

1 INTRODUÇÃO

A participação de moléculas e células nas respostas inflamatória e imunológica é de primordial relevância para o entendimento fundamental, básico, e específico dos mecanismos envolvidos na relação patógeno-hospedeiro. No caso particular desta Dissertação, envolvendo o parasitismo por larvas de *Dermatobia hominis* em mamíferos, é tema de exponencial interesse, pois a miíase por *D. hominis* (zoonose neotropical) tem grande importância médica e veterinária, sobretudo, por continuar determinando elevado prejuízo econômico à exploração pecuária bovina, em especial no Brasil. Neste contexto, são ainda incipientes os estudos, em natureza ou experimental, que focalizam a relação do parasitismo cutâneo por *D. hominis* em animais.

No presente ensaio experimental, o uso de roedores como modelo de laboratório para miíase por *D. hominis*, tem sido praticado no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG) e já resultou em várias publicações, e vem norteando novos estudos, dentre eles, o que encerra esta Dissertação de Mestrado¹.

Especificamente, a proposta em apreço utiliza ratos experimentalmente reinfestados por *D. hominis* e retratará a histopatologia da pele parasitada durante distintos períodos do desenvolvimento dos estágios² larvais do inseto, associado à expressão dos leucócitos sanguíneos do hospedeiro durante a miíase.

O texto apresenta uma revisão de literatura mais relevante, correlacionada direta ou indiretamente com a proposta de trabalho. Tal revisão dá em sequência aspectos da resposta imunológica (humoral e celular), inflamatória e hematológica dos hospedeiros à miíases. Obviamente, a literatura consultada foi também de fundamental importância para delinear o experimento, sobretudo em conexão com a metodologia, além do cronograma de atividades para fins de conclusão do Mestrado.

Conforme pré-determinado pela Pós-Graduação de Parasitologia, do ICB-UFMG, o presente texto foi elaborado em sintonia com a Associação Brasileira de Normas Técnicas, como preconizadas por França e Vasconcellos (2009).

¹ Aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA-UFMG). Protocolo: 106/2009.

² O termo estágio será utilizado nesta dissertação de acordo com Carlson, 1983.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *D. hominis*

D. hominis, única espécie no gênero, é um dos mais importantes insetos (Diptera: Oestridae³), cujas larvas são causadores de miíase cutânea na América Latina. O parasitismo por larvas de *D. hominis*, popularmente conhecido como berne, está presente desde o sul do México até o norte da Argentina, exceto no Chile (NEEL, URBINA e ALBA, 1955; GUIMARÃES e PAPAVERO, 1999).

As larvas do díptero exercem parasitismo em mamíferos (silvestres e domésticos), e indivíduos humanos. Em natureza, a miíase atinge mais frequentemente bovinos e canídeos domésticos (RONCALLI, 1984), mas é para a pecuária bovina, que o berne acarreta grandes perdas econômicas, sobretudo em decorrência da depreciação do couro e baixa produção de carne e leite do rebanho (HALL e WALL, 1995).

Espécimes adultos de *D. hominis* (ou mosca do berne), medem de 1,0 a 1,2 cm, tem cabeça amarelada com a parte superior escura, tórax marrom com tons de azul, e abdome azul metálico (JAMES, 1947). Como adultos, eles não se alimentam por possuírem o aparelho bucal atrofiado (não funcional), vivem em média seis dias, e sobrevivem para cópula e reprodução utilizando de reservas nutricionais previamente estocadas durante a vida dos seus estágios imaturos parasitários (NEIVA e GOMES, 1917).

Em natureza, os machos de *D. hominis* possuem comportamento de agregação facilitando assim o encontro de outros espécimes para exercer o acasalamento (GUIMARÃES, 1966). A maturidade sexual dos adultos é atingida cerca de 4 horas após emergirem do pupário (BANEGAS e MOURIER, 1967). Sob a presença de diferentes ferormônios sexuais ocorre comunicação química no processo de cópula, moléculas expelidas principalmente por indivíduos fêmeas (GOMES, TRIGO e EIRAS, 2008). Em laboratório, a cópula ocorre, em média, durante nove minutos, e ambos os sexos copulam repetidas vezes (BANEGAS e MOURIER, 1967).

