CAMPBELL, 2004; ALMOSNY e MONTEIRO, 2007).

Swist et al. (2002), desenvolveram um estudo com bovinos que foram expostos à extratos de glândulas salivares de *S. calcitrans* e observaram uma proliferação de linfócitos associada a uma resposta imunológica às proteínas salivares. Os resultados também indicaram que a saliva das moscas dos estábulos tem uma ação potencial de modular a função dos linfócitos T, que se refletia no perfil sangüíneo.

Gonçalves et al. (2002), observaram algumas diferenças significativas na expressão de leucócitos na circulação sanguínea durante o curso da infestação experimental por *Dermatobia hominis* em ratos. Os monócitos e basófilos apresentaram contagem inexpressiva e foram excluídos das análises estatísticas, mas os neutrófilos apresentaram contagem significativamente superior em relação ao grupo controle. A contagem de linfócitos dos animais parasitados foi inferior à do controle e o número de eosinófilos apresentou-se baixo, embora não tenha apresentado diferença significativa.

Oliveira et al. (2003) desenvolveram um trabalho para avaliar o desempenho produtivo e a contagem de linfócitos de coelhos submetidos a duas densidades populacionais. Constataram uma redução de linfócitos e eosinófilos circulantes no grupo com maior densidade populacional. Este achado foi relacionado à situação de stress a que estes animais foram submetidos. O estímulo potente para a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), o qual estimula a secreção de glicocorticóides pela glândula adrenal, é influenciado pelo grau de estresse, em coelhos. Os glicocorticóides promovem lise do tecido linfático e reduzem o número de linfócitos e de eosinófilos circulantes. Desta maneira, situações de stress, levam à liberação de corticóides, que determinam uma redução no número de linfócitos e de eosinófilos circulantes.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Localização do experimento

O experimento se desenvolveu no setor de cunicultura do Colégio Técnico e na Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, no município de Seropédica (RJ) e nos Laboratórios de Patologia Clínica e Histopatologia do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário Plínio Leite - UNIPLI, em Itaboraí (RJ), no período de setembro a novembro de 2008.

#### 3.2. Obtenção e manutenção de *S. calcitrans*

Para o estabelecimento da colônia de *S. calcitrans*, foram capturadas moscas adultas que infestavam bovinos e eqüinos do Hospital Veterinário e do Setor de Reprodução Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. As moscas foram mantidas em gaiolas próprias, por um período de 20 dias, alimentadas diariamente com sangue citratado (0,38%) aquecido de bovino, segundo a técnica adaptada descrita por Mello e Garcia (1988), Mello (1989) e Moraes (2007).

#### 3.3. Animais do experimento

Para a realização do presente estudo foram selecionados trinta coelhos machos, da raça Nova Zelândia branca, com idade entre 96 e 105 dias, provenientes do Instituto de Zootecnia da UFRRJ. Os coelhos foram mantidos em gaiolas próprias, com alimentação e manejo adequados, no setor de cunicultura do Colégio Técnico da UFRRJ.

#### 3.4. Delineamento experimental

##### 3.4.1. Amostragem

Os coelhos foram submetidos à infestação experimental por *S. calcitrans*, na pele da face externa de uma das orelhas, por cinco minutos (Figura 1). Os animais foram divididos em cinco grupos, cada qual com seis animais, a saber:

- GRUPO I: submetido à infestação com três moscas na orelha esquerda;
- GRUPO II: submetido à infestação com sete moscas na orelha esquerda;
- GRUPO III: submetido à infestação com 14 moscas na orelha esquerda;
- GRUPO IV: submetido à infestação com 14 moscas na orelha esquerda e a re-infestação 15 dias após na orelha direita;
- GRUPO V: controle, submetido à infestação com sete moscas cujos aparelhos bucais foram removidos para que os coelhos não fossem picados.

##### 3.4.2. Preparação dos animais

Tanto para a infestação experimental quanto para a coleta dos fragmentos de biópsia e punção venosa, os coelhos foram anestesiados com injeção intra-muscular de cloridrato de ketamina, na dose de 40mg/Kg de peso, em combinação com xilazina na dose de 10mg/Kg de peso (QUESENBERRY, 1998).

As moscas foram submetidas à restrição alimentar no dia anterior à infestação experimental e transferidas da caixa de criação para tubos de vidro, com a boca telada para que as elas pudessem se alimentar na pele dos coelhos (Figura 2).

Após a coleta dos fragmentos, as orelhas foram tratadas com spray repelente, larvicida e cicatrizante (Figura 3).

### 3.4.3. Biópsia cutânea e punção venosa

Quarenta e oito horas após as infestações, foram realizadas biópsias com o auxílio de saca bocado de 5mm de diâmetro, na região da pele da face externa da orelha acometida por *S. calcitrans* (Figura 4). Os fragmentos de pele obtidos foram fixados por imersão em solução de formalina a 10% (LUNA, 1968).

Também foram coletadas amostras de sangue por punção venosa da orelha em que não foi realizada a biópsia, com a utilização de seringas de 10ml e agulha 25x7, rinsadas com aticoagulante EDTA (ácido etileno diamino tetracético) (FELDMAN *et al* 2000) (Figura 5).

### 3.4.4 Processamento das amostras

#### 3.4.4.1. Pele

Os espécimes coletados e fixados foram processados segundo a técnica histológica de rotina para inclusão em parafina, com cortes de 5  $\mu$ m de espessura. Para análise histopatológica, os cortes foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina, Azul de Toluidina e Giemsa e observados ao microscópio óptico (LUNA, 1968).

Na avaliação das alterações teciduais, os tipos celulares presentes nos infiltrados dos espécimes, foram identificados e as reações inflamatórias classificadas de acordo com as suas intensidades, para uma análise comparativa.

#### 3.4.4.2. Sangue

No momento da coleta foram confeccionados esfregaços de sangue, posteriormente corados em solução May Grünwald-Giemsa e observados sob microscopia óptica, visando a leucocitoscopia. As amostras de sangue, com EDTA (ácido etileno diamino tetracético) foram enviadas ao Laboratório de Patologia Clínica do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário Plínio Leite – UNIPLI (Itaboraí-RJ) e a leucometria global foi efetuada conforme Jain (1986) e Feldman *et al* (2000).

### 3.5. Metodologia estatística

#### 3.5.1. Coleta e apresentação dos dados

Os dados coletados foram apresentados por meio de gráficos e tabelas, bem como os resultados provenientes de análises estatísticas.

#### 3.5.2. Nível de significância

O nível de significância adotado foi de 5% de probabilidade ( $\alpha= 0,05$ ) para rejeitar a hipótese nula.

#### 3.5.3. Análises Estatísticas

Nas análises dos componentes sanguíneos foram utilizados testes não-paramétricos como o Teste de Kruskal-Wallis, na comparação entre os efeitos devidos aos tratamentos (grupos), e o Teste Exato de Fisher, para testar a hipótese de que as proporções entre os valores na faixa e fora da faixa de referência independem da infestação de moscas.

Após o Teste de Kruskal-Wallis foi aplicado o teste t de “Student” usado para comparar as médias dos postos, descrito em Sampaio (1998).

Nas análises estatísticas envolvendo a ausência ou a presença de fatores histopatológicos, também foi utilizado o Teste Exato de Fisher, para testar a hipótese de que as percentagens de ocorrências destes fatores independem da infestação de moscas.



**Figura 1.** Infestação experimental por *Stomoxys calcitrans* em orelha de coelho.



**Figura 2.** *Stomoxys calcitrans* acondicionadas em tubo para a realização da infestação experimental em coelhos.

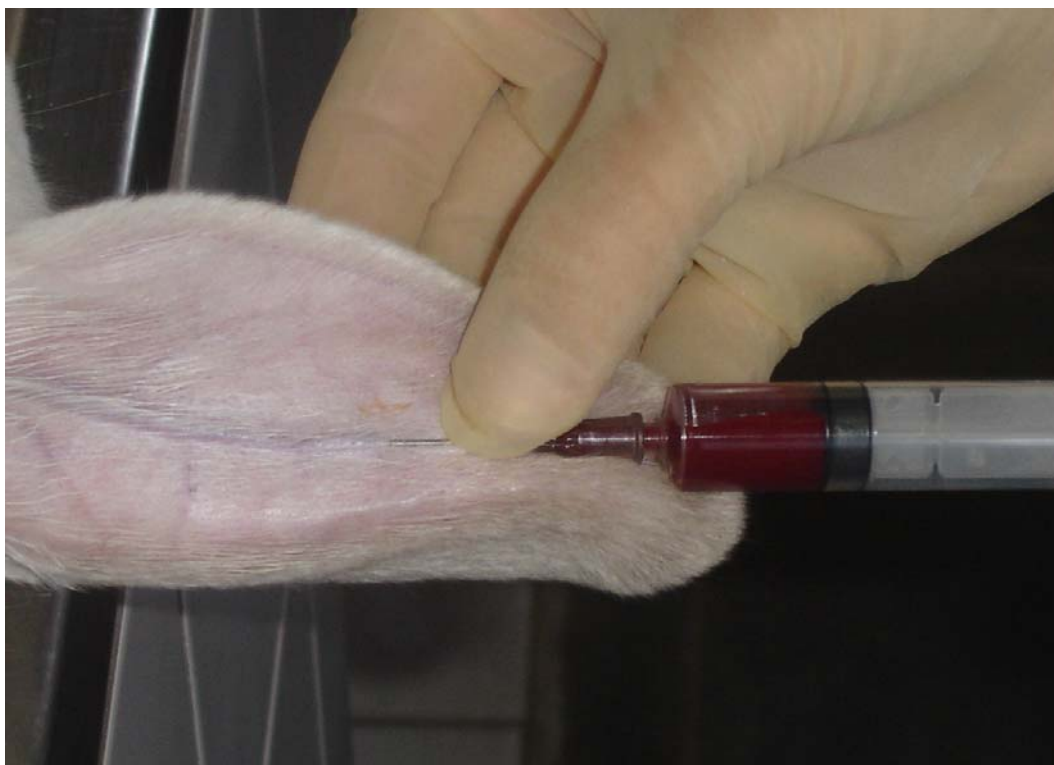




**Figura 3.** Orelha do coelho após a coleta de biópsia e já com o tratamento tópico.



**Figura 4.** Coleta de fragmento de pele da orelha de coelho acometida por *Stomoxys calcitrans*, com a utilização de saca bocado de 5mm



**Figura 5.** Punção venosa na orelha de coelho com seringa rinsada com anticoagulante EDTA (ácido etileno diamino tetracético)

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período que compreendeu a realização deste experimento, entre os meses de setembro a novembro, observou-se um acréscimo na infestação por *S. calcitrans* de bovinos e eqüinos na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Esta observação coincide com Bittencourt e Moya Borja (2000), que observaram no município de Espírito Santo do Pinhal (SP), o maior número de moscas infestando bovinos e eqüinos, no período de outubro a dezembro, em função principalmente da temperatura e umidade.

Durante a captura foi observado que os locais de predileção das moscas dos estábulos para a alimentação, estão de acordo com os relatos de Bittencourt e Moya Borja (2000) e (2002) e Pires et al. (2003). Nestes trabalhos, os autores constataram que, nos eqüinos, 70% das moscas preferiam picar e sugar o sangue dos membros torácicos, concentrando-se nas regiões abaixo do joelho, principalmente na canela. Nos bovinos, os membros torácicos também são os mais acometidos, seguidos dos membros pélvicos e do tórax. Todd (1964) relatou que a preferência de *S. calcitrans* por picar a superfície dos membros torácicos dos animais, poderia ser devida ao fato da pele ser mais fina e por possuir um grande número de capilares superficiais, o que facilitaria a ingestão de sangue.

