

NELSON LUIS MELLO FERNANDES

**Dinâmica Populacional da *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (Diptera: Cuterebridae) e o Comportamento da resposta imune de bovinos, imunizados com extrato de larvas.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área de Concentração: Patologia Animal.

Orientadora:  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanete Thomaz Soccol

Co-orientadora:  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Simone Benghi Pinto

CURITIBA

2004

NELSON LUIS MELLO FERNANDES

**Dinâmica Populacional da *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (Diptera: Cuterebridae) e o Comportamento da resposta imune de bovinos, imunizados com extrato de larvas.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área de Concentração: Patologia Animal.

Orientadora:  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Vanete Thomaz Soccol

Co-orientadora:  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Simone Benghi Pinto

CURITIBA

2004

*Dedico este Trabalho*

*... À Jô, exemplo de mulher, esposa, mãe e profissional. Pelo amor, companheirismo e apoio constante e por compartilhar os momentos mais difíceis...*

*... Às minhas filhas, Ana Júlia e Ana Paula, que procuraram compreender e superar as tantas idas e vindas para "Piba", com paciência e alegria, mesmo nos momentos de ausência...*

## AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Vanete Thomaz Soccol, pela orientação, oportunidade de ingresso na carreira científica e ensinamentos transmitidos, o devido reconhecimento e gratidão.

À Professora Dra. Simone Benghi Pinto, pela co-orientação, apoio, incentivo e amizade.

Ao Professor Dr. João Carlos Minozzo, pela amizade, ensinamentos, auxílio e valiosa colaboração nas técnicas laboratoriais empregadas.

Ao Corpo docente do Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, pelo estímulo constante da busca e aperfeiçoamento, especialmente na pessoa do Prof. Dr. José Francisco Ghignatti Warth.

À Universidade Federal do Paraná – UFPR, pela oportunidade.

Ao Dr. Maurício Passos, do Departamento de Farmácia da UFPR, pelo empréstimo de equipamentos e utilização do laboratório na preparação do antígeno.

A Regiane Szargik, mestranda do curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia do Departamento de Patologia Básica, pela amizade e colaboração nos testes laboratoriais.

Às técnicas do laboratório de parasitologia molecular do Departamento de Patologia Básica, a farmacêutica Juliana Tracz e a bióloga Luciane Hennig.

Aos funcionários técnicos da UFPR – Campus Palotina, Alaércio da Costa Freitag e Alice Dalastra Freitag pela colaboração no trabalho de campo em Mundo Novo-MS.

À família Donin por permitir a realização do experimento com os animais de sua propriedade, no município de Mundo Novo-MS.

Aos alunos do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná, Campus Palotina, Érika Zanoni, Matheus Bonfim, Rodrigo Siqueira Rivera e Ângela Idalia Sovinski pelo auxílio e dedicação no laboratório de Análises Clínicas.

Aos meus pais pela constante presença e apoio em mais esta caminhada.

Aos meus cunhados João Carlos Ruczysk e Jovania Maria Müller pelo tempo compartilhado e companheirismo. Minha gratidão pelo apoio incondicional, amizade e acolhida em sua casa.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....		ix
LISTA DE TABELAS.....		xi
1.	INTRODUÇÃO.....	1
REFERÊNCIAS.....		4
CAPÍTULO I: DINÂMICA POPULACIONAL E DISTRIBUIÇÃO CORPORAL DAS LARVAS DE <i>Dermatobia hominis</i> (Linnaeus Jr., 1781) EM BOVINOS DA RAÇA NELORE.....		5
Resumo.....		6
Abstract.....		7
1.	INTRODUÇÃO.....	8
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	11
2.1.	DESCRIÇÃO DA ÁREA DE TRABALHO.....	12
2.2.	PARÂMETROS LEUCOCITÁRIOS.....	13
2.3.	EXAMES COPROPARASITOLÓGICOS.....	14
2.4.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	14
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
3.1.	SAZONALIDADE DAS LARVAS DE <i>Dermatobia hominis</i> .....	17
3.2.	DISTRIBUIÇÃO CORPÓREA DAS LARVAS DE <i>D. hominis</i> NOS BOVINOS.....	22
3.3.	MARCADORES DA RESPOSTA DO HOSPEDEIRO FRENTE AO PARASITISMO POR LARVAS DE <i>Dermatobia hominis</i> .....	25
3.3.1.	Exames Hematológicos.....	25
3.3.2.	Exames Coproparasitológicos.....	29
4.	CONCLUSÕES.....	30
REFERÊNCIAS.....		31
CAPÍTULO II: RESPOSTA IMUNE-HUMORAL DE BOVINOS IMUNIZADOS COM EXTRATO DE LARVAS (L <sub>2</sub> e L <sub>3</sub> ) DE <i>Dermatobia hominis</i> (Linnaeus Jr., 1781).....		36
Resumo.....		37
Abstract.....		38
1.	INTRODUÇÃO.....	39
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
2.1.	PREPARAÇÃO DO EXTRATO ANTIGÊNICO DE LARVAS L <sub>2</sub> E L <sub>3</sub> DE <i>Dermatobia hominis</i> .....	42

2.1.1.	Componentes Biológicos para Preparação de Antígenos.....	42
2.1.1.1.	Obtenção das larvas L <sub>2</sub> e L <sub>3</sub> de <i>D. hominis</i> .....	42
2.1.1.2.	Preparação do extrato solúvel.....	43
2.2.	CARACTERIZAÇÃO PROTÉICA DO EXTRATO ANTIGÊNICO.....	44
2.2.1.	Determinação do Teor Protéico do Extrato de Larvas.....	44
2.2.2.	Perfil Eletroforético do Extrato de Larvas de <i>D. hominis</i> .....	44
2.2.2.1.	Preparação do conjunto de placas para moldar o gel.....	45
2.2.2.2.	Preparação dos géis.....	45
2.2.2.3.	Preparação e aplicação do gel de separação (ou de corrida).....	45
2.2.2.4.	Preparação e aplicação do gel de empilhamento.....	46
2.2.2.5.	Preparação das amostras.....	46
2.2.2.6.	Preparo do padrão.....	46
2.2.2.7.	Aplicação das amostras e do padrão.....	47
2.2.2.8.	Corrida.....	47
2.2.2.9.	Revelação do gel.....	47
2.2.2.10.	Cálculo.....	47
2.3.	SELEÇÃO E MANEJO DOS ANIMAIS.....	47
2.3.1.	Aplicação do Extrato Imunogênico de Larvas de <i>D. hominis</i> .....	49
2.4.	O TESTE ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA).....	50
2.4.1.	Sensibilização da Placa com o Antígeno.....	51
2.4.2.	Primeira Lavagem.....	51
2.4.3.	Bloqueio da Placa.....	51
2.4.4.	Segunda Lavagem.....	52
2.4.5.	Diluições dos Soros.....	52
2.4.6.	Terceira Lavagem.....	52
2.4.7.	Diluição do Conjugado.....	52
2.4.8.	Quarta Lavagem.....	52
2.4.9.	Substrato.....	52
2.4.10.	Parada da Reação.....	53
2.4.11.	Leitura.....	53
2.5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53

<b>3.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>55</b>
3.1.	EXTRATO IMUNOGÊNICO PREPARADO COM LARVAS L <sub>2</sub> E L <sub>3</sub> DE <i>Dermatobia hominis</i> .....	55
3.1.1.	Concentração Protéica do Extrato de Larvas de <i>Dermatobia hominis</i> .....	55
3.1.2.	Eletroforese do Extrato de Larvas.....	55
3.2.	ACOMPANHAMENTO DA PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS PELO MÉTODO DE ENZIMOIMUNOENSAIO.....	56
3.2.1.	Padronização do Teste de Enzimoimunoensaio – ELISA.....	56
3.2.2.	Diluição dos Soros.....	58
3.2.3.	Diluição do Conjugado.....	58
3.2.4.	Cálculo do Ponto de Corte Entre Soro Reagente e Não Reagente no Teste Enzimoimunoensaio.....	58
3.3.	CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS NOS ANIMAIS IMUNIZADOS E COMPARAÇÃO COM A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS DOS ANIMAIS NÃO IMUNIZADOS.....	58
3.4.	EXAMES HEMATOLOÓGICOS.....	61
3.4.1.	Comparação dos Valores Hematológicos da Série Branca em Relação ao Número de Nódulos nos Diferentes Tratamentos.....	62
3.4.2.	Comparação do Diferencial de Leucócitos de Acordo com a Cinética de Anticorpos.....	69
3.5.	POPULAÇÃO DE LARVAS DE <i>Dermatobia hominis</i> OBSERVADA NOS ANIMAIS SUBMETIDOS A DIFERENTES TRATAMENTOS E GRUPO CONTROLE.....	73
<b>4.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>75</b>
<b>5.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>76</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>77</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>81</b>



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

FIGURA 01:	Localização geográfica do município de Mundo Novo, Estado do Mato Grosso do Sul e divisa com o estado do Paraná.....	12
FIGURA 02:	Piquete em que os animais ficaram confinados durante o período experimental, destacando a proximidade da mata ciliar.....	13
FIGURA 03:	Flutuação populacional de larvas de <i>D. hominis</i> em bovinos da raça Nelore, no período de maio de 2002 a abril de 2003, no município de Mundo Novo-MS.....	18
FIGURA 04:	Número de nódulos(nº nod) de <i>Dermatobia hominis</i> observados ao longo do período experimental, e a relação entre as variáveis climáticas: IP(índice pluviométrico), UR(umidade relativa) e TEMP(temperatura).....	20
FIGURA 05:	Distribuição do número de nódulos de <i>D. hominis</i> , em regiões posterior e anterior de bovinos da raça Nelore.....	23
FIGURA 06:	Distribuição do número de nódulos de <i>D. hominis</i> por região levando-se em conta o lado parasitado.....	24
FIGURA 07:	Número de leucócitos totais, neutrófilos segmentados, linfócitos, eosinófilos e monócitos, em função do número de nódulos de <i>Dermatobia hominis</i> observados no período do experimento I, realizados em bovinos Nelore.....	27

## CAPÍTULO II

FIGURA 01	Seleção dos animais para o experimento, brincagem, pesagem e sorteio dos grupos.....	48
FIGURA 02:	Aplicação do extrato antigênico por via subcutânea.....	50
FIGURA 03:	Perfil eletroforético do extrato antigênico de larvas de <i>D. hominis</i> em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE), destacando os pesos moleculares em kDa em diferentes concentrações de amostra (1 e 2%).....	56
FIGURA 04	Teste ELISA, mostrando a melhor discriminação entre bovinos soro reagentes de não reagentes, ao antígeno de <i>D. hominis</i> .....	57
FIGURA 05:	Comparação das densidades ópticas da reação antígeno-anticorpo, através do teste ELISA, distribuídas ao longo das colheitas de sangue, realizadas a cada 15 dias, entre os diferentes grupos de animais.....	59
FIGURA 06:	Absorbância obtidas dos soros de bovinos no teste ELISA, de acordo com o número de nódulos encontrados nos diferentes grupos.....	61
FIGURA 07:	Variação do número de leucócitos em relação ao número de nódulos, nos três grupos de bovinos da raça Nelore.....	63
FIGURA 08:	Variação do número de neutrófilos segmentados em relação ao número de nódulos de larvas de <i>Dermatobia hominis</i> , em bovinos infestados naturalmente e submetidos a imunização com extrato antigênico de larvas.....	64
FIGURA 09:	Variação do número de linfócitos em relação ao número de nódulos de larvas de <i>Dermatobia hominis</i> , em bovinos infestados naturalmente e submetidos a imunização com extrato antigênico de larvas.....	65
FIGURA 10:	Variação do número de eosinófilos em relação ao número de nódulos de larvas de <i>Dermatobia hominis</i> , em bovinos infestados naturalmente e submetidos a imunização com extrato antigênico de larvas.....	66
FIGURA 11:	Variação do número de monócitos em função do número de nódulos de larvas de <i>Dermatobia hominis</i> , em bovinos infestados naturalmente e submetidos a imunização com extrato antigênico de larvas.....	67
FIGURA 12:	Variação do número de leucócitos em relação a absorvância do teste ELISA, no soro de bovinos imunizados com extrato de larvas de <i>D. hominis</i> e infestados naturalmente.....	69
FIGURA 13:	Variação do número de neutrófilos em relação a absorvância do teste ELISA, no soro de bovinos imunizados com extrato de larvas de <i>D. hominis</i> e infestados naturalmente.....	70

FIGURA 14:	Variação do número de linfócitos em relação a absorbância do teste ELISA, no soro de bovinos imunizados com extrato de larvas de <i>D. hominis</i> e infestados naturalmente.....	70
FIGURA 15:	Variação do número de eosinófilos em relação a absorbância do teste ELISA, no soro de bovinos imunizados com extrato de larvas de <i>D. hominis</i> e infestados naturalmente.....	71
FIGURA 16:	Variação do número de monócitos em relação a absorbância do teste ELISA, no soro de bovinos imunizados com extrato de larvas de <i>D. hominis</i> e infestados naturalmente.....	72
FIGURA 17:	Comportamento médio do número de nódulos de <i>Dermatobia hominis</i> nos diferentes grupos de animais. Grupo A, animais imunizados com extrato protéico de larvas L <sub>2</sub> e L <sub>3</sub> . Grupo B, animais controle e Grupo C, animais tratados com quimioterápicos.....	74

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

TABELA 01:	Número de nódulos, mensais de <i>D. hominis</i> encontrados em doze bovinos da raça Nelore, no período de maio de 2002 a abril de 2003, no município de Mundo Novo-MS.....	17
TABELA 02:	Temperaturas médias, mínima, média e máxima registradas no período de maio de 2002 e abril de 2003, no município de Mundo Novo-MS.....	19
TABELA 03:	Precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar registradas no período de maio de 2002 a abril de 2003, no município de Mundo Novo-MS.....	19
TABELA 04:	Distribuição das larvas de <i>D.hominis</i> nas regiões corporais dos 12 bovinos da raça Nelore, durante o período experimental, no município de Mundo Novo-MS.....	23
TABELA 05:	Valores médios do leucograma de bovinos da raça Nelore e o número de nódulos encontrados de maio de 2002 a abril de 2003.....	26

### CAPÍTULO II

TABELA 01:	Densidade óptica obtida pela técnica de enzimoimunoensaio – ELISA e número de nódulos de larvas de <i>Dermatobia hominis</i> observados em bovinos da raça Nelore nos diferentes períodos de colheita realizados no período de setembro de 2003 a fevereiro de 2004.....	60
TABELA 02:	Número médio de nódulos de <i>Dermatobia hominis</i> observados em cada grupo de oito animais, durante o experimento II. Grupo A, animais imunizados; Grupo B, animais controle; e Grupo C animais tratados com quimioterápicos.....	73

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, no ano de 2000, o valor do produto interno bruto da bovinocultura foi de US\$ 9,5 bilhões com 37 milhões de cabeças abatidas. Neste período foram exportadas 420 mil toneladas de carne, das 6,7 milhões de toneladas produzidas, o que representou um faturamento de US\$ 688 milhões (BUTOLO, 2002).

Atualmente o país possui o maior rebanho mundial, com 191,2 milhões de cabeças, produzindo 7,8 milhões de toneladas de carne. Anualmente são abatidas 35,5 milhões de cabeças, das quais 1.180 mil toneladas são exportadas, representando um faturamento de mais de US\$ 2 bilhões (FAO, 2003).

O aumento das exportações demonstra notável melhora nos índices de produtividade no que se refere à qualidade de carne, uma vez que a quantidade de animais abatidos em 2003 foi menor que a dos últimos anos. Infelizmente esse incremento não pode ser observado quanto ao melhoramento na produtividade e beneficiamento do couro.

A pecuária leiteira movimenta anualmente US\$ 10 bilhões e emprega 3 milhões de pessoas; das quais acima de 1 milhão são produtores, que totalizam 21 bilhões de litros de leite/ano (SOUZA, 2000).

Comparado a outros países, principalmente aos grandes produtores de leite, o Brasil tem uma produtividade considerada muito aquém de suas possibilidades. Contribuem para este quadro, questões de ordem técnica, política, econômica e social, além dos aspectos sanitários do rebanho, dentre os quais merecem destaque as ectoparasitoses.

O impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil é estimado em 2,65 bilhões de dólares. Somente o carrapato *Boophilus microplus* causa prejuízos estimados em 2 bilhões. Os prejuízos causados pelas larvas de *Dermatobia hominis*, pelas bicheiras, *Cocliomya hominivorax*, pela mosca dos chifres, *Haematobia irritans* e mosca dos estábulos, *Stomoxys calcitrans*, somam 650 milhões de dólares (GRISI *et al.*, 2002).

Como conseqüências das infestações por estes parasitos pode-se observar ainda um aumento no coeficiente de mortalidade, principalmente em bezerros, bem como os efeitos negativos na produção animal, como o decréscimo na produção de leite, carne e do ganho de peso. Ocorre ainda um aumento considerável dos custos

de produção, pela necessidade de aplicação de inseticidas e acaricidas, bem como pela diminuição das taxas de conversão alimentar e dos índices de fertilidade.

Segundo GRISI *et al.* (2002), os principais problemas econômicos decorrentes destas ectoparasitoses estão ligados diretamente à ação espoliativa sobre o hospedeiro, ou indiretamente, pela transmissão de outros patógenos, tais como: vírus, rickettsias, bactérias e protozoários.

As possíveis perdas com a diminuição da produção de leite e de carne provocadas pela dermatobiose, associadas ao custo de medicamentos bernicidas, podem alcançar US\$ 250 milhões por ano, uma vez que parte considerável da população bovina está em áreas sujeitas à infestação (BAYARDO *et al.*, 2003).

As larvas da *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) provocam lesões ulcerativas, danificando o tecido subcutâneo e conseqüentemente a pele do hospedeiro. O couro é o subproduto que sofre maior depreciação, o que muitas vezes, impossibilita seu aproveitamento, resultando na desvalorização comercial e inadequação à industrialização. Couros que apresentem 10 a 20 perfurações, na região crânio/dorsal, do corpo do animal perdem 30 a 40% de seu valor (BAYARDO *et al.*, 2003).

No Brasil, somente 15% dos 12 milhões de couros produzidos anualmente podem ser classificados como de primeira categoria, e dos 85% restantes, 40% são de segunda, 30% de terceira e 15% são refugos (MATHEUS, 1979; HORN e ARTECHE, 1985).

O Brasil deixa de ganhar anualmente cerca de US\$ dois bilhões por não investir na qualidade do couro obtido de animais para a produção de carne. Apenas 8,6% do couro produzido é considerado de alta qualidade, contra 85% da produção dos EUA com qualificação semelhante. Só no Mato Grosso do Sul são abatidos cerca de 25 mil animais por dia, mas apenas oito mil peles são aproveitadas para industrialização (BAYARDO *et al.*, 2003).

Segundo GOMES *et al.* (2002), 60% dos defeitos no couro ocorrem na propriedade rural. Destes, 10% devido à marcação errada do gado, e o restante pôr manejo inadequado, principalmente pela falta de controle das ectoparasitoses. O local mais adequado para a marcação do gado é na articulação da coxa com a perna, mas, também, podem ser marcados na articulação da paleta com a canela, ou na frente. Muitos produtores marcam o gado em áreas nobres, prejudicando o aproveitamento das peles. Os outros 40% de defeitos no couro acontecem no

transporte do animal (com pregos e parafusos expostos) e por salga e esfolagem mal feitas.

GOMES *et al.* (2002), citam que 70% dos couros acabados são direcionados para a produção de calçados, roupas e artigos "de luxo". A proteína do couro ainda poderia ser mais bem utilizada na alimentação (gelatina, sorvete, bolos, embutidos etc) e na indústria farmacêutica (cápsula de remédios, filmes de raios-X). O resíduo líquido do iodo, resultante do beneficiamento inicial do couro, é rico em cal e nitrogênio, também pode se transformar em importante adubo para a agropecuária.

Como o controle químico, continua sendo a única arma utilizada para o controle da dermatobiose, e podendo este, acarretar acúmulo de substâncias tóxicas nos animais e no ambiente, o estudo da dinâmica populacional dos ectoparasitos; os aspectos clínicos, hematológicos e imunológicos observados, tornam-se de suma importância, afim de que se possam criar mecanismos alternativos para o controle das infestações de larvas de *D. hominis* e seus prejuízos.

Com o objetivo de estudar a dinâmica populacional da *D. hominis*, bem como pesquisar as reações imuno e hematológicas provocadas pela imunização de bovinos com um extrato de larvas, L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub>, foram desenvolvidos dois experimentos:

- EXPERIMENTO I: dinâmica populacional e distribuição corporal das larvas de *D. hominis* (Linnaeus Jr., 1781) em bovinos da raça Nelore.
- EXPERIMENTO II: resposta imune-humoral e celular em bovinos da raça Nelore, imunizados com extrato de larvas (L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub>), de *D. hominis* (Linnaeus Jr., 1781).

## REFERÊNCIAS

BAYARDO, F.M.H; SPROESSER, R. Couro Bovino. **Boletim Técnico UFMS**. Campo Grande, n. 3, 190 p, 2003.

BUTOLO, J. E. **Qualidade de Ingredientes na Alimentação Animal**. Campinas: CBNA, 430 p, 2001.

FAO. **Panorama mundial do setor de carnes em 2003**. Disponível em : <http://www.beefpoint.com.br/> Acesso em 20 março 2004.

GOMES, P.R.; KOLLER, W.W.; GOMES, A.; CARVALHO, C.J.B.; ZORZATTO, J.R. Dípteros fanídeos vetores de ovos de *Dermatobia hominis* em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 3, p. 114-118, 2002.

GRISI, L.; MASSARD, C.L.; BORJA, M.G.E.; PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, n. 125, p. 8-10, 2002.

HORN, S.C.; ARTECHE, C.C.P. Situação parasitária da pecuária no Brasil. **A Hora Veterinária**. Porto Alegre, v. 4, n. 23, p. 12-32, 1985.

MATHEUS, V.G. Dermatobiose. In: SEMINÁRIO NACIONAL SOBRE PARASITOLOGIA DOS BOVINOS, Campo Grande, 1979, **Anais...**, Campo Grande: EMBRAPA-CNGC, 1979. p. 315-329, 331-333.

SOUZA, D.P.H. **Análise da estrutura de custo e preço de sobrevivência dos principais sistemas de produção de leite**. Viçosa, 2000. Dissertação (Mestrado em Economia Rural) - Universidade Federal de Viçosa.



## **CAPÍTULO I**

**DINÂMICA POPULACIONAL E DISTRIBUIÇÃO CORPORAL DAS LARVAS  
DE *Dermatobia hominis* (LINNAEUS JR., 1781) EM BOVINOS DA RAÇA  
NELORE.**

**DINÂMICA POPULACIONAL E DISTRIBUIÇÃO CORPORAL DAS LARVAS  
DE *Dermatobia hominis* (LINNAEUS Jr., 1781) EM BOVINOS DA RAÇA  
NELORE.**

**Resumo:** O objetivo deste experimento foi conhecer a epidemiologia e a bioecologia de larvas de *D. hominis* na região sul do estado do Mato Grosso do Sul. Foram utilizadas 12 fêmeas bovinas da raça Nelore, com aproximadamente 18 meses, criadas em regime extensivo. Durante doze meses, os animais foram recolhidos, mensalmente a mangueira onde, pela inspeção e palpação, o número de nódulos cutâneos eram contados e mapeados conforme sua distribuição corpórea. Colheitas de sangue também foram feitas para realização de hemograma. Neste período um total de 294 nódulos cutâneos foram observados, sendo a paleta a região corpórea mais parasitada (24,52%), seguida das costelas (15,64%) e flanco (13,60%). A região anterior dos animais apresentou 71,09% das larvas observadas. A flutuação populacional das larvas de *D. hominis* registrou um número máximo nos meses do verão, onde foram observados 80,26% dos nódulos, com nítida influência da temperatura sobre esses piques populacionais. A variação do número de leucócitos está diretamente relacionada com o número de neutrófilos segmentados e monócitos. Todas as células da série branca apresentaram um aumento de seu número diretamente proporcional ao número de nódulos de larvas de *D. hominis*.

**Palavras-chave:** *Dermatobia hominis*, nódulos, berne, flutuação populacional.

**POPULATION DYNAMIC AND CORPORAL DISTRIBUTION OF THE LARVAE  
*Dermatobia hominis* ( LINNÆUS JR. 1788) IN BOVINES OF NELORE RACE**

**Abstract:** Aiming to know the epidemiology and bioecology of *Dermatobia hominis* larvae in the south of Mato Grosso do Sul, 12 Nelore female, age of approximately 18 months old, that were bred in extend regimen were utilized. Within a period of 12 months, every month the animals were gathered into a corral and by palpation and inspection all the dermal nodules were counted and mapped according to their corporal distribution. Blood samples were collected to verify the haemogram. In that period it was observed a total of 294 dermal nodules and the more parasitized corporal region was the palette (24.52%), followed by rib (15.64%) and flank (13.60%). The fore regions of the animals showed 71.09% of the observed larvae. Population fluctuation of the *Dermatobia hominis* registered a greater number of larvae during summer time, when it was observed 80.26% of nodules with a clear influence of the temperature on these population increase. Leukocytes variation is straightly related with the number of segmented neutrophils and monocytes. All the white series cells react increasing themselves when is observed a raised of the nodules number.

**Key words:** *Dermatobia hominis*, nodules, worm, fluctuation of the population.

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre os ectoparasitos de importância médico-veterinária na América Latina está a espécie *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (Diptera: Cuterebridae), conhecida popularmente por “mosca do berne”. A larva deste inseto é o agente da miíase furunculóide em humanos, animais domésticos e selvagens, na América tropical e subtropical (RIBEIRO, 1982; FONSECA, 1989; RODRIGUES, 1998; SILVA JUNIOR *et al.*, 1998; GOMES *et al.*, 1998; GUIMARÃES e PAPAVERO, 1999; BARBOSA *et al.*, 2000; PINTO, 2001).

No início do século XX, o berne foi considerado como uma das mais importantes parasitoses do gado bovino no Brasil (BARBOSA *et al.*, 2000). Atualmente, apesar do controle químico existente, a dermatobiose continua sendo um problema para a pecuária brasileira por seus prejuízos diretos ou indiretos.

Como prejuízos diretos, estão as perdas ocasionadas pela diminuição da produção de leite e carne, pelo baixo ganho de peso e pela dificuldade de aclimação de raças selecionadas, podendo ocasionar ainda a morte de bezerros quando estes estiverem intensamente infestados.

Os prejuízos indiretos causados pela dermatobiose estão relacionados com a formação de abscessos que podem ser a porta de entrada para as outras miíases, ou outros agentes patogênicos, e com a desvalorização do couro. Os gastos relacionados com a mão-de-obra e medicamentos utilizados para o combate desta ectoparasitose, também devem ser considerados.

A *D. hominis* apresenta no curso de seu ciclo biológico duas fases: uma parasita de mamíferos e outra de vida livre. Na fase de vida livre, machos e fêmeas emergem do pupário em torno do 30º dia, acasalando-se imediatamente. As fêmeas realizam a postura sobre outros insetos, fenômeno este conhecido como foresia (RODRIGUES, 1998).

Aproximadamente 50 espécies de insetos vetores têm sido catalogadas, entre elas mosquitos dos gêneros *Culex*, *Anopheles* e *Simulium* e moscas dos gêneros *Stomoxys*, *Neivamyia*, *Sarcopromusca* e *Fannia* (RIBEIRO, 1982; GUIMARÃES e PAPAVERO, 1999; PINTO *et al.*, 2002).

Os ovos depositados sobre outros insetos, têm um período de incubação de até sete dias. As larvas podem sobreviver dentro do ovo, por aproximadamente 20 dias (BRITO *et al.*, 2001). A maioria das larvas L<sub>1</sub> penetra no mesmo lugar onde

pousa seu vetor, podendo ocorrer em qualquer parte do corpo do animal.

O período larval é em torno de 40 a 50 dias, evoluindo por três estágios larvais (L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub>). As larvas de primeiro a terceiro estágio (L<sub>1</sub> a L<sub>3</sub>) de *D. hominis* produzem a miíase furuncular cutânea, também denominada dermatobiose, que se caracteriza pela produção de um nódulo parasitário cutâneo com aspecto de furúnculo (PESSÔA, 1982; DAEMON e PRATA, 1997; RODRIGUES, 1998).

Quando as larvas completam seu desenvolvimento, abandonam seus hospedeiros, caindo no solo, onde penetram para pupar. Como nesta fase as larvas L<sub>3</sub> precisam penetrar no solo, é muito importante que as condições climáticas e o tipo de solo contribuam para tal.

Os adultos emergem do pupário em torno do 30º dia, completando seu ciclo.

Dentre os fatores que mais influenciam no desenvolvimento (fases de vida livre) de *D. hominis*, estão a temperatura e a precipitação pluviométrica. Os níveis populacionais variam ao longo do tempo nas regiões subtropicais, conforme a temperatura média (BORJA 1982, RODRIGUES, 1998; BARBOSA *et al.*, 2000). Segundo OLIVEIRA (1991), influenciadas pelas condições climáticas, as larvas de *D. hominis* que abandonam o hospedeiro durante a primavera e verão, apresentam um desenvolvimento mais rápido e um índice de emergência mais elevado, havendo assim uma maior incidência de moscas adultas nesse período. Nos meses mais frios, o estágio pupal é mais longo e o percentual de emergência menor.

BELLATO *et al.* (1986); SARTOR (1986); MAGALHÃES e LESSKIU (1982); RIBEIRO *et al.* (1989), mostraram que a sazonalidade e a flutuação populacional variam de acordo com as características de cada região quanto a altitude, longitude, latitude e proximidades a matas fechadas.

Como o Brasil apresenta uma vasta extensão territorial, com uma grande variedade de latitudes, longitudes e altitudes e, por conseqüência, de vários tipos climáticos, a população de larvas de *D. hominis* nos hospedeiros pode variar de uma região para outra. Desta forma, é necessário conhecer a sazonalidade do parasitismo na região de interesse para racionalizar o controle.

Os estudos sobre a sazonalidade de *D. hominis* em países da América Latina e no Brasil mostram que há uma acentuada correspondência dos índices de precipitação pluviométrica mensal com o percentual de infecção dos animais (PINTO, 2001).

HORN e ARTECHE (1984); MAIA e GUIMARÃES (1985b); MAGALHÃES e LIMA (1988); OLIVEIRA (1991) e GOMES *et al.* (1998), relacionaram a incidência do “berne” com fatores ecológicos mensuráveis e encontraram uma correlação positiva dos índices de precipitação pluviométrica mensal com o percentual de animais parasitados.

A dinâmica populacional e a distribuição corporal de larvas nos animais infestados, segundo, MAGALHÃES e LIMA (1988); GOMES e MAIA (1988); RIBEIRO *et al.* (1989) e PINTO *et al.* (2002), tem uma maior incidência, na região das paletas e costelas.

Visando o conhecimento da epidemiologia e da bioecologia de *D. hominis* na região sul do estado do Mato Grosso do Sul, foi realizado este experimento com os objetivos de avaliar:

- a) a dinâmica populacional de larvas de *D. hominis* em bovinos da raça Nelore;
- b) a distribuição desses ectoparasitos na superfície corporal de bovinos (segundo regiões previamente estabelecidas);
- c) possíveis marcadores parasitológicos e leucocitários que possam ser auxiliares na seleção de bovinos resistentes ao parasitismo por larvas de *D. hominis*.