Após o acasalamento, as fêmeas de *D. hominis* depositam os ovos sobre o corpo de outros insetos (várias espécies de Diptera), que funcionam como vetores mecânicos (foréticos). Nestes são depositados em média de 20-30 ovos por vez, os quais ficam aderidos

³ Família classificada por Pape (2001), que contém 151 espécies distribuídas em 28 gêneros (WOOD, 1987).

no corpo dos foréticos (usualmente no abdomen) por uma substância colante excretada durante a postura (NEEL, UBINA e ALBA, 1955; GUIMARÃES e PAPAVERO, 1999). Aproximadamente 800 ovos podem ser depositados em distintos foréticos (NEIVA, 1910). A incubação dos ovos ocorre em sete dias (média) e as larvas de primeiro estágio (L₁) eclodem dos ovos quando o vetor pousa sobre os hospedeiros mamíferos para repouso ou alimentação (HALL e WALL, 1995).

A penetração ativa da larva na pele íntegra do hospedeiro é completada dentro de 5-10 minutos (NEIVA e GOMES, 1917) e ao chegar à região mais profunda do tecido subcutâneo, se intensifica o processo de interação larva-mamífero. A larva não migra pelo hospedeiro como fazem muitos Oestridae (COLWELL, HALL e SCHOLL, 2006), e na derme profunda ocorrem duas metamorfoses larvais (a L₁ muda para segundo estágio = L₂, e esta para o terceiro estágio = L₃) dentro de uma cavidade contornada e construída em decorrência de um processo inflamatório do tipo tumor furunculose (GUIMARÃES e PAPAVERO, 1999). A média do período de parasitismo, em dias, dos três estágios larvais é de 35-40 em canídeos (NEIVA e GOMES, 1917), 40-60 em bovinos e caprinos, 35-50 em cobaias, 25-35 em camundongos, 30-40 em ratos (JOBSEN e MOURIER, 1972), e 46-54 em humanos (DUNN, 1930).

Cessado o parasitismo a larva L₃, piriforme, de *D. hominis*, que mede cerca de 20 mm de comprimento e máximo de 0,8 cm de espessura, sai do hospedeiro, cai no solo e imerge na terra, onde dois a três dias após tem início a fase de pupa. Em temperatura de 27°C e umidade relativa de 70 a 80%, o período de pupa varia de 27-78 dias (CATTS, 1982). Cessado tal período, o adulto emerge do pupário, usualmente durante as horas mais quentes do dia (NEIVA e GOMES, 1917).

Experimentalmente, vários hospedeiros foram submetidos à infestação por larvas de *D. hominis*: cães (NEIVA e GOMES, 1917), humanos (DUNN, 1930), cobaias (NEEL, UBINA e ALBA, 1955), coelhos, (LELLO, MOTA e PERAÇOLI, 1980; LELLO e BOULARD, 1990; LELLO e PERAÇOLI, 1993), bovinos (OLIVEIRA-SEQUEIRA *et al.*, 1996; SANCHO, CABALLERO e RUÍZ-MARTINEZ, 1996), ratos (JOBSEN e MOURIER, 1972; DE FILIPPIS e LEITE, 1997; EVANGELISTA e LEITE, 2005, GONÇALVES *et al.*, 2007; CARDOSO *et al.*, 2009), camundongos (MOYA-BORJA, 1966; LELLO e ROSIS, 2003).

Quanto à resposta imune-humoral, os primeiros estudos foram realizados em coelhos (MOTA, PERAÇOLI e LELLO, 1980; PERAÇOLI, LELLO e MOTA, 1980), cuja

imunização com macerado total de larvas ($L_2 + L_3$) de *D. hominis* induziram a produção de anticorpos circulantes (não especificados). Também utilizando coelhos imunizados (LELLO e BOULARD, 1990) com macerado total de L_1 , L_2 , L_3 , e $L_2 + L_3$ foram observados níveis elevados de anticorpos (não especificados) contra os antígenos das larvas. Estes animais, quando subsequentemente infestados permaneceram com altas titulações dos anticorpos, os quais decresceram logo após a saída da larva. A presença de imunoglobulinas (IgM e IgG) foi identificada em tecidos da pele de bovinos, que já haviam sido parasitados naturalmente por *D. hominis* (OLIVEIRA-SEQUEIRA *et al.*, 1996). Nestes ruminantes, quando experimentalmente infestados, tanto IgM como IgG foram detectadas na pele, margiando às reações inflamatórias. Obviamente, o encontrado IgG após 1, 2, 7 dias pós-infestação (dpi) estava associado a miíase primária (natural) dos animais, os quais provinham de áreas endenes para dermatobiose.