Bittencourt e Moya Borja (2000) observaram, em eqüinos, uma média de três moscas infestando os membros anteriores, nos períodos de menor incidência, e quinze moscas, em média, nos períodos de maior infestação. Praticamente o mesmo número de moscas foi utilizado nesta infestação experimental.

Nos cães, as regiões mais acometidas por picadas de *S. calcitrans* são as orelhas e a face. Estas observações determinaram a escolha das orelhas como local para a infestação dos coelhos no presente experimento. (YERUHAM e BRAVERMAN, 1995; SCOTT et al., 1996).

### 4.1 Alterações Anátomo-histopatológicas

Imediatamente após a infestação foram observados pequenos pontos hemorrágicos nos locais das picadas de *S. calcitrans* (Figura 6). Em seguida formaram-se pequenos hematomas circulares, subcutâneos, medindo aproximadamente 1 a 2mm de diâmetro (Figura 7). Estas observações são compatíveis com àquelas descritas por Jubb et al. (2007), mas contrariamente, neste experimento as lesões não evoluíram para áreas focais de necrose com ulcerações. Provavelmente devido à infestação experimental ter ocorrido uma única vez, por cinco minutos, enquanto que nas infestações naturais, as moscas picam os animais várias vezes ao longo do dia. Yeruham e Braverman (1995), também descreveram a presença de sangramento imediato, após as picadas.



**Figura 6.** Pontos hemorrágicos na pele de coelho imediatamente após a infestação por *Stomoxys calcitrans*.



**Figura 7.** Hematomas circulares subcutâneos em pele de coelho após a infestação por *Stomoxys calcitrans*.

Os animais foram monitorados após a infestação e no dia da coleta do fragmento de biópsia e punção venosa, depois que retornavam da anestesia. Nestas oportunidades não foi observado prurido nas orelhas acometidas pelas picadas das moscas, o que está em desacordo com Mc Gavin e Zachary (2007), Cotran et al. (1999) e Moorhouse (1972). Estes autores observaram prurido intenso nos animais acometidos, especialmente àqueles com hipersensibilidade às picadas de mosca. Para Perris (1995), a hipersensibilidade às picadas de insetos é uma das principais causas do prurido. Desta maneira, a ausência deste sinal nos animais deste experimento, pode estar relacionada com a ausência desta condição. Yeruham e Braverman (1995) relatam que as picadas de *S. calcitrans* são dolorosas, no entanto como os coelhos estavam anestesiados no momento da infestação experimental, não foi possível a avaliação da sensibilidade de dor.

Quando da realização das biópsias (48 horas após a infestação experimental), não foram visualizadas alterações macroscópicas significativas na pele da face externa das orelhas. Exceção feita a dois coelhos do grupo IV (reinfestação), que apresentaram discreta exsudação serosa nos locais das picadas. Não foram observadas áreas alopecicas e pápulas, como também não houve espessamento da pele do pavilhão auricular. Contrariamente, Jubb et al. (2007), Cotran et al. (1999) e Souza et al. (2005), descreveram a presença de pápulas, pústulas, colaretos epidérmicos e crostas num curso agudo. Enquanto que no curso crônico, áreas liquenificadas, ulceradas, exsudativas, crostosas, alopecicas e, por vezes, sangrantes, estavam presentes. Stork (1979) também descreveu reações de hipersensibilidade com o aparecimento de vesículas na epiderme dos animais acometidos por *S. calcitrans*. Neste experimento houve um único momento de contato das moscas com a pele dos coelhos ou no máximo dois contatos, no caso do grupo IV (reinfestado), o que pode não ter sido suficiente para desencadear a reação de hipersensibilidade que normalmente leva ao prurido e consequentemente à alopecia, vesículas e ulcerações.

Os fragmentos analisados ao microscópio óptico, apresentavam-se revestidos por pele delgada nos dois lados e tecido cartilaginoso elástico normal, na região central. Na pele da face externa da orelha havia uma maior quantidade de anexos cutâneos (folículos pilosos e glândulas), que ainda assim apareciam em quantidade moderada. Os folículos pilosos ocorriam tipicamente em grupos (grupos pilosos), com glândulas sebáceas, de configuração normal, associadas.

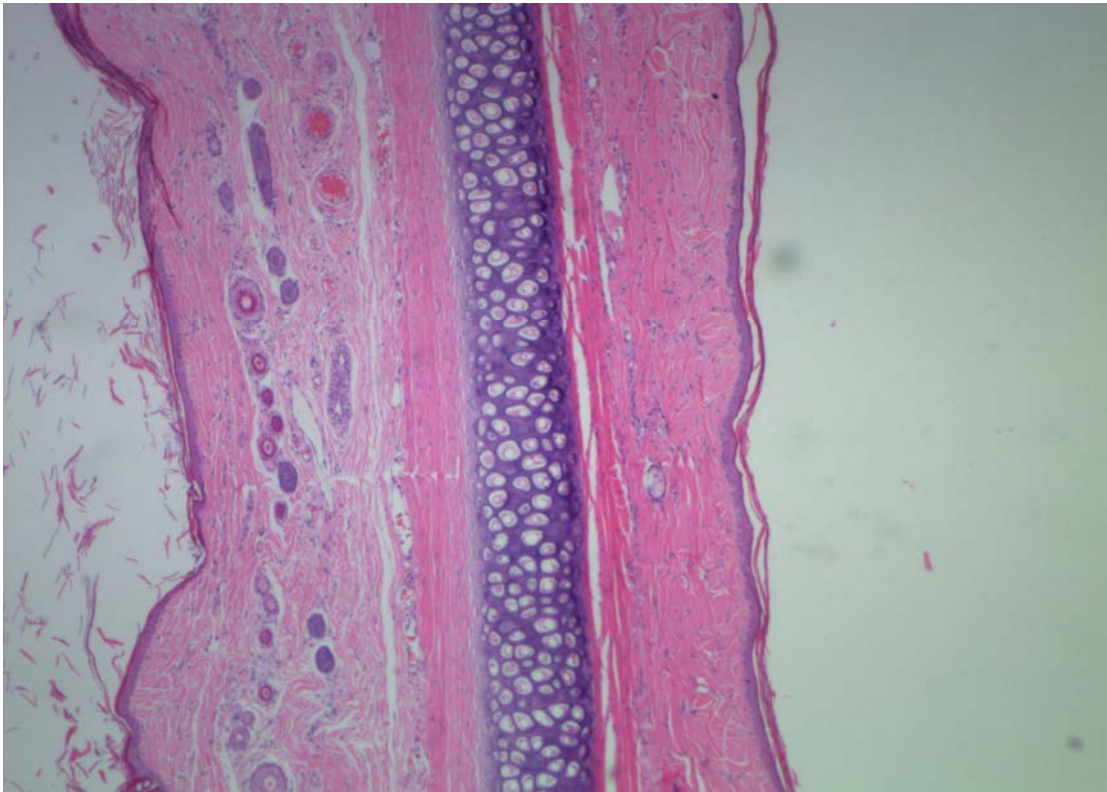
Na avaliação microscópica dos fragmentos de pele dos animais do grupo V (controle), somente dois animais apresentaram discreta congestão. Os demais animais deste grupo não apresentaram alterações evidentes, o que determinou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para os animais do grupo experimental em todos os parâmetros avaliados, com exceção da hemorragia intersticial. A epiderme da face externa apresentou uma média de 3 a 4 estratos celulares e o estrato basal bem definido. Camada córnea normalmente delgada. Derme reticular compacta, com o colágeno bem estruturado, folículos pilosos com glândulas sebáceas. Raros adenômeros tubulares sudoríparos foram observados na derme profunda, que apresentava um plexo vascular com artérias musculares e veias de médio e pequeno calibre. Também foi observada pequena quantidade de tecido adiposo abaixo da derme, junto ao pericôndrio. (Tabela 1) (Figura 8).

Nos coelhos dos diferentes grupos submetidos às picadas de *S. calcitrans*, dezenove animais (79,2%) apresentaram hiperqueratose ortoceratótica compacta (Figura 9). Somente em três animais foi evidenciada acantose. Também em três animais foram observadas crostas serocelulares (exsudativas), com hemácias e debris celulares. Um destes coelhos apresentou lesão erosiva associada à crosta e discreta espongiose (Figura 10). Souza et al. (2005) observaram além da hiperqueratose ortoceratótica, a paraceratótica que pode estar associada às infestações crônicas num surto de dermatite alérgica sazonal em ovinos. Mc Gavin e Zachary (2007) e Cotran et al. (1999) verificaram a presença de espongiose, bolhas intra-

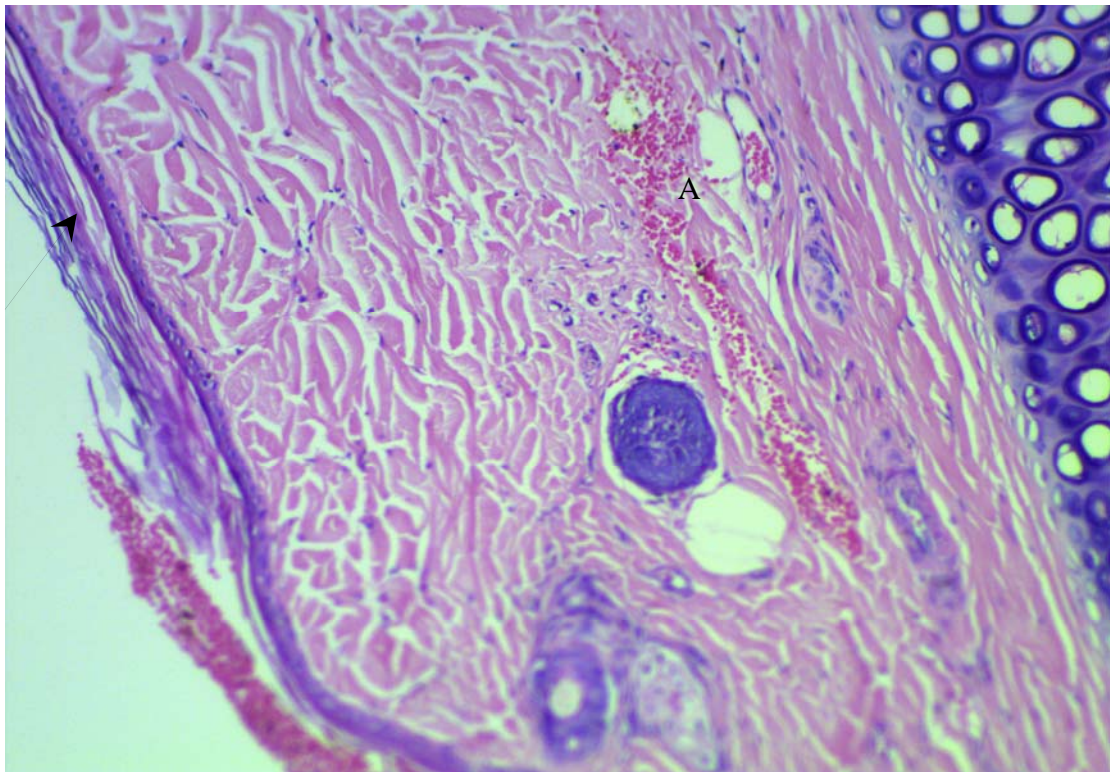


epidérmicas, hiperplasia, paraqueratose e hiperqueratose, sugerindo que estas alterações poderiam ser secundárias ao trauma determinado pelo prurido, o que não foi observado neste experimento. Segundo Scott et al. (1996), as crostas indicam apenas um processo exsudativo anterior e raramente são de significância diagnóstica.