De posse destes dados será possível estabelecer qual a melhor época do ano para realizar a imunização dos animais com o extrato antigênico de larvas L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub> de *Dermatobia hominis*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

A colheita do material biológico deste trabalho foi realizada numa propriedade rural do município de Mundo Novo – MS, e processada nos laboratórios de Análises Clínicas e Parasitologia da Universidade Federal do Paraná – Campus Palotina, no período compreendido entre maio de 2002 e abril de 2003.

Para estimativa da dinâmica populacional e distribuição corporal de larvas de *D. hominis* (Linnaeus Jr., 1781), em bovinos da raça Nelore, foram utilizadas 12 fêmeas, de aproximadamente 18 meses, criadas em regime extensivo, devidamente identificadas com brincos, numerados de 1 a 12. Os animais, durante a fase experimental, não receberam tratamento contra endo e ectoparasitos. As vacinações contra a febre aftosa foram realizadas normalmente, seguindo o calendário oficial da Secretaria da Agricultura.

Mensalmente, durante um período de doze meses, os animais foram recolhidos à mangueira, onde, pela inspeção e palpação, a população de “bernes” foi contada e mapeada conforme sua distribuição no corpo do hospedeiro. A contagem dos furúnculos larvais na superfície corpórea dos bovinos foi realizada em cada lado do animal (esquerdo e direito), visando uma comparação do parasitismo. O número de nódulos observados eram anotados em uma ficha para descrição do local parasitado (ANEXO 01). A superfície do corpo dos bovinos foi hipoteticamente, dividida em 16 regiões, (RIBEIRO *et al.* 1989), em: 1) orelha; 2) cabeça; 3) pescoço; 4) barbela; 5) paleta; 6) cupim; 7) membro torácico; 8) tórax; 9) ventre; 10) costela; 11) flanco; 12) anca 13) períneo; 14) cauda; 15) membro pélvico e 16) virilha.

Os dados climáticos de interesse (temperatura média mensal, precipitação total mensal e umidade relativa do ar) relativos ao período de realização deste estudo, foram obtidos junto ao SIMEPAR (Sistema Meteorológico do Paraná).

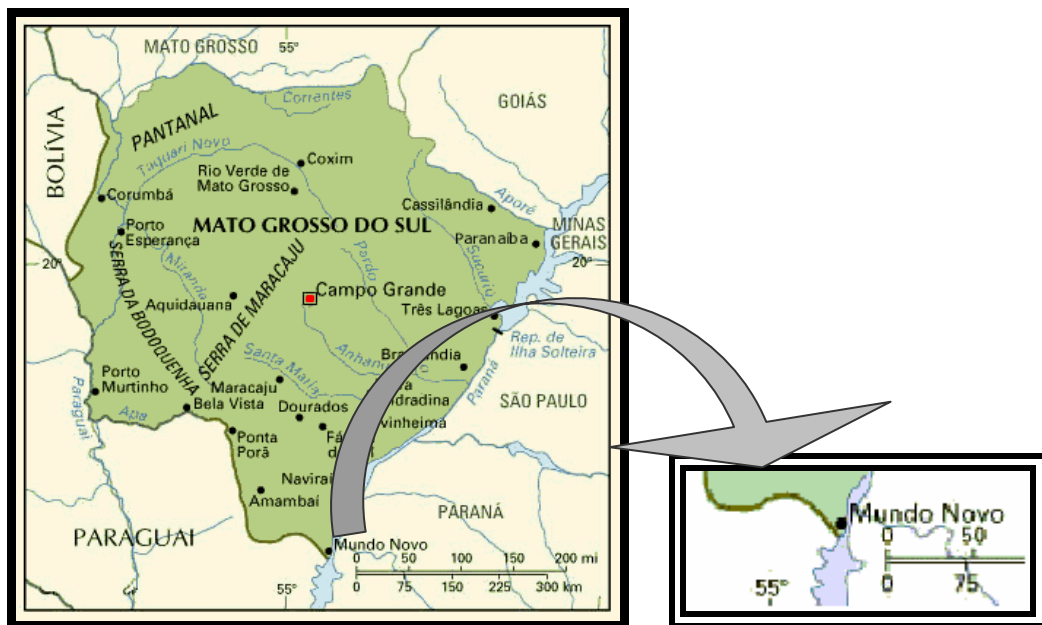
Para a investigação de possíveis marcadores que possam refletir a habilidade dos bovinos em resistir a parasitose por larvas de *D. hominis*, foram estudados marcadores parasitológicos (número de nódulos de *D. hominis*) e marcadores hematológicos (contagem total e diferencial de leucócitos).

As colheitas de sangue foram realizadas no período da manhã, todas no mesmo horário, como recomendado por JAIN (1993) e realizado por PINTO (2001).

Como a resposta imune tanto aos ectoparasitas como aos endoparasitas é representada por leucocitose e eosinofilia, os animais foram acompanhados durante todo o período experimental através de exame clínico e exames coproparasitológicos para verificar a possível influência na resposta imune dos bovinos.

## 2.1. DESCRIÇÃO DA ÁREA DE TRABALHO

O experimento foi desenvolvido em uma propriedade rural do município de Mundo Novo, que se localiza na região Sul do estado do Mato Grosso do Sul, compreendido numa área de 443 Km<sup>2</sup>, latitude sul de 23°53'17", e longitude oeste 54°16'15", a uma altitude de 280 m em relação ao nível do mar (FIGURA 01).



**FIGURA 01:** Localização geográfica do município de Mundo Novo, Estado do Mato Grosso do Sul, e divisa com o estado do Paraná.

A área total da propriedade rural é de 430 ha e está voltada para a bovinocultura de corte. A formação vegetal é representada por mata que se assemelha a capões, com árvores com aproximadamente 10 m de altura e mata ciliar, o que constitui, habitat ideal da *D. hominis* e dos dípteros vetores de seus ovos (FIGURA 02). A agrobiocenose é representada pelas áreas das instalações e construções físicas da propriedade, destacando-se a mangueira e tronco de



contenção, área de repouso, área de alimentação dos animais em coxos cobertos, e piquetes formados pela gramínea, *Brachiaria brizanta*.



**FIGURA 02:** Piquete em que os animais ficaram confinados durante o período experimental, destacando a proximidade da mata ciliar.

## 2.2. PARÂMETROS LEUCOCITÁRIOS

Para a avaliação dos parâmetros leucocitários foram colhidos 5 mL de sangue através de punção da veia jugular esquerda. O sangue colhido foi acondicionado em frascos contendo o EDTA (ácido etileno diamino tetracético) anticoagulante. Após a colheita, os frascos foram identificados e mantidos em caixas de isopor com gelo reciclável, para encaminhamento ao laboratório clínico.

O hemograma é o exame laboratorial do sangue, constituído pelo eritrograma e pelo leucograma, que fornece dados quantitativos e qualitativos sobre eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Os exames foram realizados seguindo a metodologia descrita por JAIN (1993); GARCIA-NAVARRO e PACHALY (1994). Os valores de referência junto aos mesmos autores.

A contagem diferencial dos leucócitos, também designada de fórmula leucocitária, foi realizada através da leitura em microscópio óptico, dos esfregaços sangüíneos, corados pelo método de Wright, segundo GARCIA-NAVARRO e PACHALY (1994).

### 2.3. EXAMES COPROPARASITOLÓGICOS

Os endoparasitos assim como os ectoparasitos podem alterar a série branca e vermelha das células sanguíneas. Para eliminar possíveis influências dos endoparasitos sobre as infestações dos ectoparasitos aqui estudados os animais foram acompanhados através de exames coproparasitológicos. Foram colhidas 10g de fezes de cada animal diretamente da ampola retal, utilizando-se luva plástica. As amostras foram acondicionadas em frascos plásticos, identificados e transportadas para o laboratório em caixa de isopor com gelo. No laboratório, foram realizados os exames coproparasitológicos pelo método de Gordon e Whitlock modificado, com o objetivo de identificar e contar os ovos de helmintos por grama de fezes (opg). O método de Gordon e Whitlock modificado é um método quantitativo que tem como objetivo determinar a intensidade do parasitismo, apesar de não expressar a real infestação do hospedeiro (HOFFMANN, 1987).

### 2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A metodologia empregada para a análise dos dados, foi a de modelos linear generalizados, apropriada para variáveis que apresentam distribuições de probabilidade da família exponencial (normal, gamma, Poisson e binomial). Onde foram adotados como ferramentas os programas: Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG, 8.0, 2002) e ASRemL (GILMOUR *et al.*, 2002).

Para a avaliação do número de nódulos presentes nos animais, distribuídos ao longo do ano e número de nódulos distribuídos em cada lado, foi considerada uma distribuição de Poisson com função de ligação logarítmica.

O modelo matemático para distribuição do número de nódulos e das variações climáticas ao longo do ano, ficou assim estabelecido:

$$y_{ij} = \mu + b_1(x_i) + b_2(x_i)^2 + b_3(x_i)^3 + e_{ij}$$

onde:

$\mu$  = constante geral;

$b_1, b_2$  e  $b_3$  = são os coeficientes linear, quadrático e cúbico, respectivamente, de regressão do número de nódulos em função dos meses;

$x_i$  = efeito de mês;

$e_{ij}$  = resíduo ou erro aleatório.

No caso do número de nódulos em relação ao lado do animal mais infectado, o modelo matemático, foi:

$$y_{ijk} = \mu + L_i + b_1(x_i) + b_2(x_i)^2 + b_3(x_i)^3 + e_{ij}$$

onde:

$\mu$  = constante geral;

$L_i$  = efeito de lado (direito ou esquerdo);

$b_1, b_2$  e  $b_3$  = são os coeficientes linear, quadrático e cúbico, respectivamente, de regressão do número de nódulos em função dos meses;

$x_i$  = efeito de mês;

$e_{ij}$  = resíduo ou erro aleatório.

Para o número de nódulos observados nas diferentes regiões corpóreas, utilizou-se uma distribuição binomial negativa com função de ligação logarítmica, avaliando cada uma das regiões, com o objetivo de verificar a existência de diferença significativa entre as mesmas. A equação do modelo matemático foi:

$$y_{ijk} = \mu + r_i + b_1(x_i) + b_2(x_i)^2 + b_3(x_i)^3 + e_{ij}$$

onde:

$\mu$  = constante geral;

$r_i$  = efeito das regiões corpóreas;

$b_1, b_2$  e  $b_3$  = são os coeficientes linear, quadrático e cúbico, respectivamente, de regressão do número de nódulos em função dos meses;

$x_i$  = efeito de mês;

$e_{ij}$  = resíduo ou erro aleatório.

Para a análise da cinética de leucócitos, aplicou-se inicialmente o teste de Lilliefors, para verificação da normalidade dos dados. Nos casos onde a distribuição

não foi normal utilizou-se a distribuição Poisson com função de ligação logarítmica. Sendo que o modelo matemático adotado foi igual ao do número de nódulos ao longo do ano.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. SAZONALIDADE DAS LARVAS DE *Dermatobia hominis*

Durante o período do experimento I, de maio de 2002 até abril de 2003, foram contados 294 nódulos cutâneos de *D. hominis*, sobre o corpo dos doze animais. A variação mensal observada oscilou entre um mínimo de zero a um máximo de 78 larvas (TABELA 01).

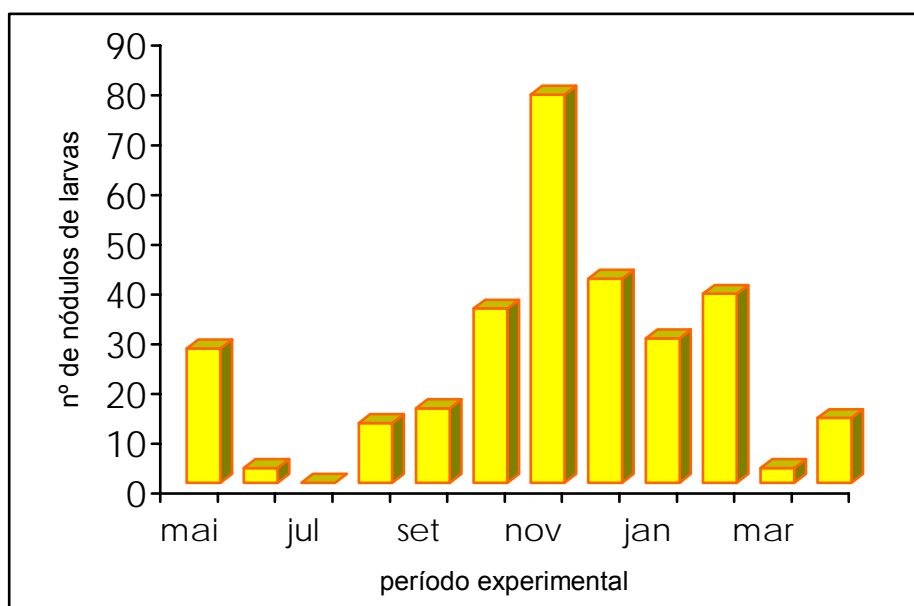
TABELA 01: Número de nódulos mensais de *D. hominis* encontrados em doze bovinos da raça Nelore, no período de maio de 2002 a abril de 2003, no município de Mundo Novo-MS.

Meses	Número de nódulos
Maio	27
Junho	03
Julho	00
Agosto	12
Setembro	15
Outubro	35
Novembro	78
Dezembro	41
Janeiro	29
Fevereiro	38
Março	03
Abril	13
Total	294

O número de Larvas de *Dermatobia hominis* registrado foi inferior ao encontrado por outros autores, em trabalhos semelhantes (MAIA e GUIMARÃES, 1985; SARTOR, 1986; RIBEIRO *et al.*, 1989; MOZZAQUATRO e SANAVRIA *et al.*, 2003), possivelmente devido a altitude (Neel *et al.*, 1955, citado por MAIO *et al.*, 2002). Segundo esses autores a *D. hominis* tem um melhor desenvolvimento em altitudes compreendidas entre 600 e 1.400m.

A intensidade de infestação dos bovinos, por larvas de *D. hominis*, na região deste experimento, sul do Mato Grosso do Sul, é considerada baixa, quando comparada a trabalhos similares, embora a flutuação populacional seja praticamente a mesma, fato também verificado por RIBEIRO *et al.* (1989) no município de Pelotas-RS e por PINTO *et al.* (2002) no município de Palotina-PR.

Quanto à flutuação populacional, pode-se verificar que ocorreu uma diminuição do número de nódulos nos meses de inverno, começando a crescer no outono e com pico no mês de novembro (FIGURA 03). Estes dados são semelhantes aos encontrados por MAIA e GUIMARÃES (1985a), RIBEIRO *et al.* (1989), PINTO (2001) e MAIO *et al.* (2002).



**FIGURA 03:** Flutuação populacional de larvas de *D. hominis* em bovinos da raça Nelore, no período de maio de 2002 a abril de 2003, no município de Mundo Novo-MS.

Nos meses correspondentes à primavera e verão, foram observados 80,26% dos nódulos, mostrando diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação a contagem registrada nos meses que compreendem o outono e inverno, que correspondeu a 19,74% dos nódulos observados.

As oscilações climáticas observadas no decorrer do experimento I, índice pluviométrico, umidade relativa e temperatura (TABELAS 02 e 03), apontam os meses de Dezembro e Janeiro com as temperatura mais elevadas e o mês de Julho a temperatura mais baixa. Os meses de maior precipitação foram Maio e Novembro, sendo que este último, superou a média registrada para o período. A

umidade relativa oscilou entre 95 e 52%, destacando o mês de Maio como o mais úmido.

De um modo geral as infestações começaram a aumentar quando a temperatura média foi superior a 23°C, esses dados corroboram com aqueles obtidos por MAGALHÃES e LESSKIU, (1982) no município de Ponta Grossa-PR e PINTO, (2001) no município de Palotina-PR.

TABELA 02: Temperaturas médias (mínima, média e máxima) registradas no período de maio de 2002 e abril de 2003, no município de Mundo Novo-MS.

Meses	Temperaturas °C		
	Mínima	Média	Máxima
Maio	17,9	21,1	25,2
Junho	15,7	19,3	24,5
Julho	13,0	17,2	22,8
Agosto	16,3	20,8	26,3
Setembro	14,9	20,1	26,4
Outubro	20,6	24,6	29,6
Novembro	18,4	24,2	30,3
Dezembro	22,9	27,4	32,8
Janeiro	23,0	26,5	35,1
Fevereiro	21,7	26,2	32,2
Março	17,5	22,2	32,9
Abril	18,7	22,9	28,3
Médias	18,38	22,71	28,87

TABELA 03: Precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar registradas no período de maio de 2002 a abril de 2003, no município de Mundo Novo-MS.

Meses	Precipitação (mm)	Umidade Relativa (%)
Maio	294,2	95,1

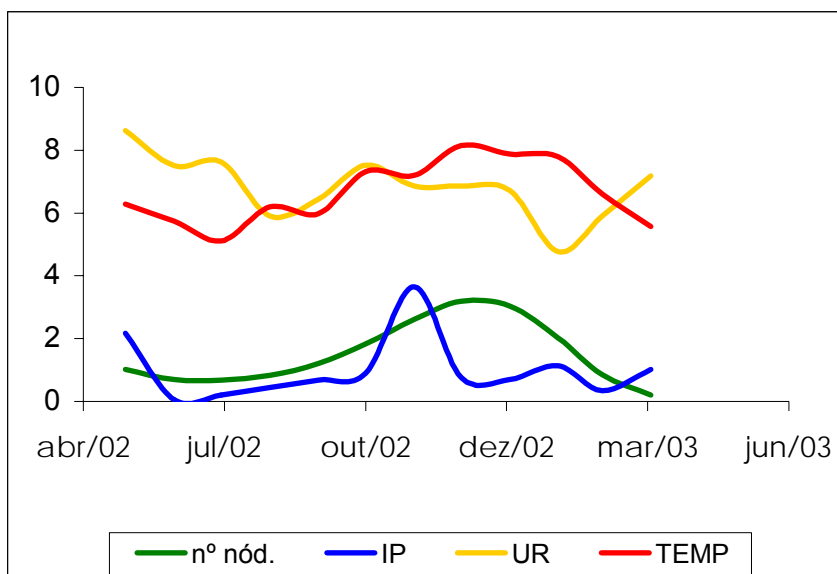
Junho	5,8	82,7
Julho	27,0	84,1
Agosto	59,8	65,2
Setembro	92,6	71,0
Outubro	121,8	82,9
Novembro	492,6	75,6
Dezembro	102,0	75,6
Janeiro	93,0	74,1
Fevereiro	152,4	52,6
Março	46,6	65,2
Abril	136,8	79,2
Médias	135,38	75,27

O número de nódulos de larvas de *D. hominis* apresenta uma oscilação muito semelhante com a verificada para a temperatura (FIGURA 04). O baixo número de nódulos encontrados nos meses de Junho e Julho (FIGURA 03), está correlacionado com as baixas temperaturas do período, quando chegaram a ser registradas temperaturas inferiores a 8 °C (entre os dias 12/07 e 19/07), condição imprópria para o desenvolvimento do berne.

No mês de março ocorreu uma queda acentuada no número de larvas, em relação a fevereiro, o que pode ter sido provocado pelo baixo índice de precipitação. O mesmo também ocorreu no mês de junho e julho, em relação ao mês de maio (TABELA 03). Esses dados sugerem que o decréscimo do número de larvas observado está relacionado com a fase de pupa da *D. hominis*. O solo seco dificulta a penetração das larvas para puparem, diminuindo o percentual de emergência dos adultos (MAIA e GUIMARÃES, 1985).

A comparação do número de nódulos, umidade relativa, índice pluviométrico e temperatura podem ser melhor compreendidos analisando-se a FIGURA 04, que mostra as curvas de regressão dos valores das variáveis climáticas e do número de nódulos ao longo do período experimental.





**FIGURA 04:** Número de nódulos(nº nod) de larvas de *Dermatobia hominis* observados ao longo do período experimental, e a relação entre as variáveis climáticas: IP(índice pluviométrico), UR(umidade relativa) e TEMP(temperatura).

Neste gráfico foram traçadas as curvas de regressão para cada variável ao longo do ano, em relação ao índice padronizado do número de nódulos observados (ANEXO 02). Todas as variáveis apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), entretanto, a melhor associação observada foi entre o comportamento das variáveis: temperatura e número de nódulos.

Nos meses de maio a julho o número de nódulos chegou a zero. Neste período pode ser observado, além de temperaturas mais baixas, os menores índices de chuvas e umidade relativa. Os índices pluviométrico (IP) e umidade relativa (UR), não apresentaram associação significativa em relação ao número de nódulos.

A maior ocorrência do berne em períodos chuvosos está correlacionada com as condições climáticas favoráveis ao ciclo da mosca e de seus foréticos, pois em solos demasiadamente secos as pupas não se desenvolvem (BARBOSA *et al.*, 2000).

Os índices pluviais aumentaram a partir de agosto, atingindo seu pico máximo em novembro, o que acompanhou a observação do número de nódulos. Nos meses de janeiro e março, houve queda do índice pluviométrico em relação aos meses de dezembro e abril, onde também foi observada a diminuição do número de nódulos.

As observações dos menores números de nódulos de larvas de *D. hominis* ocorreram nos meses de junho, julho e março, quando as taxas de temperaturas e precipitação foram as mais baixas registradas durante o experimento. Esses dados contribuem para que as pupas não se desenvolvam, diminuindo as infestações dos animais.

BARBOSA *et al.* (2000), ao analisarem a duração do período pupal, verificaram que nos períodos de temperaturas mais altas, houve uma menor duração do período pupal enquanto que sob temperaturas menores este período foi maior.

O modelo de flutuação populacional observado em bovinos no estado do Mato Grosso foi praticamente o mesmo encontrado por PINTO (2001), em trabalho realizado no município de Palotina-PR, o que pode ser atribuído à proximidade geográfica das regiões. RIBEIRO *et al.* (1989), observaram que a percentagem de animais infestados aumentou proporcionalmente com o aumento da temperatura, e que diminuiu drasticamente a temperaturas inferiores a 18°C. Neste mesmo trabalho, realizado no município de Pelotas-RS, não foi observada relação significativa entre umidade relativa e precipitação.

Estes dados corroboram com os apresentados por este trabalho, mas diferem dos encontrados por MAIA e GUIMARÃES (1985), no município de Governador Valadares-MG, onde observaram que existe uma correlação positiva entre a umidade relativa (U.R) e o índice pluviométrico (I.P) com a população de *D. hominis*.

BRITO e BORJA (2000), obtiveram resultados semelhantes, analisando as peles bovinas oriundas de matadouro do município de Piraí-RJ. Neste trabalho a umidade relativa do ar foi o fator climático de menor influência sobre o aumento do número de nódulos, e os meses de maior incidência da dermatobiose foram os antecidos por períodos de precipitação acima de 200 mm<sup>3</sup>. Este resultado difere do encontrado por GOMES *et al.* (2002) que ao estudarem os foréticos para a *D. hominis*, na região de Campo Grande-MS, verificaram que a incidência dos mesmos foi maior quando os índices pluviométricos foram menores.

### 3.2. DISTRIBUIÇÃO CORPÓREA DAS LARVAS DE *D. hominis* NOS BOVINOS

De acordo com a distribuição corporal das larvas, nos bovinos, das 294 larvas encontradas, as regiões mais infestadas foram as paletas (24,52% dos nódulos), seguida pela região das costelas e flanco com 15,64% e 13,60% respectivamente (TABELA 04).

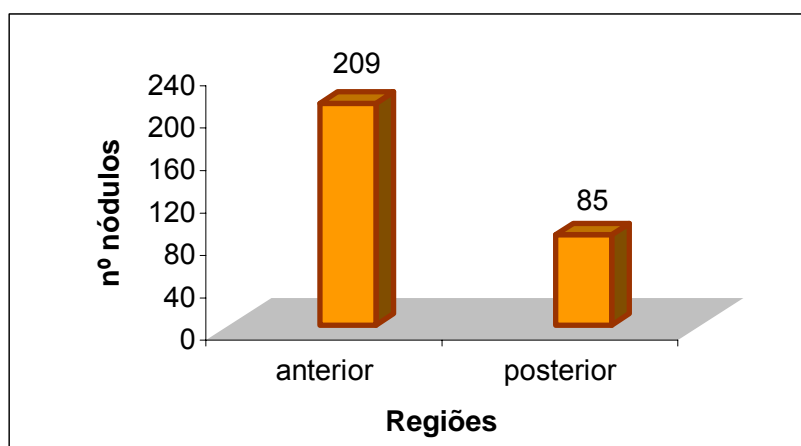
Paletas e costelas representaram uma participação de 40,16% nas infestações, esta localização merece destaque, uma vez que é considerada a região do couro de maior valor econômico. Todas as regiões foram comparadas estatisticamente pela análise de variância, mostrando haver diferença significativa entre elas ( $p < 0,05$ ). Apesar da incidência do número de nódulos ter sido menor do que os dados apontados pela literatura, estes resultados foram semelhantes aos encontrados por vários autores como LELLO *et al.* (1982), MAIA e GUIMARÃES (1985a), BELLATO *et al.* (1986), PINTO *et al.* (2002) e SANAVRIA *et al.* (2002).

TABELA 04: Distribuição das larvas de *D.hominis* nas regiões corporais dos 12 bovinos da raça Nelore, durante o período experimental, no município de Mundo Novo-MS.

Região	% na infestação	Nódulos		Região	% na infestação	Nódulos	
		Direita	Esquerda			Direita	Esquerda
Orelha	0,34	0	1	Ventre	8,50	9	16
Cabeça	0,68	2	0	Costela	15,64	15	31
Pescoço	4,76	9	5	Flanco	13,60	18	22
Barbela	6,80	6	14	Anca	3,74	4	7
Paleta	24,52	29	43	Períneo	0	0	0
Cupim	9,18	18	9	Cauda	1,02	3	0
Memb.				Memb.			
Torácico	5,44	9	7	Pélvico	1,36	0	4
Peito	3,74	3	8	Virilha	0,68	2	0
<b>TOTAL</b>	<b>55,46</b>	<b>76</b>	<b>87</b>		<b>44,54</b>	<b>51</b>	<b>80</b>

Neste experimento houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as regiões anterior e posterior dos animais, com participação de 71,09% e 28,91% na infestação, respectivamente (FIGURA 05). Dados da literatura corroboram com nossos resultados (LELLO *et al.*, 1982; MAIA e GUIMARÃES, 1985a; OLIVEIRA e ALENCAR, 1990 e PINTO, 2001). Entretanto em alguns trabalhos, foram registrados índices de infestação bastante superiores, OLIVEIRA (1985), MAIO, *et al.* (2002) e MOZZAQUATRO e SANAVRIA (2003), que encontraram uma freqüência de 95%, 90,06% e 83,3%, respectivamente, na região anterior. A maior incidência de nódulos na região anterior pode ser atribuída à ação da “vassoura” da cauda na repulsão dos foréticos dos ovos de *D. hominis*, como também descrevem os trabalhos de LELLO *et al.* (1982), MAIA e GUIMARÃES (1985b) e GOMES *et al.*

(1998).

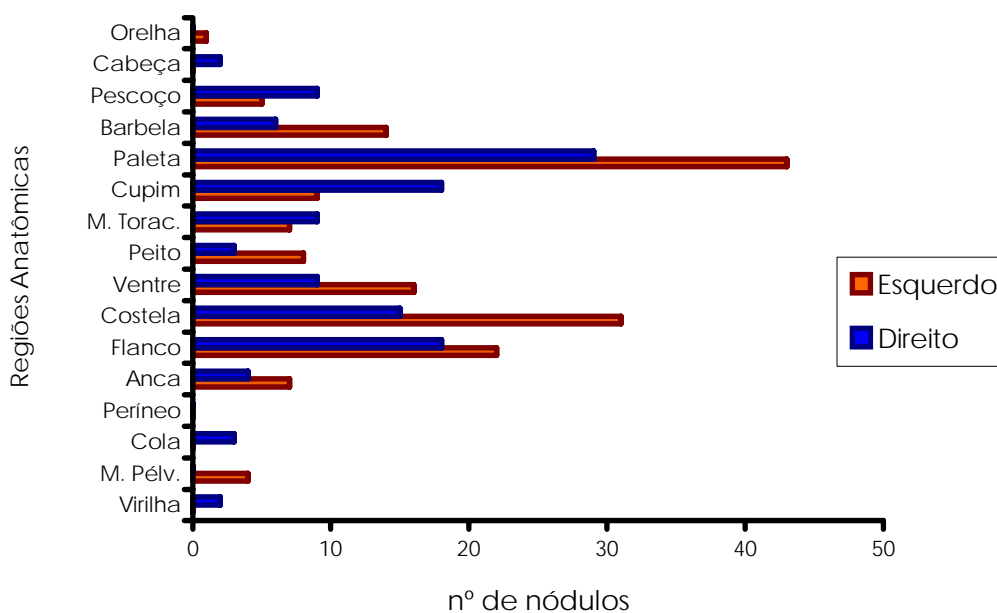


**FIGURA 05:** Distribuição do número de nódulos de *D. hominis*, em regiões posterior e anterior de bovinos da raça Nelore.

Diversos autores não atribuem critérios para as divisões corpóreas, e dividem o animal apenas em lado direito e esquerdo, ou em quadrantes (anterior esquerdo e direito e posterior esquerdo e direito). Pelo resultado obtido neste experimento, ao comparar regiões próximas, como: paleta, costela e cupim; cabeça, orelha e pescoço; e membros anteriores e posteriores, verificou-se que existe diferença significativa entre essas regiões, justificando-se então estabelecer como critérios de avaliação a divisão do animal nas dezesseis regiões propostas (ANEXO 01).

Em um estudo epidemiológico da dermatobiose no município de Santa Maria-RS, MOZZAQUATRO e SANAVRIA (2003), observaram que as regiões corpóreas mais infestadas foram os membros anteriores, o tórax e paleta e as costelas, com freqüências de 34,5%, 27,8% e 13,5%, respectivamente.

A distribuição dos nódulos de larvas nas laterais direita e esquerda, no presente experimento, apresentou resultados similares aos encontrados por BELLATO *et al.*, (1986), RIBEIRO *et al.*, (1989), PINTO (2001) e SANAVRIA *et al.*, (2002), onde o lado esquerdo mostrou ser significativamente ( $p < 0,05$ ) o mais afetado (FIGURA 06). A este fato pode-se atribuir a preferência dos animais pelo decúbito esternal direito, principalmente no momento da ruminação. Este resultado difere de MAGALHÃES e LIMA (1988) e MAIO *et al.* (2002) que não encontraram diferença significativa entre os lados parasitados.



**FIGURA 06:** Distribuição do número de nódulos de *D. hominis* por região corpórea de bovinos, levando-se em conta o lado parasitado.