Sob o enfoque imunecelular, coelhos previamente imunizados com macerado total de $L_2 + L_3$ de *D. hominis* e subsequentemente infestados, apresentaram, no local da miíase, inflamação com infiltração de eosinófilos (LELLO, MOTA e PERAÇOLI, 1980). Grogan *et al.* (1987) estudando um caso de miíase por L_3 de *D. hominis*, em indivíduo humano, revelou na lesão: infiltrado de linfoblastos, eosinófilos, fibroblastos ativados, histiócitos maduros, mastócitos, e células plasmáticas, indicando haver uma resposta imunológica complexa do hospedeiro. Também em coelhos imunizados com macerado total de $L_2 + L_3$ - e posterior infestação por *D. hominis* (LELLO e PERAÇOLI, 1993) - foi demonstrado que os animais imunizados desenvolviam uma resposta imunecelular mais rápido, e que tinham maior número de leucócitos na pele do que nos coelhos apenas infestados. Oliveira-Sequeira *et al.* (1996) em um ensaio sobre infestações experimentais de bovinos com larvas de *D. hominis* - que já haviam tido naturalmente a miíase - observaram grande número de eosinófilos, além de basófilos e mastócitos degranulados, na pele parasitada.

Em ratos de laboratório infestados com larvas de *D. hominis* (PEREIRA, LEITE e LEITE, 2001), os achados histopatológicos na pele revelaram que: aos dois dpi, a larva estava rodeada por uma área inflamada com predominância de neutrófilos; aos 4 dpi havia uma fina camada de necrose próxima à larva, além de um grande número de neutrófilos, linfócitos, macrófagos, e raros eosinófilos e mastócitos. Citam os autores que, sucessivamente, o

processo inflamatório continuou crescente com proliferação de fibroblastos e células endoteliais, além do aparecimento de focos hemorrágicos. E que aos 18 e 20 dpi havia uma espessa camada de necrose e produção de fibras colágenas, além de concentração de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e mastócitos, e poucas células plasmáticas. Aos 25-30 dpi havia redução da camada necrosada e do número de neutrófilos e linfócitos, embora ocorresse grande quantidade de eosinófilos, células plasmáticas e fibras colágenas. Decorridos 30 dpi as larvas deixaram o hospedeiro, quando então era assinalada uma diminuição da cavidade que contornava a larva e crescente infiltração de mastócitos e muitas fibras colágenas. E finalmente aos 10 dias pós-emergência, a pele lesada apresentava cicatrização.

Sobre a expressão de eosinófilos e mastócitos na pele de ratos com miíase por *D. hominis* (PEREIRA e LEITE, 2002), o número de eosinófilos foi significativo até os 10 dpi, e em seguida decrescente até os 28 dpi, data próxima da emergência da larva do hospedeiro. Os mastócitos foram significativos no início da infestação (4 dpi) e aos 20 dpi.

Em infestação e reinfestação experimental de camundongos (LELLO e ROSIS, 2003), embora sem revelar análise estatística, a lesão da pele tinha grande número de neutrófilos e raros eosinófilos. Durante o curso da infestação havia ao redor da larva uma área de necrose seguida por células inflamatórias e fibroblastos. Na reinfestação, ocorrida após 30 dias da retirada da larva (com 5 dias após a primoinfestação), a inflamação na pele era intensa um dia após a reinfestação, com grande número de eosinófilos. A presença de fibroblastos circundando a área necrosada foi observada aos 3 dpi no grupo reinfestado, e aos 7 dpi no grupo apenas com a primoinfestação. Também em camundongos infestados e reinfestados, subpopulações de linfócitos: CD4 e CD8 (linfócitos T), e CD45 (linfócitos B) foram analisadas (LELLO, 2006). Nestes roedores, as células CD4⁺ foram significativamente maiores, em número, do que CD8⁺, mas o número absoluto de ambas as células foi maior em animais reinfestados, enquanto que o número de linfócitos B teve aumento gradual em ambos os grupos de camundongos, sendo mais elevado na reinfestação.

Quanto a aspectos blastogênicos, células do baço de camundongos foram examinadas aos 5, 10, 20 e 25 dpi com *D. hominis* e 5, 10, 15, 30 e 60 dias pós-emergência da larva (dpel) (GONÇALVES *et al.*, 2009). Tais células foram cultivadas em meio RPMI-1640 contendo ou não (controle) produtos de secreção das larvas (PSL) de *D. hominis* com idade de 5, 10, 15, 20 e 25 dias. Em cada grupo com cinco camundongos testados nos meios de cultura, o número de células foi significativo para 25 dpi, com crescente aumento na seguinte ordem: PSL-10 d, -25 d, -5 d, -20 d, -15 d e RPMI. Resultados também significantes foram

observados nos testes entre cada meio com células tanto de camundongos dpi ou dpel. Particularmente, em cada dpel grupo versus meio, significância foi somente verificada para 10 dpel, na ordem crescente: PSL-5 d, -20 d, -25 d, -10 d, -15 d e RPMI. Testes comparativos foram também conduzidos entre grupos. Como síntese foi provado que a miíase causou depleção de células do baço, particularmente sob efeito do PSL-10 e -15, tendo ocorrido normalidade do número de células aos 60 dpel.