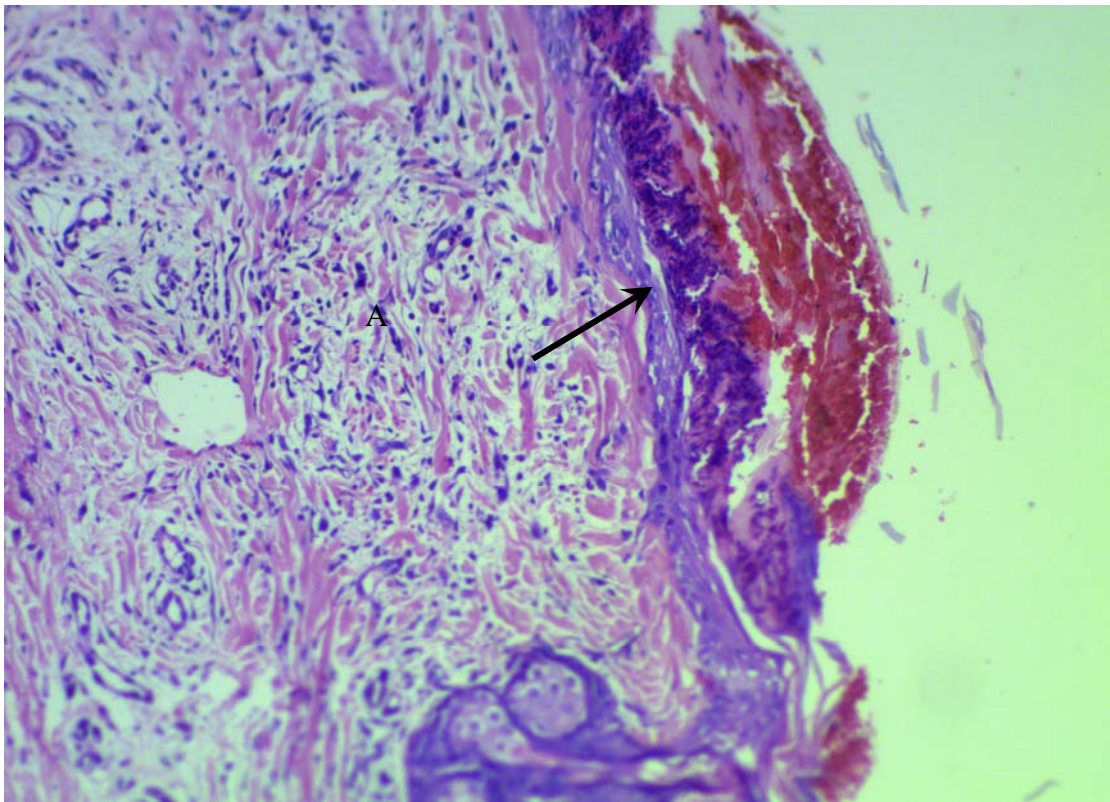
Em relação às alterações na derme reticular, o edema intersticial, classificado como discreto a moderado, estava presente em 18 animais (75%). Nos grupos I e II (três e sete moscas, respectivamente), somente três animais em cada grupo, apresentaram edema discreto. Nos grupos III e IV (14 moscas e reinfestação), observou-se edema em todos os animais, que foi classificado como discreto em nove coelhos destes dois grupos (75%) e como moderado em outros três animais (25%). As diferenças entre o grupo controle e o grupo experimental mostraram-se significativas pelo Teste Exato de Fisher ( $p < 0,05$ ), evidenciando que as picadas das moscas contribuíram significativamente para o aparecimento de Edema. Os vasos linfáticos dilatados – linfangectasia, que não são visíveis na pele normal, foram evidenciados em quinze coelhos (62,5%), sendo que somente no grupo IV (reinfestação) todos os animais apresentaram esta alteração. Para Scott et al. (1996), a dilatação dos vasos linfáticos geralmente está associada ao edema (Figura 11).



**Figura 8.** Fotomicrografia de pele normal (Coelho 4, Grupo controle). HE, obj.10x.

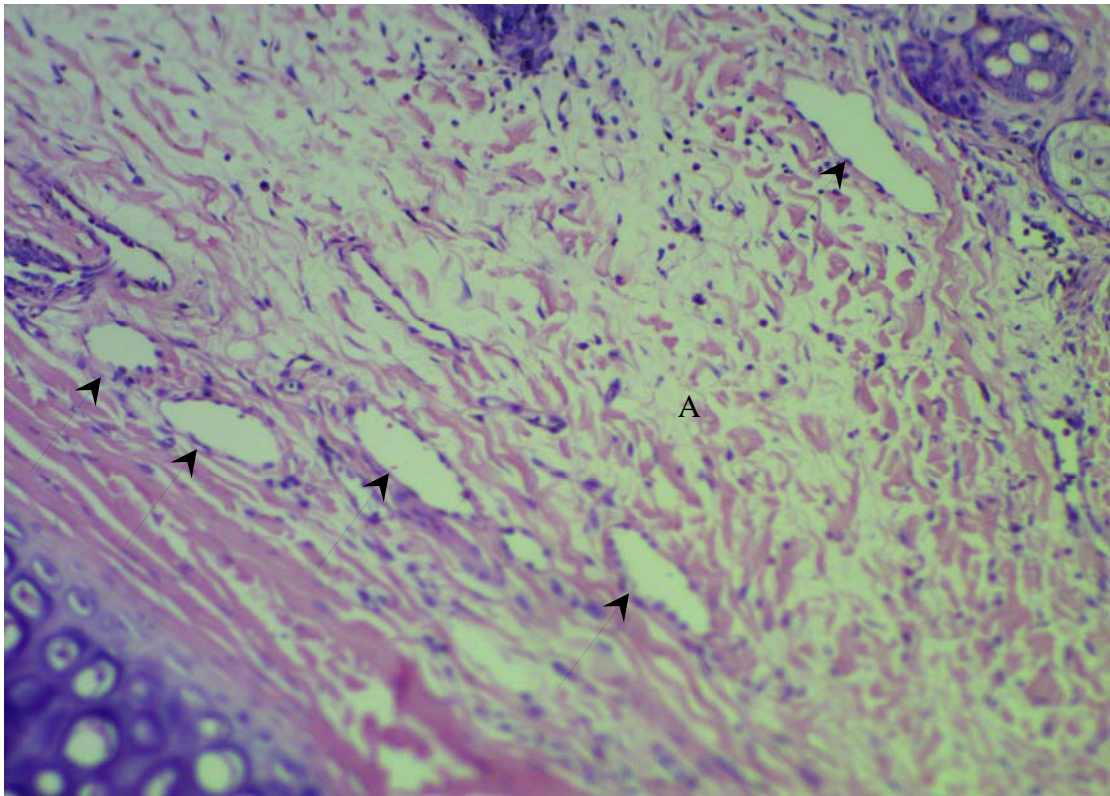


**Figura 9.** Fotomicrografia de pele com Hiperqueratose ortoceratótica compacta (seta) Hemorragia discreta na derme profunda (A). (Coelho 1, Grupo IV). HE, obj.40x.



**Figura 10.** Fotomicrografia de epiderme com lesão erosiva e crosta serocelular com hemácias e restos celulares associados (seta). Intenso infiltrado mononuclear histiocítico intersticial (A). (Coelho 5, Grupo IV). HE, obj.40x





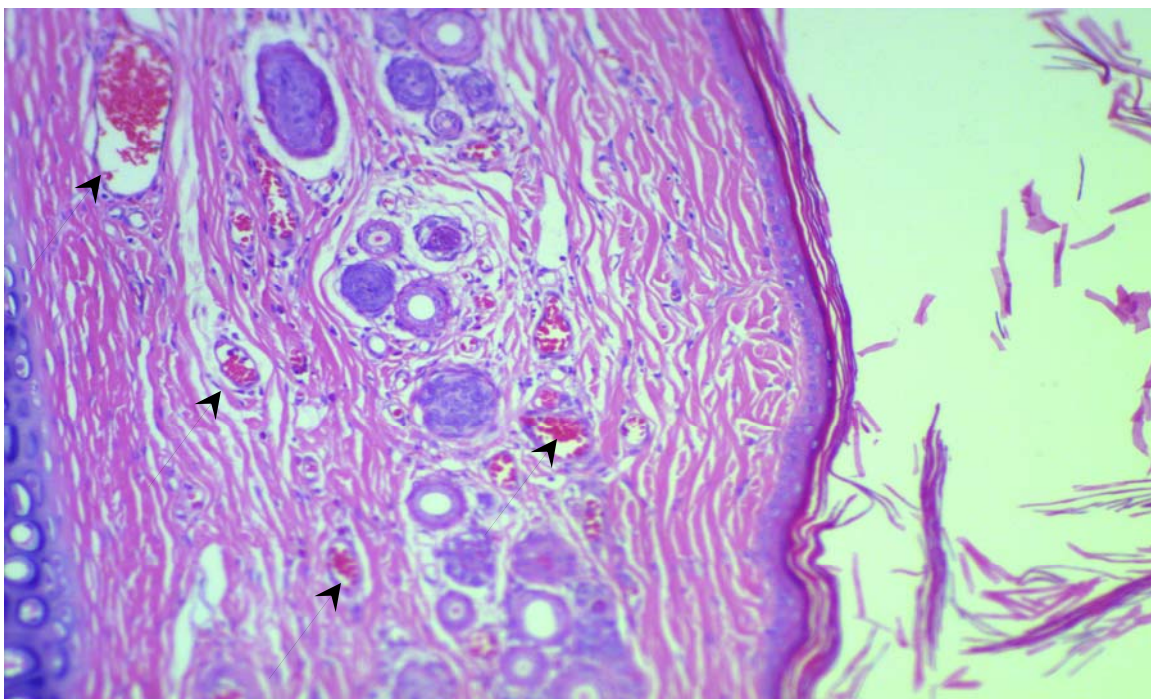
**Figura 11.** Fotomicrografia de pele com edema moderado (A) e linfangectasia (setas). Infiltrado inflamatório mononuclear histiocítico moderado. (Coelho 6, Grupo IV). HE, obj.40x

Onze coelhos dos grupos experimentais apresentaram hemorragia intersticial (45,8%); em nove foi caracterizada como discreta (Figura 9) e apenas dois espécimes apresentavam hemorragia moderada. Cabe ressaltar que as hemorragias observadas se localizavam profundamente na derme, junto ao plexo vascular. Esta condição provavelmente deve-se à probóscida pontiaguda e proeminente de *S. calcitrans* descrita por Urquwart et al. (1996). As percentagens encontradas quase foram significativas pelo Teste Exato de Fisher ( $p = 0,06$ ), indicando que a presença de moscas quase contribuiu significativamente para o aparecimento de hemorragia. Esta quantidade de coelhos que apresentaram hemorragia confronta com as observações de Jubb et al. (2007), Mc Gavin e Zachary (2007) e Cotran et al. (1999), que relataram ser a hemorragia um achado relativamente freqüente em lesões causadas por picadas de insetos.