### 3.3. MARCADORES DA RESPOSTA DO HOSPEDEIRO FRENTE AO PARASITISMO POR LARVAS DE *Dermatobia hominis*.

#### 3.3.1. Exames Hematológicos

Durante o período experimental de um ano, foi realizado mensalmente, um leucograma de cada animal (TABELA 05), a fim de tentar estabelecer alguma correlação entre o número de leucócitos totais e seus tipos celulares, com o grau de infestação dos animais. Podendo assim verificar a resposta celular frente à infestação pela *Dermatobia hominis* e uma possível reação de resistência orgânica individual.

Os leucócitos são as células relacionadas com a defesa do organismo contra infecções (JAIN, 1993). Estas células atuam na identificação e neutralização de antígenos, que são responsáveis pelo desencadeamento do processo de inflamação (GARCIA-NAVARRO e PACHALY, 1994).

Como os valores absolutos da contagem diferencial de leucócitos têm grande amplitude, trabalhou-se com os dados padronizados para todos os tipos celulares,

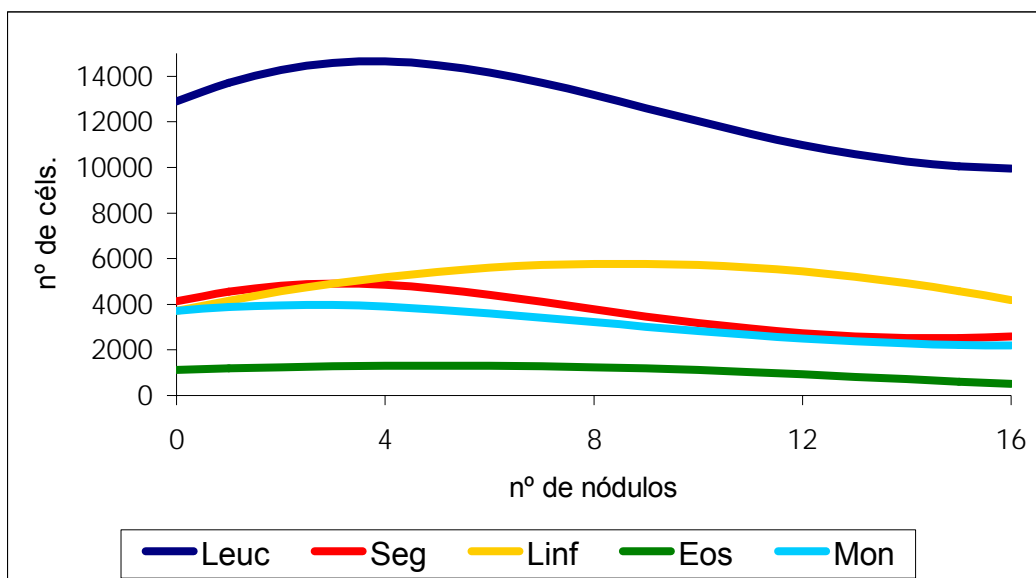
ajustados em relação ao número de nódulos encontrados em cada período da colheita de dados (ANEXO 04).

A variação do número total de leucócitos pode ser atribuída a inúmeras alterações orgânicas por isso deve ser estudada de acordo com a variação de seus tipos celulares. O número de leucócitos totais, no presente trabalho, oscilou entre 6.600 e 27.100 céls/ $\mu$ L (ANEXO 03), o que supera os valores de referência para a espécie, 4.000 e 12.000 céls./ $\mu$ L (JAIN, 1993).

A variação dos leucócitos totais foi influenciada pelo número de neutrófilos segmentados, como demonstrado na FIGURA 07, pela similaridade entre as curvas. O número de linfócitos assim como os eosinófilos apresentam comportamentos similares, com um declínio das curvas de regressão, que poderia ser explicado pela resistência orgânica individual, pela resposta imune ou ainda a fatores ligados a faixa etária destes animais.

TABELA 05: Valores médios do leucograma de bovinos da raça Nelore, e o número de nódulos encontrados nos meses de maio de 2002 a abril de 2003.

Mês	nº de nódulos	leucócitos		bastonetes		segmentados		linfócitos		eosinófilos		monócitos	
		µL	σ	µL	σ	µL	σ	µL	σ	µL	σ	µL	σ
mai/02	27	18330	± 4352	64	± 95	7847	± 2676	4985	± 1493	1060	± 525	4432	± 2104
jun/02	3	15213	± 5127	1696	± 1418	5388	± 2028	1590	± 1695	2719	± 1857	3766	± 2640
jul/02	0	12446	± 2236	47	± 59	4970	± 1960	3242	± 1390	1494	± 648	2693	± 1090
ago/02	12	12325	± 2447	42	± 100	3656	± 1155	3658	± 1066	1068	± 643	3915	± 949
set/02	15	13767	± 4483	35	± 67	4135	± 1482	4908	± 2565	1737	± 919	3016	± 925
out/02	35	14896	± 3479	12	± 43	5501	± 2269	5537	± 1811	957	± 565	3065	± 2095
nov/02	78	13075	± 4728	0	-	4101	± 2372	2459	± 2898	936	± 518	5579	± 1647
dez/02	41	12629	± 4814	0	-	3078	± 1261	2420	± 1566	1315	± 776	5816	± 2689
jan/03	29	14028	± 2808	36	± 94	4021	± 1196	3272	± 970	1291	± 558	6264	± 2944
fev/03	38	13442	± 2613	10	± 34	3310	± 1169	5562	± 1585	1183	± 361	3378	± 1657
mar/03	3	11638	± 1717	10	± 33	3044	± 650	5104	± 1312	1354	± 802	2116	± 767
abr/03	13	11243	± 1502	21	± 49	1466	± 796	6379	± 1156	857	± 361	2554	± 693



**FIGURA 07:** Número de leucócitos totais, neutrófilos segmentados, linfócitos, eosinófilos e monócitos, em função do número de nódulos de *Dermatobia hominis* observados no período do experimento I, realizados em bovinos Nelore.

Os fatores etários exercem influência significativa sobre o leucograma de fêmeas zebuínas, com um aumento do número de neutrófilos maior, em animais com idade até os 24 meses. Em contra-posição a elevação significativa dos eosinófilos é verificada a partir dos 24 meses de idade, sendo que os demais tipos celulares não sofrem variações influenciadas pela evolução etária (COSTA, *et al.*, 2000).

Quanto ao número de neutrófilos segmentados e linfócitos, os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os encontrados por BARBOSA *et al.* (2003), que ao estudarem as alterações hematológicas em bovinos infestados experimentalmente, com larvas de *D. hominis*, encontraram ligeira linfopenia e aumento do número de neutrófilos segmentados. Esses achados poderiam estar relacionados com a liberação de corticóides devido ao estresse provocado pela ação mecânica dos ganchos bucais destas larvas.

O número de eosinófilos manteve-se praticamente dentro dos limites da normalidade durante todo o período experimental, exceção feita ao mês de Junho onde se encontrou ligeira eosinofilia. Como neste período foi observada uma infestação muito baixa de larvas, os eosinófilos foram detectados no sangue periférico, em maior quantidade. Segundo PEREIRA e LEITE (2002), os eosinófilos são encontrados em grande quantidade ao redor das larvas de *D. hominis* no



período inicial da infestação (larvas L<sub>1</sub>, até o 10º dia de infestação), o que representaria uma diminuição deste tipo celular no sangue periférico.

A contagem de monócitos mostrou-se elevada durante todo o período experimental, este fato também foi observado por BARBOSA *et al.* (2003), quando estudaram as alterações hematológicas em bovinos experimentalmente infestados, muito embora em proporções muito menos significativas. BIRGEL JUNIOR, *et al.* (2001), atribuem o aumento absoluto de monócitos muito além dos valores de referência, às dificuldades de diferenciação ou critérios de classificação dos monócitos, em face da semelhança existente entre monócitos e linfócitos do tipo monocitóide.

A monocitose caracterizada durante todo o período experimental poderia ser atribuída ao papel destas células em neutralizar partículas antigênicas através da fagocitose e atuar como células apresentadoras de antígenos às células T auxiliares facilitando a ligação com linfócitos específicos.

Em relação a contagem absoluta de neutrófilos bastonetes, observou-se que a média destas células não apresentaram diferença significativa, mostrando um aumento apenas durante o mês de Junho. Este aumento pode ser atribuído ao acúmulo de neutrófilos tecidual ao redor das larvas L<sub>1</sub> de *D. hominis* (SANAVRIA *et al.*, 1987 e LELLO *et al.*, 1980). Como a reserva de neutrófilos segmentados na espécie bovina não é muito grande, a medula óssea lançaria mão de células jovens para suportar um aumento na demanda.

Em trabalho realizado por BARBOSA *et al.*(1997), bovinos infestados experimentalmente por *Dermatobia hominis* foram submetidos a hemogramas completos semanalmente onde não foram observadas diferenças significativas (P<0,05) em relação a série vermelha (hematócrito, nº de hemácias, hemoglobina) quando comparado ao grupo controle. Quanto a série branca (leucócitos, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e monócitos), também não houve diferenças significativas em relação ao grupo controle, muito embora o número de leucócitos totais, eosinófilos, linfócitos e neutrófilos segmentados tenham sido maiores que no grupo controle.

PINTO (2001), comparou os resultados hematológicos de 14 animais, avaliados através de hemogramas realizados mensalmente por um período de 24

meses, onde só encontrou diferença significativa entre a contagem global de leucócitos, nos animais mais parasitados comparados aos menos parasitados.

Os estudos sobre a hematologia dos bovinos são muito discutidos por diversos autores, por sofrerem influências de vários fatores. Segundo DITTRICH *et al.* (1996), os resultados laboratoriais podem sofrer alterações devido a condições de criação dos animais, tipo de alimentação, idade, sexo, raça e condições patológicas subclínicas. Como os animais utilizados para este experimento, pertenciam a raça Nelore e de idade aproximada de 18 meses, fica difícil estabelecer um parâmetro de referência.

Ao estudarem os parâmetros sangüíneos de bovinos da raça Nelore BENESI *et al.* (2002), demonstraram que o diferencial celular do leucograma de zebuínos, é predominantemente linfocitário. A razão para este comportamento, do número absoluto de linfócitos, poderia ser atribuído à ocorrência de hemoparasitas ou premunição natural e contínua.

BIRGEL Jr (1991) diz que os valores padrões estabelecidos para animais de uma determinada região não podem ser extrapolados para fora desta. Destacando a importância de serem determinados valores de referência para cada região e raça a serem estudados.

### 3.3.2. Exames Coproparasitológicos

Esses exames foram realizados com o objetivo de descartar a influência do endoparasitismo dos animais, uma vez que este poderia alterar a relação do número de leucócitos apresentados pelo leucograma, principalmente os eosinófilos. Os resultados encontrados nos exames estiveram dentro da faixa de normalidade para a espécie (UENO e GONÇALVES, 1994). Os resultados encontrados estão no ANEXO 05, e não apresentaram diferença estatística significativa.

#### 4. CONCLUSÕES

- A condição climática que mais influenciou a flutuação populacional de larvas foi a temperatura.
- A maior ocorrência de nódulos de *Dermatobia hominis* nos animais do experimento I, foi nos meses de primavera e verão (80,26%).
- As regiões mais parasitadas dos bovinos foram as paletas (24,52%), costelas (15,64%) e flanco (13,60%).
- Paletas e costelas, sendo consideradas as regiões nobres para o aproveitamento do couro, representam uma participação de 40,16% na infestação.
- A lateral esquerda do corpo dos animais foi a mais atingida, com 56,8% das larvas encontradas. 71,09% das larvas encontraram-se na região anterior dos animais.
- Os resultados dos leucogramas se mantiveram dentro dos limites da normalidade estabelecidos para a espécie bovina, apresentando pequeno aumento, que pode ser atribuído ao número de neutrófilos segmentados e monócitos.

## REFERÊNCIAS

- BARBOSA, C.G.; SANAVRIA, A; FREIRE, R. B. Dermatobiose bovina experimentalmente causada por larvas de *Dermatobia hominis*: Aspectos clínicos, hematológicos e imunológicos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 6, p. 62-66, 1997.
- BARBOSA, C.G.; SANAVRIA, A; BARBOSA, M.D.P.C. Período pupal da *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae) em condições de temperatura ambiente. **Parasitologia al Dia**, Santiago, v. 24, n. 1-2, p. 63-66, 2000.
- BARBOSA, C.G.; SANAVRIA, A; BARBOSA, M.D.P.C. Alterações Hematológicas em Bovinos Infestados Experimentalmente com Larvas de *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 12, n. 2, p. 61-67, 2003.
- BELLATO, V.; PALOSCHI, C.G.; SOUZA, A.P.; RAMOS, C.I.; SARTOR, A.A. Variação sazonal das larvas da mosca de berne em bovinos no planalto catarinense. **Com. Téc. EMPASC**, Florianópolis, n. 101, p. 1-7, 1986.
- BENESI, F. J.; COSTA, J. N.; BIRGEL, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; AYRES, M. C. C.; BARROS FILHO, I. R. Leucograma padrão de bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*). Influência de fatores sexuais. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 8, n. 1, p. 59-66, 2002.
- BIRGEL JUNIOR, E. H. **O hemograma de bovinos (*Bos taurus*, L.) da raça Jersey, criados no estado de São Paulo. Influências dos fatores etários, sexuais e da infecção pelo vírus da leucose bovina**. São Paulo-SP, 1991. 172p. Dissertação (Mestrado em Patologia Bovina) – Curso de Patologia Experimental e Comparada, Universidade de São Paulo, 1991.
- BIRGEL JUNIOR, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; BENESI, F.J.; BIRGEL, E. H. Valores de referência do leucograma de bovinos da raça Jersey criados no Estado de São Paulo. **Brazilian Journal Veterinary Animal Science**. São Paulo, v. 38, n. 3, p. 136-141, 2001.
- BORJA, G.E.M. Retrospectiva da dermatobiose e epidemiologia da *Dermatobia hominis*. In: SEMINÁRIO NACIONAL SOBRE PARASITOSE DOS BOVINOS, 1., 1982, Campo Grande. **Anais...**, 1982. p. 303-314.
- BRITO, L.G. BORJA, G.E.M. Flutuação sazonal de *Dermatobia hominis* em peles bovinas oriundas de matadouro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 4, p. 151-154, 2000.

BRITO, L.G; PAES, M. J.; BORJA, G.E.M. Infestação artificial e desenvolvimento larval de *Dermatobia hominis* (L.Jr., 1781) (Diptera: Cuterebridae) em suínos e eqüinos. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 48, n. 277, p. 401-403, 2001.

COSTA, J. N.; BENESI, F. J.; BIRGEL, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; AYRES, M. C. C.; BARROS FILHO, I. R. Fatores Etários no leucograma de fêmeas zebuínas sadias da raça Nelore (*Bos indicus*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 3, p. 399-403, 2000.

DAEMON, E.; PRATA, M.C.A. Mííase conjuntival por larvas de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (Diptera: Cuterebridae) em eqüino: descrição de um caso. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 2, p. 81-84, 1997.

DITTRICH, R. L.; BARROS FILHO, I. R.; YORINOR, E. H.; SCHIMANSKI, N. Valores de referência para leucograma de bovinos da raça Holandesa preta e barnca no Paraná. **Agrárias**, Curitiba, v. 15, n. 2, p.207-211, 1996.

FONSECA, A.J.C. **Aspectos imunológicos, atividade antibacteriana e efeito de várias doses de ivermectina sobre larvas de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (Diptera: Cuterebridae)**. Itaguaí, 1989. 23 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

GARCIA-NAVARRO, C.E.K.; PACHALY, J.R. **Manual de Hematologia Veterinária**. São Paulo: Varela, 1994. 169 p.

GILMOUR, A.R.; GOGEL, B.J.; CULLIS, B.R.; WELHAM, S.J.; THOMPSON, R. **ASRemL User Guide Release 1.0**. Hemel Hempstead, United Kingdom, 2002. HP1 1ES, ISBN 1-904375-07-3

GOMES, A.; HONER, M.R.; KOLLER, W.W.; SILVA, R.L. Vetores de ovos de *Dermatobia hominis* (L. Jr., 1781) (Diptera: Cuterebridae) na região de cerrados do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 37-40, 1998.

GOMES, A.G.; MAIA, A.A. Berne: distribuição sazonal, localização no hospedeiro e susceptibilidade de bovinos mestiços na região de Uberaba, Minas Gerais. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 25, p. 109-115, 1988.

GOMES, P.R.; KOLLER, W.W.; GOMES, A.; CARVALHO, C.J.B.; ZORZATTO, J.R. Dípteros fanídeos vetores de ovos de *Dermatobia hominis* em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 3, p. 114-118, 2002.

GUIMARÃES, J.H.; PAPAVERO, N. **Myiasis in Man and Animals in the Neotropical Region**. São Paulo: Plêiade/FAPESP, 1999.

HOFFMANN, R.P. **Diagnóstico de Parasitismo Veterinário**. Porto Alegre: Sulina, 1987. 156 p.

HORN, S.C.; ARTECHE, C.C.P. Carrapato, berne e bicheira no Brasil. **Inquérito Secretaria de defesa Sanitária Animal do Ministério da agricultura**. Brasília – DF., 1984, 83 p.

JAIN, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.

LELLO, E.; MOTA, N.G.S.; PERAÇOLI, M.T.S. Reação inflamatória causada pelo berne em coelhos imunizados ou não, com extrato antigênico de *Dermatobia hominis* (Díptera: Cuteribridae). **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 32, p. 458-461, 1980.

LELLO, E.; PINHEIRO F.A.; NOCE, O.F. Epidemiologia de miíases no município de Botucatu, São Paulo. **Arquivos da Escola de Veterinária UFMG**, Belo Horizonte, v. 34, n. 1, p. 93-104, 1982.

MAGALHÃES, F.E.P.; LESSKIU, C. Efeito do controle do berne sobre o ganho de peso e qualidade dos couros em novilhos de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 2, p. 329-336, 1982.

MAGALHÃES, F.E.P.; LIMA, J.D. Freqüência de larvas de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781), em bovinos em Pedro Leopoldo, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 40, n. 5, p. 361-367, 1988.

MAIA, A.A.M.; GUIMARÃES, M.P. Distribuição sazonal de larvas de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (Diptera, Cuterebridae) em bovinos de corte da Região de Governador Valadares, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 37, n. 5, p. 469-475, 1985a.

MAIA, A.A.M.; GUIMARÃES, M.P. Berne: Susceptibilidade de bovinos, distribuição no hospedeiro, associação com outras miíases e abscesso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 37, n. 5, p. 461-467, 1985b.

MAIO, F.G.; SOUZA, W.M.; RAMALHO, L.D.; SANAVRIA, A.; FIGUEIREDO, M.A.; GRISI, L. Distribuição sazonal das larvas de *Dermatobia hominis* em bovinos leiteiros no município de Vassouras, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista brasileira de Ciências Veterinárias**, Niterói, v. 9, n. 1, p. 29-31, 2002.

MOZZAQUATRO, F.D.; SANAVRIA, A. Estudo epidemiológico da *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae) em bovinos de produção leiteira no Município de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Parasitologia Latinoamericana**, Santiago v. 58, n. 1-2, p. 80-82, 2003.

OLIVEIRA, G. P. Fatores que afetam economicamente a produção de couro bovino. **Arquivos de Biología e Tecnologia**, Curitiba, v. 26, p 353-358, 1985.

OLIVEIRA, C.B.; ALENCAR, M.M. Resistência de bovinos de seis graus de sangue Holandês-Guzerá a carrapato (*Boophilus microplus*) e ao berne (*Dermatobia hominis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 42, n. 2, p. 127-135, 1990.

OLIVEIRA, G.P. Ecologia de *Dermatobia hominis* L. Jr. 1781 (Díptera: Cuterebridae) na Região de São Carlos, Estado de São Paulo, Brasil. **Turrialba**, São José, v. 41, n. 3, p. 367-375, 1991.

PESSOA, S.B. **Parasitologia Médica**. 11ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 872 p.

PEREIRA, M.C.T.; LEITE, A.C.R. Eosinophil and mast cell expression in host skin during larval development of the human bot fly *Dermatobia hominis*. **Parasite**. Paris, v. 9 n. 4, p. 333-339, 2002.

PINTO, S.B. **Aspectos bioecológicos e imunológicos de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (Diptera: Cuterebridae)**. Curitiba, 2001.135 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

PINTO, S.B.; SOCCOL, V.T.; VENDRUSCULO, E.; ROCHADELLI, R.; RIBEIRO, P.B.; FREITAG, A.; HENEMANN, C.; UEMURA, M. Bioecologia de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) em Palotina, Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 5, p. 821-27, 2002.

RIBEIRO, P.B. **Ciclo biológico de *Dermatobia hominis* (L.Jr., 1781) (Diptera: Cuterebridae) oriunda de bovinos**. Porto Alegre, 1982. 24 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Parasitárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

RIBEIRO, P.B.; OLIVEIRA, C.M.B.; COSTA, P.R.P.; BRUM, J.G.W. Foréticos da *Dermatobia hominis* (L. Jr., 1781) (Diptera: Cuterebridae), no Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 37, n. 5, p. 507-509, 1985.

RIBEIRO, P.B.; OLIVEIRA, C.M.B.; COSTA, P.R.P.; BRUM, J.G.W.; BATISTA, Z.R. Flutuação populacional de *Dermatobia hominis* (L. Jr., 1781) sobre bovinos no município de Pelotas, RS. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 41, n. 3, p. 223-231, 1989.

RODRIGUES, B. R. ***Dermatobia hominis* (L. Jr., 1781) (Diptera: Oestridae: Cuterebrinae)**: ciclo silvestre e ecologia das infestações de bovinos pelo berne no município de Pedro Leopoldo, MG, Brasil. Belo Horizonte, 1998. 101 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

SANAVRIA, A.; LOPES, C. W. G.; BORJA, G.E.M. Histologia da pele de bovino na infecção experimental por *Dermatobia hominis*. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Itaguaí, v. 10, p. 9-23, 1987.

SANAVRIA, A.; BARBOSA, C.G.; BEZERRA, E.S. Distribuição e freqüência de larvas de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (Díptera: Cuterebridae) em peles de bovinos. **Parasitologia Latinoamericana**, Santiago, v. 57, n. 1-2, p. 21-24, 2002.

SARTOR, A.A. **Parasitismo por larvas de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) em bovinos no município de Lorena, estado de São Paulo**. Rio de Janeiro, 1986. 76 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1986.

SILVA JUNIOR, V. P.; LEANDRO, A. S. BORJA, G. E. M. Ocorrência do berne, *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae) em vários hospedeiros, no Rio de Janeiro, Brasil. **Parasitologia al Dia**, Santiago, v. 22, n. 3-4, p. 97-101, 1998.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para Diagnóstico das Helminthoses de Ruminantes**. Porto Alegre, Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1994, 166p.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. Centro de Processamento de Dados. UFV. **Sistema para Análises Estatísticas – SAEG 8.0**, Viçosa, 2002.



## CAPÍTULO II

**RESPOSTA IMUNE-HUMORAL E CELULAR EM BOVINOS DA RAÇA NELORE  
IMUNIZADOS COM EXTRATO DE LARVAS (L<sub>2</sub> E L<sub>3</sub>) DE *Dermatobia hominis*  
(LINNAEUS JR., 1781)**

**RESPOSTA IMUNE-HUMORAL E CELULAR EM BOVINOS DA RAÇA NELORE  
IMUNIZADOS COM EXTRATO DE LARVAS (L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub>) DE *Dermatobia hominis*  
(LINNAEUS JR., 1781)**

**Resumo:** O objetivo do presente trabalho foi avaliar a resposta imune-humoral e celular da espécie bovina frente à aplicação de um extrato antigênico preparado com larvas de segundo e terceiro estágio de *Dermatobia hominis*. Para a realização do trabalho foram estabelecidos três grupos de oito bezerras da raça Nelore com idade aproximada de 10 meses, totalizando 24 animais. O primeiro grupo de bovinos recebeu aplicação de extrato imunogênico de larvas de *D. hominis*, o segundo grupo não recebeu nenhum tipo de tratamento (grupo controle) e o terceiro grupo eram animais que receberam o tratamento convencional adotado na propriedade para o controle de ectoparasitos. Os animais imunizados receberam três aplicações do extrato antigênico, com intervalos de quinze dias. A cada intervalo de quinze dias foram colhidas amostras de sangue para avaliação da resposta celular, através de leucogramas e da produção de anticorpos através da técnica de enzimoimunoensaio-ELISA. Os testes mostraram que o extrato de larvas foi imunogênico para os bovinos, constatando-se que os anticorpos circulantes atingiram níveis máximos no 45º dia após a primeira imunização. Os três tratamentos apresentaram diferenças significativas quanto à cinética de anticorpos, sendo que o grupo de animais imunizados foi o que apresentou maior produção. O número de nódulos de larvas encontrado nos animais não imunizados foi 148,3% maior que nos animais que receberam as aplicações. O contato prévio dos animais do grupo imunizado com os antígenos de *Dermatobia hominis* estimulou uma maior produção de neutrófilos, eosinófilos e monócitos.

**Palavras chave:** *Dermatobia hominis*, nódulos, antígeno, neutrófilos, eosinófilos.

**IMMUNE HUMORAL AND CELLULAR RESPONSE OF NELORE BOVINES  
IMMUNIZED WITH LARVAE EXTRACT (L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub>) of *Dermatobia hominis*  
(LINNAEUS JR., 1781)**

**Abstract:** The aim of this research was to evaluate the immune humoral and cellular bovine response towards the application of an antigenic extract prepared with larvae of second and third stage of *Dermatobia hominis*. 24 Nelore females with the age of 10 months were used. It was settled three groups of 8 animals each. The first one was of the bovine which had already received larvae immunogenic extract, the second group did not received any sort of treatment and the 3<sup>rd</sup> one was of animals that received a conventional treatment adopted by the property owner to control the ectoparasites. The immunized animals received three applications of the extract within a 15 days interval. In each 15 days interval blood samples were collected to evaluate the cellular response (reaction) by means of blood test and the formation of antibodies by enzyme immunoassay test - ELISA. The test showed that the larvae extract was immunogenic to bovine, and it was found out that the circulating antibodies had achieved the greatest levels at the 45<sup>th</sup> day after the first immunization. Significant differences were showed by the three treatments for antibodies kinetic whose animals of the immunized group presented the greatest production. The number of larvae nodules found on the non immunized animals was 148% bigger than of the animals that had received the larvae extract applications. The previous contact of the immunized animals with the antigens *Dermatobia hominis* stimulated a greatest production of neutrophils, eosinophils and monocytes.

**Key words:** *Dermatobia hominis*, nodules, antigen, neutrophils, eosinophils.

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil a dermatobiose é um fator limitante para a produção e desenvolvimento da bovinocultura (HORN e ARTECHE, 1985; RODRIGUES, 1998). O tratamento desta parasitose atualmente é feito apenas com produtos químicos que pode deixar resíduos no ambiente e no animal (carne). Assim, novas alternativas para o controle da dermatobiose têm sido pesquisadas. Uma delas seria a seleção de animais geneticamente resistentes, ou seja, animais com habilidade de impedir o estabelecimento e/ou subsequente desenvolvimento das larvas de *D. hominis* (PINTO, 2001).

Pesquisas realizadas por ULLOA e ALBA (1957), MORAES *et al.*, (1986), HONER e GOMES (1990), OLIVEIRA e ALENCAR (1990) e GOMES *et al.* (1996) têm demonstrado que é possível explorar a variação genética de *Bos taurus* e *Bos indicus*, por seleção, para a resistência ao ectoparasitismo por larvas de *D. hominis*. As questões remanescentes estão relacionadas com a seleção de bovinos de uma mesma raça. Sabe-se que a escolha de um único marcador poderia interferir na produtividade. Pôr este motivo é interessante estudar vários caracteres que possam ajudar nessa seleção.

Os ectoparasitos exercem várias ações sobre seus hospedeiros, como ações mecânicas, espoliadoras e tóxicas. Estas, muitas vezes se associam, tornando muito complexa a patogenia destas parasitoses. Uma ação irritativa e inflamatória é encontrada na quase totalidade das parasitoses (PESSOA, 1982).

LELLO *et al.* (1980), ao estudarem a reação inflamatória causada pelo berne, em coelhos imunizados, relataram a intensa reação inflamatória eosinofílica. O eosinófilo é uma célula envolvida com todo o tipo de reações imunológicas, seja ela alérgica ou não, e o estímulo a sua produção é comprovadamente mais eficaz quando provocado pelo complexo antígeno-anticorpo, do que pelo antígeno isoladamente.

Outro aspecto pouco conhecido é a resposta imune celular e humoral do hospedeiro frente ao parasitismo por larvas de *D. hominis*. MOTA *et al.* (1980), estudaram a formação de anticorpos circulantes em coelhos imunizados por via subcutânea e intravenosa, com antígenos obtidos de larvas L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub> de *D. hominis* e ainda compararam as reações antigênicas, através das técnicas de imunodifusão dupla em ágar gel e hemoaglutinação passiva, onde constataram a maior

sensibilidade da segunda. O comportamento imunológico de coelhos imunizados com extratos antigênicos mostrou que a presença de larvas é capaz de provocar reação anamnésica (PERAÇOLI *et al.*, 1980).

A resposta imune estimulada por ectoparasitos e outros artrópodes tem recebido atenção crescente, entretanto, na literatura poucos trabalhos são encontrados referindo-se a *D. hominis*. Na maioria deles, a resposta imune dos hospedeiros foi avaliada por técnicas de imunodifusão radial e hemaglutinação passiva. Segundo REIS (1998), a técnica de imunodifusão dupla radial é um método de baixa sensibilidade.

BARBOSA *et al.* (2000) e PINTO *et al.* (2003), comprovaram a aplicabilidade do método Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) para avaliação de anticorpos específicos contra antígenos de larvas de *D. hominis*.

SANAVRIA *et al.* (1987) e OLIVEIRA-SEQUEIRA *et al.* (1996) analisaram a reação histopatológica e imunológica de animais frente a larva (L<sub>1</sub>) de *D. hominis*. LELLO *et al.* (1980) e PINTO *et al.*, (2003) ao estudarem a reação inflamatória causada pelo berne, em coelhos imunizados, descrevem a importante resposta eosinofílica observada graças à formação do complexo antígeno-anticorpo. FONSECA (1989) e BARBOSA *et al.* (2000) estudaram aspectos antigênicos de bovinos experimentalmente infestados com larvas de *D. hominis*.

Frente a essas ações do parasito, o organismo sofre várias alterações hematológicas, que já foram estudadas em alguns trabalhos (capítulo I). BARBOSA *et al.* (2000) infestaram bezerros artificialmente, com larvas de primeiro estágio e colheram amostras de sangue semanalmente. Durante o período do experimento, detectaram neutrofilia e linfocitose significativa em relação ao grupo controle. Durante a análise dessas amostras, foi dosado o nível sérico de proteínas totais, albumina e globulinas, os quais também se encontraram alterados.

Visando ampliar o conhecimento da resposta imunológica do hospedeiro frente a dermatobiose, bovinos da raça Nelore, foram imunizados com extratos de larvas L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub> de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781), com o objetivo de:

- a) Avaliar por meio do método de enzimoimunoensaio, teste ELISA indireto (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), a cinética da produção de anticorpos contra a dermatobiose.