Na avaliação histopatológica de linfonodos de ratos infestados com *D. hominis* (CARDOSO *et al.*, 2009) foram identificadas: aos 2 dpi hiperplasia no centro germinativo, com grande número de centroblastos, células mitóticas e apoptóticas, além de uma discreta área parafolicular. No paracórtex linfonodal havia também hiperplasia, com presença de células dendríticas, imunoblastos, e vênulas endoteliais com diapedese presenciada a partir dos 4 dpi. Nesta mesma data, a paracórtex, exibia hiperplasia do sinus medular como também sinus dilatado, linfa, macrófagos, neutrófilos, mastócitos, e eosinófilos. Os cordões medulares estavam expandidos e repletos de imunoblastos, células mitóticas e plasmócitos. Linfadenite não foi observada durante a miíase. Quanto à expressão de mastócitos, estes tiveram números similares nos animais controle e infestados, embora ocorresse aumento significativo, aos 7 e 15 dias pós-saída da larva (dpsl). Em contraste, eosinofilia ocorreu tanto aos 4, 10, 15, 20, 28 dpi como também aos 2, 7, e 15 dpsl, principalmente nas últimas três observações de dpi e as duas primeiras de dpsl. Aos 60 dpsl, final do experimento, os tecidos do linfonodo exibiram completa reparação.

Com ênfase a estudos sobre as alterações hematológicas (BARBOSA, SANAVRIA e BARBOSA, 2003) foram observados semelhantes parâmetros (não significativos) de hemácias, das médias da leucometria global, e nas contagens absolutas e relativas de linfócitos, em bovinos infestados experimentalmente com larvas de *D. hominis*.

A expressão de leucócitos sanguíneos circulantes em ratos experimentalmente infestados com *D. hominis* (GONÇALVES *et al.*, 2007) foi analisada estatisticamente antes (controle), durante [aos 6 (L₁), 10 e 15 (L₂), 20 e 28 (L₃) dpi] e após a miíase [aos 7, 15, 30, 60 (dpsl)] dos hospedeiros. Durante a infestação, o número total de leucócitos não apresentou diferença marcante quando comparado todos os grupos de animais, todavia, diferenças significantes foram assinaladas quando comparado os grupos entre si, sendo maiores no grupo controle, 15, 20 ou 28, que aos 6 dpi. Em relação aos neutrófilos, os ratos com L₃ apresentaram número significativamente maior. Semelhança em números ocorreu para eosinófilos ou linfócitos totais, exceto a favor de 20 dpi comparando com os grupos de 6 ou

10 dpi. Nenhuma diferença significativa foi registrada entre o número total de leucócitos e linfócitos; ocorrendo o contrário para neutrófilos aos 7 ou 15 em comparação com 30 dpsl e eosinófilos aos 15 versus 60 dpsl.

2.2 Outros Diptera Oestridae

2.2.1 *Hypoderma*

Como todo Oestridae, larvas de *Hypoderma* são também parasitos obrigatórios de mamíferos (Rodentia, Lagomorpha e Artiodactyla), principalmente nas regiões paleárticas, afrotropical e neártica (HALL e SMITH, 1993). Diferentemente de *D. hominis*, espécimes fêmeas de *Hypoderma* depositam ovos sobre os hospedeiros (aderidos aos pelos). Quanto as L₁ que eclodem, após 3-7 dias de incubação dos ovos, sua penetração na pele íntegra dos hospedeiros é seguida por migração pelos tecidos, durante 4-6 meses, até atingir uma localização final embaixo da pele, quando então formam uma miíase furuncular por L₂ e L₃. As consequências da hipodermose determinam também elevados prejuízos econômicos, sobretudo à pecuária bovina, por perda de peso, produção de leite e depreciação do couro. Ao contrário de *D. hominis*, que parasitam múltiplos hospedeiros, *Hypoderma*⁴ contém espécies hospedeiro específica. Usualmente o ciclo completo de *Hypoderma* dura 6-12 meses.