Analisando a congestão dos vasos sanguíneos das biópsias, verificou-se que ela estava presente em 22 coelhos do grupo experimental (91,7%), sendo caracterizada como discreta em 20 e como moderada em apenas dois animais (Figura 12). Nos coelhos do grupo controle, dois (33,3%) apresentaram congestão classificada como discreta. Estas diferenças foram detectadas estatisticamente pelo Teste Exato de Fisher ( $p < 0,05$ ). Estes achados coincidem com os relatos de Perris (1995), Cotran et al. (1999) e Guglielmone et al. (1999), que observaram vasodilatação, hiperemia e edema, em decorrência da picada de insetos. Para Cotran et al. (1999), estas alterações estão associadas à hipersensibilidade do tipo I, normalmente envolvida nas respostas imunológicas às picadas de insetos. Para Tizard (2002) *S. calcitrans* está envolvida com a hipersensibilidade do tipo I e tipo IV, enquanto Cotran et al. (1999) descreveram que na primeira etapa da reação tipo I, observa-se vasodilatação e extravasamento vascular que resulta em edema, também observado neste trabalho.



A segunda etapa da hipersensibilidade do tipo I inicia-se duas a oito horas após a exposição inicial e pode durar vários dias. Esta reação mais tardia se caracteriza por um infiltrado tecidual mais intenso com eosinófilos, neutrófilos, mastócitos, basófilos, monócitos e linfócitos. Neste tipo de reação, os mastócitos e basófilos têm um papel destacado (COTRAN et al., 1999). No presente estudo, foi observado infiltrado inflamatório em 15 coelhos (62,5%) dos grupos experimentais, enquanto que nenhum coelho do grupo controle apresentou esta alteração. Dentre os animais que apresentaram esta alteração, 13 coelhos (54,2%) apresentaram infiltrados inflamatórios de polimorfonucleares, sendo 12 discretos e em apenas um animal este tipo de infiltrado foi classificado como moderado. Em 14 coelhos (58,3%) foram observados infiltrados de mononucleares, dentre os quais oito discretos, cinco moderados e apenas um classificado como intenso (Figura 10).



**Figura 12.** Fotomicrografia de vasos sanguíneos com congestão moderada (setas).  
(Coelho 3, Grupo III). HE, obj.10x

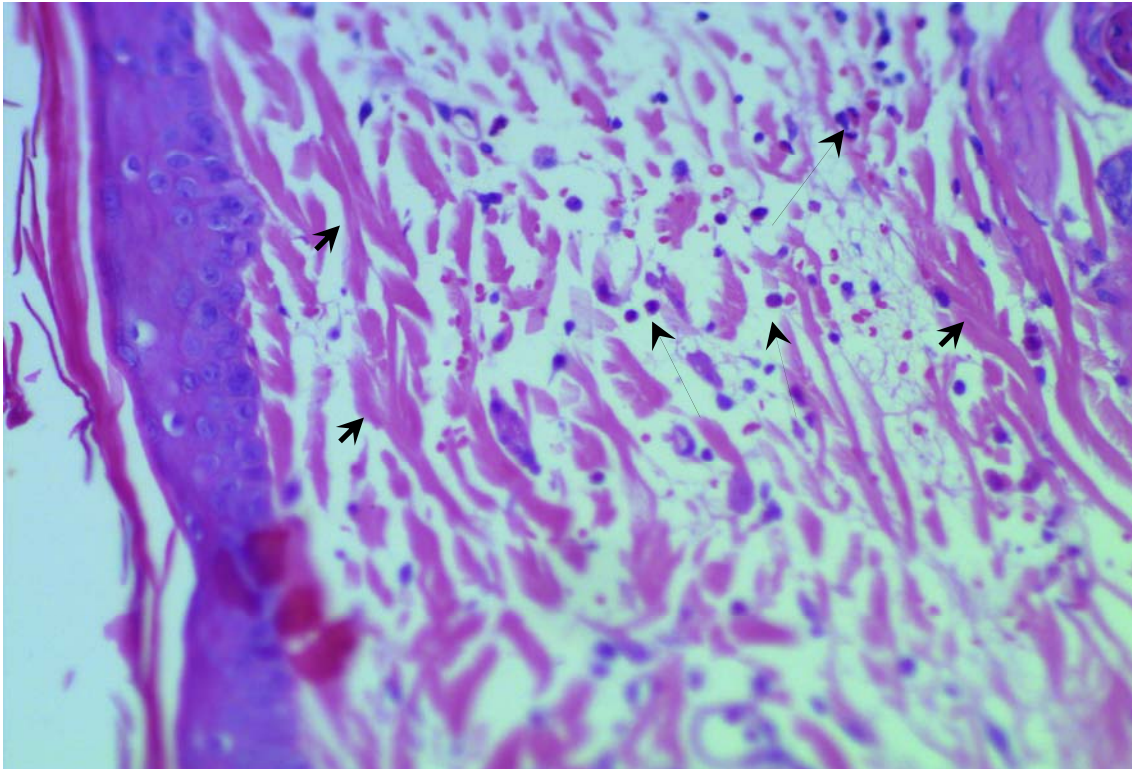
Os infiltrados de polimorfonucleares eram predominantemente de eosinófilos, com localização perivascular e intersticial (Figura 13), o que coincide com as observações de Baker e Quinn (1978), Guglielmono et al. (1999), Gross et al. (2005), Souza et al. (2005) e Jubb et al. (2007). No entanto, estes autores classificaram a maioria dos infiltrados como intenso, o que não coincide com este experimento, uma vez que foi observado somente um infiltrado moderado, enquanto que em 12 animais o infiltrado de eosinófilos foi classificado apenas como discreto. A maioria dos infiltrados discretos associados à ausência de prurido observados neste estudo, sugerem que os coelhos desenvolveram uma reação de menor intensidade em comparação à hipersensibilidade I clássica. Souza et al. (2005) observaram muitos eosinófilos degranulados em íntima associação com fibras colágenas hialinizadas e de aspecto flocular. Em algumas áreas, os eosinófilos infiltravam a epiderme formando pústulas. Os focos de colagenólise podem formar estruturas chamadas de “figuras em chamas”, que são geralmente rodeadas por um infiltrado eosinofílico intenso (GROSS et al., 1992; JUBB, et al., 2007; TEIXEIRA e AMORIM, 2006). Nos fragmentos de pele avaliados neste estudo, não foram observados infiltrados eosinofílicos intensos e no único corte com infiltrado moderado evidenciou-se colagenólise com as chamadas “figuras em chamas” (Fig. 13). Nos demais

espécimes, foram observadas alterações na estruturação do colágeno, que podiam estar associada à reação de menor intensidade, uma vez que os infiltrados eosinofílicos foram classificados apenas como discretos.

Segundo Cotran et al. (1999), na hipersensibilidade tipo I os mastócitos e basófilos têm um papel destacado, em função da liberação dos mediadores químicos quando da ligação da imunoglobulina E, que promovem vasodilatação, hiperemia, extravasamento vascular e edema. Desta maneira, para melhor identificar a presença de mastócitos, os cortes histológicos foram corados com azul de toluidina e Giemsa. No entanto, contrariando as observações destes autores, este tipo celular não foi evidenciado em nenhum corte, indicando que os infiltrados mononucleares foram predominantemente histiocíticos. A ausência de mastócitos intersticiais pode estar relacionada ao momento da coleta dos fragmentos (48 horas após a infestação) e este achado pode indicar que, transcorrido este tempo, o infiltrado inflamatório apresente mudanças no tipo celular predominante e os infiltrados eosinofílicos, somente discretos na maioria das amostras, podem corroborar com esta tendência. Este achado também contrastou com Feldman et al. (2000) que relataram que, nestes animais, o número de basófilos circulantes é inversamente proporcional ao número de mastócitos tissulares. Como a leucometria dos coelhos neste estudo demonstrou maioria dos animais com a contagem de basófilos abaixo dos valores de referência, era de se esperar uma maior quantidade de mastócitos intersticiais. A ausência deste tipo celular nos fragmentos de pele dos coelhos deste experimento, pode estar relacionado com o momento da realização das biópsias (48 horas após a infestação experimental).

Os achados histopatológicos indicaram que as infestações nos animais deste experimento determinaram o desenvolvimento de dermatites do tipo perivascular e intersticial, diferentemente da dermatite necrótica nas orelhas de cães e dermatite exudativa nos membros de eqüinos, descritas por Yeruham e Braverman (1995). Estas divergências nas lesões observadas, provavelmente se devem às diferenças nos tipos de infestação (experimental e natural, respectivamente). Também se observou uma tendência de maior intensidade nas alterações histopatológicas nos animais submetido à reinfestação, embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

Passados 15 dias da coleta de fragmentos para biópsia, observou-se a quase completa cicatrização das feridas, sem a presença de infecções secundárias ou outras intercorrências (Figura 14). Esta condição não foi observada em infestações naturais, provavelmente pela repetição das picadas, que levava ao prurido e conseqüente alopecia e ulcerações, conforme descreveram Jubb et al. (2007), Cotran et al. (1999) e Souza et al. (2005).



**Figura 13.** Fotomicrografia de infiltrado intersticial moderado de polimorfonucleares (setas) com colagenólise – “figuras em chamas” (cabeças de seta) e edema moderado (Coelho 1, Grupo III). HE, obj. 40x



**Figura 14.** Orelha de coelho quinze dias após a realização da coleta de fragmento para biópsia, evidenciando a quase completa cicatrização.

**Tabela 1.** Resultados da avaliação histopatológica nos coelhos não infestados (controle) por *Stomoxys calcitrans*.

COELHO	Edema	Hemorr.	Congest.	PMN	MN	Linfang.	Epiderme
1	--	--	--	--	--	(-)	--
2	--	--	1	--	--	(-)	--
3	--	--	--	--	--	(-)	--
4	--	--	1	--	--	(-)	--
5	--	--	--	--	--	(-)	--
6	--	--	--	--	--	(-)	--

-- ausente, 1 – discreto, 2 – moderado, 3- intenso; PMN – Infiltrado polimorfonuclear; MN - Infiltrado mononuclear; Linfang. – Linfangectasia – (+) presente (-) ausente; Epiderme – tipo de alteração.

**Tabela 2.** Resultados da avaliação histopatológica nos coelhos infestados por 3 moscas.

COELHO	Edema	Hemorr.	Congest.	PMN	MN	Linfang.	Epiderme
1	1	--	1	--	--	(-)	hiperqueratose
2	--	1	1	--	--	(+)	hiperqueratose
3	1	1	1	1	1	(+)	hiperqueratose
4	1	--	1	1	1	(+)	--
5	--	1	1	1	1	(-)	hiperqueratose
6	--	1	--	1	1	(-)	hiperqueratose

-- ausente, 1 – discreto, 2 – moderado, 3- intenso; PMN – Infiltrado polimorfonuclear; MN - Infiltrado mononuclear; Linfang. – Linfangectasia – (+) presente (-) ausente; Epiderme – tipo de alteração.