- b) Avaliar através de leucogramas a resposta celular dos bovinos imunizados, comparada com a de animais não imunizados.
- c) Comparar através da contagem do número de nódulos de larvas de *Dermatobia hominis*, sobre a superfície corpórea de bovinos, que foram divididos em três grupos:
- GRUPO A: animais imunizados com o extrato de larvas.
  - GRUPO B: animais que não receberam nenhum tratamento.
  - GRUPO C: animais que receberam tratamento químico, utilizado pela propriedade.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido numa propriedade pecuária do município de Mundo Novo-MS, no período de setembro de 2003 a fevereiro de 2004. O material biológico colhido neste experimento foi processado no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Federal do Paraná – Campus Palotina e no Laboratório de Parasitologia Animal da UFPR, Campus Curitiba.

### 2.1 PREPARAÇÃO DO EXTRATO ANTIGÊNICO DE LARVAS L<sub>2</sub> E L<sub>3</sub> DE *Dermatobia hominis*.

A preparação do antígeno (extratos de larvas L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub>) de *D. hominis* foi realizada segundo o método descrito por MOTA *et al.* (1980), com modificações realizadas por PINTO (2001).

#### 2.1.1. Componentes Biológicos para Preparação de Antígenos

##### 2.1.1.1. Obtenção das larvas L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub> de *D. hominis*

Para o preparo do antígeno usou-se larvas L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub> de *D. hominis* obtidas de bovinos naturalmente infestados. Os nódulos de *D. hominis* presentes no tecido intradérmico dos bovinos foram identificados pela inspeção e palpação. As larvas foram eliminadas através de compressão manual dos nódulos.

Foram colhidas aproximadamente 100g de larvas L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub> de *D. hominis*, sendo que 70% eram de larvas de segundo estágio e 30% de terceiro. Logo depois de colhidas as larvas foram armazenadas em um frasco contendo solução fisiológica. Após o término da colheita de larvas, procedeu-se então a lavagem das mesmas em solução fisiológica estéril. Este procedimento foi repetido por cinco vezes. As larvas foram armazenadas e congeladas em vidro estéril, submersas em solução fisiológica acrescida de solução de gentamicina 40 mg/mL.

### 2.1.1.2. Preparação do extrato solúvel

Após o descongelamento, as larvas foram lavadas com solução salina e pesadas. Vinte gramas de larvas, sendo 14g de larvas L<sub>2</sub> e 6g de larvas L<sub>3</sub>, foram mergulhadas em frasco contendo 100 mL de solução salina tamponada (NaCl 0,15 M: fosfato de sódio monobásico 0,01 M: pH 7,2). As larvas foram trituradas em homogeneizador vitris durante 20 minutos. Este processo foi repetido duas vezes e então filtrado em algodão de nylon, como descrito por PINTO (2001).

O filtrado foi submetido ao ultra-som (sonicador de 35 Khz, 2,60 mA – 460/H – Elma<sup>®</sup>) por um período de 30 segundos, por quatro vezes, com intervalos de 30 segundos, entre cada período de sonicação. O Becker contendo o material foi mantido sempre emergido no gelo.

Após a sonicação, o material obtido, foi distribuído em tubos de centrifuga (previamente resfriados) e submetido à centrifugação (Hermle<sup>®</sup> Z 513K) a 4°C durante 40 minutos a 6.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi colocado, por inversão, em novos tubos de centrifuga e o processo de centrifugação repetido. O sedimento obtido a cada centrifugação foi desprezado. O processo foi repetido por mais cinco vezes, entretanto a 10.000 rpm e a 4°C.

O produto final foi então submetido a duas filtrações, sendo a primeira com um microfiltro de 0,80 µm e a segunda com um microfiltro de 0,22 µm. Ambas realizadas em capela de fluxo laminar.

Após a filtração, o extrato foi denominado antígeno solúvel e congelado em alíquotas de 16 mL, em frascos estéreis, até o momento de sua utilização.

Uma alíquota do material obtido foi usada para dosar a proteína pelo método de BRADFORD (1976). A dosagem protéica teve a finalidade de determinar a concentração do extrato antigênico a ser aplicado nos animais.



## 2.2. CARACTERIZAÇÃO PROTÉICA DO EXTRATO ANTIGÊNICO

### 2.2.1 Determinação do Teor Protéico do Extrato de Larvas

A partir de 100 g de larvas de segundo e terceiro estágio de *Dermatobia hominis*, obteve-se um extrato imunogênico cuja concentração protéica, determinada pelo método de BRADFORD (1976), foi de 10,02 mg/mL.

A determinação da concentração protéica fez-se necessário para calcular a diluição do antígeno na reação.

Reativo de Bradford:

- 40mg azul de cromassie G250
- 20 mL Etanol absoluto
- 40 mL de ácido fosfórico 85%
- 100 mL água destilada q.s.p.

A solução usada como padrão para a curva de calibração do espectrofotômetro (Zuzi<sup>®</sup> 4100) foi a albumina bovina (BSA), contendo 1mg/mL. Após a calibração do aparelho, procedeu-se a leitura da densidade ótica (D.O) das amostras.

### 2.2.2. Perfil Eletroforético do Extrato de Larvas de *D. hominis*

A eletroforese é uma técnica utilizada para separar os componentes de uma mistura de várias espécies iônicas, através da sua migração num campo elétrico. A carga iônica das biomoléculas depende do pH do meio e deve ser estabilizada por tampões.

A eletroforese foi realizada pela migração de proteínas de diferentes pesos moleculares através de um gel de poliácridamida na presença de duodecil sulfato de sódio(SDS), como descrito por TOWBIN *et al.*, (1979) e adaptado por MINOZZO (2003). As soluções utilizadas, bem como o protocolo, para o desenvolvimento da técnica estão dispostas no ANEXO 02.

### 2.2.2.1 Preparação do Conjunto de Placas para Moldar o Gel

As placas de vidro que compõe o conjunto são deixadas submersas em solução de álcool-éter, durante alguns minutos, a fim de remover todo o tipo de sujidades e gorduras. Após enxugá-las, montar o conjunto de placas sobre uma superfície limpa, colocando entre elas os espaçadores de 1,0 mm de espessura. Os espaçadores devem ser dispostos ao longo das extremidades laterais e inferiores da placa. Prender o conjunto com grampos e vedá-lo com auxílio de borracha siliconada de 1,0 mm de espessura a fim de evitar possíveis vazamentos. Depois de montado o conjunto de placas deve ser nivelado e transferido para o local de moldagem.

### 2.2.2.2. Preparação dos Géis

Para realizar a eletroforese são preparados dois géis: o de separação e o de empilhamento. As diferenças entre ambos são a concentração maior ou menor de acrilamida e bisacrilamida e o tipo de tampão utilizado nos dois géis. O tampão do gel de separação tem pH 8,8 conferindo carga às moléculas de proteína. Já o tampão do gel de empilhamento tem pH 6,8 não conferindo carga às proteínas. As proteínas no gel de empilhamento não sofrendo ação de carga elétrica, serão influenciadas pelo tamanho dos poros do gel. Por esta razão faz-se os poros do gel de empilhamento maiores, para que todas as proteínas cheguem ao mesmo tempo no gel de separação (ou de corrida).

### 2.2.2.3. Preparação e aplicação do gel de separação (ou de corrida)

O grau de filtração molecular na PAGE vai depender do tamanho dos poros que por sua vez é determinado pela concentração de acrilamida usada na polimerização do mesmo. Para obtenção do gel de separação a 12% foram utilizados:

- 6,6 mL água destilada
- 8,0 mL acrilamida 30%
- 5,0 mL Tris 1,5M pH 8,8
- 0,2 mL SDS 10%
- 0,2 mL persulfato de amônio 10%
- 0,2 mL TEMED (tetraetilmetilenediamina)

O gel de separação foi aplicado entre as placas de vidro do conjunto com o auxílio de micro pipeta. Sobre esse gel foi acrescentado, logo em seguida, 600 $\mu$ L de álcool isoamílico, que após a polimerização do gel, foi desprezado.

#### 2.2.2.4. Preparação e aplicação do gel de empilhamento

Lavar com água destilada o resíduo de álcool isoamílico e enxugar com papel filtro. Aplicar o gel de empilhamento no conjunto de placas, colocando em seguida o pente para aplicação das amostras no gel ainda líquido. Após a polimerização, remover o pente e fixar as placas na cuba de corrida.

Para a obtenção do gel de empilhamento foram utilizados:

- 2,1 mL de água destilada
- 0,5 mL acrilamida 30%
- 0,38 mL tris 1,0M pH 6,8
- 30  $\mu$ L SDS 10%
- 8  $\mu$ L TEMED (tetraetilmetilenediamina)

#### 2.2.2.5. Preparação das Amostras

As amostras a serem analisadas foram diluídas com cerca de 0,5 a 2 mg/mL em proteína e um volume total de 50 a 100  $\mu$ L. Usou-se para a diluição a solução salina tamponada (NaCl 0,15 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01 M: pH 7,2)

As soluções obtidas foram diluídas 1:1 em solução desnaturante, e fervidas em banho-maria, durante cinco minutos.

#### 2.2.2.6. Preparo do Padrão

As proteínas marcadoras também foram desnaturadas e dissociadas de modo idêntico às amostras. Utilizou-se como padrão de peso molecular de proteínas o Prestained Protein Marker, Broad Range (BioLabs cód. P7708S) composto de oito frações protéicas com pesos moleculares variando de 6,5 a 175 KDa.

#### 2.2.2.7. Aplicação das Amostras e do Padrão

Após a montagem da cuba de eletroforese, esta foi preenchida com o tampão de corrida em ambos compartimentos. As amostras e o padrão foram aplicados cuidadosamente no fundo de cada poço do gel, obedecendo-se rigorosamente o mesmo volume.

#### 2.2.2.8. Corrida

A fonte de tensão foi ligada estabelecendo corrente elétrica entre os pólos negativo e positivo da cuba. A amperagem constante foi estabelecida em 20 mA. O tempo de corrida foi de aproximadamente 5 horas, e determinado pela chegada do corante indicador (azul de bromofenol) ao final do gel.

#### 2.2.2.9. Revelação do Gel

Após a eletroforese as posições das bandas protéicas foram reveladas pela coloração com o Cromassie Azul Brilhante.

#### 2.2.2.10. Cálculo

O peso molecular de cada polipeptídeo foi determinado pela construção de reta padrão obtida em função do peso molecular e da mobilidade eletroforética das proteínas do padrão.

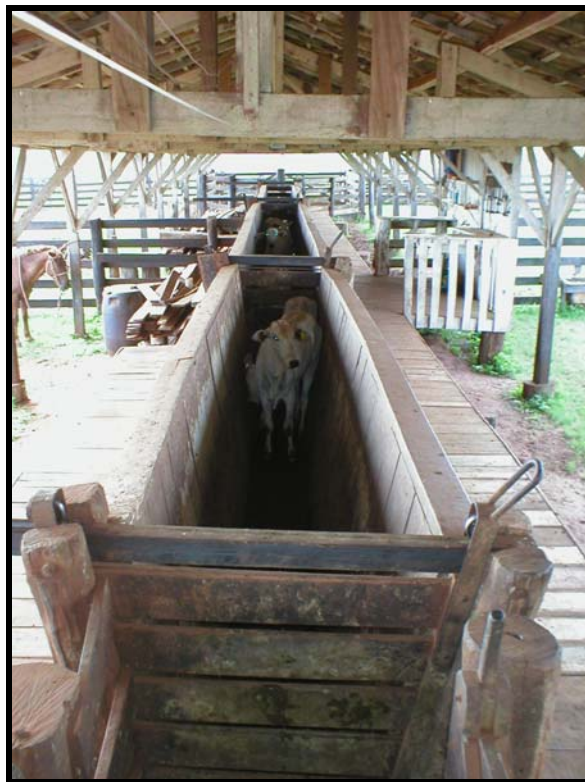
### 2.3 SELEÇÃO E MANEJO DOS ANIMAIS

Foram utilizadas 24 fêmeas da raça Nelore com idade aproximada de 10 meses. Os animais foram submetidos a um período de adaptação de 20 dias, no piquete onde ficaram confinadas durante o período experimental, antes do início das imunizações.

No primeiro dia do experimento todos os animais foram reunidos na mangueira, e aleatoriamente, encaminhados ao brete. Cada animal foi então identificado através de brinco numerado, escolhido por sorteio (FIGURA 01). Os

animais foram então divididos em três grupos, de oito animais, ficando assim dispostos:

- GRUPO A: animais a serem imunizados com o extrato de larvas.
- GRUPO B: animais que não receberam nenhum tratamento.
- GRUPO C: animais que receberam tratamento químico, utilizado pela propriedade, que consistiu de banhos por aspersão, utilizando-se como princípio ativo o Dichlorvos associado a Cypermetrina.



**FIGURA 01:** Seleção dos animais para o experimento, brincagem, pesagem e sorteio dos grupos.

A cada quinze dias os animais foram recolhidos à mangueira para a colheita de sangue, através da punção da veia jugular esquerda de cada animal, após sua contenção no tronco. Aproximadamente 10 mL de sangue total foram acondicionados em tubos de ensaio e armazenados em caixa isotérmica com gelo reciclável, para encaminhamento ao laboratório. Ao chegar no laboratório as amostras foram submetidas a centrifugação, para retirada do coágulo, e então

alíquotas, em duplicata, de soro foram guardadas e congeladas para posterior realização do teste enzimoimuniensaio.

A cada trinta dias os nódulos de larvas de *Dermatobia hominis* foram contados, seguindo-se a mesma metodologia do experimento I (Capítulo I), neste mesmo período, amostras de sangue foram colhidas com EDTA, servindo de anticoagulante, para realização do leucograma, e acompanhamento da resposta celular dos bovinos imunizados. As amostras foram colhidas aproveitando-se o mesmo acesso venoso utilizado para a colheita de sangue total. O sangue também foi transportado ao laboratório em caixas isotérmicas sob refrigeração. Nestes mesmos dias, os animais passaram pela pesagem individual para acompanhamento de seu ganho de peso.

### 2.3.1. Aplicação do Extrato Imunogênico de Larvas de *D. hominis*

Os animais que foram imunizados (grupo A), receberam a primeira dose de 2,0 mL do extrato solúvel de larvas (L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub>) de *D. hominis*, com concentração protéica de 20,04 mg, acrescida de partes iguais do adjuvante completo de Freund (Sigma Chemical Company), em 23 de setembro de 2003.

A dose foi inoculada por via subcutânea, na região da escápula esquerda de cada animal (FIGURA 02). Os animais foram imunizados pela via subcutânea, uma vez que a via através da qual o antígeno é administrado, afeta a magnitude e o tipo da resposta imune obtida. De acordo com JANEWAY e TRAVERS (1997), os antígenos injetados por via subcutânea em geral induzem as respostas mais fortes, enquanto que os antígenos injetados diretamente na corrente sangüínea tendem a induzir tolerância ou insensibilidade.

Após 15 dias, os animais receberam uma segunda imunização, composta do antígeno e do adjuvante incompleto de Freund (Sigma Chemical Company), por via subcutânea, na região escapular direita. A terceira imunização foi repetida 15 dias após a aplicação da segunda dose, sendo idêntica a esta última, mas aplicada na região da escápula esquerda. Cento e quarenta e dois dias após a primeira imunização os animais receberam uma quarta dose. Nesta dose foi inoculado o antígeno e o adjuvante incompleto de Freund, por via subcutânea, na paleta direita.



**FIGURA 02:** Aplicação do extrato antigênico por via subcutânea.

A função dos adjuvantes, completo e incompleto de Freund, é a de concentrar os antígenos nos locais onde os linfócitos possam encontrá-los e a indução de citocinas que regulam a função linfocitária (PINTO, 2001).

Os animais que não receberam o extrato imunogênico (grupos B e C), receberam como placebo 2,0 mL de solução fisiológica acrescida de partes iguais dos adjuvantes, seguindo-se o mesmo esquema de aplicação adotado para os animais imunizados (grupo A).

Todas as vezes que os animais, pertencentes ao grupo C, receberam tratamento contra ectoparasitas, os demais animais também foram banhados utilizando-se água como placebo.

#### 2.4. Teste Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

O método de enzimoimunoensaio foi usado no presente trabalho para detectar, no soro de bovinos imunizados com extratos de larvas, anticorpos específicos contra antígenos de larvas de *D. hominis*. A técnica foi padronizada para o presente estudo e seguiu os princípios propostos por MINOZZO (1997) e PINTO (2001), sendo que estes autores seguiram um protocolo que usava soro imunizado de coelhos. O protocolo adotado para este experimento está descrito no ANEXO 01.

O princípio da técnica é uma reação de cor. A coloração faz-se presente quando a enzima peroxidase, integrante do conjugado, desdobra o substrato. Para que haja manifestação de cor, é preciso que ocorra uma série de eventos em seqüência. Estes eventos têm início com a sensibilização da placa com o antígeno até a aferição da cor pelo leitor de placas.

#### 2.4.1. Sensibilização da Placa com antígeno

Para a sensibilização da placa a quantidade de antígeno por “pocinho” foi baseada na concentração protéica do mesmo. De posse da concentração protéica do antígeno, foi feita a diluição do mesmo em solução de “coating buffer” (tampão carbonato 0,05M, com pH 9,6). Com auxílio de multipipetador (Jencons Scientific) foram realizadas a homogeneização e distribuição da solução antigênica na placa, com 100 µl da solução de antígeno por “pocinho”, com exceção da primeira coluna (branco). A placa sensibilizada foi deixada em geladeira “over night” (16 horas).

Utilizou-se placas de polietileno (Nunc Brad Products), constituída de 96 “pocinhos” (12 colunas com oito “pocinhos” em cada) com o fundo chato.

#### 2.4.2. Primeira Lavagem

A primeira lavagem teve como finalidade remover o excesso de antígeno que não se fixou na placa. Utilizou-se a solução de lavagem (0,05% Tween-salina), com o auxílio do aparelho para lavagem de placas. A solução ainda restante nos orifícios da placa foi retirada, invertendo-se a placa sobre papel absorvente. A operação de lavagem foi repetida por três vezes.

#### 2.4.3. Bloqueio da Placa

A solução de bloqueio foi usada para bloquear os sítios de ligação não específicos. O bloqueio da placa foi feito utilizando-se 100 µl por “pocinho” de solução de bloqueio (caseína 2%; 0,05% tween 20; diluídas em PBS). Incubou-se a mesma em estufa (J. PROLAB Mod JP 101), a 37°C, por 60 minutos.



#### 2.4.4. Segunda Lavagem

A finalidade desta lavagem foi a de remover proteínas da solução de bloqueio que não se fixaram à placa. Procedeu-se de forma semelhante à primeira lavagem.

#### 2.4.5. Diluições dos Soros

Os soros foram diluídos em tampão de incubação (PBS; 0,25% caseína; 0,05% de tween 20). Em cada “pocinho” foram colocados 100 µl de soro diluído com a finalidade de fazer a ligação do antígeno, fixado na placa, com os anticorpos presentes no soro dos bovinos.

#### 2.4.6. Terceira Lavagem

Esta lavagem destinou-se à remoção de anticorpos que não se ligaram aos antígenos fixados na placa. Procedeu-se de forma semelhante à primeira lavagem, entretanto, este procedimento foi repetido seis vezes.

#### 2.4.7. Diluição do Conjugado

O segundo anticorpo a ser adicionado na placa foi a imunoglobulina anti-IgG de bovino, conjugado com a enzima peroxidase (Sigma Chemical Company). De forma semelhante ao soro, o conjugado foi diluído em tampão de incubação.

#### 2.4.8. Quarta Lavagem

Esta lavagem teve como objetivo remover o excesso de conjugado que não se ligou às moléculas de anticorpos nos “pocinhos” da placa. Procedeu-se de forma semelhante à terceira lavagem.

#### 2.4.9. Substrato

A atividade enzimática foi revelada usando-se como substrato a solução de ortofenilenodiamino (OPD). Os substratos cromogênicos sob a ação enzimática dão

origem a produtos coloridos cuja quantificação é feita pela medida da densidade óptica da solução em espectrofotômetro.

Em cada “pocinho” aplicou-se 100 µl do substrato (OPD) diluído em tampão de substrato (4 mg de OPD + 10,5 mL de tampão citrato pH 5,0 + 4 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Incubou-se a microplaca por 15 a 20 minutos, em estufa, a 24°C.

#### 2.4.10. Parada da Reação

Após 15 minutos de incubação a reação foi interrompida pela adição de 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 5% em cada “pocinho”.

#### 2.4.11. Leitura

Procedeu-se a leitura da densidade óptica (D.O) no leitor de microplaca (BIORAD Model 550) utilizando-se um filtro com comprimento de onda de 492nm. A leitura foi realizada nos dez minutos seguintes à parada da reação, para evitar o esmaecimento da coloração.

### 2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A metodologia empregada para a análise dos dados, foi a de modelos lineares generalizados, apropriadas para variáveis que apresentam distribuições de probabilidade da família exponencial (normal, gamma, Poisson e binomial). Foram adotados como ferramentas os programas estatísticos: Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG, 8.0, 2002) e ASRemL (GILMOUR, *et al.* 2002).

A análise dos dados obtidos seguiu o mesmo princípio adotado no experimento anterior (Capítulo I), diferindo apenas nos modelos matemáticos empregados. Para tal foi realizado o teste de LILLIEFORS (SAEG) para verificar a distribuição normal dos dados.

Na avaliação do número de nódulos observados ao longo do experimento em função dos tratamentos adotados, utilizou-se a distribuição de Poisson com função de ligação logarítmica, cujo modelo matemático ficou assim estabelecido:

$$y_{ijk} = \mu + T_i + b_1(x_i) + b_2(x_i)^2 + b_3(x_i)^3 + e_{ijk}$$

onde:

$\mu$  = constante geral;

$T_i$  = efeito de tratamento ( $i = 1, 2, 3$ );

$b_1, b_2$  e  $b_3$  = são os coeficientes linear, quadrático e cúbico, respectivamente, de regressão do número de nódulos em função dos meses;

$x_i$  = efeito de mês;

$e_{ij}$  = resíduo ou erro aleatório;

Para a análise da absorvância do teste ELISA em função dos tratamentos ao longo do experimento, foi adotada a distribuição gamma com função de ligação logarítmica e o modelo matemático semelhante ao anterior, modificando-se apenas a variável número de nódulos pela absorvância do teste ELISA.

Para verificar o comportamento das absorvâncias do teste ELISA em função do número de nódulos, dentro de cada tratamento, utilizou-se uma distribuição gamma com função de ligação inversa para o grupo A e B, e distribuição gamma com função identidade para o grupo C. O modelo matemático foi determinado pela equação:

$$y_{ij} = \mu + b_1(n_i) + b_2(n_i)^2 + b_3(n_i)^3 + e_i$$

onde:

$\mu$  = constante geral;

$n_i$  = número de nódulos

$b_1, b_2$  e  $b_3$  = são os coeficientes linear, quadrático e cúbico, respectivamente, de regressão do número de nódulos em função dos meses;

$e_{ij}$  = resíduo ou erro aleatório;

A cinética dos leucócitos foi avaliada em função do número de nódulos, da absorvância do teste ELISA e dos tratamentos. Os tratamentos dos grupos A e C, mostraram distribuição normal para as variáveis: leucócitos totais, neutrófilos segmentados e linfócitos, nas demais variáveis (eosinófilos e monócitos), foi utilizado distribuição Poisson com função de ligação logarítmica. Nos animais do grupo B, somente para os eosinófilos utilizou-se a distribuição gamma.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. EXTRATO IMUNOGÊNICO PREPARADO COM LARVAS L<sub>2</sub> E L<sub>3</sub> DE *Dermatobia hominis*.

##### 3.1.1. Concentração Protéica do Extrato de Larvas de *Dermatobia hominis*.

A concentração protéica do extrato antigênico preparado com larvas de segundo e terceiro estágio de *Dermatobia hominis*, foi de 10,02 mg/mL. Este valor foi acima do descrito por MOTA *et al.* (1980) e PINTO (2001), que encontraram 8,0 e 8,3 mg/mL, respectivamente. Esta diferença pode ser atribuída ao fato de neste trabalho terem sido utilizadas 70% de larvas de segundo estágio e 30% de terceiro enquanto que os demais autores prepararam seus extratos com proporções iguais de larvas L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub>. BARBOSA *et al.* (2000), ao estudarem as alterações imunológicas de bovinos infestados experimentalmente com larvas L<sub>1</sub>, utilizando anticorpos contra L<sub>1</sub> ou L<sub>2</sub> ou L<sub>3</sub>, através da técnica ELISA, comprovaram diferentes concentrações protéicas para os extratos antigênicos obtidos para cada estágio larval, sendo o extrato de larvas L<sub>3</sub> o menos concentrado.

Para a imunização dos animais a concentração protéica do extrato antigênico foi de 20,04 mg/mL/animal. Esta dosagem foi obtida através da extrapolação alométrica, baseada na dosagem administrada a coelhos imunizados com extrato antigênico de larvas de *D. hominis*, em pesquisas realizadas por diversos autores (MOTA *et al.*, 1980; PERAÇOLI *et al.*, 1980; LELLO e BOULARD, 1990; LELLO e PERAÇOLI, 1993; LELLO *et al.*, 1999 e PINTO *et al.*, 2003)

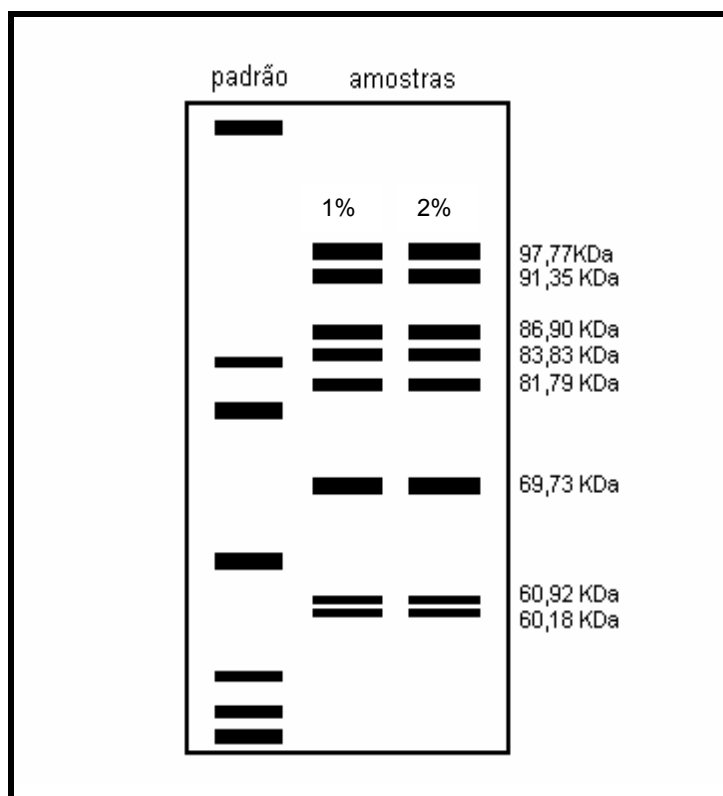
##### 3.1.2. Eletroforese do Extrato de Larvas

A eletroforese do extrato antigênico preparado com as larvas de segundo e terceiro estágio de *D. hominis* foi realizada com o objetivo de determinar as frações protéicas contidas no extrato.

As proteínas existentes no antígeno produzido foram determinadas através da eletroforese (PAGE-SDS) em gel de poliacrilamida na presença de SDS (duodecil sulfato de sódio), onde foi possível identificar oito frações protéicas distintas, com os

pesos moleculares de: 97,77; 91,35; 86,90; 83,83; 81,79; 69,73; 60,92; e 60,18 KDa (FIGURA 03).

No único relato encontrado na literatura, MOTA *et al.*, 1980 observaram uma única fração protéica, na eletroforese de extrato preparado com larvas L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub> de *D. hominis*. A técnica foi realizada com gel inoágar nº 2, a 1%.



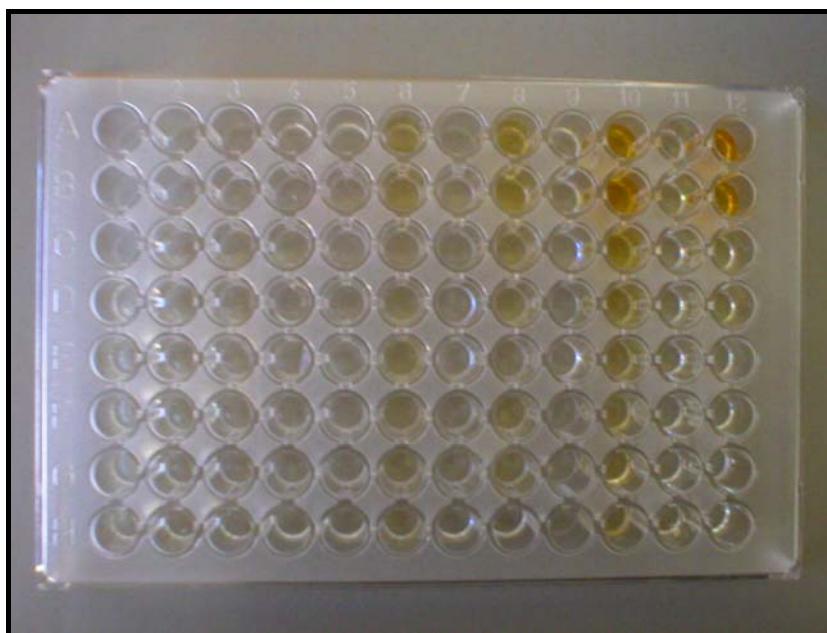
**FIGURA 03:** Perfil eletroforético do extrato antigênico de larvas de *D. hominis* em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE), destacando os pesos moleculares em KDa, em diferentes concentrações de amostra (1 e 2%).

### 3.2. ACOMPANHAMENTO DA PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS PELO MÉTODO DE ENZIMOIMUNOENSAIO.

#### 3.2.1. Padronização do Teste de Enzimoimunoensaio - ELISA

Para determinar a concentração ideal de antígeno várias concentrações foram testadas: 250 a 1500 ng/pocinho, com base nos trabalhos realizados por PINTO (2001). Todavia, estes autores usaram soro de coelhos imunizados. No presente

trabalho as concentrações propostas não permitiram discriminar entre os soros positivos e negativos de bovinos. Seguiu-se então diluindo o antígeno nas concentrações de 1500 a 5063 ng/pocinho. Optou-se por utilizar esta última, pois a mesma estabelecia a melhor discriminação entre os soros positivos e negativos (FIGURA 04).



**FIGURA 04:** Teste ELISA, mostrando a melhor discriminação entre bovinos soro reagentes e não reagentes, ao antígeno de *D. hominis*.

Para a melhor diferenciação da reação entre soros positivo e negativo foi usado um pool de soros positivos (soros controles positivos), formado por 100  $\mu$ L de cada amostra de soro colhida no 45º dia do experimento (3ª. Imunização), dos animais pertencentes ao grupo A. Os resultados obtidos foram comparados a absorvância encontrada nos testes realizados com o soro de animais maciçamente e naturalmente infestados.