Resistência adquirida por bovinos a sucessivas infestações naturais por *Hypoderma* foi primeiramente assinalada por Carpenter, Hewitt e Reddin (1914). Embora ocorram fatores de resistência nas reinfestações, com diminuição do número de larvas viáveis no hospedeiro, em ensaios com bovinos (COLWELL, 2001) submetidos: a 100 L₁ (infestação única, primeiro grupo), 2 exposições de 50 larvas (com intervalos de 15 dias, segundo grupo), 4 exposições de 25 larvas (aos 0, 9, 15 e 21 dpi; terceiro grupo) os níveis de anticorpos IgG foram semelhantes nos três grupos de animais.

⁴ Em natureza, indivíduos humanos podem acidentalmente apresentar de forma transitória: lesões oftálmicas ou cutânea por L₁, e mais raramente há o completo desenvolvimento dos três estágios larvais (ZUMPT, 1965).

Em relação à resposta imune-humoral, ensaios foram realizados em coelhos infestados com L₁ de *Hypoderma bovis* (primeiro grupo), infestados e reinfestados com L₁ de *Hypoderma lineatum* (segundo grupo), e animais imunizados com extrato total de larvas L₁ de *H. lineatum* e frações parcialmente purificadas dos produtos metabólicos das larvas, compostas principalmente de colagenase (terceiro grupo) (BOULARD e WEINTRAUB, 1973). Como resultados os coelhos apenas infestados (com ambas *Hypoderma*) e nos reinfestados exibiram títulos de anticorpos (aglutininas) que haviam aumentado rapidamente entre 30 e 60 dias e permanecendo até cerca de 200 dpi. Em relação aos coelhos imunizados com altas doses de antígeno, administrada em três inóculos (intervalo de três dias cada), as aglutininas apareceram 5 dias após o primeiro inóculo e decresceram nos próximos 8 dias, apesar dos dois outros inóculos de antígeno. Os animais imunizados com apenas um inóculo os resultados foram similares aos dos coelhos com três inóculos, mas o título máximo de anticorpos ocorreu aos 18 dias após o 1º inóculo e foi muito menor. Nos coelhos inoculados com baixas doses de antígeno (4 inóculos – dias 1, 3, 9, 21) as aglutininas apareceram aos 20 dias após o 1º inóculo, aumentando gradualmente até aproximadamente 50 dias e em seguida tendo rápido decréscimo. Na análise imunoeletroforética do soro foi demonstrado que os produtos metabólicos das larvas foram mais importantes que os extratos totais das larvas, na estimulação de anticorpos.

Em período de baixa infestação natural por *Hypoderma* sp. (entre 1995 a 2000) foi demonstrado que na primoinfestação os bovinos tiveram uma baixa resposta de anticorpos (IgG) por 4-5 meses, seguida com aumento, pico máximo aos 7-8 meses pós-infestação. Nos animais com maior carga parasitária (mais que 20 larvas) os anticorpos foram detectados, nas primeiras seis semanas (BOULARD, 2006).

Pesquisas adicionais, utilizando bovinos natural e experimentalmente infestados com *H. bovis* e *H. lineatum* (BOULARD, 1969; BOULARD, 1970; BOULARD, SORIA e SORIA, 1970) provaram que a resposta imune-humoral do hospedeiro advinha da antigenicidade da colagenase⁵ de L₁ (denominada hipodermina C – enzima liberada continuamente por L₁). Outras enzimas, denominadas hipoderminas⁶: A (serino protease), B

⁵ Primeira colagenase descrita em invertebrado.

⁶ Dos três estágios larvais somente L₁ produz hipodermina.

(semelhante à tripsina), e D (semelhante a tripsina) isoladas de L₁ de *H. lineatum* foram usadas em experimentos sobre a interação *Hypoderma*-bovino (BOULARD, 2006).

A dinâmica da circulação de IgG anti-hipodermina C foi avaliada em quatro grupos de bovinos experimentalmente infestados com 50 L₁ de *H. lineatum*, com ausência ou não de uma primoinfestação natural (COLWELL *et al.*, 2008). Nos animais os anticorpos anti-hipodermina C foram detectados em bovinos sem prévia infestação após 6 semanas, tendo pico máximo na semana 24, 25, e 32. Em contraste, os animais com prévia infestação natural (e submetidos à aplicação de larvicidas) mostraram grande aumento das taxas de anticorpos na terceira semana após a infestação experimental, com pico na semana 8, 24 e 26.