**Tabela 3.** Resultados da avaliação histopatológica nos coelhos infestados por 7 moscas.

COELHO	Edema	Hemorr.	Congest.	PMN	MN	Linfang.	Epiderme
1	--	--	--	1	1	(-)	acantose
2	1	1	1	1	2	(+)	hiperqueratose
3	--	--	1	--	--	(-)	hiperqueratose
4	1	1	2	--	--	(+)	hiperqueratose
5	--	2	1	1	1	(-)	hiperqueratose
6	1	--	1	--	--	(+)	hiperqueratose

-- ausente, 1 – discreto, 2 – moderado, 3- intenso; PMN – Infiltrado polimorfonuclear; MN - Infiltrado mononuclear; Linfang. – Linfangectasia – (+) presente (-) ausente; Epiderme – tipo de alteração.



**Tabela 4.** Resultados da avaliação histopatológica nos coelhos infestados por 14 moscas.

COELHO	Edema	Hemorr.	Congest.	PMN	MN	Linfang.	Epiderme
1	2	--	1	2	2	(+)	hiperqueratose
2	1	--	1	--	1	(-)	hiperqueratose
3	1	1	2	1	2	(-)	hiperqueratose
4	1	--	1	1	2	(+)	--
5	1	--	1	--	--	(-)	hiperqueratose
6	1	--	1	--	--	(+)	hiperqueratose

-- ausente, 1 – discreto, 2 – moderado, 3- intenso; PMN – Infiltrado polimorfonuclear;  
 MN - Infiltrado mononuclear; Linfang. – Linfangectasia – (+) presente (-) ausente;  
 Epiderme – tipo de alteração

**Tabela 5.** Resultados da avaliação histopatológica nos coelhos reinfestados por 14 moscas.

COELHO	Edema	Hemorr.	Congest.	PMN	MN	Linfang.	Epiderme
1	1	2	1	--	--	(+)	hiperqueratose
2	1	--	1	--	--	(+)	hiperqueratose
3	1	--	1	--	1	(+)	hiperqueratose
4	1	--	1	1	--	(+)	hiperqueratose
5	2	1	1	1	3	(+)	acantose
6	2	1	1	1	2	(+)	acantose

-- ausente, 1 – discreto, 2 – moderado, 3- intenso; PMN – Infiltrado polimorfonuclear;  
 MN - Infiltrado mononuclear; Linfang. – Linfangectasia – (+) presente (-) ausente;  
 Epiderme – tipo de alteração.

#### 4.2 Perfil Leucocitário Sanguíneo

Para a análise do perfil leucocitário sanguíneo, os valores de leucometria global e específica foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, ao nível de 5% de probabilidade. Por apresentarem características morfofuncionais distintas, os resultados da leucometria específica foram analisados separadamente para cada tipo de leucócito nos coelhos dos diferentes grupos. A amostra de sangue do coelho seis do grupo III (14 moscas) não apresentou condições de ser analisada, em função de estar coagulada quando da chegada ao laboratório.

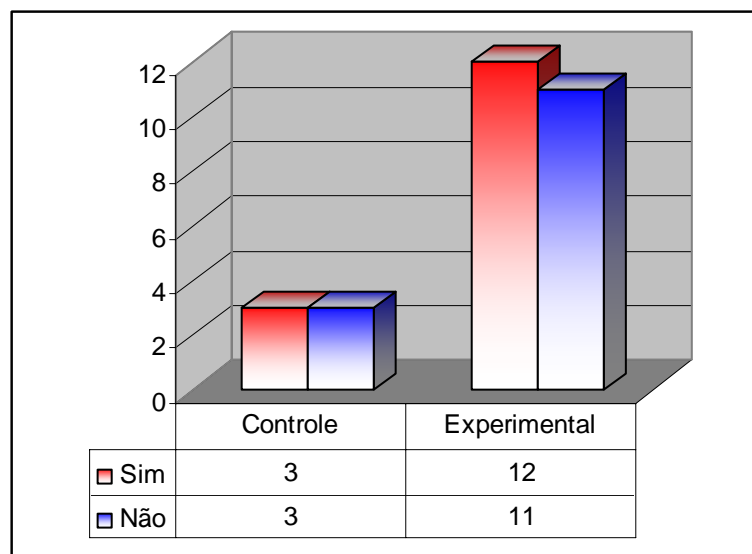
Os resultados absolutos referentes à Leucometria Global por mm<sup>3</sup> no sangue dos coelhos dos grupos controle e experimental encontram-se na Tabela 6.

**Tabela 6.** Valores de Leucometria Global por mm<sup>3</sup> no sangue dos coelhos nos diferentes grupos.

Grupos/Coelhos	1	2	3	4	5	6	Média
(V) Controle	10000	8600	6500	4000	3600	4300	6166,67
(I) 3 moscas	5300	10100	20200	10800	8300	8000	10450,00
(II) 7 moscas	6500	13300	9400	5400	10000	6400	8500,00
(III) 14 moscas	15300	7200	6900	11200	7400	--	9600,00
(IV) 14 moscas - reinfestação	5100	3600	4600	4000	4800	4200	4383,33

Considerando-se os valores de referência para a leucometria global em coelhos Nova Zelândia Brancos, machos, com três meses de idade, que segundo Feldman et al. (2000), encontram-se entre 6.400 a 13.000 leucócitos por  $\text{mm}^3$  de sangue, verificou-se que todos os coelhos do grupo IV (reinfestação) apresentaram valores abaixo da referência. Este resultado é significativamente inferior aos demais grupos experimentais ( $p < 0,05$ ), indicando que em ambiente onde há um número mínimo de 14 moscas, com re-infestação, há uma diminuição da Leucometria Global. Segundo Almosny e Monteiro (2007), doenças inflamatórias, em sua fase inicial, costumam determinar leucopenia devido à rápida mobilização de neutrófilos (heterófilos) para os órgãos-alvo, o que não se aplica neste estudo, uma vez que ocorreu heterofilia, conforme será comentado posteriormente. A leucopenia observada nos coelhos submetidos à reinfestação pode estar relacionada com a linfocitopenia ocasionada pela liberação de glicocorticóides em resposta ao stress, que foi maior nos animais deste grupo.

A média da leucometria global dos animais do grupo controle ficou um pouco abaixo dos valores de referência, onde três animais apresentaram-se dentro da normalidade e outros três fora da normalidade. Analisando-se todos os coelhos dos grupos experimentais, 12 animais (52,17%) apresentaram-se dentro da faixa de normalidade (Figura 15), não diferindo estatisticamente do grupo controle ( $p > 0,05$ ) e confirmando que o grupo submetido à reinfestação foi o mais afetado.



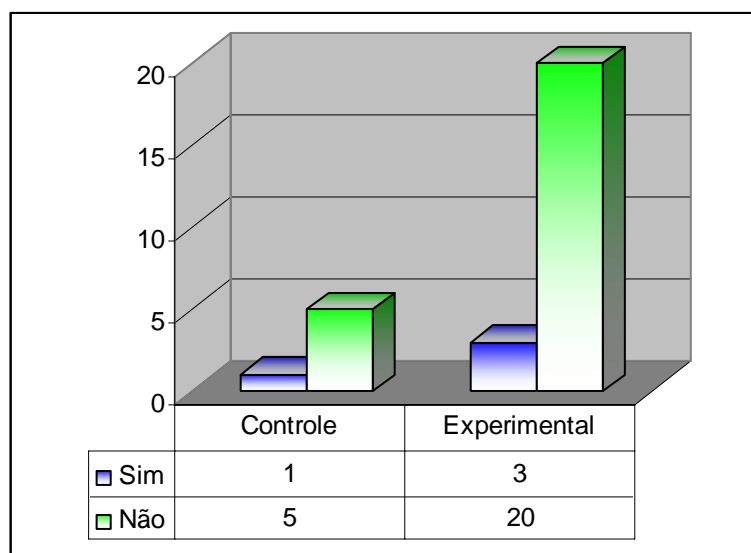
**Figura 15.** Associação dos coelhos, nos grupos controle e experimental, com valores de referência para a leucometria global.

Os resultados absolutos referentes à quantidade de Basófilos por  $\text{mm}^3$  no sangue dos coelhos controle e experimental encontram-se na Tabela 7.

**Tabela 7.** Valores absolutos de Basófilos por  $\text{mm}^3$  de sangue dos coelhos nos diferentes grupos.

Grupos/Coelhos	1	2	3	4	5	6	Média
(V) Controle	300	86	0	40	72	129	104,50
(I) 3 moscas	212	101	0	216	83	160	128,67
(II) 7 moscas	0	0	0	0	100	128	38,00
(III) 14 moscas	459	0	759	112	74	--	280,80
(IV) 14 moscas - reinfestação	51	36	0	120	192	84	80,50

Os valores encontrados não diferiram estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ), indicando que a quantidade de moscas não interferiu nos valores absolutos de basófilos no sangue. No entanto ao compararmos com os valores de referência, ou seja, entre 198,4 a 403,0 (3,1%) basófilos/ $\text{mm}^3$  de sangue (FELDMAN et al., 2000), verificou-se que todas as médias dos grupos, com exceção do grupo III (14 moscas), estão abaixo da faixa de referência. Vinte coelhos (87%) dos grupos que sofreram infestação apresentaram taxas de basófilos abaixo dos valores de referência (Figura 16), mas mesmo assim não diferiram estatisticamente do grupo controle ( $p > 0,05$ ). Campbell (2004) e Almosny e Monteiro (2007) relataram que a função dos basófilos ainda não está completamente esclarecida, mas em alguns animais acompanham as eosinofílias ou estão relacionadas à ocorrência de infestações parasitárias. Neste experimento os valores de eosinófilos também ficaram abaixo da referência, corroborando com estas observações. Em contrapartida, Gonçalves et al. (2002) relataram contagem inexpressiva de basófilos nos ratos infestados por *Dermatobia hominis*, o que pode estar relacionado tanto com o tipo de animal utilizado no experimento, quanto com o tipo de parasita.



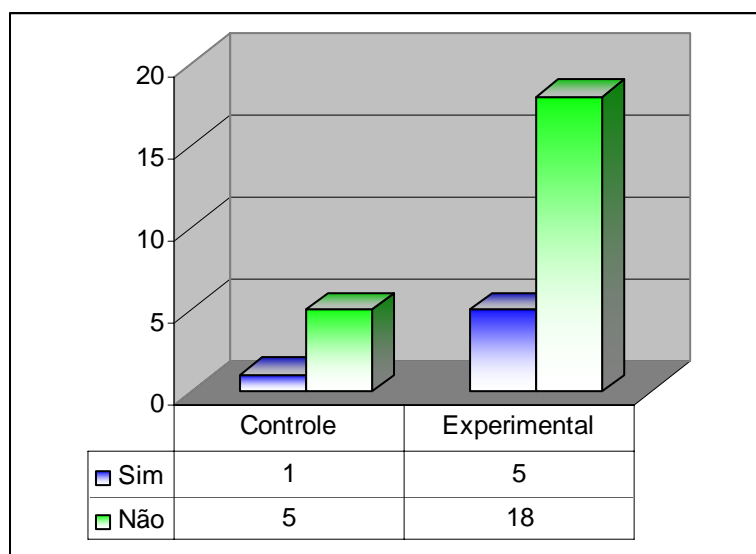
**Figura 16.** Associação dos coelhos, nos grupos controle e experimental, com valores de referência para contagem de basófilos por  $\text{mm}^3$  de sangue.

Os resultados absolutos referentes à quantidade de eosinófilos por  $\text{mm}^3$  no sangue dos coelhos controle e experimental encontram-se na Tabela 8.