Para controle negativo foi utilizado um pool de soros, formado por amostras de soro colhidos no 1º dia do experimento (dia zero) comparado aos resultados da absorvância encontrada nos testes com soros provenientes de animais com aproximadamente 70 dias de idade, que não haviam tido contato prévio com a *Dermatobia hominis*.

### 3.2.2. Diluição dos soros

Várias diluições dos soros foram feitas visando estabelecer a melhor concentração na reação. Os soros foram diluídos em tampão de incubação, nas proporções de 1:50; 1:100; 1:200 e 1:400. A diluição estabelecida como a ideal foi a de 1:50. Na primeira coluna não foi colocada amostra do soro, sendo a mesma utilizada para fazer o branco do aparelho. Na última coluna da placa foram colocados controles negativos e os controles positivos. As amostras de soro foram analisadas em duplicata.

### 3.2.3. Diluição do Conjugado

Vários testes foram feitos para conhecer a diluição ideal do conjugado a ser utilizado. As diluições usadas foram de 1:1250 e 1:2500, sendo a que apresentou melhor resultado foi a diluição de 1:1250.

### 3.2.4. Cálculo do Ponto de Corte entre Soro Reagente e Não Reagente no Teste Enzimoimunoensaio

Para determinar o ponto de corte do teste ELISA entre os soros reagentes e não reagentes, utilizou-se a absorbância dos soros de animais com aproximadamente 70 dias de idade, que foram utilizados como controle negativo para padronização dos testes. A absorbância dessas amostras variou de 0,039 a 0,174 e foi usada para estabelecer o “cut-off” de 0,190.

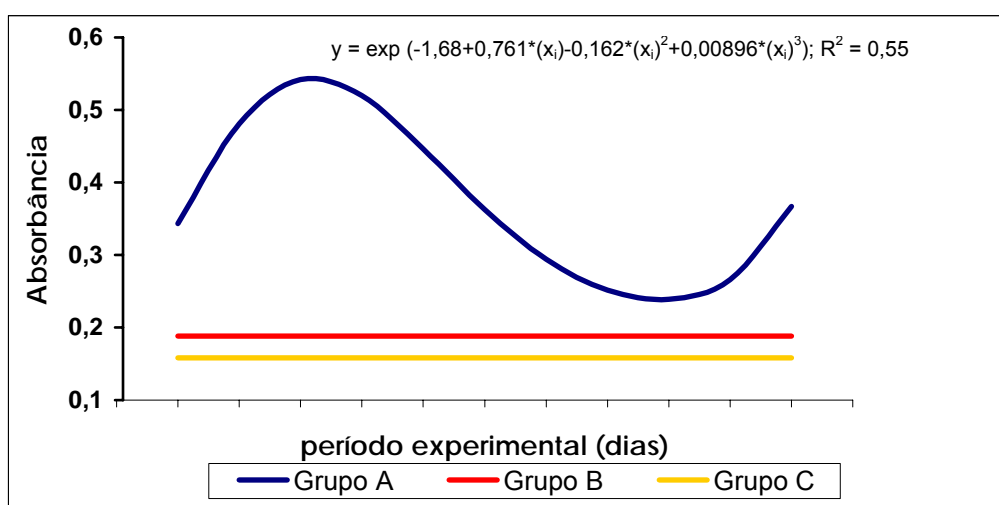
A fórmula usada para o cálculo foi composta da média aritmética dos resultados, somado três desvios padrão. Valores superiores a este foram considerados reagentes para o teste imunoenzimático.

## 3.3. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS NOS ANIMAIS IMUNIZADOS E COMPARAÇÃO COM A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS DOS ANIMAIS NÃO IMUNIZADOS.

Os valores de absorbância obtidos pela técnica ELISA indireto para cada grupo de animais segundo o tratamento, estão discriminados nas TABELAS 01, 02 e 03 do ANEXO 01. As médias das absorbâncias da reação antígeno-anticorpo do teste de

ELISA para os animais do grupo A, encontram-se acima do “cut-off”, estabelecido em 0,190.

Nos animais imunizados a produção de anticorpos foi progressiva atingindo pique máximo aos 45 dias (4ª semana) da primeira imunização, e seguiu com declínio, atingindo seu ponto mínimo aos 135 dias (9ª semana). Os animais do grupo A, imunizados com larvas de *Dermatobia hominis*, apresentaram diferença significativa na curva de regressão quando comparados aos outros grupos (controle e tratamento quimioterápico).



**FIGURA 05:** Comparação das densidades ópticas da reação antígeno-anticorpo, através do teste ELISA, distribuídas ao longo das colheitas de sangue, realizadas a cada 15 dias, entre os diferentes grupos de animais.

O comportamento da absorbância obtida nos bovinos imunizados (grupo A) (FIGURA 05), em relação ao longo do período experimental foi estatisticamente diferente dos grupos B e C ( $p < 0,05$ ). Estes dois grupos não apresentaram variação na produção de anticorpos durante o período do experimento. Nestes dois grupos de animais a média da D.O. ficou abaixo do valor do nível de corte, ou seja, considerados negativos. Entretanto, os animais do grupo B apresentaram, um valor de absorbância maior que o dos animais do grupo C. Isto pode ser explicado pela maior incidência de número de nódulos de larvas nos animais do grupo B.

Isto ressalta que o grupo A só teve valores de absorbância mais altos, devido a aplicação do extrato antigênico, mostrando que formaram anticorpos, e comprova que um pequeno número de nódulos de larvas, não é suficiente para induzir a formação de anticorpos suficientes.



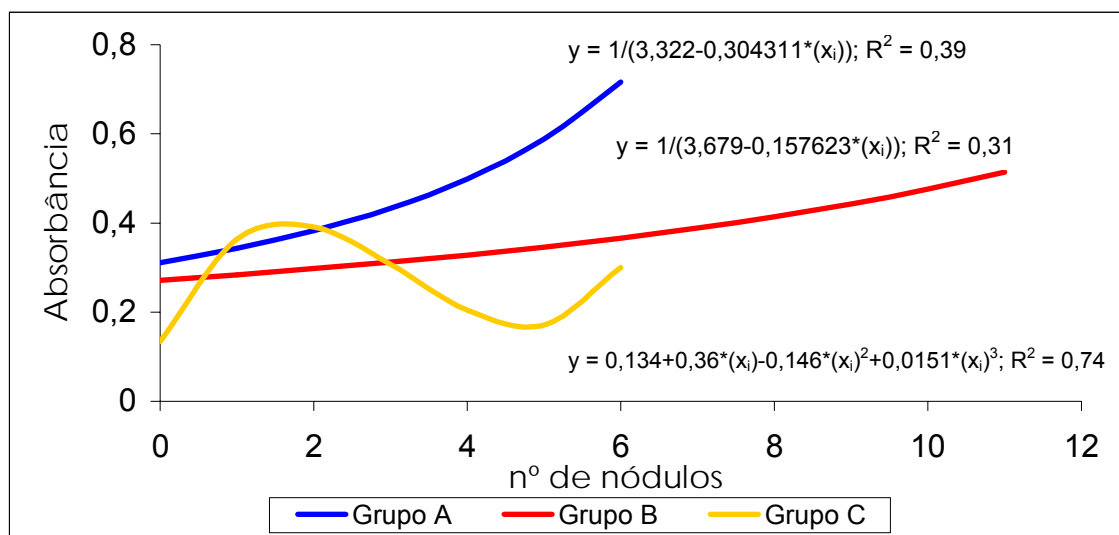
Quando se analisa o número de nódulos e os valores de absorvância (TABELA 01) é possível verificar que alguns animais apresentam valores menor ou maior que o esperado em função do número de nódulos, levando em consideração o valor do “cut-off”. Isto fez com que os valores encontrados não assumissem uma distribuição normal, por esse motivo, optou-se por analisar o comportamento de cada grupo em relação ao teste em função do número de nódulos (FIGURA 06). Os dados do teste ELISA foram ajustados para a curva de regressão.

TABELA 01: Densidade óptica obtida pela técnica de enzimoimunoensaio – ELISA e número de nódulos de larvas de *Dermatobia hominis* observados em bovinos da raça Nelore nos diferentes períodos de colheita realizados no período setembro de 2003 a fevereiro de 2004.

Grupo	Animal	set/03		out/03		nov/03		dez/03		jan/04		fev/04	
		Nód	D.O	nód	D.O	nód	D.O	nód	D.O	nód	D.O	nód	D.O
A	26	0	0,471	0	0,231	0	0,259	2	0,369	1	0,262	0	0,257
	27	0	0,112	0	0,447	6	0,420	0	0,162	0	0,083	1	0,445
	28	0	0,237	1	0,502	0	0,235	0	0,226	0	0,192	1	0,413
	29	0	0,288	0	0,353	0	0,129	1	0,392	3	0,325	0	0,262
	30	0	0,261	0	0,615	1	0,161	1	0,373	0	0,241	0	0,161
	31	0	0,142	0	0,725	1	0,684	0	0,097	0	0,082	0	0,131
	32	0	0,096	0	0,833	2	0,535	0	0,245	1	0,402	0	0,214
	33	0	0,390	0	0,462	0	0,382	3	0,451	4	0,642	0	0,230
B	34	0	0,102	2	0,075	3	0,216	0	0,148	0	0,125	2	0,309
	35	0	0,158	0	0,086	6	0,368	3	0,353	1	0,263	3	0,591
	36	0	0,259	4	0,305	11	0,521	6	0,304	1	0,564	5	0,704
	37	0	0,221	0	0,254	8	0,332	0	0,276	0	0,460	0	0,529
	38	0	0,316	0	0,300	2	0,312	0	0,156	0	0,394	0	0,279
	39	0	0,187	0	0,093	0	0,244	1	0,353	1	0,362	0	0,325
	40	0	0,360	1	0,596	0	0,350	0	0,278	0	0,299	0	0,228
	41	0	0,208	1	0,110	4	0,161	4	0,154	1	0,172	2	0,397
C	42	0	0,184	0	0,140	0	0,152	3	0,444	1	0,326	0	0,307
	43	0	0,180	0	0,172	0	0,143	0	0,083	0	0,202	0	0,109
	44	0	0,089	0	0,065	0	0,121	6	0,321	0	0,108	2	0,638
	45	0	0,146	0	0,072	0	0,088	0	0,084	0	0,078	1	0,324
	46	0	0,219	0	0,101	3	0,266	1	0,350	1	0,380	0	0,298
	47	0	0,110	0	0,081	0	0,064	0	0,085	0	0,107	0	0,109
	48	0	0,136	0	0,213	2	0,301	0	0,141	5	0,146	2	0,484
	49	0	0,091	0	0,069	0	0,075	0	0,062	2	0,105	0	0,335

O comportamento da absorvância (D.O) do teste ELISA em função do número de nódulos de larvas de *D. hominis*, observados nos bovinos imunizados, mostrou-se crescente e mais intenso do que nos bovinos não imunizados.

Analisando o comportamento dos animais do grupo C observa-se que a oscilação não linear pode ser devido à resistência individual, pois alguns animais não apresentaram infestação por larvas.



**FIGURA 06:** Absorvância obtidas dos soros de bovinos no teste ELISA, de acordo com o número de nódulos de *D. hominis* encontrados nos diferentes grupos.

### 3.4. EXAMES HEMATOLÓGICOS

Os valores hematológicos obtidos ao longo do experimento II encontram-se dentro dos parâmetros de normalidade para a espécie bovina, muito embora, como já discutido neste trabalho (Capítulo I), os conceitos sobre normalidade estabelecidos por diversos autores diferem, em função destes apresentarem influência de inúmeros fatores como: raça, sexo, idade, alimentação, alterações patológicas subclínicas e condições de estresse.

Como a resposta imune-celular produzida contra ectoparasitos está relacionada ao leucograma, este será discutido em maiores detalhes.

Nos leucogramas detectaram-se alterações significativas, uma vez que estas estão diretamente relacionadas com a defesa do organismo, atuando na identificação e neutralização de antígenos (JAIN, 1993).

Os resultados obtidos nos leucogramas dos animais do experimento II estão nas TABELAS de 01 a 06 do ANEXO 02, onde foi observada ligeira leucocitose, atribuída a monocitose encontrada em todo o período experimental. Nas colheitas realizadas a partir do mês de novembro, também foi observada discreta neutrofilia.

O objetivo da realização dos leucogramas foi avaliar a resposta celular de bovinos não imunizados e imunizados com o extrato de larvas de *D. hominis*, portanto os resultados obtidos foram avaliados quanto ao comportamento apresentado para cada tipo celular, de acordo com o número de nódulos e a resposta do teste ELISA.

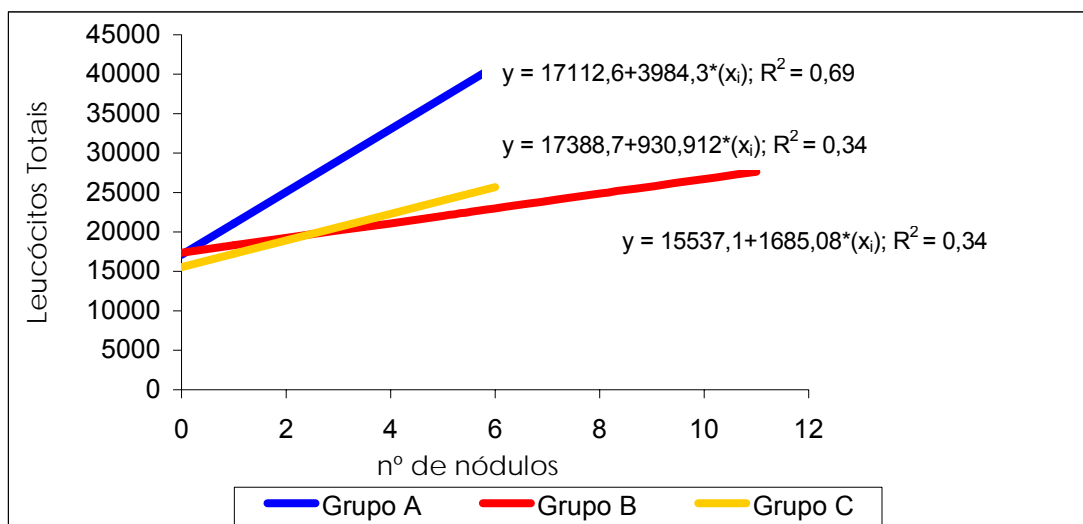
Como os valores para leucócitos totais apresentaram uma oscilação muito grande, os valores foram padronizados para melhor ajuste em função do número de nódulos encontrados.

Os animais dos três grupos de tratamentos (A, B e C) apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quanto ao número de leucócitos totais, muito embora o comportamento seja bastante semelhante, apenas mostrando um aumento mais significativo nos animais do grupo A (grupo de animais imunizados).

Alterações clínicas, quanto aos parâmetros fisiológicos, não foram observadas nos animais durante o transcorrer deste experimento, como também foi constatado por BARBOSA et al., 2002 ao avaliarem as alterações clínicas em bovinos experimentalmente infestados com larvas de primeiro estágio de *D. hominis*.

#### 3.4.1 Comparação dos Valores Hematológicos da Série Branca em Relação ao Número de Nódulos nos Diferentes Tratamentos

O comportamento do número de leucócitos totais, em relação ao número de nódulos de *Dermatobia hominis*, foi similar apresentando-se crescente nos três grupos de animais. A resposta observada nos animais do grupo A mostra uma melhor correlação entre estas variáveis, como explica o  $R^2$  da curva de regressão (FIGURA 07). Os animais dos três grupos de tratamentos apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ), muito embora o comportamento seja bastante semelhante, apenas mostrando um aumento de leucócitos mais significativo nos animais do grupo A, que foram aqueles imunizados com o extrato antigênico.

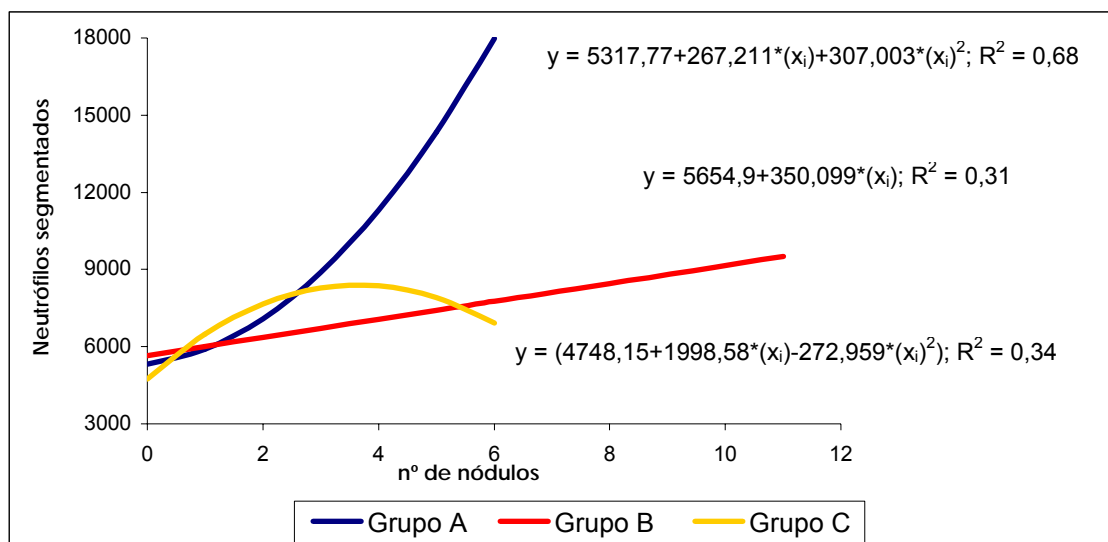


**FIGURA 07:** Variação do número de leucócitos em relação ao número de nódulos de *D. hominis*, nos três grupos de bovinos da raça Nelore.

Hemogramas de animais infestados artificialmente com larvas de primeiro estágio de *Dermatobia hominis*, em experimentos feitos por BARBOSA *et al.* (2003), não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle.

Quanto ao número de neutrófilos segmentados, o comportamento observado para os três grupos de animais do presente experimento foi distinto, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos e o comportamento entre cada grupo, também foi significativa (FIGURA 08).

Os grupos A e B apresentaram comportamento linear semelhante, mas o grupo dos animais imunizados apresentaram resposta mais acentuada. Isto demonstra a capacidade de produção de defesa do organismo que ocorre com muito mais intensidade e mais rapidamente nos animais imunizados.



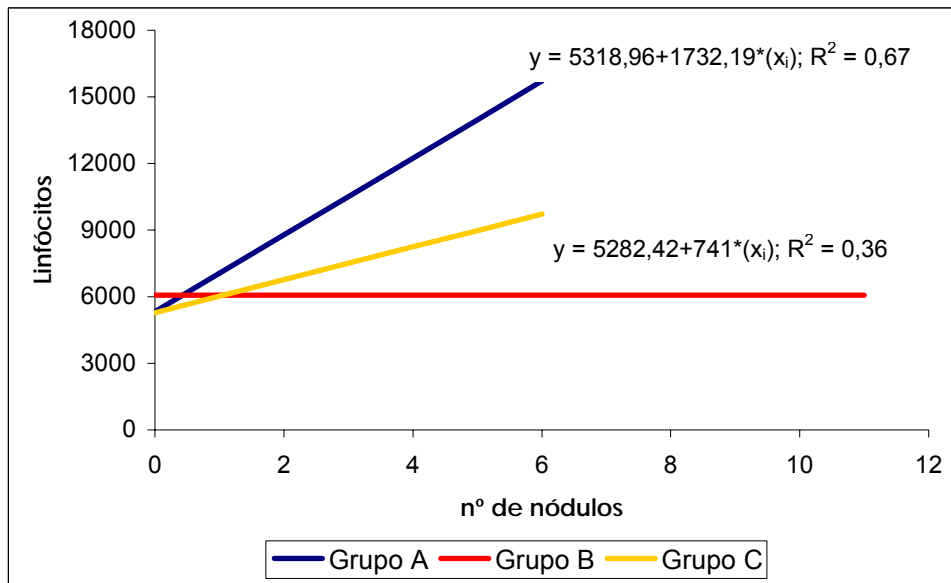
**FIGURA 08:** Variação do número de neutrófilos segmentados em relação ao número de nódulos de larvas de *D. hominis*, em bovinos infestados naturalmente e submetidos a imunização com extrato antigênico de larvas.

Ao comparar os resultados de  $R^2$  encontrados para os diferentes tratamentos, fica confirmada a melhor resposta dos animais que receberam o extrato de larvas, tendo este promovido uma resposta mais homogênea e mais eficiente com relação à produção de neutrófilos segmentados.

Os animais do grupo C apresentaram um comportamento quadrático, justificado pela presença do tratamento químico da propriedade, ou seja, quando os animais apresentaram um número crescente de nódulos, a resposta celular começou a ocorrer, mas em virtude do tratamento realizado, o número de nódulos diminuiu, diminuindo também o estímulo para resposta orgânica.

Quanto a variação do número de linfócitos, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos segundo o tratamento, com comportamento similar entre o grupo A e C. Nos animais do grupo B não foi observado nenhum efeito do número de nódulos em relação ao número de nódulos encontrados (FIGURA 09), apesar deste grupo ter apresentado maior número de nódulos.

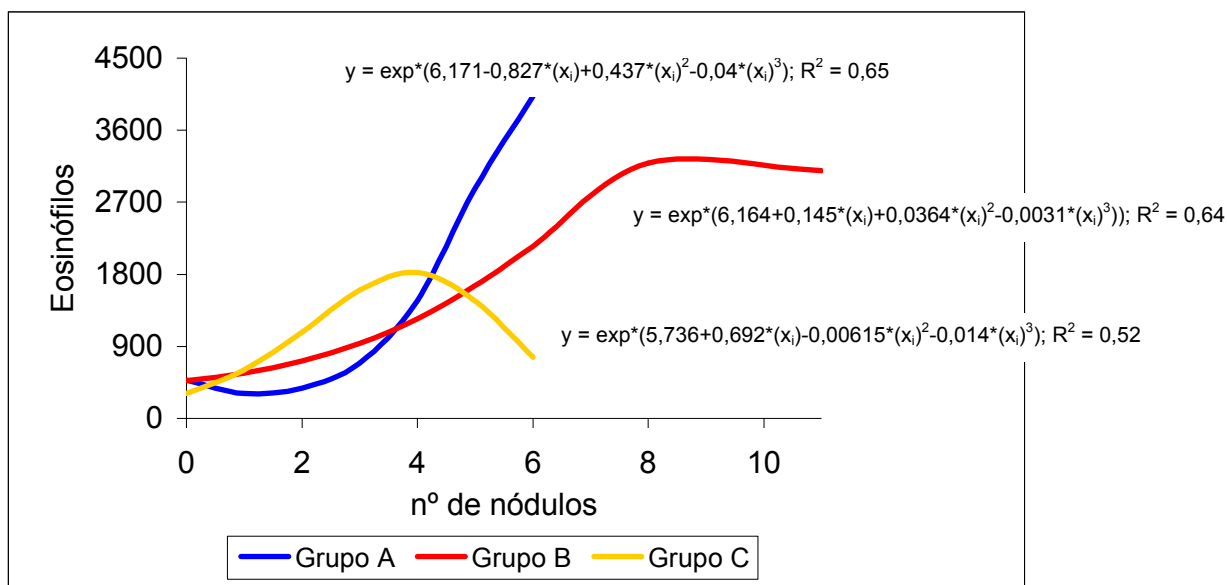
Assim como no número de neutrófilos segmentados, o grupo A também apresentou uma resposta mais efetiva quanto a produção de linfócitos, confirmado pelo  $R^2$  das curvas apresentadas.



**FIGURA 09:** Variação do número de linfócitos em relação ao número de nódulos de larvas de *D. hominis*, em bovinos infestados naturalmente e submetidos a imunização com extrato antigênico de larvas.

Ao estudar o comportamento dos eosinófilos, constatou-se a diferença entre os três grupos de tratamento ( $p < 0,05$ ). As curvas de regressão partem praticamente do mesmo ponto, demonstrando que a resposta celular depende do número de nódulos, e conseqüentemente do tratamento a que cada grupo foi submetido (FIGURA 10).

Isto ressalta a resposta orgânica na produção de eosinófilos nos indivíduos parasitados, que começam com uma resposta orgânica de comportamento muito próximo nos três grupos. Embora, a produção de tais células tenha sido mais efetiva no grupo de animais imunizados, como mostra a curva traçada e seu coeficiente de determinação.



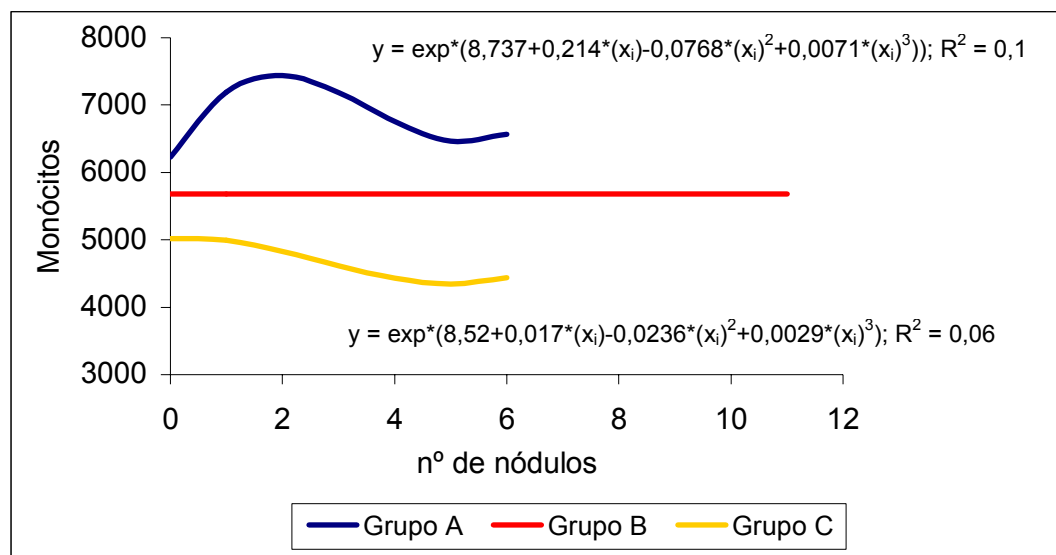
**FIGURA 10:** Variação do número de eosinófilos em relação ao número de nódulos de larvas de *D. hominis*, em bovinos infestados naturalmente e submetidos a imunização com extrato antigênico de larvas.

A resposta celular no grupo imunizado ocorre mais rapidamente e com mais intensidade que nos demais grupos. O grupo de animais controle (grupo B) apresenta uma resposta inicial satisfatória, mas esta não se mantém e é inferior ao grupo imunizado. Já o grupo de animais que recebeu tratamento quimioterápico (grupo C) apresentou declínio acentuado da resposta celular, justificado pela diminuição do número de nódulos frente ao tratamento. Assim, animais tratados com produtos químicos não têm imunidade frente a novas infestações, ou seja, o tratamento químico pode estar impedindo a formação de uma resposta imune mais efetiva.

Nos animais do grupo A os eosinófilos têm um comportamento crescente atingindo um número bastante elevado, em relação à normalidade, uma vez que esses resultados estão ajustados para as equações de regressão.

Quanto ao número de monócitos, quando comparados em função do número de nódulos, pode-se destacar um comportamento distinto para os três grupos de animais, os quais diferem significativamente ( $p < 0,05$ ). Só os animais do grupo B não apresentaram efeito estatístico na relação com o número de nódulos e a variação do número de células (FIGURA 11).

Embora tenham sido encontrados valores bem acima dos limites observados para a espécie bovina, fica demonstrado, que tal variação tem uma participação muito pequena na influência em relação ao número de nódulos, pelo  $R^2$  calculado.



**FIGURA 11:** Variação do número de monócitos em função do número de nódulos de larvas de *D. hominis*, em bovinos infestados naturalmente e submetidos a imunização com extrato antigênico de larvas

A resposta imunomediada por células, demonstrada através do aumento de leucócitos totais, nos diferentes tratamentos deste experimento, ocorreu principalmente em função do aumento de neutrófilos, eosinófilos e monócitos. Estes dados discordam do trabalho apresentado por BARBOSA *et al.* (1997), onde em relação à série branca, as médias obtidas da leucometria global, do número de neutrófilos, eosinófilos e linfócitos foram maiores no grupo de animais infestados artificialmente, porém sem diferença significativa em relação ao grupo controle (animais não infestados).

Em diversos trabalhos relacionados com a produção de defesa celular contra ectoparasitos e a reação inflamatória produzida, foi observado um aumento de neutrófilos e plasmócitos ao redor da área infiltrada. Essas alterações entre as células do infiltrado inflamatório, foram muito mais rápidas e eficientes nos animais em que houve um contato prévio com as larvas. Estes dados vêm de encontro aos resultados obtidos neste experimento pelos animais do grupo A (imunizados).



Ao realizar um experimento com biopsias de pele de ratos, experimentalmente infestados com larvas L<sub>1</sub> de *D. hominis*, PEREIRA *et al.* (2001), observaram que as primeiras células encontradas no infiltrado da inflamação foram os neutrófilos, após o sétimo dia de infecção quando as larvas de segundo estágio formaram-se, as células predominantes foram os neutrófilos e linfócitos, e após a formação da L<sub>3</sub>, predominaram os eosinófilos e neutrófilos.

LELLO *et al.* (1999) ao compararem a resposta tissular, frente a infestação artificial, de coelhos imunizados com extratos de larvas e sem a imunização, comprovaram que a reação inflamatória nos animais imunizados era mais intensa e precoce do que nos animais apenas infestados. As células predominantes no infiltrado inflamatório foram os neutrófilos e eosinófilos, que apareceram após as primeiras 24 hs no grupo imunizado.

LELLO e ROSIS (2000), mostraram que o contato prévio com o antígeno estimulou o rápido aparecimento do número de eosinófilos em camundongos.

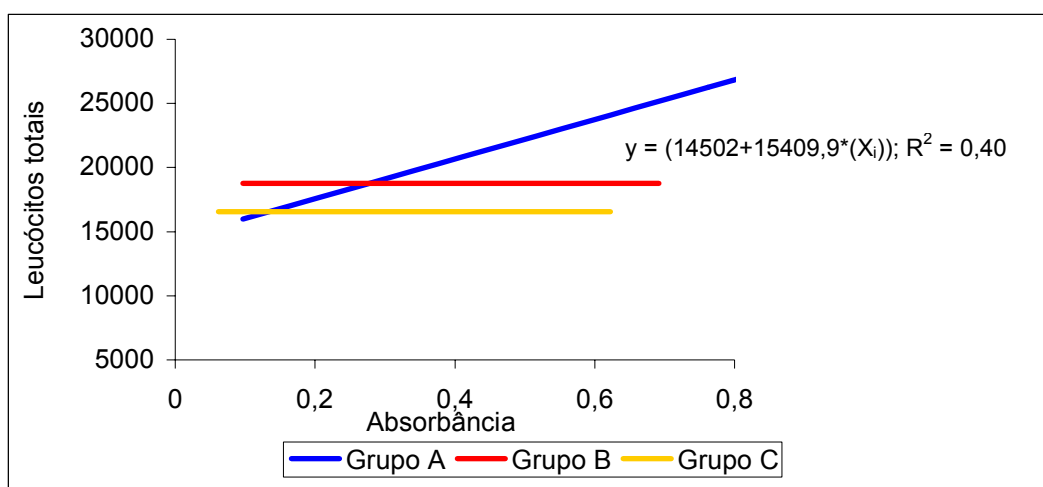
PEREIRA e LEITE (2002), estudaram a produção e aparecimento de eosinófilos em ratos infestados artificialmente e observaram que L<sub>1</sub> e L<sub>3</sub> estimulam maior produção das mesmas.