Em ensaios sobre lesão cutânea recente (após 6-96 horas), em bovinos infestados experimentalmente com larvas de *H. lineatum* (LÓPEZ *et al.*, 2005), 48 horas pós-infestação (hpi) a reação da pele foi caracterizada por um infiltrado inflamatório moderado na derme superficial, por células mononucleares e raros neutrófilos polimorfonucleares. Nos animais reinfestados (após 1 ano da primoinfestação) a resposta na pele foi mais intensa e extensa no começo da reinfestação. Um infiltrado perivascular foi observado 6hpi na derme superficial, principalmente por células mononucleares. A reação da pele aumentou consideravelmente aos 12 hpi, podendo ser observado infiltrado inflamatório perivascular com grande número de eosinófilos. Após 48-96 hpi a resposta inflamatória era muito intensa com envolvimento da derme tanto superficial como profunda caracterizada pela presença, sobretudo, de neutrófilos polimorfonucleares, eosinófilos e linfócitos. Em ambos os grupos de bovinos o infiltrado perivascular por linfócitos T CD3⁺ foi moderada no grupo apenas infestado e expressiva nos animais reinfestados. Quanto aos linfócitos B, os animais reinfestados tiveram grande número destas células na derme profunda.

Vários mecanismos de imunomodulação envolvem a participação de hipodermina A na infestação de bovinos por *Hypoderma*, como redução da produção de citocinas (NICOLAS-GAULARD, MOIRE e BOULARD, 1995) e a expressão de receptores de linfócitos, tais como CD2, CD4, CD18 (MOIRÉ *et al.*, 1997, MOIRÉ, 1998). Ensaios com purificados de hipodermina B e C apresentaram respectivamente, média e nula atividade imunossupressiva (BOULARD, 2006). Em função da antigenicidade e imunogenicidade determinada pelas hipoderminas, várias investigações tem sido motivadas para fins de controle da hipodermose, inclusive através do uso de vacinas (BARON e COLWELL, 1991b; BOULARD, 2006).

Bovinos imunizados com a combinação de purificados de hipodermina A, B, e C mais monofosforil lipídico A (MPL) ou apenas com MPL e infestados com larvas de *H. lineatum* (BARON e COLWELL, 1991a), tiveram significante aumento da proliferação dos linfócitos *in vitro*, incubados com concavalina A, 4 e 12 semanas pós-infestação (pi), quando comparados com o grupo controle. Por outro lado, os animais imunizados com hipoderminas mais MPL tiveram uma grande proliferação de linfócitos *in vitro* quando incubados com extrato bruto de larvas L₁ de *H. lineatum*, em comparação com os animais imunizados apenas com MPL.

Com ênfase ao entendimento da participação de secreções de L₁ de *H. lineatum* na modulação da resposta imune dos hospedeiros (usando extrato bruto de L₁ e frações purificadas das hipoderminas A, B, e C) na presença ou não de Con A, em ensaios sobre a proliferação de células mononucleares do sangue periférico, foram analisados bovinos com ou sem prévia infestação por *H. lineatum* (PANADERO *et al.*, 2009). A presença das células monucleares foi significativa nos animais reinfestados sendo a hipodermina A a maior inibidora da resposta proliferativa, seguida por hipoderminas B e C, e extrato bruto das larvas. Hipodermina A provocou aumento de IFN γ e a supressão da produção de IL-10 em ambos os grupos de animais. Quanto a culturas de células de animais previamente infestados, a hipodermina B reduziu a produção de IL-10 quando estimulada pela Con A. Nenhuma modulação na produção de citocinas foi mediada por hipodermina C. Nos testes com extratos brutos de L₁ ocorreu diminuição significativa da produção de IFN γ , IL-4 e IL-10 nos grupos estudados.

Também sobre a resposta de citocinas, em tecidos da lesão e no soro sanguíneo (sistêmica), durante a penetração de larvas L₁ de *H. lineatum* (DACAL *et al.*, 2009), três grupos de bovinos foram infestados com 25 L₁. No primeiro grupo (sem exposição prévia a infestação), e nos segundo e terceiro grupos (que haviam sido artificialmente infestados por 2 ou 3 anos consecutivos), foi observado aos 6 hpi um aumento significante de IL-4 (nos tecidos) dos reinfestados. Todavia, as IL-4⁺ diminuíram significativamente 48 hpi nesses dois grupos de animais reinfestados. Células IL-10⁺, na pele, aumentaram no grupo sem prévia infestação as 6hpi e as 48 hpi, enquanto que em ambos os grupos reinfestados o aumento aconteceu após as 12 hpi, com pico as 48 hpi. Células locais (IFN γ ⁺) mostraram um aumento significante, em todos os grupos, 6 hpi. Subsequentemente, essas células decresceram significativamente no grupo 1 e 2 as 12 hpi, entretanto no grupo 3 o decréscimo foi significante as 48 hpi. Com relação às citocinas do soro, não houve diferenças significantes,

entre os grupos, para IL-4 e IFN- γ . No entanto, a concentração de IL-10 no soro foi significativamente diferente entre os grupos: as 12 hpi, pró grupo 3 e 2 versus grupo 1; e as 48 hpi, pró grupo 2 versus 1.