**Tabela 8.** Valores absolutos de eosinófilos por  $\text{mm}^3$  de sangue dos coelhos nos diferentes grupos.

Grupos/Coelhos	1	2	3	4	5	6	Média
(V) Controle	0	0	0	80	36	215	55,17
(I) 3 moscas	106	101	0	0	0	0	34,50
(II) 7 moscas	65	0	0	0	0	64	21,50
(III) 14 moscas	0	216	207	112	0	--	107,0
(IV) 14 moscas - reinfestação	0	36	0	0	0	0	6,00

A exemplo do que aconteceu com os basófilos, os valores encontrados nos grupos não diferiram estatisticamente entre si ( $p>0,05$ ), indicando que a quantidade de moscas não interferiu nos valores absolutos de eosinófilos no sangue, embora possa ser observada uma tendência de diminuição de eosinófilos na medida que aumenta o número de moscas na infestação. Considerando os valores de referência citados por Feldman et al. (2000), que são de 64 a 130 (1%) eosinófilos/ $\text{mm}^3$  de sangue, verificou-se que todas as médias dos grupos, com exceção do grupo III (14 moscas), estão abaixo da faixa de referência. Dos 23 coelhos dos grupos experimentais, cinco (21,74%) apresentaram-se dentro da faixa de normalidade, enquanto que, no grupo controle apenas um animal (16,67%) apresentou valores normais de eosinófilos por  $\text{mm}^3$  de sangue ( $p>0,05$ ) (Figura 17). Estas observações coincidem com Gonçalves et al. (2002), que relataram diminuição no número de eosinófilos, mas sem significância estatística. Contrariamente, Campbell (2004) e Almosny e Monteiro (2007) relataram que em alergias e parasitoses pode ocorrer a elevação dessas células. No entanto, também observaram que em casos de processos alérgicos superagudos ocorre eosinopenia. Desta maneira, a eosinofilia que estes autores descreveram nas parasitoses pode estar relacionada provavelmente à um processo crônico.





**Figura 17.** Associação dos coelhos, nos grupos controle e experimental, com valores de referência para contagem de Eosinófilos por mm<sup>3</sup> de sangue.

Os resultados absolutos referentes à quantidade de Heterófilos por mm<sup>3</sup> no sangue dos coelhos controle e experimental encontram-se na Tabela 9.

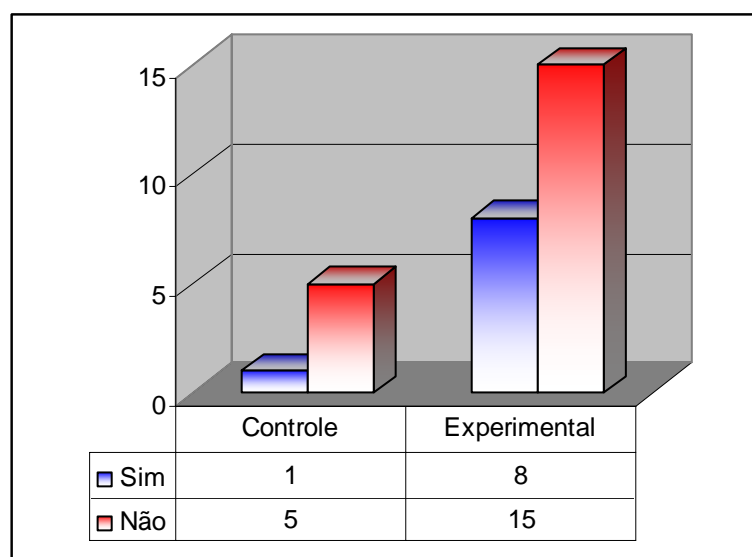
**Tabela 9.** Valores absolutos de Heterófilos por mm<sup>3</sup> de sangue dos coelhos nos diferentes grupos.

Grupos/Coelhos	1	2	3	4	5	6	Média
(V) Controle	4500	4988	3900	800	1368	731	2714,50
(I) 3 moscas	3180	5959	11514	4212	3735	3280	5313,33
(II) 7 moscas	3055	10241	5076	2106	7200	3456	5189,00
(III) 14 moscas	10557	2952	3795	7952	3922	--	5835,60
(IV) 14 moscas - reinfestação	2295	1836	1794	1840	2064	1890	1953,17

A contagem de heterófilos por mm<sup>3</sup> de sangue dos coelhos nos diferentes grupos indicaram que as picadas das moscas determinaram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) destas células, quando comparado com o grupo controle. Enquanto que a contagem de heterófilos no Grupo IV (reinfestação) foi estatisticamente inferior a dos Grupos I (3 moscas), II (7 moscas) e III (14 moscas) ( $p < 0,05$ ), indicando que em ambiente onde há um número mínimo de 14 moscas, com re-infestação, há uma diminuição de Heterófilos. Esta situação pode estar relacionada com um curso mais agudo nos grupos I, II e III, que foram infestados apenas uma vez, enquanto que no grupo de reinfestação (IV) haveria uma tendência para um padrão de resposta de curso mais crônico, resultando na diminuição dos heterófilos.

Comparando as médias dos resultados dos Heterófilos dos grupos estudados com os valores de referência, verificou-se que os grupos, cujos coelhos foram infestados por de 3, 7 e 14 moscas, não apresentaram médias na faixa de referência, enquanto que nos outros dois grupos, as médias encontraram-se na faixa de referência, ou seja, entre 1.920 a 3.900 (30%) heterófilos por mm<sup>3</sup> de sangue (FELDMAN et al., 2000). Embora no grupo controle um coelho (16,67%) apresentou-se dentro da faixa de normalidade e no grupo experimental oito coelhos (43,48%), esta diferença não foi significativa ( $p > 0,05$ ) (Figura 18).

O aumento na contagem de heterófilos nos grupos I, II e III coincide com as descrições de Gonçalves et al. (2002), que observaram que os neutrófilos apresentaram contagem significativamente superior em ratos infestados por larvas de *Dermatobia hominis*, quando comparados ao grupo controle. Esta heterofilia também poderia ser explicada pela liberação de cortisol, em consequência ao stress imposto aos coelhos infestados por *S. calcitrans*. Nesta condição os heterófilos migram do “pool” marginal para o circulante, determinando o aumento na sua contagem (ALMOSNY e MONTEIRO, 2007).



**Figura 18.** Associação dos coelhos, nos grupos controle e experimental, com valores de referência para contagem de Heterófilos por  $\text{mm}^3$  de sangue.

Os resultados absolutos referentes à quantidade de Linfócitos por  $\text{mm}^3$  no sangue dos coelhos controle e experimental encontram-se na Tabela 10.

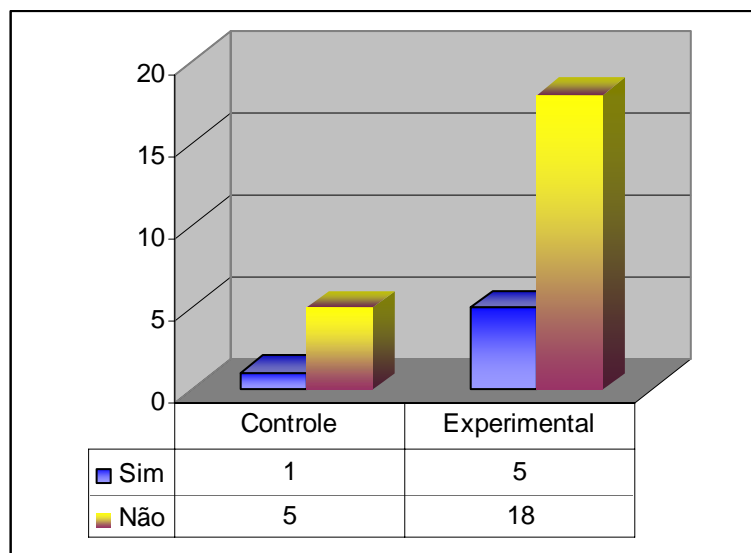
**Tabela 10.** Valores absolutos de Linfócitos por  $\text{mm}^3$  de sangue dos coelhos nos diferentes grupos.

Grupos/Coelhos	1	2	3	4	5	6	Média
(V) Controle	4700	3182	2145	2800	1908	2924	2943,17
(I) 3 moscas	1166	3232	7676	6156	4067	4080	4396,17
(II) 7 moscas	2925	2261	3948	2862	1600	2240	2639,33
(III) 14 moscas	1836	3528	1587	2800	3256	--	2601,40
(IV) 14 moscas – reinfestação	2142	1332	2622	1560	1920	1806	1897,00

A avaliação das médias das contagens de linfócitos por  $\text{mm}^3$  de sangue dos coelhos nos diferentes grupos, evidenciou uma diminuição do número de linfócitos na medida em que aumentou a quantidade de moscas na infestação. Apesar desta tendência, os grupos I, II e III não diferiram estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ). Entretanto a média de linfócitos do grupo IV (reinfestação) foi estatisticamente inferior a do grupo V (controle) e a do grupo I (3 moscas) ( $p < 0,05$ ), indicando que em ambiente onde há um número mínimo de 14 moscas, com reinfestação, há uma diminuição de Linfócitos. Estes resultados coincidiram com as observações de Oliveira et al. (2003) que relataram uma diminuição do número de linfócitos circulantes em coelhos submetidos ao stress de uma maior densidade populacional na cunicultura. O estímulo potente para a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), o qual estimula a secreção de glicocorticóides pela glândula adrenal, é influenciado pelo grau de estresse em coelhos. Os glicocorticóides promovem lise do tecido linfático e reduzem o número de linfócitos e eosinófilos circulantes (OLIVEIRA et al., 2003).

Comparando as médias das contagens de Linfócitos dos grupos estudados com os valores de referência, verificou-se que todos os grupos apresentaram médias com valores abaixo da faixa de referência, ou seja, entre 3.840 a 7.800 (60%) linfócitos por  $\text{mm}^3$  de sangue (FELDMAN et al., 2000), com exceção do grupo I (3 moscas).

Aplicando o teste exato de Fisher para testar a hipótese de independência entre os valores normais ou não nos grupos controle e experimental, pode-se concluir que o grupo controle, com um coelho (16,67%) na faixa de normalidade, não diferiu estatisticamente ( $p>0,05$ ) do grupo experimental, que apresentou cinco coelhos (21,74%) na faixa de referência (Figura 19).



**Figura 19.** Associação dos coelhos, nos grupos controle e experimental, com valores de referência para contagem de linfócitos por  $\text{mm}^3$  de sangue.

Em coelhos estressados há uma redução no número de linfócitos e de eosinófilos em função do aumento de glicocorticóides circulantes (OLIVEIRA et al., 2003). Estas observações foram concordantes com as encontradas na presente pesquisa, pois se constatou que nos grupos submetidos às picadas das moscas, 18 coelhos (78,3%) apresentaram linfopenia. Nos coelhos do Grupo Controle, cinco animais (83,3%) também apresentaram linfopenia, que pode ser explicada pelo stress que estes animais também sofreram com todo o processo de manipulação para a coleta de biópsia e sangue, embora não tenham sido picados pelas moscas. Campbell (2004) e Almosny e Monteiro (2007) também relataram que o uso de corticosteróides determina grave linfopenia, assim como o estresse prolongado que eleva os seus níveis endógenos. A mesma conclusão, com valores percentuais iguais, pode ser estendida para a contagem de eosinófilos no presente estudo, uma vez que os animais tanto dos grupos experimentais, quanto do grupo controle, apresentaram eosinopenia. Contrária à estas observações, Swist et al. (2002) relataram uma proliferação de linfócitos em bovinos expostos à extratos de glândulas salivares de *S. calcitrans*. Esta linfocitose poderia estar relacionada à uma característica da espécie bovina, bem como ao fato do experimento em si não ter imposto aos animais uma condição de stress capaz de estimular uma liberação significativa de glicocorticóides.