Em trabalho semelhante, a produção de eosinófilos foi constatada por LELLO e ROSIS (2003), ao infestarem artificialmente dois grupos de ratos, observaram através de biopsias que o número de células foi muito maior no grupo de animais previamente infestados. O mesmo ocorreu com o número de neutrófilos segmentados. Esses dados corroboram com os resultados apresentados por este trabalho.

Mecanismos de defesa das larvas de *D. hominis* têm sido estudados na tentativa de explicar a maior ou menor produção da defesa tissular do hospedeiro. LEITE e EVANGELISTA (2002), demonstraram através da microscopia eletrônica a ativação de neutrófilos no intestino delgado das larvas L<sub>3</sub>, o que contribuiria para o aumento celular no infiltrado inflamatório. FARALDO e LELLO (2003) estudaram as reações de defesa das células granulares e dos hemócitos nos mecanismos de encapsulamento de substâncias estranhas às larvas L<sub>3</sub>. Estes estudos confirmam o importante papel da resposta celular nos mecanismos de controle parasitário

### 3.4.2. Comparação do Diferencial de Leucócitos de Acordo com a Cinética de Anticorpos

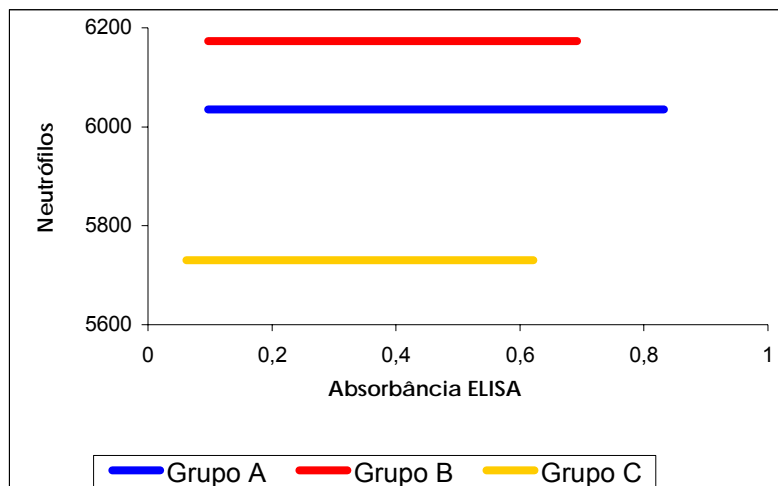
O número de leucócitos apresenta uma oscilação bastante acentuada nos diferentes tratamentos em virtude de estar diretamente relacionado a resposta imune-humoral do organismo. Este aumento do número de leucócitos totais pode ser observado ao avaliar seu comportamento em função da absorvância obtidas no teste ELISA (FIGURA 12), onde ocorre diferença significativa ( $p < 0,05$ ) somente entre os animais imunizados (grupo A).



**FIGURA 12:** Variação do número de leucócitos em relação a absorvância do teste ELISA, no soro de bovinos imunizados com extrato de larvas de *D. hominis* e infestados naturalmente.

Estes resultados confirmam a maior produção de anticorpos do grupo de animais imunizados em comparação aos demais, onde a variação de células brancas permanece constante. Os grupos B e C não apresentaram efeito estatístico no comportamento do número de células brancas quando comparados aos resultados das absorvâncias obtidas no teste ELISA.

A variação das médias do número de neutrófilos segmentados não apresentou efeito de comportamento em nenhum dos grupos estudados (FIGURA 13). Os animais do grupo controle, por possuírem um maior número de nódulos, apresentaram um maior número de neutrófilos que os demais grupos, mas sem influenciar a cinética de anticorpos.

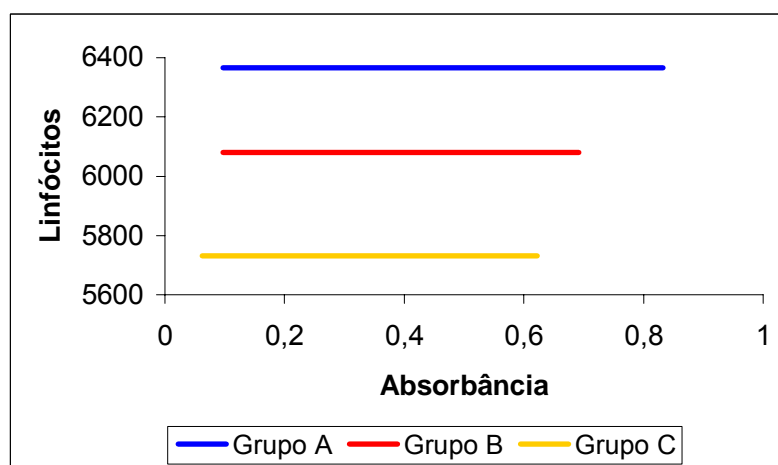


**FIGURA 13:** Variação do número de neutrófilos em relação a absorvância do teste ELISA, no soro de bovinos imunizados com extrato de larvas de *D.hominis* e infestados naturalmente.

Quanto ao número de linfócitos, observa-se que não houve alteração em seu comportamento em relação à absorvância obtida no teste ELISA.

O número médio de linfócitos do grupo de animais imunizados mostrou-se mais elevado que nos demais grupos onde não houve a imunização, com diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Este dado torna-se importante ao se destacar o papel dos linfócitos na resposta imune (FIGURA 14).

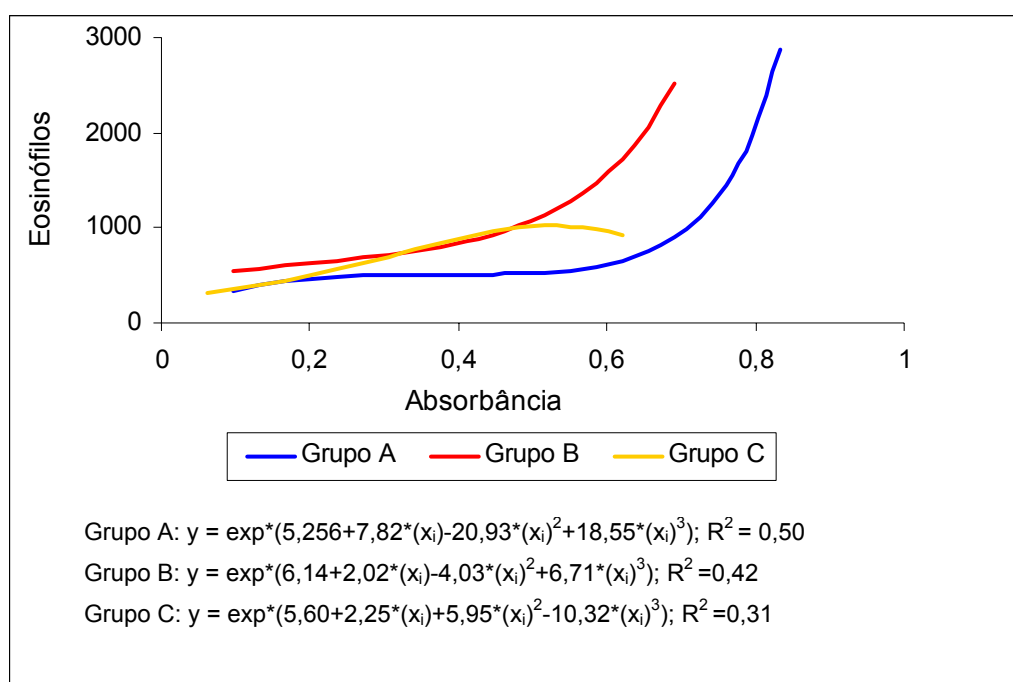
O número médio de linfócitos dos animais do grupo B (controle), também foi mantido próximo ao limite máximo da normalidade, por provavelmente ter apresentado um grande número de nódulos, e com isto ter iniciado a formação de anticorpos, mas não tão efetivamente quanto os animais imunizados.



**FIGURA 14:** Variação do número de linfócitos em relação a absorvância do teste ELISA, no soro de bovinos imunizados com extrato de larvas de *D.hominis* e infestados naturalmente.

O comportamento do número de eosinófilos em comparação com a absorvância do teste ELISA, (FIGURA 15), mostra uma correlação direta, ou seja, frente ao aumento da resposta de produção de anticorpos, há um aumento do número de células.

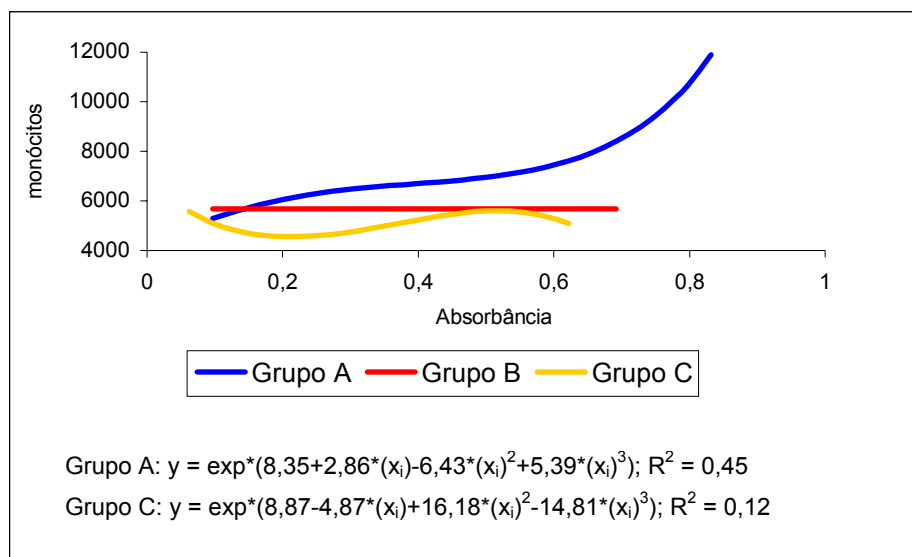
No grupo C, dos animais tratados com quimioterápico, também ocorre um aumento no número de células, mas muito discreto em relação aos grupos A e B, provavelmente em função do tratamento realizado, como já explicado anteriormente.



**FIGURA 15:** Variação do número de eosinófilos em relação a absorvância do teste de ELISA, no soro de bovinos imunizados com extrato de larvas de *D.hominis* e infestados naturalmente.

O número de monócitos nos animais controle (grupo B) não apresentou diferença significativa, em relação à absorvância do teste ELISA (FIGURA 16).

O grupo de animais imunizados (grupo A) apresentou marcante aumento no comportamento ( $p < 0,05$ ) e o grupo C apresenta uma ligeira oscilação no comportamento, mantendo-se próximo à normalidade. Os monócitos são células responsáveis pelo complexo monocítico fagocitário e estão em número alterado sempre que condições adversas acometam o organismo.



**FIGURA 16:** Variação do número de monócitos em relação a absorbância do teste de ELISA, no soro de bovinos imunizados com extrato de larvas de *D.hominis* e infestados naturalmente.

O presente trabalho mostra que a imunização de bovinos com extrato imunogênico de larvas de *Dermatobia hominis* altera a imunidade humoral, comprovada pela cinética da produção de anticorpos, através da técnica de enzimo-imunoensaio (ELISA).

Larvas de *D. hominis* infestando coelhos previamente imunizados induziram o aumento de títulos de anticorpos, mais rapidamente do que nos coelhos não imunizados. Estes títulos mantiveram-se ainda altos mesmo depois das larvas de terceiro estágio terem deixado o hospedeiro (PERAÇOLI *et al.*, 1980 ;LELLO e PERAÇOLI , 1993). Esses resultados corroboram com o presente experimento onde os resultados confirmam existir diferença no padrão da resposta imune entre os animais infestados naturalmente e os imunizados.

LELLO e BOULARD (1990) comprovaram a melhor resposta humoral de coelhos imunizados com antígenos utilizando larvas L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub> , do que em animais onde foram aplicados antígenos preparados com apenas um estágio larval (L<sub>1</sub> ou L<sub>2</sub> ou L<sub>3</sub>). Os extratos preparados com apenas um estágio larval não produzem resposta anamnésica, ou quando o fazem, esta apresenta títulos muito baixos e pouco duradouros.

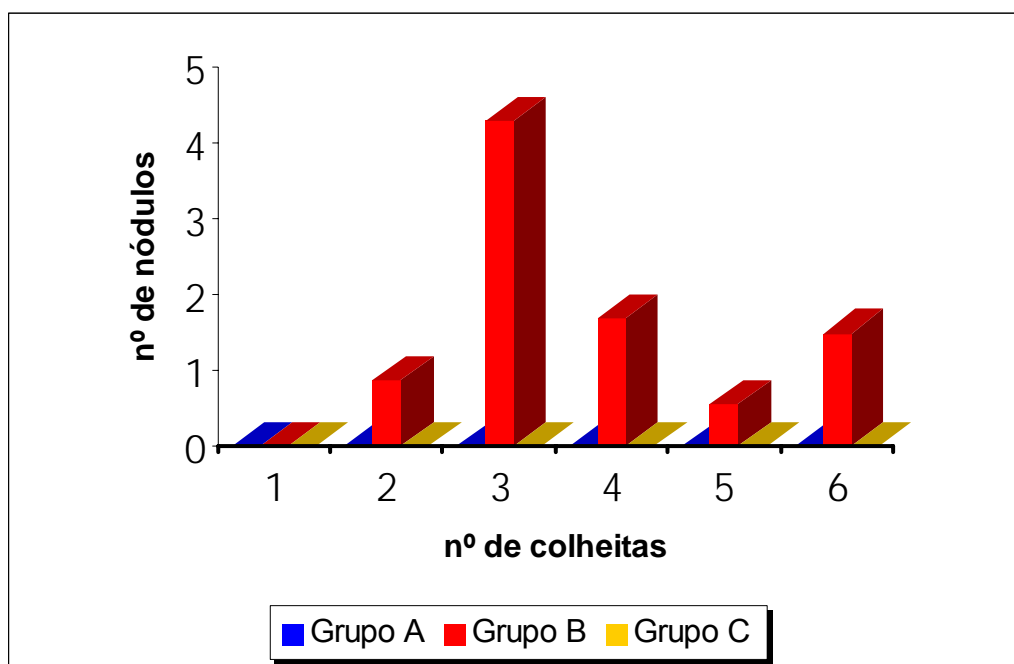
### 3.5. POPULAÇÃO DE LARVAS DE *Dermatobia hominis* OBSERVADA NOS ANIMAIS SUBMETIDOS A DIFERENTES TRATAMENTOS E GRUPO CONTROLE.

O número médio de nódulos observados nos animais de cada grupo (TABELA 02), durante as colheitas do experimento II, revela uma maior incidência de larvas no grupo de animais que não sofreram nenhum tipo de tratamento (grupo B), com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) dos grupos A, que corresponde a animais imunizados com o extrato antigênico, e o grupo C que são animais tratados com produtos químicos (FIGURA 17).

O comportamento observado nos animais do grupo B (controle) é similar ao apresentado pelos animais do experimento I, no mesmo período correspondente, ou seja, de setembro a fevereiro. Nos animais dos grupos A ocorreu uma oscilação quanto ao número de nódulos obedecendo a um comportamento similar ao grupo C, não existindo diferença significativa entre os mesmos. Entre os grupos A e B houve um significativo aumento do número de nódulos ( $p < 0,05$ ), sendo a infestação deste último, 148,3% maior que nos animais do grupo A. Isto demonstra que os animais imunizados adquiriram uma maior resistência ao parasitismo. O mesmo raciocínio pode ser utilizado para explicar o comportamento dos animais do grupo C, que receberam tratamento anti parasitário adotado pela propriedade.

TABELA 02: Número médio de nódulos de *Dermatobia hominis* observados em cada grupo de oito animais, durante o experimento II. Grupo A, animais imunizados; Grupo B, animais controle; e Grupo C animais tratados com quimioterápicos.

Meses	Número de nódulos		
	Grupo A	Grupo B	Grupo C
Setembro	0	0	0
Outubro	1	7	0
Novembro	10	34	5
Dezembro	7	14	10
Janeiro	9	5	8
Fevereiro	2	12	5
Total	29 <sup>a</sup>	72 <sup>b</sup>	28 <sup>a</sup>



**FIGURA 17:** Número médio de nódulos de *Dermatobia hominis* nos diferentes grupos de animais. Grupo A, animais imunizados com extrato protéico de larvas L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub>. Grupo B, animais controle e Grupo C, animais tratados com quimioterápicos.

O tratamento ao qual os animais do grupo C foram submetidos, foi através de banhos por aspersão à base de piretróides. Os banhos foram realizados com intervalos de 15 a 20 dias, a partir do início do mês de novembro, num total de quatro banhos.

#### 4. CONCLUSÕES

- Os extratos obtidos a partir de larvas de segundo e terceiro estágio de *Dermatobia hominis*, foram imunogênicos para bovinos.
- A produção de anticorpos dos animais do grupo imunizado atingiu um pico máximo aos 45 dias após a 1<sup>a</sup>. dose de imunização.
- O contato prévio com os antígenos de *Dermatobia hominis*, estimulou no hospedeiro, uma rápida produção de neutrófilos e eosinófilos.
- O número de nódulos de larvas de *Dermatobia hominis* encontrado nos animais do grupo controle, foi 148,3% maior que no grupo dos animais imunizados.



## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os danos causados pela dermatobiose abrangem desde o custo com medicamentos anti-parasitários, equipamentos e mão de obra; a queda no desempenho dos animais, que normalmente perdem peso, apresentam menores índices de fertilidade, diminuem a produção de leite e em alguns casos morrem (principalmente no caso de bezerros), até a diminuição da qualidade dos subprodutos, como o couro (70% do couro brasileiro é de 2ª e 3ª categoria forçando o país com o maior rebanho comercial do mundo a importar este subproduto).

As vantagens no controle da dermatobiose seriam imediatas no avanço da pecuária, hoje com o maior rebanho mundial, o Brasil deixa de ganhar bilhões de dólares na industrialização do couro. No Brasil, o couro representa 6% do preço do boi em pé, entretanto, nos EUA representa entre 10 e 12%. A diferença é devido à má qualidade do couro produzido no Brasil quando comparado àquele produzido nos EUA. Os produtores brasileiros deixam de receber de R\$ 20 a 25,00/boi (BRASPELCO, 2004). Mesmo com esta diferença o setor coureiro tem trazido mais divisas para o Brasil do que o setor de carnes. As exportações de carne chegaram a US\$ 1,52 bilhão em 1999 e as exportações de couro e sapatos chegaram a US\$ 1,84 bilhão (CACEX, 2004).

Para o uso de medicações estratégicas no controle do berne sobre os bovinos, é necessário o prévio conhecimento da sazonalidade deste parasita. O controle eficiente do berne resulta na redução do número de aplicações de drogas bernicidas sobre os animais, diminuindo o risco de consumo de carne ou leite contaminados por resíduos de drogas e os prejuízos econômicos advindos da sua infestação.

A comprovação da resposta imunológica dos animais, obtidos no presente trabalho, abre caminhos para a pesquisa de uma vacina obtida a partir do extrato imunogênico preparado com larvas. O que contribuiria ainda mais para a pecuária, diminuindo seus custos de produção e minimizando as agressões ao meio ambiente e aos produtos de origem animal.

## REFERÊNCIAS

- BARBOSA, C.G.; SANAVRIA, A; BARBOSA, M. P. R. C. Fase Parasitária e alterações clínicas em bovinos infestados experimentalmente com larvas de *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae). **Parasitologia Latinoamericana**, Santiago, v. 57, p. 15-20, 2002.
- BARBOSA, C.G.; SANAVRIA, A; BARBOSA, M. P. R. C. Alterações hematológicas em bovinos infestados experimentalmente com larvas de *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 2, p. 61-67, 2003.
- BARBOSA, C.G.; SANAVRIA, A; FREIRE, R. B. Dermatobiose bovina experimentalmente causada por larvas de *Dermatobia hominis*: Aspectos clínicos, hematológicos e imunológicos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 6, p. 62-66, 1997.
- BARBOSA, C.G.; SANAVRIA, A; FREIRE, R. B. Humoral immune response in cattle experimentally infested with larvae of *Dermatobia hominis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 3, p. 449-453, 2000.
- BORJA, G.E.M. Erradicação ou manejo integrado das miíases neotropicais das Américas?. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 32, p. 131-138, 2003.
- BRASPELCO. **O Brasil no mercado mundial do couro**. Disponível em: <http://www.braspelco.com.br/> Acesso em: 20 jun. 2004.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CACEX. **Câmara do Comércio Exterior**. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/> Acesso em: 20 jun. 2004.
- FARALDO, A.C.; LELLO, E. Defense reactions of *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae) larval hemocytes. **Biocell**, Mendoza, v. 27, n. 2, p. 197-203, 2003.
- FONSECA, A.J.C. **Aspectos imunológicos, atividade antibacteriana e efeito de várias doses de ivermectina sobre larvas de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (Diptera: Cuterebridae)**. Itaguaí, 1989. 23 f. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária) – Instituto de Biologia, Universidade Federal d Rio de Janeiro.

GILMOUR, A.R.; GOGEL, B.J.; CULLIS, B.R.; WELHAM, S.J.; THOMPSON, R. **ASRemL User Guide Release 1.0**. Hemel Hempstead, United Kingdom, 2002. HP1 1ES, ISBN 1-904375-07-3

GOMES, A.; HONER, M.R.; SILVA, R.L. Intensidade parasitária de larvas de *Dermatobia hominis* (L. Jr., 1781) (Díptera: Cuterebridae) em bovinos de diferentes raças criadas extensivamente na região de cerrado em Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 2, p. 103-106, 1996.

HORN, S.C.; ARTECHE, C.C.P. Situação parasitária da pecuária no Brasil. **A Hora Veterinária**. Porto Alegre, v. 4, n. 23, p. 12-32, 1985.

HONER, M.R.; GOMES, A. **O manejo integrado de mosca-dos-chifres, berne carrapato em gado de corte**. Campo Grande: EMBRAPA-CNPG, 1990. 60 p.

JAIN, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.

JANEWAY Jr., C.A.; TRAVERS, P. **Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença**. 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

LEITE, A.C.R.; EVANGELISTA, L.G. Activated host neutrophils in the larval midgut lumen of the human bot fly *Dermatobia hominis*. **Tissue and Cell**, Universidade de Siena: Itália, v. 34, n. 2, p. 98-102, 2002.

LELLO, E.; MOTA, N.G.S.; PERAÇOLI, M.T.S. Reação inflamatória causada pelo berne em coelhos imunizados ou não, com extrato antigênico de *Dermatobia hominis* (Díptera: Cuterebridae). **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 32, p. 458-461, 1980.

LELLO, E.; BOULARD, C. Rabbit antibody responses to experimental infestation with *Dermatobia hominis*. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 4, p. 303-309, 1990.

LELLO, E.; PERAÇOLI, M.T.S. Cell-mediated and humoral immune responses in immunized and/or *Dermatobia hominis* infested rabbits. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 47, p. 129-138, 1993.

LELLO, E.; PERAÇOLI, M.T.S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G. Inflammatory response in *Dermatobia hominis* infested rabbits. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 8, p. 287-291, 1999.

LELLO, E.; ROSIS, A. M. B. Reação inflamatória em camundongos infestados com larvas de *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae). **Naturália**, São Paulo, v. 25, p. 53-66, 2000.

LELLO, E.; ROSIS, A. M. B. Inflammatory reaction to the human bot-fly, *Dermatobia hominis*, in infested and reinfested mice. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 17, p. 55-60, 2003.

MINOZZO, J.C. **Teste de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) para imunodiagnóstico da cisticercose bovina**. Curitiba, 1997. 96 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

MINOZZO, J.C. **Imunoeletrotransferência e Enzimoimunoensaio como Ferramentas para o Imunodiagnóstico da Neurocisticercose**. Curitiba, 2003. 114 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

MOTA, N.G.S.; PERAÇOLI, M.T.S.; LELLO, E. Anticorpos circulantes em coelhos imunizados com antígenos obtidos de larvas de *Dermatobia hominis* Lin. (Díptera: Cuterebridae). **Ciência e Cultura**. São Paulo, v. 32, n. 4, p. 453-457, 1980.

MORAES, F.R.; COSTA, A.J.; VASCONCELOS, O.T.; ROCHA, U.F. Ensaio comparativo de susceptibilidade natural de zebuínos e taurinos à larva de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781). **A Hora Veterinária**. Porto Alegre, v. 2, n. 2, p. 247-253, 1986.

OLIVEIRA, C.B.; ALENCAR, M.M. Resistência de bovinos de seis graus de sangue Holandês-Guzerá a carrapato (*Boophilus microplus*) e ao berne (*Dermatobia hominis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 42, n. 2, p. 127-135, 1990.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G.; SEQUEIRA, J.L.; SCHIMITT, F.L.; LELLO, E. Histological and immunological reaction of cattle skin to first-instar larvae of *Dermatobia hominis*. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 10, p. 323-330, 1996.

PERAÇOLI, M.T.S.; LELLO, E.; MOTA, N.G.S. Comportamento da resposta imune-humoral em coelhos imunizados com antígenos de *Dermatobia hominis* Linnaeus, frente às larvas desse parasita (Díptera: Cuterebridae). **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 32, n. 11, p. 1537-1542, 1980.

PEREIRA, M.C.T.; LEITE, A.C.R. Eosinophil and mast cell expression in host skin during larval development of the human bot fly *Dermatobia hominis*. **Parasite**, v. 9, n. 4, p. 333-339, 2002.

PEREIRA, M.C.T.; LEITE, V.H.R.; LEITE, A.C.R. Experimental skin lesions from larvae of the bot fly *Dermatobia hominis*. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 15, n. 1, p. 22-27, 2001.

PESSOA, S.B. **Parasitologia Médica**. 11ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 872 p.

PINTO, S.B. **Aspectos bioecológicos e imunológicos de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (Díptera: Cuterebridae)**. Curitiba, 2001. 135 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

PINTO, S. B.; SOCCOL; V. T.; MINOZZO, J. C.; ZABOTT, M. V.; VENDRUSCOLO, E. G.; ROCHADELLI, R.; FREITAG, A.; GUETNER, C. Resposta imune humoral de coelhos frente a extratos de larvas de *Dermatobia hominis*. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 8, n. 2, p. 19 - 25, 2003.

REIS, M.M. **Testes Imunológicos: manual ilustrado para profissionais da saúde**. Porto Alegre: AGE, 1998. 112 p.

RODRIGUES, B. R. ***Dermatobia hominis* (L. Jr., 1781) (Díptera: Oestridae: Cuterebrinae)**: ciclo silvestre e ecologia das infestações de bovinos pelo berne no município de Pedro Leopoldo, MG, Brasil. Belo Horizonte, 1998. 101 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

SANAVRIA, A.; LOPES, C. W. G.; BORJA, G.E.M. Histologia da pele de bovino na infecção experimental por *Dermatobia hominis*. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Itaguaí, v. 10, p. 9-23, 1987.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, I. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 76, n. 9, p.4350-52, 1979.

ULLOA, G.; ALBA, J. Resistência e los parásitas externos en algunas razas de bovinos. **Turrialba**, São José, v. 7, p. 8-12, 1957.

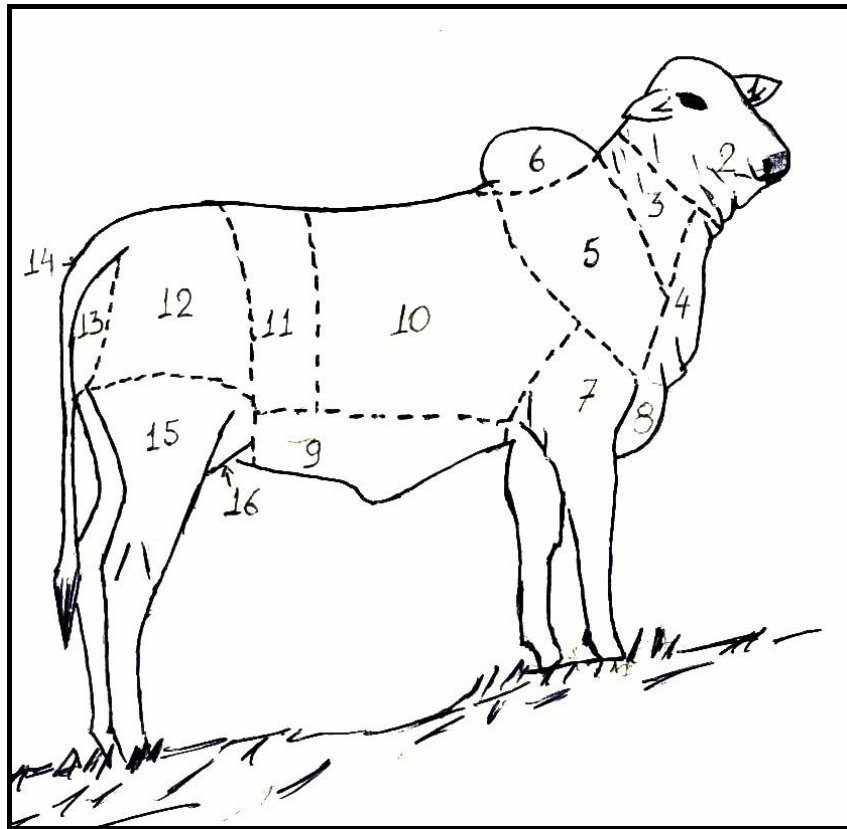
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. Centro de Processamento de Dados. UFV. **Sistema para Análises Estatísticas – SAE 8.0**, Viçosa, 2002.

## ANEXOS

## ANEXOS CAPÍTULO I

## ANEXO 01

Ficha para anotar a localização corpórea dos nódulos cutâneos formados por larvas de *Dermatobia hominis*. Divisão zotécnica das unidades experimentais.



Região	Nódulos		Região	Nódulos	
	Direita	Esquerda		Direita	Esquerda
Orelha			Ventre		
Cabeça			Costela		
Pescoço			Flanco		
Barbela			Anca		
Paleta			Períneo		
Cupim			Cola		
Memb. Torácico			Memb. Pélvico		
Peito			Virilha		
TOTAL					

## ANEXO 02

## Tabelas das variáveis climáticas

TABELA 01: Padronização das variáveis de temperatura, número de nódulos de larvas de *Dermatobia hominis*, índice pluviométrico e umidade relativa, ao longo do experimento I.