2.2.2 *Oestrus ovis*

Outro Oestridae de grande importância médica e veterinária é *O. ovis*, espécie cosmopolita, cujas larvas⁷ são agentes da miíase naso-sinusal de ovinos e caprinos (ZUMPT, 1965). A fêmea dessa mosca, após a cópula, põe larvas nas aberturas nasais dos hospedeiros, devendo, em seguida, as L₁ mudarem para L₂ e L₃ na cavidade naso-sinusal (HALL e WALL, 1995). O parasitismo das larvas (por 30-60 dias) acarreta manifestações clínicas nos hospedeiros, como rinites, sinusites e lesões pulmonares, que induz a grandes prejuízos econômicos, incluindo até morte dos animais (DORCHIES *et al.*, 2006).

Quanto a resposta imune-humoral durante a oestrose experimental em ovinos, IgG e IgA foram detetados contra antígenos da glândula salivar de larvas L₂ e L₃ (TABOURET *et al.*, 2003). Durante a infestação natural foi também observado aumento de anticorpos em ovinos adultos (IgM e IgG) e jovens (IgM, IgG, IgA) (SUÁREZ *et al.*, 2005).

Sob testes ELISA, IgG foi avaliada em três grupos de ovinos, expostos a altas taxas (não indicado pelos autores) de infestação natural por *O. ovis* (ÂNGULO-VALADEZ *et al.*, 2008) na pesquisa utilizando como antígenos: extratos brutos de larvas L₂, extratos de glândulas salivares de larvas L₂, e extratos de glândulas salivares de larvas L₃. Altos níveis de IgG, em tecido lesado (local) e soro sanguíneo (sistêmica) ocorreu quando foram usados como antígenos glândulas salivares de L₂ ou L₃.

Em um ensaio para o diagnóstico da oestrose (SÁNCHEZ-ANDRADE *et al.*, 2005) – a partir de caprinos mantidos sob infestação natural – produtos de secreção e excreção de L₂, considerados antígenos metabólicos, foram mais efetivos do que antígenos somáticos

⁷ L₁ pode causar em indivíduos humanos lesão transitória ocular, nasal, ótica e faringeana. Raramente L₂ e L₃ são encontradas em humanos (ZUMPT, 1965).

(macerado total de L₂), sobretudo devido a sua correlação direta entre infestação e a resposta imune-humoral (IgG) dos hospedeiros. A resposta sistêmica de IgG em caprinos adultos e jovens submetidos, respectivamente, a infestação natural e experimental, com larvas de *O. ovis* foi monitorada utilizando extratos de glândulas salivares de L₃ como antígeno (ÂNGULO-VALADEZ *et al.*, 2009). Os anticorpos, em animais jovens, não foram estatisticamente diferentes. Nos animais adultos, o nível de IgG estava correlacionado com a prevalência da oestrose nestes animais.

Quanto à resposta inflamatória da oestrose natural em ovinos Van-khanh *et al.*, (1996) verificaram na membrana mucosa do septo nasal dos animais infestados (versus controle) duas vezes mais mastócitos, 17 vezes mais eosinófilos; estas últimas se apresentaram 29 e 58 vezes mais na concha e seio nasal, respectivamente. Com efeito, os autores admitiram a existência de hipersensibilidade durante a oestrose. Em estudos subsequentes com ovinos e caprinos naturalmente infestados com *O. ovis* Van-Khanh *et al.*, (1999) assinalaram intensa inflamação, mais evidente em ovinos, sobretudo pela presença de mastócitos. Para a resposta imunecelular na oestrose experimental Tabouret *et al.*, (2003), observaram no local da miíase, hiperplasia, metaplasia e eosinofilia, além de linfócitos T e B, macrófagos e mastócitos.

Em ovinos infestados por cinco sucessivas semanas com *O. ovis* (YACOB *et al.*, 2004) foram registrados: acúmulo de mastócitos, leucócitos e eosinófilos na mucosa do trato respiratório superior; além de um significativo acúmulo de eosinófilos nos tecidos da traquéia, brônquios e pulmões. Também foi demonstrado que a eosinofilia sanguínea estava mais elevada aos 4 dpi, acompanhado por um pico máximo somente aos 4 dias após a segunda infestação.