Os resultados absolutos referentes à quantidade de Monócitos por  $\text{mm}^3$  no sangue dos coelhos controle e experimental encontram-se na Tabela 11.

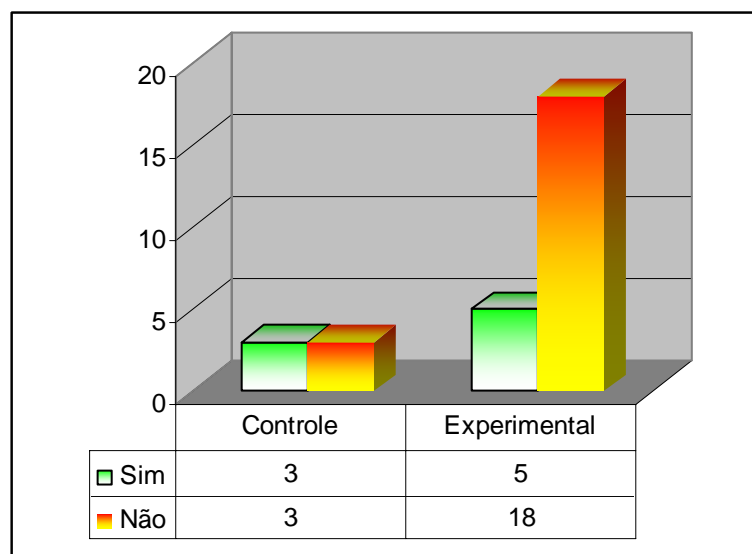
**Tabela 11.** Valores absolutos de Monócitos por  $\text{mm}^3$  de sangue dos coelhos nos diferentes grupos.

Grupos/Coelhos	1	2	3	4	5	6	Média
(V) Controle	500	344	455	240	180	301	336,67
(I) 3 moscas	583	707	1010	216	415	480	568,50
(II) 7 moscas	455	798	376	432	1100	512	612,17
(III) 14 moscas	2448	504	552	224	148	--	775,20
(IV) 14 moscas - reinfestação	612	252	184	480	576	378	413,67

Os resultados das contagens de monócitos por  $\text{mm}^3$  de sangue dos coelhos nos diferentes grupos, indicaram um aumento na sua quantidade, que acompanha o aumento do número de moscas nas infestações. Exceção feita ao grupo IV (reinfestação) que apresentou uma diminuição no valor absoluto, mas não no valor relativo (9,44%). Na comparação das médias dos postos pelo teste t de “Student”, verificou-se que não há uma diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ), indicando que a quantidade de Monócitos não é influenciada pela ausência ou presença de moscas.

Comparando as médias dos resultados dos Monócitos dos grupos estudados com os valores de referência, verificou-se que o grupo controle apresentou média na faixa de referência, ou seja, entre 198,5 a 403 (3,1%) Monócitos por  $\text{mm}^3$  de sangue (FELDMAN et al., 2000), enquanto que os animais dos grupos experimentais apresentaram médias superiores as de referência.

No grupo controle, três coelhos (50%) apresentaram a contagem de monócitos na faixa de normalidade, enquanto que no grupo experimental cinco coelhos (26%) apresentaram a contagem na faixa de referência. Esta diferença não foi significativa ( $p > 0,05$ ), conforme pode-se observar na Figura 20.



**Figura 20.** Associação dos coelhos, nos grupos controle e experimental com valores de referência para contagem de Monócitos por  $\text{mm}^3$  de sangue.

A monocitose observada nas médias de todos os grupos de coelhos, contrasta com as observações de Gonçalves et al. (2002), que relataram que os monócitos e basófilos apresentaram contagem inexpressiva. O aumento na contagem de monócitos normalmente está relacionada a afecções crônicas ou doenças infecciosas específicas e necroses, principalmente quando extensas e neoplasias (WALLACH e BOEVER, 1983; ALMOSNY e SANTOS, 2000). É importante observar que coelhos apresentam, normalmente, um número elevado de monócitos, se comparados a outros mamíferos, assim como o de basófilos (FELDMAN et al., 2000). Este fato pode estar relacionado a uma reação inflamatória específica desta espécie animal.

Nos coelhos submetidos à reinfestação com 14 moscas (Grupo IV), cabe ressaltar que a redução na leucometria global, associada com uma elevação na contagem de monócitos, confirmaram a caracterização de uma reação crônica, conforme descrito por Almosny e Monteiro (2007). Ainda neste grupo a contagem de heterófilos foi estatisticamente inferior aos demais grupos, o que pode reforçar a tendência ao padrão crônico de resposta inflamatória, 48 horas após a reinfestação por *S. calcitrans*.

Normalmente, em uma cunicultura ou em outros sistemas de criação animal, a presença de moscas e outros vetores é frequente. Portanto é de se esperar que os animais sejam picados mais de uma vez, ou seja, há re-infestação das moscas. Assim sendo, estes resultados sugerem que em locais onde há moscas, principalmente em número mais elevado, de no mínimo 14, há uma diminuição da leucometria global e especificamente de linfócitos e Heterófilos, com aumento na contagem de monócitos. Estas alterações no perfil leucocitário sanguíneo nos animais infestados por *S. calcitrans* podem favorecer o estabelecimento de outras afecções.

Quando avaliadas em conjunto, as médias dos valores relativos (Tabela 12) e a média dos valores absolutos (Tabela 13) dos diferentes grupos de infestação, reinfestação e controle, comparadas aos valores de referência (FELDMAN et al., 2000), pode-se visualizar melhor as tendências de heterofilia e monocitose, como também a eosinopenia e linfopenia, além da leucopenia do grupo IV (reinfestação), descritas nos parágrafos anteriores.

**Tabela 12.** Média dos valores relativos (%) dos diferentes tipos de leucócitos nos grupos e valores de referência (FELDMAN, 2000).

Células/Grupos	Ref. (%)	Contr. (%)	G I (%)	G II (%)	G III (%)	G IV (%)
Basófilos	3,1	1,69	1,23	0,45	2,93	1,84
Eosinófilos	1,0	0,89	0,33	0,25	1,11	0,14
Heterófilos	30,0	44,02	50,85	61,05	60,79	44,56
Linfócitos	60,0	47,73	42,07	31,05	27,10	43,28
Monócitos	3,1	5,46	5,44	7,20	8,08	9,44

**Tabela 13.** Médias da Leucometria Global e dos valores absolutos dos diferentes tipos de leucócitos nos grupos com valores de referência (FELDMAN, 2000).

Células/Grupos	Ref.	Contr.	G I	G II	G III	G IV
Leucometria Global	6400 - 13000	6166	10450	8500	9600	4383
Basófilos	198,5 – 403	104,50	128,67	38,0	280,80	80,50
Eosinófilos	64 – 130	55,17	34,50	21,50	107,0	6,00
Heterófilos	1920 – 3900	2714,50	5313,33	5189,00	5835,60	1953,47
Linfócitos	3840 – 7800	2943,17	4396,17	2639,33	2601,40	1897,00
Monócitos	198,5 – 403	336,67	568,50	612,17	775,20	413,67

Os valores absolutos e relativos da leucometria de cada grupo de coelhos estão apresentados separadamente nas Tabelas 14, 15, 16, 17 e 18.

**Tabela 14.** Valores absolutos, relativos e de leucometria global e específica dos coelhos do grupo I (3 moscas)

Coelho	Leucom. Global	Basófilos ABS - (%)	Eosinófilo ABS - (%)	Heterófilo ABS - (%)	Linfócitos ABS - (%)	Monócitos ABS - (%)
1	5300	212 (4)	106 (2)	3180 (60)	1166 (22)	583 (11)
2	10100	101 (1)	101 (1)	5959 (59)	3232 (32)	707 (7)
3	20200	0 (0)	0 (0)	11514 (57)	7676 (38)	1010 (5)
4	10800	216 (2)	0 (0)	4212 (39)	6156 (57)	216 (2)
5	8300	83 (1)	0 (0)	3735 (45)	4067 (49)	415 (5)
6	8000	160 (2)	0 (0)	3280 (41)	4080 (51)	480 (6)
Média	10450	128,6 (1,2)	34,5(0,33)	5313,3 (50,8)	4396,2 (42,07)	568,5 (5,4)
Referência	9700 (3.3)	3,1%	1%	30%	60%	3,1%

**Tabela 15.** Valores absolutos, relativos e de leucometria global e específica dos coelhos do grupo II (7 moscas)

Coelho	Leucom. Global	Basófilos ABS - (%)	Eosinófilo ABS - (%)	Heterófilo ABS - (%)	Linfócitos ABS - (%)	Monócitos ABS - (%)
1	6500	0 (0)	65 (1)	3055 (47)	2925 (45)	455 (7)
2	13300	0 (0)	0 (0)	10241 (77)	2261 (17)	798 (6)
3	9400	0 (0)	0 (0)	5076 (54)	3948 (42)	376 (4)
4	5400	0 (0)	0 (0)	2106 (53)	2862 (53)	432 (8)
5	10000	100 (1)	0 (0)	7200 (72)	1600 (16)	1100 (11)
6	6400	128 (2)	64 (1)	3456 (54)	2240 (35)	512 (8)
Média	8500	38 (0,45)	34,5(0,33)	5189 (61,05)	2639,3 (31,05)	612,17 (7,2)
Referência	9700 (3.3)	3,1%	1%	30%	60%	3,1%

**Tabela 16.** Valores absolutos, relativos e de leucometria global e específica dos coelhos do grupo III (14 moscas)

Coelho	Leucom. Global	Basófilos ABS - (%)	Eosinófilo ABS - (%)	Heterófilo ABS - (%)	Linfócitos ABS - (%)	Monócitos ABS - (%)
1	15300	459 (3)	0 (0)	10557 (69)	1836 (12)	2448 (16)
2	7200	0 (0)	216 (3)	2952 (41)	3528 (49)	504 (7)
3	6900	759 (11)	207 (3)	3795 (55)	1587 (23)	552 (8)
4	11200	112 (1)	112 (1)	7952 (71)	2800 (25)	224 (2)
5	7400	74 (1)	0 (0)	3922 (53)	3256 (44)	148 (2)
6						
Média	9600	128,6 (1,2)	107(1,11)	5835,6 (60,79)	2601,4 (27,10)	775,2 (8,08)
Referência	9700 (3.3)	3,1%	1%	30%	60%	3,1%

**Tabela 17.** Valores absolutos, relativos e de leucometria global e específica dos coelhos do grupo IV (reinfestação com 14 moscas)

Coelhos	Leucom. Global	Basófilo ABS - (%)	Eosinófilo ABS - (%)	Heterófilo ABS - (%)	Linfócito ABS - (%)	Monócito ABS - (%)
1	5100	51 (1)	0 (0)	2295 (45)	2142 (42)	612 (12)
2	3600	36 (1)	36 (1)	1836 (51)	1332 (37)	252 (7)
3	4600	0 (0)	0 (0)	1794 (39)	2622 (57)	184 (4)
4	4000	120 (3)	0 (0)	1840 (46)	1560 (39)	480 (12)
5	4800	192 (4)	0 (0)	2064 (43)	1920 (40)	576 (12)
6	4200	84 (2)	0 (0)	1890 (45)	1806 (43)	378 (9)
Média	4383,33	80,5 (1,84)	6 (0,14)	1953,2 (44,56)	1897 (43,28)	413,67 (9,44)
Referência	9700 (3.3)	3,1%	1%	30%	60%	3,1%