Mês	nº nód.	IP	UR	TEMP
mai/02	1,012494	2,180876	8,627252	6,278661
jun/02	0,695188	0,042995	7,502353	5,743040
jul/02	0,675485	0,200148	7,629357	5,118150
ago/02	0,840170	0,443292	5,914793	6,189391
set/02	1,210012	0,686435	6,440956	5,981094
out/02	1,825228	0,902892	7,520496	7,320145
nov/02	2,608450	3,651596	6,858257	7,201118
dez/02	3,194625	0,756116	6,858257	8,153332
jan/03	3,032931	0,689400	6,722180	7,885522
fev/03	2,019037	1,129726	4,771750	7,796252
mar/03	0,852508	0,345441	5,914793	6,605984
abr/03	0,206518	1,014085	7,184841	5,564500

Equação de regressão:

▪ nº de nódulos:  $y_{ij} = \exp*(1,1347-1,08076*(x_i)+0,273935*(x_i)^2-0,01671924*(x_i)^3)$



TABELA 02: Dados das temperaturas (em °C) máximas diárias, com a mínima, média e máxima, registradas pelo SIMEPAR, entre os meses de maio e dezembro de 2002.

Dias	Meses							
	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
1	27,5	24,7	27,8	21,2	17,8	27,7	30,4	34
2	28,9	25,6	26,9	14,5	18,5	29,6	31,8	25,6
3	25,2	26,6	25,2	16,6	22	25,9	32,8	31,5
4	27,9	26,7	25,7	23,4	25,1	28,9	27,4	30,9
5	24	26,6	23	24,9	26,4	32,7	28,5	34,6
6	23,5	28,4	23,2	28,9	34	31,7	29	34,1
7	29,2	29,1	15,2	29	21,9	34,1	28,7	27,1
8	24,5	27,7	16,4	29,2	26,9	30,7	29,7	29,5
9	25,9	27,9	18	24,4	25	32,8	33,9	29,5
10	27,7	26,4	22,7	24,8	28,6	33,5	30,2	32
11	29	28,4	18,1	27,7	30,1	33,7	26,3	33,7
12	29,2	19,9	20,9	28,9	23,4	24,4	25,3	32,6
13	29,4	18,6	20,1	30,6	23,5	27,2	28	33,2
14	29,8	17	23,1	29	27,6	26,9	22,1	33,9
15	30,5	19,2	24,9	27,9	32,1	32,5	24,2	30,8
16	26,2	24,5	26,3	28,2	29	31,1	28,6	34,3
17	27,5	26,6	26,4	29,1	27,8	29,1	32,1	33,8
18	22,2	23,2	21,2	29	24,3	29,5	31,7	36
19		20,9	22,3	28,8	28,5	29,6	31,2	34
20	21,8	25,5	22,3	24,4	20	31,9	33	31,7
21	18	27,9	22,2	21,5	22,2	27,9	29	33,6
22	22,6	19,8	24,4	27,7	25,2	26,5	30,9	32,5
23	25,1	19,2	23,9	29	26,1	29,6	33,7	33,5
24	24,1	20,8	27,2	30,1	27,3	32,1	35,4	29,7
25	23,3	22,9	24,5	30	26,6	31,4	33,1	29,7
26	24,7	24,7	26,1	34,3	28,8	29,3	35,9	35,4
27	26,2	25,7	18,9	29,2	28,9	30,8	36,5	34,8
28	25,4	26,7	21,3	28,4	29,3	26,6	27	33,8
29	19,2	27,1	21,8	24	30,8	24,3	28,9	36,7
30	18,7	28	20,6	22	35,6	29,2	32,6	37,2
31	20,1		27,4	19,9		27,9		36,1
Min	18	17	15,2	14,5	17,8	24,3	22,1	25,6
Max	30,5	29,1	27,8	34,3	35,6	34,1	36,5	37,2
Med	25,2	24,5	22,8	26,3	26,4	29,6	30,3	32,8

TABELA 03: Dados das temperaturas (em °C) máximas diárias, com a mínima, média e máxima, registradas pelo SIMEPAR, entre os meses de janeiro e abril de 2003.

Dias	Meses			
	Jan	Fev	Mar	Abr
1	35,9	33,1	37	33,2
2	35	33,1	36,4	35,5
3	38,8	35,9	36	31,2
4	31	33,7	35,5	28,8
5	38,9	32,9	34,4	26,8
6	31,9	32,9	34,4	27,1
7	39,1	34,9	34,5	18,4
8	36,6	32,8	33	30,4
9	37,7	34,2	31,6	22,9
10	37,2	28,6	31,6	23,4
11	25	28,8	28,3	24
12	33,1	29,4	31,4	22,4
13	32,8	22,5	31,9	25,8
14	36,4	37,1	34,5	27,7
15	37,6	31,6	34,9	29,8
16	35,4	31,1	34,9	30,7
17	36,5		33,7	29,4
18	34,8	29,2	32,7	30,1
19	35	32,3	32,9	20,6
20	34,2	32,8	31,6	23,6
21	32,1		26,1	27,3
22	38,1		30,3	31,5
23	28,2		31,9	31,5
24	35,8		31,9	30
25	36,2		32,8	30,2
26	34	30	29,7	30,6
27	33,6	35,3	31,7	30,7
28	32,7	36,3	32,8	31
29	34,3		33,6	32,1
30	38,1		31,7	33,6
31	40,8		34,8	
Min	25	22,5	26,1	18,4
Max	40,8	37,1	37	35,5
Med	35,1	32,2	32,9	28,3

TABELA 04: Dados das temperaturas (em °C) médias diárias, com a mínima, média e máxima, registradas pelo SIMEPAR, entre os meses de maio e dezembro de 2002.

Dias	Meses							
	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
1	21,8	20,7	22,3	17,8	12,1	23,1	22,7	28
2	22,4	21,4	20,9	12,5	10,6	25,1	24,5	23,8
3	21,1	22,1	20,9	11,2	12,8	22,1	27,2	25,4
4	23,5	22,1	21	15,7	17,1	23,9	22	26,6
5	22,4	21,7	19	19,8	20,8	27	22,5	27,6
6	21	22,1	18	20,9	24,3	26,3	23,4	27,5
7	23,6	23,4	12,5	22,9	17,4	27,5	22,8	23,6
8	21,8	22,1	12	23,8	17,8	26	21	24,7
9	21,7	22,5	11,4	20,8	20,9	26,4	19	25,7
10	22,8	21,5	13,8	16,3	22,6	26,1	20,8	25,9
11	23,7	21,1	15,4	19,6	24,8	25,6	20,1	27,6
12	23,7	17,2	16,1	21,9	20,5	23	20,8	27,4
13	24,3	16,3	13,5	23,3	19,9	22,8	22,5	26,5
14	24,7	15,2	13,7	22,6	21,4	24,2	19,8	26,8
15	25,5	15	15	23,6	22	26,1	20,6	26
16	23,9	18	16,6	23	22,9	24	22,9	26,5
17	22,6	20,4	17,2	23,2	23,9	24,6	26,4	27,6
18	21,1	18,8	15,4	23,6	22,7	25,3	26,3	28,2
19		16,5	16,7	24	22,9	25	26,3	29,2
20	19,6	18,4	18,4	21,4	16,8	26,8	29,1	26,9
21	15,7	20,5	20,1	19,3	15	23,1	24,3	25,7
22	16,4	16,2	20,1	23,8	16,5	19,7	25,6	27,3
23	18,4	14,2	19,4	23,4	19,6	23,5	26,8	28,2
24	19	14,8	21,8	24,3	20,3	26,5	28,1	26,6
25	18,5	14,3	20,8	24,5	19,8	27	27,5	23,9
26	18,9	16,4	19,8	24,3	20,9	23,7	29	26,4
27	19,7	19,6	16,2	22,9	21,9	23,2	27,4	27,6
28	20,3	20,9	13,7	23,7	24,1	23,9	24,3	27,9
29	18	22,4	14,8	19,5	25,1	22,4	24,9	30
30	17,7	22,8	17,5	16,3	25,2	24,2	26,8	28,3
31	18,5		20,5	15,3		23,6		28,4
Min	15,7	14,2	11,4	11,2	10,6	19,7	19	23,6
Max	25,5	23,4	22,3	24,5	25,2	27,5	29,1	30
Med	21,1	19,3	17,2	20,8	20,1	24,6	24,2	26,8

TABELA 05: Dados das temperaturas (em °C) médias diárias, com a mínima, média e máxima, registradas pelo SIMEPAR, entre os meses de janeiro e abril de 2003.

Dias	Meses			
	Jan	Fev	Mar	Abr
1	28,5	26,3	29,7	25,3
2	27,4	27,1	29,2	25,9
3	26,9	28,9	27,6	24,9
4	25,4	26,8	27,8	24,5
5	27,9	26,7	28,3	22,3
6	26,9	26,6	28,5	21,7
7	28,8	26,9	27,5	16,3
8	29,3	27,1	25,6	21,3
9	30	27	26,1	20,5
10	29,6	24,1	26,2	20,5
11	23,8	24,2	24,6	18,9
12	26,4	24,2	26,4	16,2
13	26	21	25,4	17,1
14	27,5	25	26,2	19
15	28,5	25,9	28,1	20,4
16	28,5	26,8	27,1	22
17	29,2		25,7	22,5
18	28,3	27,7	27	24,1
19	29,1	28,1	27,2	18,6
20	27,6	27,9	25,7	17,6
21	26,7		21,6	19,2
22	29,3		22,3	24,4
23	25		24,6	24,9
24	27,1		25,1	24,8
25	26,3		25	24,7
26	24,9	27,4	25,1	25
27	26	28,6	25,1	25,3
28	26	29,1	26,1	25,5
29	27,1		25,4	25,9
30	27,6		25,1	26,2
31	28,7		25,7	
Min	23,8	21	21,6	16,2
Max	30	29,1	29,7	26,2
Med	27,4	26,5	26,2	22,2

TABELA 06: Dados das temperaturas (em °C) mínimas diárias, com a mínima, média e máxima, registradas pelo SIMEPAR, entre os meses de maio e dezembro de 2002.

Dia	Meses							
	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
1	17	18,1	18,8	14,4	6	19,3	17,7	24,3
2	20,2	18,6	15,9	10,4	3,8	20,6	15,9	21,7
3	19,2	19	17,8	8	4,2	18,9	22,5	22
4	20,5	18,5	17,7	9,2	8	18,7	20,3	23,9
5	20	18,3	15,9	16,8	16,4	22,5	16,9	23,9
6	18,4	19,2	13,4	16	18,1	21,9	19,7	23,6
7	20,8	19,3	10,8	17,6	14	23,1	17,8	20,5
8	19,4	17,6	9,2	18,6	12	22,1	0	20,7
9	19,6	19	5,3	14,9	18,8	21,6	0	22,8
10	18,5	18,3	7,3	8,7	18	22,4	0	21
11	20,4	17,9	13,3	13,6	20,7	22	13,9	22,8
12	19,2	15,4	11,3	15,4	17,8	21,4	17,3	23,4
13	20,3	14,9	9	17	17,3	19,2	18	20,5
14	20,7	13,3	6,8	18	16,7	21	17,9	20,4
15	22	12,9	8,4	19,6	18,7	22,2	18,1	23,2
16	20,8	13,5	10	18,1	18,9	20,8	18,5	21,4
17	20,1	15,6	9,5	18,5	20,1	21	22,2	23,4
18	18,7	15,7	10,8	18,9	21,1	22	23,3	21,4
19		14,1	11,5	19,2	20,1	21,6	22,3	24,9
20	18	13,1	15,5	19,6	12,3	22	25	23,5
21	12,9	16,6	18,4	18,6	9	16,7	21	23,2
22	12,8	12,6	17,6	19,9	8,5	15	20,9	22,5
23	13,8	11,3	15,5	19,7	13	16,8	21,4	23,6
24	14,2	12,2	17,7	18,6	13,6	22,1	22,2	22,7
25	14,6	9,2	18,5	20,4	12,5	23,8	23,8	19,4
26	14,7	9,6	17,9	17,6	13,5	19,7	24,4	19,9
27	15,2	14,8	11,7	17,8	14,3	18,5	24,1	23
28	15,6	16,1	7,8	18,9	19,1	19,9	22,2	20,9
29	16,4	17,6	7,6	15,1	19,5	20,6	22,4	23,8
30	16,9	19,4	15	12	21,5	20,8	23,4	24,7
31	15,9		17	12,7		20		22,6
Min	12,8	9,2	5,3	8	3,8	15	0	19,4
Max	22	19,4	18,8	20,4	21,5	23,8	25	24,9
Med	17,9	15,7	13	16,3	14,9	20,6	18,4	22,4

TABELA 07: Dados das temperaturas (em °C) mínimas diárias, com a mínima, média e máxima, registradas pelo SIMEPAR, entre os meses de janeiro e abril de 2003.

Dia	Meses			
	Jan	Fev	Mar	Abr
1	23,7	22,6	24,2	19,9
2	23,9	23,3	24,4	19,9
3	23,9	22,6	22,9	20,6
4	23,3	22,3	23	22,2
5	22,9	23,7	23,9	20,2
6	23,8	23,3	24,6	18
7	22,1	23,9	24	13,8
8	22,6	23,8	23	14,6
9	24,3	22,7	23	19
10	23,2	22,1	23,4	18,5
11	22,5	20,8	22,6	14,7
12	22,6	20,8	22,9	10,9
13	23	19,6	20,9	9,3
14	23,1	20,1	19,9	12
15	24	23,1	23,2	12,9
16	24,4	24,2	22,5	15,4
17	24,8		20,3	16,6
18	23,1	26,4	23,3	19,3
19	23,4	24,6	22,5	15,9
20	22,3	25,4	19,9	13,1
21	21,8		19,1	11,2
22	24,4		17,1	20,2
23	21,5		20,2	21,2
24	22,9		19,7	20,9
25	23,7		19,7	20,1
26	21,3	25,7	21,2	20,4
27	20,8	22,7	20,6	20,6
28	20	22,7	20,7	22,1
29	21		21,1	21,2
30	23,6		18,7	21,1
31	23,3		19,4	
Min	20	19,6	17,1	9,3
Max	24,8	26,4	24,6	22,2
Med	22,9	23	21,7	17,5

TABELA 08: Dados da umidade relativa do ar (em %) diária, com a mínima, média e máxima, registradas pelo SIMEPAR, entre os meses de maio e dezembro de 2002.

Dias	Meses							
	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
1	78	87,1	84	95,8	54,4	82,3	74,3	79,1
2	82,7	84,1	81,3	94	56,8	80,3	66,6	91
3	93,9	79,5	76,1	78,9	60,8	85,8	68,2	85,4
4	90,9	78,4	73,4	80,8	59,7	80,8	87,3	85
5	97,6	79,1	87,2	91,8	54,5	75,6	70,4	79,8
6	95	80,1	93,3	85,2	61,9	70,7	65,8	79,7
7	88,5	74,2	84,3	80,6	60,6	70,7	58,8	90,1
8	96,3	84	73,4	71,2	62,1	79,5	58,6	76,9
9	89,1	78,3	78,3	69,6	74,8	78,2	22,3	77,2
10	84,6	79	78,6	62,4	78,8	80	43,9	71,8
11	81,2	88,9	87,6	73,3	71,5	80,3	60	72,3
12	77,6	91,6	86,5	80,5	87	83,8	64,9	77,3
13	75,8	89,4	75,4	67,7	92,1	89,2	82,8	67,8
14	73,1	93,2	78,2	73,4	77,7	86,5	94,2	70,5
15	80,8	90,9	82,8	68,7	85	79,9	92,7	79,4
16	85,4	90,3	78,3	74,5	80,4	82,2	94,1	82,8
17	91,4	83	71,3	68,1	80,1	83,7	87,3	85,7
18	95,7	88,2	74,2	62	90,2	77,6	82,8	76,5
19		90,9	77,9	63,5	91	77,9	83,7	76,6
20	97,1	88,2	84,7	77,6	87,7	73	79,1	80,3
21	90,8	87	86,7	96,9	64,3	79,5	85,9	87,4
22	87,5	85,1	88,6	77,6	68,1	63,4	81,1	80,5
23	80,4	80,3	88,6	74,2	68,3	71,3	73,2	78,9
24	72,8	78,4	78,9	66,5	55,2	70,7	77,1	81
25	76,4	79,6	86	65,4	67,6	76,1	80,9	79,6
26	72,9	76,9	93,1	56,1	70,2	85	76,3	75,5
27	70	72	93,8	64,1	68,7	80,4	82,6	72,2
28	69,7	73,6	71,1	64,1	62,4	82,8	93,1	69
29	85,3	74	75,6	91,1	67,1	96,1	91,8	67,5
30	95,3	75,9	74,9	77,1	71,2	84,1	86,8	75,6
31	95,1		84,1	65,2		82,9		75,6
Min	69,7	72	71,1	56,1	54,4	63,4	22,3	67,5
Max	97,6	93,2	93,8	96,9	92,1	96,1	94,2	91
Med	85	82,7	81,6	74,8	71	79,7	75,6	78,3

TABELA 09: Dados da umidade relativa do ar (em %) diária, com a mínima, média e máxima, registradas pelo SIMEPAR, entre os meses de janeiro e abril de 2003.

Dias	Meses			
	Jan	Fev	Mar	Abr
1	75,8	85,2	72	68,4
2	82,3	80,5	70	73
3	84,4	73,4	74,6	81,4
4	92,2	80,4	77,3	88,7
5	79,8	84,5	74,4	80,7
6	84,3	83,6	74,1	70,8
7	71,7	84,3	79,2	87,1
8	69,4	80,5	88,8	68,9
9	68,5	82,5	85	88,2
10	74,6	95	84,7	95
11	92	87	86,7	71,9
12	83,4	88,5	76,9	64,4
13	86,2	94,8	74,9	65,2
14	81,1	83,4	74,3	70,4
15	75,6	87,4	74,1	76,5
16	75,6	87,2	78,4	75,8
17	76,7		74,6	75,9
18	77,4	80,8	70,7	79,2
19	76,6	80,4	73,5	90,5
20	83,5	84,2	81,4	78,6
21	76,3		82,4	83,9
22	78		81,7	85,2
23	90,3		72,9	83,9
24	77,2		68,3	80,5
25	88,1		73,2	82,6
26	92,1	74,2	76,2	82,7
27	80,8	73,3	78,7	83,3
28	69,4	71,7	77,4	84,6
29	72,6		73,1	80,8
30	73,9		69,5	78,3
31	74,1		65,2	
Min	68,5	71,7	65,2	64,4
Max	92,2	95	88,8	95
Med	79,5	82,9	76,3	79,2



TABELA 10: Dados do índice pluviométrico (em mm) diário, com a mínima, média e máxima, registradas pelo SIMEPAR, entre os meses de maio e dezembro de 2002.

Dias	Meses							
	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
1	0	0,6	0	1,8	0	1	0	0
2	4,4	0	0	1,6	0	0	0	11,4
3	2,2	0	0	0	0	63	0	0
4	6,4	0	0	0	0	0	37,8	0
5	47,4	0	0	0,8	0	0	0	0
6	0	0	6,4	0	0	0	0	0,2
7	0	0	0,6	0	0	0	0	36,2
8	46	0	0	0	0	8,8	26	0
9	2	0	0	0,6	0	3,4	37,2	0
10	0	0	0	0	0	6	168,4	0
11	0	0	1,2	0	0	0,2	16,6	0
12	0	0	1,4	0	16	1,4	0,8	0
13	0	0	0	0	1,4	5	7,4	0
14	0	0,2	0	0	0	1,4	50,2	0
15	0	0	0	0	1,4	0	1,6	0
16	2,8	0	0	0	0	10	10,2	0,2
17	52,8	0	0	0	0	0	0	9,2
18	64	5	0	0	3,8	0,4	0	0
19		0	0	0	26,2	1,4	0	0
20	46,6	0	3	3,8	41,8	0	0	12,8
21	0	0	4	19,4	0	0	10,2	15,4
22	0	0	1,4	0,4	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0	10,4
24	0	0	0	0	0	0	0	6,2
25	0	0	0,4	0	0	0	6,4	0
26	0	0	0	0	0	6,2	0	0
27	0	0	5,4	0	0	0	12,2	0
28	0	0	0,2	1,2	0	0	50,4	0
29	8,2	0	0	30,2	0	13,4	52,8	0
30	11,4	0	2,6	0	2	0,2	4,4	0
31	0		0,4	0		0		0
nº dias	12	3	12	9	7	15	16	9
Total	294,2	5,8	27	59,8	92,6	121,8	492,6	102
Min	0	0	0	0	0	0	0	0
Max	64	5	6,4	30,2	41,8	63	168,4	36,2
Med	9,8	0,2	0,9	1,9	3,1	3,9	16,4	3,3

TABELA 11: Dados do índice pluviométrico (em mm) diário, com a mínima, média e máxima, registradas pelo SIMEPAR, entre os meses de janeiro e abril de 2003.

Dia	Meses			
	Jan	Fev	Mar	Abr
1	0	51,4	0	0
2	0,6	0	0	0
3	9,6	0	2	7,2
4	16	15,2	0,2	7,6
5	0,2	4,6	0	0
6	0	0	1	0
7	0	1	2,2	0
8	0	0,8	20,4	0
9	0	6,4	0,2	77
10	1,4	12,4	0	1,2
11	2	14,4	5,4	0,2
12	0,2	15	0	0
13	4	27,6	0	0
14	0	0,2	0	0
15	0	3,4	0	0
16	0	0	0	0
17	0		0	0
18	0	0	0	24,2
19	0	0	0	19,4
20	4,8	0	13,8	0
21	0		0,2	0
22	11,8		1,2	0
23	17,4		0	0
24	0		0	0
25	4		0	0
26	20,8	0	0	0
27	0,2	0	0	0
28	0	0	0	0
29	0		0	0
30	0		0	0
31	0		0	
nº dias	14	12	10	7
Total	93	152,4	46,6	136,8
Min	0	0	0	0
Max	20,8	51,4	20,4	77
Med	3	6,9	1,5	4,6

## ANEXO 03

TABELA 01: RESULTADOS DOS LEUCOGRAMAS DE BOVINOS DA RAÇA NELORE, NO MÊS DE MAIO DE 2002.

	Leucócito ( $\mu$ L)	bastonetes		segmentados		linfócitos		eosinófilos		Monócitos	
		(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)
Animais											
01	11350	0	0	38	4313	21	2383	7	794	34	3859
02	10400	0	0	22	2288	34	3536	4	416	40	4160
03	19450	1	194	42	8169	21	4084	3	583	33	6418
04	19200	0	0	49	9408	20	3840	7	1344	24	4608
05	27100	0	0	43	11653	21	5691	3	813	33	8943
06	20350	0	0	55	11193	28	5698	11	2238	6	1221
07	16730	1	167	47	7863	33	5520	8	1338	11	1840
08	18920	1	189	39	7378	25	4730	7	1324	28	5297
09	18300	0	0	40	7320	27	4941	4	732	29	5307
10	17450	0	0	40	6980	34	5933	3	523	27	4711
11	21315	1	213	48	10231	24	5115	5	1065	22	4689
12	19400	0	0	38	7372	43	8342	8	1552	11	2134

TABELA 02: RESULTADOS DOS LEUCOGRAMAS DE BOVINOS DA RAÇA NELORE, NO MÊS DE JUNHO DE 2002.

	Leucócito ( $\mu$ L)	bastonetes		segmentados		linfócitos		eosinófilos		monócitos	
		(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)
Animais											
01	9850	24	2364	42	6107	3	295	11	1083	20	1970
02	23300	18	4194	30	6990	13	3029	28	6524	11	2563
03	13950	10	1395	34	4743	6	837	29	4045	20	2790
04	19150	16	3064	40	7660	6	1149	11	2106	27	5170
05	12550	6	753	66	8283	0	0	14	1757	14	1757
06	10600	5	530	55	5830	4	424	18	1908	18	1908
07	25450	9	2290	24	6108	8	2036	18	4581	39	9925
08	14450	26	3757	10	1445	15	2167	20	2890	29	4190
09	9050	1	90,5	26	2353	12	1086	29	2624	32	2896
10	16300	0	0	38	6194	38	6194	4	652	20	3260
11	14900	5	745	33	4917	9	1341	29	4321	24	3576
12	13000	9	1170	31	4030	4	520	1	130	55	7150

TABELA 03: RESULTADOS DOS LEUCOGRAMAS DE BOVINOS DA RAÇA NELORE, NO MÊS DE JULHO DE 2002.

	Leucócito ( $\mu$ L)	bastonetes		segmentados		linfócitos		eosinófilos		Monócitos	
		(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)
Animais											
01	12450	0	0	29	3610	27	3361	18	2241	26	3237
02	10500	1	105	27	2835	20	2100	20	2100	32	3360
03	14700	0	0	41	6027	26	3822	17	2499	16	2352
04	13500	0	0	38	5130	18	2430	15	2025	29	3915
05	17050	0	0	59	10060	23	3921	5	852	13	2216
06	9800	0	0	40	3920	34	3332	12	1176	14	1372
07	13050	0	0	22	2871	54	7047	10	1305	14	1827
08	9250	1	92	53	4902	26	2405	11	1017	9	832
09	14050	1	140	37	5198	16	2248	14	1967	32	4496
10	11350	1	113	32	3632	33	3745	7	794	27	3064
11	12750	0	0	42	5355	19	2422	11	1402	28	3570
12	10900	1	109	56	6104	19	2071	5	545	19	2071

TABELA 04: RESULTADOS DOS LEUCOGRAMAS DE BOVINOS DA RAÇA NELORE, NO MÊS DE AGOSTO DE 2002.

	Leucócito ( $\mu$ L)	bastonetes		segmentados		linfócitos		eosinófilos		monócitos	
		(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)
Animais											
01	11550	0	0	26	3003	23	2656	4	462	47	5428
02	13000	0	0	29	3770	25	3250	11	1430	35	4550
03	11100	2	222	16	1776	39	4329	11	1221	32	3552
04	8450	0	0	21	1774	39	3295	2	169	38	3211
05	14350	2	287	26	3731	31	4448	11	1578	30	4305
06	12500	0	0	34	4250	25	3125	10	1250	31	3875
07	11250	0	0	39	4387	31	3487	11	1237	19	2137
08	10000	0	0	45	4500	21	2100	8	800	26	2600
09	11950	0	0	24	2868	40	4780	5	597	31	3704
10	17250	0	0	33	5692	24	4140	15	2587	29	5002
11	10850	0	0	33	3580	23	2495	5	542	39	4231
12	15650	0	0	29	4538	37	5790	6	939	28	4382

TABELA 05: RESULTADOS DOS LEUCOGRAMAS DE BOVINOS DA RAÇA NELORE, NO MÊS DE SETEMBRO DE 2002.

	Leucócito	bastonetes		segmentados		linfócitos		eosinófilos		monócitos	
	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)
Animais											
01	8350	0	0	46	3841	15	1252	10	835	29	2421
02	15600	0	0	29	4524	32	4992	10	1560	29	4524
03	18300	1	183	37	6771	30	5490	14	2562	18	3294
04	15550	1	155	20	3110	46	7153	8	1244	26	4043
05	13750	0	0	25	3437	45	6187	13	1787	17	2337
06	14300	0	0	45	6435	24	3432	16	2288	21	3003
07	13400	0	0	36	4824	23	3082	15	2010	26	3484
08	10950	0	0	40	4380	29	3175	7	766,5	24	2628
09	11100	0	0	25	2775	40	4440	19	2109	16	1776
10	7800	1	78	19	1482	38	2964	14	1092	28	2184
11	24250	0	0	19	4607	46	11155	16	3880	18	4365
12	11850	0	0	29	3436	47	5569	6	711	18	2133

TABELA 06: RESULTADOS DOS LEUCOGRAMAS DE BOVINOS DA RAÇA NELORE, NO MÊS DE OUTUBRO DE 2002.

	Leucócito	bastonetes		segmentados		linfócitos		eosinófilos		monócitos	
	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)
Animais											
01	14850	1	148	34	5049	43	6385	3	445	19	2821
02	23350	0	0	27	6304	40	9340	6	1401	27	6304
03	11400	0	0	24	2736	53	6042	7	798	16	1824
04	11050	0	0	38	4199	37	4088	1	110	24	2652
05	16150	0	0	27	4360	17	2745	5	807	51	8236
06	13600	0	0	35	4760	56	7616	6	816	23	3128
07	18900	0	0	56	10584	23	4347	5	945	16	3024
08	12150	0	0	25	3037	49	5953	13	1579	13	1579
09	15600	0	0	42	6552	39	6084	2	312	9	1404
10	14350	0	0	46	6601	29	4161	9	1291	10	1435
11	15100	0	0	54	8154	26	3926	14	2114	16	2416
12	12250	0	0	30	3675	47	5757	7	857	16	1960

TABELA 07: RESULTADOS DOS LEUCOGRAMAS DE BOVINOS DA RAÇA NELORE, NO MÊS DE NOVEMBRO DE 2002.

	Leucócito ( $\mu\text{L}$ )	bastonetes		segmentados		linfócitos		eosinófilos		monócitos	
		(%)	( $\mu\text{L}$ )	(%)	( $\mu\text{L}$ )	(%)	( $\mu\text{L}$ )	(%)	( $\mu\text{L}$ )	(%)	( $\mu\text{L}$ )
Animais											
01	9.950	0	0	16	1.592	20	1.990	6	597	58	5.771
02	18.400	0	0	12	2.208	56	10.304	3	552	29	5.336
03	6.600	0	0	28	1.848	7	462	16	1.056	49	3.234
04	16.350	0	0	46	7.521	28	4.578	2	327	24	3.924
05	20.800	0	0	30	6.240	24	4.992	7	1.456	39	8.112
06	8.000	0	0	48	3.840	9	720	9	720	34	2.720
07	15.150	0	0	46	6.969	4	606	7	1.060	43	6.514
08	11.650	0	0	34	3.961	8	932	6	699	52	6.058
09	10.100	0	0	22	2.222	9	909	17	1.717	52	5.252
10	19.300	0	0	40	7.720	10	1.930	10	1.930	40	7.720
11	10.700	0	0	30	3.210	13	1.391	4	428	53	5.671
12	9.900	0	0	19	1.881	7	693	7	693	67	6.633

TABELA 08: RESULTADOS DOS LEUCOGRAMAS DE BOVINOS DA RAÇA NELORE, NO MÊS DE DEZEMBRO DE 2002.

	Leucócito ( $\mu\text{L}$ )	bastonetes		Segmentados		linfócitos		eosinófilos		monócitos	
		(%)	( $\mu\text{L}$ )	(%)	( $\mu\text{L}$ )	(%)	( $\mu\text{L}$ )	(%)	( $\mu\text{L}$ )	(%)	( $\mu\text{L}$ )
Animais											
01	13250	0	0	15	1987	11	1457	11	1457	63	8347
02	10500	0	0	22	2310	8	840	12	1260	58	6090
03	9200	0	0	42	3864	24	2208	8	736	26	2392
04	7800	0	0	28	2184	15	1170	9	702	48	3744
05	17950	0	0	27	4846,5	18	3231	10	1795	45	8077
06	9450	0	0	22	2079	13	1228,5	8	756	57	5386
07	14200	0	0	24	3408	45	6390	8	1136	23	3266
08	10150	0	0	23	2334	22	2233	10	1015	45	4567
09	8000	0	0	21	1680	16	1280	22	1760	41	3280
10	24700	0	0	23	5681	15	3705	14	3458	48	11856
11	12900	0	0	30	3870	15	1935	7	903	48	6192
12	13450	0	0	20	2690	25	3362	6	807	49	6590

TABELA 09: RESULTADOS DOS LEUCOGRAMAS DE BOVINOS DA RAÇA NELORE, NO MÊS DE JANEIRO DE 2003.

	Leucócito		bastonetes		segmentados		linfócitos		eosinófilos		Monócitos	
	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	
Animais												
01	11780	0	0	16	2376	28	4158	5	742	51	7573	
02	14650	0	0	19	4437	13	3035	5	1168	63	14710	
03	12300	0	0	19	2166	22	2508	11	1254	48	5472	
04	10870	0	0	34	3757	22	2431	7	773	37	4088	
05	13400	0	0	36	5814	14	2261	7	1131	43	6944	
06	12800	0	0	29	3944	20	2720	9	1224	41	5576	
07	19730	0	0	29	5481	25	4725	7	1323	39	7371	
08	13230	1	121	45	5468	17	2065	8	972	30	3645	
09	17400	2	312	29	4524	18	2808	18	2808	34	5304	
10	13520	0	0	28	4018	25	3587	11	1579	34	4879	
11	17600	0	0	22	3322	31	4681	11	1661	36	5436	
12	11050	0	0	24	2940	35	4287	7	857	34	4165	

TABELA 10: RESULTADOS DOS LEUCOGRAMAS DE BOVINOS DA RAÇA NELORE, NO MÊS DE FEVEREIRO DE 2003.

	Leucócito		bastonetes		segmentados		linfócitos		eosinófilos		monócitos	
	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	
Animais												
01	18150	2	363	19	3449	44	7986	6	1089	29	5263	
02	13800	0	0	29	4002	39	5382	8	1104	24	3312	
03	6950	0	0	31	2155	49	3405	3	208	17	1181	
04	10400	0	0	41	4264	26	2704	12	1248	21	2184	
05	15550	0	0	18	2799	45	6997	15	2333	22	3421	
06	20200	0	0	32	6464	36	7272	12	2424	20	4040	
07	13100	0	0	27	3537	42	5502	12	1572	19	2489	
08	13900	0	0	27	3753	45	6255	4	556	24	3336	
09	13050	0	0	30	3915	38	4959	14	1827	13	1696	
10	13450	0	0	29	3901	44	5918	15	2018	15	2017	
11	16500	0	0	27	4455	41	6765	11	1815	21	3465	
12	15950	0	0	26	4147	40	6380	6	957	28	4466	

TABELA 11: RESULTADOS DOS LEUCOGRAMAS DE BOVINOS DA RAÇA NELORE, NO MÊS DE MARÇO DE 2003.

	Leucócito	bastonetes		segmentados		linfócitos		eosinófilos		monócitos	
	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)
Animais											
01	12870	0	0	49	6306	15	1930	12	1544	24	3088
02	11350	0	0	47	5335	19	2156	5	567	29	3291
03	9430	1	94	25	2358	29	2734	2	188	44	4149
04	11350	0	0	44	4994	17	1929	12	1362	26	2951
05	12740	0	0	45	5733	29	3694	10	1274	16	2038
06	16800	0	0	36	6048	35	5880	13	2184	16	2688
07	12350	0	0	40	4940	18	2223	14	1729	28	3458
08	11950	0	0	48	5736	19	2270	4	478	29	3465
09	14320	0	0	38	5442	7	1002	8	1146	47	6730
10	10630	0	0	42	4465	19	2019	6	637,8	33	3507
11	15840	2	316	40	6336	11	1742	11	1742	37	5860
12	12300	0	0	49	6027	19	2337	2	246	30	3690

TABELA 12: RESULTADOS DOS LEUCOGRAMAS DE BOVINOS DA RAÇA NELORE, NO MÊS DE ABRIL DE 2003.

	Leucócito	Bastonetes		segmentados		linfócitos		eosinófilos		monócitos	
	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)	(%)	( $\mu$ L)
Animais											
01	11100	1	111	20	2220	45	4995	17	1887	17	1887
02	10650	0	0	23	2450	51	5431	17	1811	9	958
03	11320	0	0	19	2151	61	6905	12	1358	8	905
04	10470	0	0	26	2722	43	4502	21	2199	10	1047
05	10230	1	102	37	3785	32	3273	19	1944	11	1125
06	11450	0	0	16	1832	43	4923	5	572	35	4007
07	11630	1	116	19	2210	51	5931	7	814	22	2558
08	10540	0	0	21	2213	54	5691	3	316	22	2318
09	9630	1	96	12	1156	45	4333	11	1059	31	2985
10	14700	0	0	39	5733	28	4116	15	2205	18	2646
11	8050	0	0	15	1208	58	4669	6	483	21	1690
12	12750	0	0	24	3060	45	5737	9	1148	22	2805



## ANEXO 04

TABELA 01: Padronização das variáveis de número de leucócitos, neutrófilos segmentados, linfócitos, eosinófilos e monócitos em função do número de nódulos, ao longo do experimento I.

nnod	Leuc	Seg	Linf	Eos	Mon
0	12887,331	4125,737	3711,000	1132,293	3707,452
1	13715,886	4551,854	4168,124	1188,439	3877,027
2	14280,925	4816,101	4568,287	1236,856	3959,971
3	14582,391	4912,951	4911,49	1275,141	3961,777
4	14638,934	4857,893	5197,733	1300,968	3893,392
5	14483,278	4680,92	5427,015	1312,252	3769,132
6	14156,937	4418,873	5599,337	1307,322	3604,665
7	13705,192	4108,733	5714,698	1285,095	3415,339
8	13172,940	3783,028	5773,099	1245,226	3215,017
9	12601,738	3467,572	5774,540	1188,211	3015,425
10	12028,090	3181,156	5719,020	1115,435	2825,95
11	11482,851	2936,548	5606,540	1029,137	2653,79
12	10991,527	2742,212	5437,099	932,2938	2504,319
13	10575,233	2604,328	5210,698	828,4297	2381,6
14	10252,122	2528,951	4927,337	721,3641	2288,967
15	10039,173	2524,378	4587,015	614,9248	2229,65
16	9954,301	2604,094	4189,733	512,6616	2207,474

## Equação de Regressão:

- Leucócitos:  $y = \exp(9,464+0,0741*(x_i)-0,0122*(x_i)^2+0,00041*(x_i)^3)$
- Segmentados:  $y = (8,325+0,121*(x_i)-0,0236*(x_i)^2+0,00089*(x_i)^3)$
- Linfócitos:  $y = (3711+485,604*(x_i)-28,4802*(x_i)^2)$
- Eosinófilos:  $y = \exp(7,032+0,0523*(x_i)-0,00374*(x_i)^2-0,000164*(x_i)^3)$
- Monócitos:  $y = \exp(8,2181+0,05745*(x_i)-0,0132*(x_i)^2+0,000474*(x_i)^3)$

## Anexo 05

Resultados dos exames coproparasitológicos dos animais durante o período experimental (maio de 2002 a abril de 2003).

Tabela 01 Resultado de exames coproparasitológico realizados pela técnica Gordon & Whitlock, em bovinos da raça Nelore realizados nos meses de maio a outubro de 2002, no município de Mundo Novo-MS.

Animais	Parasitas	Período - nº de ovos por grama					
		Mai/02	Jun/02	Jul/02	Ago/02	Set/02	Out/02
1	Ovos de tipo estrombiliformes	-	-	50	100	100	50
2	Ovos de tipo estrombiliformes	50	-	-	-	50	-
3	Ovos de tipo estrombiliformes	-	-	-	-	-	50
4	Ovos de tipo estrombiliformes	-	-	-	-	-	-
5	Ovos de tipo estrombiliformes	-	-	-	-	50	-
6	Ovos de tipo estrombiliformes	-	50	50	100	150	100
7	Ovos de tipo estrombiliformes	-	50	-	-	-	-
8	Ovos de tipo estrombiliformes	-	-	100	50	-	150
9	Ovos de tipo estrombiliformes	-	-	100	-	50	-
10	Ovos de tipo estrombiliformes	-	50	50	-	-	100
11	Ovos de tipo estrombiliformes	-	-	-	-	50	50
12	Ovos de tipo estrombiliformes	50	-	50	50	-	-
Média		8,33	12,5	33,33	25	37,5	41,66

Tabela 02 Resultado de exames coproparasitológico realizados pela técnica Gordon & Whitlock, em bovinos da raça Nelore realizados nos meses de novembro de 2002 a abril de 2003, no município de Mundo Novo-MS.

Animais	Parasitas	Período - nº de ovos por grama					
		Nov/02	Dez/02	Jan/03	Fev/03	Mar/03	Abr/03
1	Ovos de tipo estrongiliformes	200	150	150	200	50	-
2	Ovos de tipo estrongiliformes	-	100	100	200	-	-
3	Ovos de tipo estrongiliformes	50	150	50	50	50	-
4	Ovos de tipo estrongiliformes	50	50	100	50	-	-
5	Ovos de tipo estrongiliformes	-	100	100	50	-	-
6	Ovos de tipo estrongiliformes	250	250	50	100	50	-
7	Ovos de tipo estrongiliformes	-	-	50	50	50	-
8	Ovos de tipo estrongiliformes	50	150	100	50	-	-
9	Ovos de tipo estrongiliformes	50	-	-	100	50	-
10	Ovos de tipo estrongiliformes	100	-	50	50	-	-
11	Ovos de tipo estrongiliformes	150	50	50	100	-	-
12	Ovos de tipo estrongiliformes	100	50	100	150	50	-
Média		75	87,5	75	95,83	25	-

## ANEXOS CAPÍTULO II

## ANEXO 01

Protocolo para a prova enzimoimunoensaio - ELISA.

Para a realização do teste ELISA foram seguidas as seguintes etapas:

- a) Sensibilizar a placa;
  - 100µL/pocinho, da solução de antígeno diluído em tampão carbonato 0,05M, pH 9,6.
- b) Armazenar a placa a 4°C “overnight”;
  - incubação durante 14 horas.
- c) Lavar a placa com a solução de lavagem;
  - repetir por 3 vezes.
- d) Bloquear a placa;
  - usar 100µL/pocinho.
- e) Incubar a placa em estufa a 37°C por 60 min.;
- f) Lavar a placa com a sol. de lavagem;
  - repetir por 3 vezes.
- g) Diluir as amostras de soro;
  - diluir em tampão de incubação e adicionar 100µL/pocinho.
- h) Incubar a placa em estufa a 37°C por 60 min.;
- i) Lavar com solução de lavagem;
  - repetir por 6 vezes.
- j) Adicionar o conjugado;
  - diluir o conjugado em tampão de incubação e distribuir 100µL/pocinho.
- k) Incubar a placa por 60 min. em estufa a 37°C;
- l) Lavar a placa com solução de lavagem;
  - repetir por 6 vezes.
- m) Adicionar o substrato;
  - diluir 4 mg do substrato em tampão citrato pH 5,0 e acrescentar 4µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- n) Incubar a placa em estufa a 22°C, por 20 min.;
- o) Parar a reação com o ácido sulfúrico;
  - usar 50 µL/pocinho de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 5%.
- p) Leitura da absorbância com o filtro de 492nm de comprimento de onda.

**Soluções utilizadas para a execução técnica:****COATING BUFFER:**

- Solução A, 1,1g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> para 200 mL de H<sub>2</sub>O deionizada.
- Solução B, 4,2g de NaHCO<sub>3</sub> para 1 L de H<sub>2</sub>O deionizada.
- Corrigir o pH para 9,6, adicionando a solução A em B.

SOLUÇÃO DE LAVAGEM:

- 9,0g de NaCl.
- 0,5g de Tween 20.
- H<sub>2</sub>O deionizada q.s.p 1000 mL.

SOLUÇÃO DE BLOQUEIO:

- caseína 2%
- 0,05% de Tween 20, diluídos em PBS.

PBS (0,05M com 0,15 M de NaCl, pH7,4), obtido a partir de:

- Solução A: - 7,1g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.
  - 8,8g NaCl.
  - H<sub>2</sub>O deionizada q.s.p 1000 mL.
- Solução B: - 1,4g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
  - 1,88g NaCl.
  - H<sub>2</sub>O deionizada q.s.p 200 mL.
- Corrigir o pH para 7,4, adicionando a solução B em A.

TAMPÃO DE INCUBAÇÃO:

- Solução A, 0,25% caseína; 0,05% de Tween 20, diluída em PBS.
- ou
- Solução B, 62,5 mL de solução de bloqueio;
    - 0,25 mL Tween 20;
    - 500 mL PBS pH 7,4.

TAMPÃO CITRATO:

- 7,10g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 5,19g ácido cítrico.
- H<sub>2</sub>O deionizada q.s.p 1000 mL.
- Corrigir o pH para 5,0.

## ANEXO 02.

Soluções utilizadas para a eletroforese da técnica de Western Blotting:

TAMPÃO DE CORRIDA:

- 3,0g de tris.
- 14,4g de glicina.
- 1,0g de SDS.
- Corrigir o pH para 8,3.

TAMPÃO DE AMOSTRA:

- 2,5 mL de solução D.
- 5,0 mL de solução C.
- 2,0 mL de glicerol.
- 0,1 mL de EDTA 0,1 M.
- 0,2 mg de azul de bromofenol.
- H<sub>2</sub>O deionizada q.s.p 20 mL.

PREPARO DO GEL:

- Solução A: 30 g acrilamida.  
0,8 g bis-acrilamida.  
H<sub>2</sub>O destilada 100 mL.
- Solução B: 18,15 g de Tris.  
H<sub>2</sub>O destilada q.s.p 100 mL.  
Corrigir o pH para 8,8.
- Solução C: 5 g de SDS.  
H<sub>2</sub>O destilada q.s.p 50 mL.
- Solução D: 3,0 g de Tris.  
H<sub>2</sub>O destilada q.s.p 60 mL.  
Corrigir o pH para 6,8.
- Persulfato de amônia 10%:  
0,5 g de persulfato  
H<sub>2</sub>O destilada q.s.p 5 mL.

## ANEXO 03

Densidades Ópticas obtidas através da técnica de imunoenensaio - ELISA, realizados nos três grupos de animais do experimento II.

TABELA 01: Resultados dos testes ELISA, nas amostras de soro dos animais do grupo A, colhidas quinzenalmente, no período de setembro de 2003 a fevereiro de 2004. Os resultados expressam as médias das densidades ópticas obtidas nas amostras feitas em duplicata.

Animais	Períodos de Colheita (em dias)										
	Dia Zero	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150
26	0,471	0,632	0,231	0,256	0,259	0,112	0,369	0,138	0,262	0,546	0,257
27	0,112	0,481	0,447	0,761	0,420	0,111	0,162	0,095	0,083	0,324	0,445
28	0,237	0,663	0,502	0,514	0,235	0,198	0,226	0,247	0,192	0,221	0,413
29	0,288	0,524	0,353	0,378	0,129	0,156	0,392	0,230	0,325	0,574	0,262
30	0,261	0,534	0,615	0,584	0,161	0,479	0,373	0,240	0,241	0,277	0,161
31	0,142	0,884	0,725	0,936	0,684	0,463	0,097	0,125	0,082	0,097	0,131
32	0,096	1,007	0,833	0,921	0,535	0,498	0,245	0,238	0,402	0,327	0,214
33	0,390	0,695	0,462	0,647	0,382	0,247	0,451	0,468	0,642	0,542	0,230

TABELA 02: Desnsidades ópticas obtidas pela técnica de enzimaímunoensaio - ELISA, nas amostras de soro dos animais do grupo B, colhidas quinzenalmente, no período de setembro de 2003 a fevereiro de 2004.

Animais	Períodos de Colheita (em dias)										
	Dia zero	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150
34	0,102	0,121	0,075	0,369	0,216	0,170	0,148	0,087	0,125	0,296	0,309
35	0,158	0,194	0,086	0,095	0,368	0,174	0,353	0,152	0,263	0,294	0,591
36	0,259	0,219	0,305	0,221	0,521	0,472	0,304	0,410	0,564	0,661	0,704
37	0,221	0,235	0,254	0,403	0,332	0,241	0,276	0,376	0,460	0,513	0,529
38	0,316	0,441	0,300	0,320	0,312	0,256	0,156	0,243	0,394	0,294	0,279
39	0,187	0,164	0,093	0,211	0,244	0,175	0,353	0,244	0,362	0,447	0,325
40	0,360	0,408	0,596	0,331	0,350	0,383	0,278	0,342	0,299	0,367	0,228
41	0,208	0,188	0,110	0,282	0,161	0,187	0,154	0,141	0,172	0,419	0,397

TABELA 03: Densidades ópticas obtidas pela técnica de enzimmunoensaio - ELISA, nas amostras de soro dos animais do grupo C, colhidas quinzenalmente, no período de setembro de 2003 a fevereiro de 2004.

Animais	Períodos de colheita (em dias)										
	Dia zero	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150
42	0,184	0,121	0,140	0,162	0,152	0,174	0,444	0,390	0,326	0,428	0,307
43	0,180	0,171	0,172	0,151	0,143	0,191	0,083	0,141	0,202	0,182	0,109
44	0,089	0,194	0,065	0,107	0,121	0,089	0,321	0,152	0,108	0,499	0,638
45	0,146	0,079	0,072	0,073	0,088	0,109	0,084	0,074	0,078	0,124	0,324
46	0,219	0,151	0,101	0,089	0,266	0,342	0,350	0,450	0,380	0,324	0,298
47	0,110	0,081	0,081	0,062	0,064	0,084	0,085	0,062	0,107	0,121	0,109
48	0,136	0,161	0,213	0,231	0,301	0,256	0,141	0,143	0,146	0,542	0,484
49	0,091	0,067	0,069	0,068	0,075	0,071	0,062	0,140	0,105	0,120	0,335

TABELA 04: Médias padronizadas das densidades óticas obtidas no teste enzimmunoensaio-ELISA, em função das colheitas ao longo do experimento, e em relação ao número de nódulos de larvas de *Dermatobia hominis* observados nos animais de diferentes grupos

nº nódulos	Grupo A	Grupo B	Grupo C
1	0,342309	0,188575	0,151875
2	0,479832	0,188575	0,151875
3	0,54168	0,188575	0,151875
4	0,519671	0,188575	0,151875
5	0,447088	0,188575	0,151875
6	0,363986	0,188575	0,151875
7	0,295904	0,188575	0,151875
8	0,253478	0,188575	0,151875
9	0,241434	0,188575	0,151875
10	0,26982	0,188575	0,151875
11	0,37335	0,188575	0,151875

Equações de regressão:

- Grupo A:  $y = \exp(-1,68 + 0,761 \cdot (x_i) - 0,162 \cdot (x_i)^2 + 0,00896 \cdot (x_i)^3)$
- Grupo B:  $y = \exp(-1,66826)$
- Grupo C:  $y = \exp(-1,8847)$



## ANEXO 04

TABELA 01: RESULTADOS DOS LEUCOGRAMAS DE BOVINOS DA RAÇA NELORE, NO MÊS DE SETEMBRO DE 2003.

	Leucócito ( $\mu$ l)	bastonetes		segmentados		linfócitos		eosinófilos		monócitos	
		(%)	( $\mu$ l)	(%)	( $\mu$ l)	(%)	( $\mu$ l)	(%)	( $\mu$ l)	(%)	( $\mu$ l)
Animais											
26	18800	0	0	21	3948	45	8460	2	376	32	6016
27	12100	0	0	15	1815	35	4235	1	121	49	5929
28	17200	0	0	23	3956	35	6020	3	516	39	6708
29	18200	1	182	13	2366	39	7098	1	182	46	8372
30	10400	0	0	12	1248	39	4056	1	104	48	4992
31	12400	0	0	20	2480	42	5208	5	620	33	4092
32	7400	0	0	25	1850	42	3108	0	0	33	2442
33	18800	0	0	57	10716	12	2256	12	2256	19	3572
34	19650	0	0	24	4716	49	9629	0	0	27	5306
35	15700	0	0	23	3611	54	8478	1	157	22	3454
36	30750	0	0	30	9225	31	9533	4	1230	35	10763
37	19300	1	193	23	4439	39	7527	11	2123	26	5018
38	12000	0	0	36	4320	40	4800	2	240	22	2640
39	22150	0	0	49	10854	27	5981	2	443	22	4873
40	41000	0	0	40	16400	44	18040	5	2050	11	4510
41	11600	1	116	29	3364	50	5800	0	0	20	2320
42	18650	0	0	28	5222	40	7460	1	187	31	5782
43	8000	0	0	32	2560	35	2800	3	240	30	2400
44	26500	0	0	36	9540	40	10600	1	265	23	6095
45	6400	3	192	23	1472	38	2432	12	768	24	1536
46	19950	0	0	39	7781	41	8180	1	200	19	3791
47	10800	0	0	31	3348	52	5616	3	324	14	1512
48	26250	0	0	26	6825	46	12075	6	1575	22	5775
49	11000	0	0	41	4510	38	4180	1	110	20	2200

TABELA 02: RESULTADOS DOS LEUCOGRAMAS DE BOVINOS DA RAÇA NELORE, NO MÊS DE OUTUBRO DE 2003.

	Leucócito	bastonetes		segmentados		linfócitos		eosinófilos		monócitos	
	( $\mu$ l)	(%)	( $\mu$ l)	(%)	( $\mu$ l)	(%)	( $\mu$ l)	(%)	( $\mu$ l)	(%)	( $\mu$ l)
Animais											
26	24450	0	0	11	2690	25	6113	6	1467	58	14181
27	14100	1	141	39	5499	20	2820	2	282	38	5358
28	22000	0	0	18	3960	10	2200	2	440	70	15400
29	13200	0	0	33	4356	23	3036	3	396	41	5412
30	16800	0	0	20	3360	35	5880	0	0	45	7560
31	30450	1	305	24	7308	38	11571	1	305	36	10962
32	28650	0	0	38	10887	9	2579	12	3438	41	11747
33	12750	0	0	27	3443	33	4208	0	0	40	5100
34	26730	1	267	21	5613	27	7217	2	535	49	13098
35	18950	0	0	16	3032	32	6064	6	1137	46	8717
36	23650	0	0	20	4730	35	8278	6	1419	39	9224
37	18370	0	0	21	3858	22	4041	4	735	53	9736
38	5400	0	0	28	1512	29	1566	3	162	40	2160
39	9950	0	0	27	2687	9	896	5	498	59	5871
40	19100	0	0	32	6112	26	4966	3	573	39	7449
41	22300	0	0	32	7136	31	6913	9	2007	28	6244
42	7950	0	0	26	2067	37	2942	3	239	34	2703
43	7650	0	0	25	1913	30	2295	2	153	43	3290
44	14800	0	0	28	4144	23	3404	2	296	47	6956
45	21450	0	0	19	4076	38	8151	4	858	39	8366
46	22000	0	0	35	7700	21	4620	5	1100	39	8580
47	16400	1	164	38	6232	38	6232	7	1148	34	5576
48	38750	0	0	17	6588	35	13563	1	388	47	18213
49	14050	0	0	31	4356	24	3372	1	141	44	6182

TABELA 03: RESULTADOS DOS LEUCOGRAMAS DE BOVINOS DA RAÇA NELORE, NO MÊS DE NOVEMBRO DE 2003.

	Leucócito ( $\mu$ l)	bastonetes		segmentados		linfócitos		eosinófilos		monócitos	
		(%)	( $\mu$ l)	(%)	( $\mu$ l)	(%)	( $\mu$ l)	(%)	( $\mu$ l)	(%)	( $\mu$ l)
Animais											
26	22500	0	0	32	7200	33	7425	1	225	34	7650
27	49600	2	992	38	18848	39	19344	8	3968	13	6448
28	25700	0	0	36	9252	41	10537	0	0	23	5911
29	13100	0	0	29	3799	36	4716	1	131	34	4454
30	24250	0	0	38	9215	33	8002	2	485	27	6547
31	18500	1	185	25	4625	44	8140	2	370	28	5180
32	26000	0	0	29	7540	39	10140	1	260	31	8060
33	14950	1	149	26	3887	42	6279	0	0	31	4634
34	27450	1	274	31	8509	38	10431	3	823	27	7411
35	27800	0	0	38	10564	33	9174	9	2502	20	5560
36	21800	0	0	33	7194	28	6104	15	3270	24	5232
37	20850	0	0	29	6046	34	7089	9	1876	28	5838
38	9500	0	0	36	3420	28	2660	3	285	33	3135
39	9700	0	0	30	2910	26	2522	1	97	43	4171
40	19400	0	0	45	8730	32	6208	0	0	23	4462
41	17700	0	0	41	7257	30	5310	2	354	27	4779
42	10050	0	0	38	3819	35	3517	1	100	26	2613
43	8900	0	0	26	2314	30	2670	0	0	44	3916
44	10350	0	0	37	3829	38	3933	0	0	25	2587
45	18250	0	0	42	7665	42	7665	2	365	14	2555
46	26400	2	528	47	12408	32	8448	6	1584	13	3432
47	18900	0	0	29	5481	27	5103	0	0	44	8316
48	23300	1	233	40	9320	41	9553	4	932	14	3262
49	12150	0	0	32	3888	35	4252	1	121	32	3888

TABELA 04: RESULTADOS DOS LEUCOGRAMAS DE BOVINOS DA RAÇA NELORE, NO MÊS DE DEZEMBRO DE 2003.

	Leucócito ( $\mu$ l)	bastonetes		segmentados		linfócitos		eosinófilos		monócitos	
		(%)	( $\mu$ l)	(%)	( $\mu$ l)	(%)	( $\mu$ l)	(%)	( $\mu$ l)	(%)	( $\mu$ l)
Animais											
26	20450	0	0	29	5931	41	8385	4	818	26	5317
27	25300	0	0	34	8602	36	9108	5	1265	25	6325
28	15350	0	0	27	4144	36	5526	3	461	34	5219
29	18200	0	0	28	5096	40	7280	1	182	31	5642
30	21950	0	0	34	7463	38	8341	3	659	25	5487
31	21350	0	0	31	6618	40	8540	6	1281	23	4910
32	18200	0	0	30	5460	32	5824	2	364	36	6552
33	26300	0	0	32	8416	39	10257	2	526	27	7101
34	18300	0	0	27	4941	35	6405	1	183	37	6771
35	21550	0	0	33	7111	29	6249	5	1077	33	7111
36	27250	1	272	38	10355	25	6812	11	2997	25	6812
37	21300	0	0	27	5751	38	8094	2	426	33	7029
38	10200	0	0	32	3264	28	2856	0	0	40	4080
39	13450	0	0	38	5111	29	3900	0	0	33	4438
40	20300	1	203	47	9541	35	7105	4	812	13	2639
41	18450	0	0	41	7564	30	5535	2	369	27	4981
42	13800	0	0	38	5244	32	4416	0	0	30	4140
43	8200	0	0	26	2132	27	2214	0	0	47	3854
44	19800	0	0	37	7326	41	8118	1	198	21	4158
45	14300	0	0	42	6006	26	3718	2	286	30	4290
46	20850	0	0	47	9799	37	7714	9	1876	7	1459
47	18250	0	0	29	5292	30	5475	0	0	41	7482
48	20700	1	207	40	8280	28	5796	2	414	29	6003
49	13000	0	0	32	4160	32	4160	0	0	36	4680

TABELA 05: RESULTADOS DOS LEUCOGRAMAS DE BOVINOS DA RAÇA NELORE, NO MÊS DE JANEIRO DE 2003.

	Leucócito ( $\mu$ l)	bastonetes		segmentados		linfócitos		eosinófilos		monócitos	
		(%)	( $\mu$ l)	(%)	( $\mu$ l)	(%)	( $\mu$ l)	(%)	( $\mu$ l)	(%)	( $\mu$ l)
Animais											
26	25300	0	0	39	9867	33	8349	0	0	28	7084
27	14200	0	0	31	4402	29	4118	2	284	38	5396
28	16400	0	0	36	5904	30	4920	0	0	34	5576
29	23900	1	239	38	9082	28	6692	3	717	30	7170
30	13900	0	0	39	5421	26	3614	0	0	35	4865
31	18600	0	0	34	6324	24	4464	3	558	39	7254
32	21400	0	0	29	6206	26	5564	1	214	44	9416
33	29250	1	292	32	9360	37	10822	5	1462	25	7312
34	14200	0	0	31	4402	31	4402	4	568	34	4828
35	19600	0	0	38	7448	24	4704	5	980	33	6468
36	21300	0	0	33	7029	39	8307	6	1278	22	4686
37	19650	0	0	29	5698	26	5109	2	393	43	8449
38	11350	0	0	36	4086	31	3518	0	0	33	3745
39	11250	0	0	39	4387	26	2925	0	0	35	3937
40	18950	0	0	36	6822	29	5495	1	189	34	6443
41	15300	0	0	42	6426	27	4131	0	0	31	4743
42	14200	0	0	29	4118	24	3408	2	284	45	6390
43	9350	0	0	38	3553	26	2431	0	0	36	3366
44	15300	0	0	33	5049	34	5202	1	153	32	4896
45	15600	0	0	35	5460	31	4836	2	312	32	4992
46	22300	0	0	29	6467	42	9366	5	1115	24	5352
47	15150	0	0	34	5151	28	4242	0	0	38	5757
48	25350	1	253	28	7098	39	9886	12	3042	20	5070
49	19250	0	0	33	6352	29	5582	3	577	35	6737

TABELA 06: RESULTADOS DOS LEUCOGRAMAS DE BOVINOS DA RAÇA NELORE, NO MÊS DE FEVEREIRO DE 2003.

	Leucócito ( $\mu$ l)	bastonetes		segmentados		linfócitos		eosinófilos		monócitos	
		(%)	( $\mu$ l)	(%)	( $\mu$ l)	(%)	( $\mu$ l)	(%)	( $\mu$ l)	(%)	( $\mu$ l)
Animais											
26	21000	0	0	39	8190	33	6930	1	210	27	5670
27	13400	2	268	31	4154	29	3886	0	0	38	5092
28	19800	0	0	36	7128	30	5940	1	198	33	6534
29	15850	0	0	38	6023	28	4438	0	0	34	5389
30	15250	0	0	39	5947	26	3965	0	0	35	5337
31	14300	0	0	34	4862	24	3432	3	429	39	5577
32	11200	0	0	29	3248	26	2912	1	112	44	4928
33	23800	0	0	32	7616	37	8806	2	476	29	6902
34	22750	0	0	31	7052	31	7052	4	910	34	7735
35	20150	1	201	38	7657	24	4836	5	1007	32	6448
36	28700	2	574	33	9471	39	11193	11	3157	15	4305
37	16200	0	0	29	4698	26	4212	3	486	42	6804
38	8950	0	0	29	2595	29	2595	0	0	42	3759
39	12000	0	0	26	3120	41	4920	2	240	31	3720
40	19200	0	0	39	7488	31	5952	0	0	30	5760
41	19600	0	0	41	8036	32	6272	1	196	26	5096
42	10100	1	101	35	3535	30	3030	1	101	33	3333
43	8750	0	0	33	2887	32	2800	0	0	35	3062
44	17250	0	0	29	5002	38	6555	4	690	29	5002
45	19900	0	0	32	6368	35	6965	3	597	30	5970
46	19000	0	0	31	5890	38	7220	1	190	30	5700
47	12350	0	0	27	3334	36	4446	0	0	37	4569
48	27200	2	544	32	8704	35	9520	8	2176	23	6256
49	15800	0	0	29	4582	31	4898	3	474	37	5846