**Tabela 18.** Valores absolutos, relativos e de leucometria global e específica dos coelhos do grupo V (Controle)

Coelhos	Leucom. Global	Basófilos ABS - (%)	Eosinófilo ABS - (%)	Heterófilo ABS - (%)	Linfócitos ABS - (%)	Monócitos ABS - (%)
1	10000	300 (3)	0 (0)	4500 (45)	4700 (47)	500 (5)
2	8600	86 (1)	0 (0)	4988 (58)	3182 (37)	344 (4)
3	6500	0 (0)	0 (0)	3900 (60)	2145 (33)	455 (7)
4	4000	40 (1)	80 (2)	800 (20)	2800 (70)	240 (6)
5	3600	72 (2)	36 (1)	1368 (38)	1908 (53)	180 (5)
6	4300	129 (3)	215 (5)	731 (17)	2924 (68)	301 (7)
Média	6166,67	104,5 (1,69)	55,16 (0,89)	2714,5 (44,02)	2943,2 (47,73)	336,6 (5,46)
Referência	9700 (3.3)	3,1%	1%	30%	60%	3,1%

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados das infestações experimentais por *Stomoxys calcitrans* em coelhos, permitiram as seguintes conclusões:

1. As alterações anátomo-histopatológicas na pele dos coelhos infestados por *Stomoxys calcitrans* são compatíveis com as reações da hipersensibilidade do tipo I;
2. Maior infestação por *S. calcitrans* determina maior reação inflamatória da pele dos coelhos;
3. Nos animais submetidos à reinfestação por *S. calcitrans*, as alterações teciduais apresentaram-se com maior intensidade;
4. A infestação por *S. calcitrans* determina alterações no perfil leucocitário sanguíneo dos coelhos.
5. A intensidade da infestação por *S. calcitrans* determina alterações no leucograma dos coelhos.
6. Nos animais submetidos à reinfestação por *S. calcitrans*, o perfil leucocitário sanguíneo é compatível com o de uma reação crônica.



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMOSNY, N.R.P.; MONTEIRO, A.O. Patologia Clínica. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens**. São Paulo: Roca.. 1354p. Cap.59, p.939-966, 2007.

ALMOSNY, N. R. P.; SANTOS, L. C. Laboratory in wild animals. In: FOWLER, M. **Biology, Medicine and Surgery of South American Wild Animals**. Iowa: Iowa State University. p. 300-320, 2000.

BAKER, K. P.; QUINN P. J. A Report on Clinical Aspects and Histopathology of Sweet Itch. **Equine Veterinary Journal**. v.10, n.4, p. 243-248, 1978.

BITTENCOURT, A. J. *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758): Importância econômica e estágio atual das pesquisas. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre - RS, v. 21, n. 125, p. 36-40, 2002.

BITTENCOURT, A. J.; MOYA BORJA, G.E. Flutuação Sazonal de *Stomoxys calcitrans* em bovinos e eqüinos no Município de Espírito Santo do Pinhal, São Paulo, Brasil. **Revista Universidade Rural – Série Ciências da Vida**. v. 22 Supl. 1, p.101-1006, 2000.

BITTENCOURT, A. J.; MOYA BORJA, G.E. *Stomoxys calcitrans* (L.) Preferência por regiões do corpo de eqüinos alimentação. **Parasitologia al Dia**. v. 24, n. 3-4, p.119-122, 2000.

BITTENCOURT, A. J.; MOYA BORJA, G.E. *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) (Díptera, Muscidae): preferência por locais do corpo de bovinos para alimentação. **Revista Brasileira de Zoociências**. v. 4, n. 1 p.75-83, 2002.

CAMPBELL J.B. ; SKODA S.R.; BERKEBILE, D.R.; BOXLER D.J.; THOMAS, G.D.; ADAMS, D.C.; DAVIS, R. Effects of stable flies (Díptera: Muscidae) on weight gains of grazing yearling cattle. **Journal Economic Entomology** v. 94, n.3, p.780-3, 2001.

CAMPBELL, T. W. Hematology of exotic animals. **The Compendium Collection**, v. 6, n. 1, Cap. 59, p. 950-956, 1991.

CAMPBELL, T.W. Hematologia de Mamíferos: Animais de Laboratório e Espécies Variadas. In: THRALL, M.A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 582p. Cap16. p.201-214, 2004.

COTRAN R. S.; KUMAR V.; COLLINS T. **Robbins Patologia Estrutural e Funcional**. 6. ed. Guanabara Koogan, p. 174-178 e 1083-1085, 1999.

CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens**. São Paulo: Roca. 1354p., 2007.

FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000

- FOWLER, M. E. **Zoo & Wild Animal Medicine**. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986.
- GONÇALVES J.M.; PEREIRA M.C.T.; EVANGELISTA L. G.; LEITE A C. R. Expressão de leucócitos na circulação sanguínea durante o curso da infestação experimental por *Dermatobia hominis* (Díptera: Cuterebridae) In. **CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA**, 12. Rio de Janeiro. *Anais ... CBPV*: Rio de Janeiro, 2002. 1 CDRoom.
- GREENBERG, B. **Flies and diseases. Vol. I. Ecology, classification and biotic association**. Princeton University Press, Princeton, 856p., 1971.
- GRISI, L.; MASSARD C.L.; MOYA BORJA, G. E.; PERERIA J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 21, n. 125, p. 08-10, 2002.
- GROSS, T.L.; IHRKE, P.J.; WALDER, E.J.; AFFOLTER, V.K. **Skin Diseases of the Dog and Cat**. 2. ed. Oxford Blackwell Science. p. 342-347, 2005.
- GUGLIELMONE A.A.; GIMENO, E.; IDIART, J.; FISHER, W.F.; VOLPOGNI M.M.; QUAINO, O.; ANZIANI, O.S.; FLORES, S.G.; WARNKE, O. Skin lesions and cattle hide damage from *Haematobia irritans* infestations. **Medical Veterinary Entomology**, v. 13, n. 3, p. 324-329, 1999.
- GUIMARÃES, J. H. Mosca dos estábulos - Uma importante praga do gado. **Agroquímica Ciba - Geigy**, n. 23, p. 10 - 14, 1984.
- JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986
- JAMES, P.J.; MONN R.D. Pruritis and dermal response to insect antigens in sheep infested with *Bovicola ovis*. **International Journal for Parasitology**. v. 28. pag. 419-427, 1998.
- JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. **Pathology of Domestic Animals**. 5.ed., Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007.
- LUNA, L.G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3.ed. New York, McGraw-Hill. 258p., 1968.
- McGAVIN, M., D; ZACHARY, J. F. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 4. ed. St. Louis, Mosby Elsevier, p. 1202, 2007.
- MELLO, R.P.; GARCIA M.L.M. Comportamento reprodutivo de fêmeas de *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera:Muscidae) criadas isoladamente em laboratório. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 3, p.385-390, 1988.
- MELLO, R. P. **Estudo de alguns aspectos do desenvolvimento biológico e do comportamento em laboratório de *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) (Diptera:Muscidae)**. Rio de Janeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 122p. (Tese de Doutorado), 1989.

MOORHOUSE, D. E. Cutaneous lesions on cattle caused by stable fly. **Australian Veterinary Journal**, v. 48, p. 643 - 644, 1972.

MORAES, A. P. R. *Stomoxys calcitrans*: estabelecimento de colônia e efeito de *Metarhizium anisopliae* sobre seus estágios imaturos Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária. 65f.:il. 2007.

OLIVEIRA, M. C. de; ARANTES, U. M.; ALVES, J. A. Desempenho Produtivo e Contagem de Linfócitos de Coelhos Sexados Submetidos a duas Densidades Populacionais. **Ciência Animal Brasileira**, Universidade Federal de Goiás, v. 4 n. 2, p. 109-15, jul/dez, 2003.

PERRIS, E. E. Parasitic Dermatoses That Cause Pruritus in Horses. **Veterinary Clinics of North América: Equine Practice**. v. 11, n.1, p. 11-29, 1995.

PIRES, S.D.; CASTRO, B.G.; BITTENCOURT, A. J. Regiões do corpo de bovinos preferidas para alimentação por *Stomoxys calcitrans* (L.) no município de Quatis - RJ. **Revista Universidade Rural – Série Ciências da Vida**, v. 23, supl. 1, p. 299-300, 2003.

QUESENBERRY, K. E. Coelhos. In: BIRCHARD, S. J; SHERDING, R. G. **Manual Saunders Clínica de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca. p 1506, 1998.

QUINN, P.J.; BAKER, K.P.; MORROW, A.N. Sweet itch: Responses of clinically normal and affected horses to intradermal challenge with extracts of biting insects. **Equine Veterinary Journal**. v.15, n.3, p. 266-272, 1983.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. Belo Horizonte:Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia-UFMG. 221p., 1988.

SCOTT, D.W.; MILLER JR., W.H.; GRIFFIN, C. E. **Dermatologia de Pequenos Animais, Muller & Kirk**. 5. ed. Rio de Janeiro, Interlivros. p. 423-424, 1996

SOUZA, T.M.; FIGHERA, R.A.; PIAZER, J.V.; BARROS, C.S.L.; IRIGOYEN, L.F. Dermatite alérgica sazonal em ovinos. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.35, n.2, p.475-477, jan-fev, 2005.

STORK, M. G. The epidemiological and economic importance of fly infestation of meat and milk producing animals in Europe. **The Veterinaty Record**, v. 105, p 341 - 343, 1979.

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* (Díptera: Muscidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 900-907, 2002.

TEIXEIRA, L.B.; AMORIM, R.L. Granuloma Eosinofílico Eqüino – Relato de caso. **Bol. Méd. Vet. – Espírito Santo do Pinhal**, v.2, n.2, p.39-43, jan/dez, 2006.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária : uma introdução**. 6. ed., São Paulo, Rocca. p. 345, 2002.

TODD, D. H. The biting fly (*S. calcitrans* L) in dairy herds in New Zealand. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 7, p. 60 - 79, 1964.

URQUWART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.N.; JENNINGS, F.N. In **Parasitologia Veterinária**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 164-165, 1996.

VERÍSSIMO, C. J.; MUKAI L. S.; BECHARA, G. H.; SZABÓ M. P. J.; ARCARO, J. R. P.; OTSUK I. P. Número de mastócitos dérmicos na pele de bovinos europeus, zebuínos e mestiços e infestação pelo carrapato *Boophilus microplus*. In. **CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12**. Rio de Janeiro. *Anais ... CBPV*: Rio de Janeiro, 2002. 1 CDRoom.

WALLACH, J. D.; BOEVER, W. J., **Diseases of Exotic Animals**. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 1329, 1983.

YERUHAM I.; BRAVERMAN Y. Skin lesions in dogs, horses and calves caused by the stable fly *Stomoxys calcitrans* (L.) (Díptera: Muscidae). **Revue Elevege Medicine Veterinaire du Pays Tropical**, v, 48, n. 4, n. 347-349, 1995.