Também em ensaios com ovinos infestados e ou reinfestados com L₁ de *O. ovis* (JACQUIET *et al.*, 2005), foram avaliados: um grupo de animais infestados por três vezes (dia 8, 43 e 78), havendo um tratamento com ivermectina (larvicida) no dia 64; um segundo e terceiro grupos foram apenas infestados; no entanto, o terceiro grupo recebeu tratamento com corticóide (imunossupressor) com efeito de persistência de 1 a 2 semanas - 24 horas antes da infestação. Todos os grupos receberam tratamento com ivermectina antes do início do experimento, e os grupos 2 e 3 receberam outra dose do tratamento no 14 dpi. O desenvolvimento das larvas foi mais rápido no grupo tratado com corticóides (grupo 3), e nos demais grupos de animais, as larvas se desenvolviam lentamente. Nenhuma diferença nas taxas de estabelecimento das larvas foi notada quando comparado os grupos infestados ou

reinfestados. Nos grupos de animais com infestação única (grupos 2 e 3): houve um pico de eosinófilos sanguíneos duas semanas após a infestação. No grupo 1 dos animais reinfestados foi observado picos de eosinófilos de 1 a 3 semanas após cada infestação; 4 a 5 semanas depois o número de eosinófilos retornava aos valores da prévia infestação. O grupo 1 teve significativamente mais eosinófilos, aos 7 dias após a terceira reinfestação, que os grupos 2 e 3 aos 7 dpi. Aos 14 e 21 dias após a terceira reinfestação no grupo 1, e aos 14 e 21 dpi no grupo 2 foi observado nos animais valores similares de eosinófilos, entretanto estes valores foram significativamente mais altos que os do grupo 3.

2.2.3 *Cuterebra*

Larvas de espécies de *Cuterebra*, que tem exclusiva distribuição no Novo Mundo, também provocam miíases cutâneas⁸, do tipo hospedeiro espécie-específico, em animais mamíferos silvestres: roedores, lagomorfos e primatas (HALL e SMITH, 1993), sendo a maioria das espécies, parasitos de roedores ou lagomorfos (WEISBROTH, WANG e SCHER, 1973). Usualmente a infestação ocorre nos animais jovens através da penetração de L₁ via orifícios naturais, pois as fêmeas do inseto depositam ovos próximos ao ninho, ou em trilhas percorridas pelos hospedeiros. Ao penetrar, a L₁ migra pelo hospedeiro (HUNTER e WEBSTER, 1973) e alcança os tecidos subcutâneos, onde muda para L₂ e L₃. Geralmente o parasitismo é de 30 dias, sendo o ciclo completo, de ovo a ovo, em cerca de dois meses (LEITE e WILLIAMS, 1988).

O uso de camundongos (*Mus musculus*, *Peromyscus boylii*, *Peromyscus leucopus*, *Peromyscus pectoralis*), gerbil (*Gerbillus gerbillus*), ratos (*Sigmodon hispidus*) e coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) infestados com *Cuterebra fontinella* (GINGRICH e BARRET, 1976); gerbis, *M. musculus*, *P. leucopus* e *P. pectoralis* como hospedeiros susceptíveis às larvas de *C. fontinella*, revelou serem estas três últimas mais susceptíveis quando as L₁ penetraram via nasal ou anal, ao contrário do que ocorria pela via pele (injeção subcutânea) ou ocular.

⁸ Podem acidentalmente causar miíase em indivíduos humanos

A resposta imune-humoral de animais de laboratório, ratos e camundongos, a antígenos (macerado total de L₁) de *C. fontinella* foi monitorado durante a primo e multi-infestação (PRUETT e BARRETT, 1983). Em ratos ocorreu menor positividade à infestação, depois de duas exposições, ao contrário de camundongos que exibiram mais susceptibilidade em ambos os modos de infestação.

A histologia patológica cutânea da miíase por *C. fontinella* (*C. angustifrons*) em *P. leucopus* naturalmente infestado, havia densa camada de necrose próxima à larva, seguida de um infiltrado leucocitário difuso, principalmente com neutrófilos, além de eosinófilos, células plasmáticas e linfócitos. Seguindo-se, logo após a saída da larva, a presença de extensa área de infiltração granulocítica, resultando depois em cicatriz cutânea (PAYNE e COSGROVE, 1966).

Em infestação natural de coelhos por *Cuterebra buccata*, foi possível observar, na pele, três distintas áreas de lesão: a primeira de inflamação aguda, sendo os neutrófilos as células predominantes; a segunda, de fibrose; e a terceira de inflamação crônica, consistindo de linfócitos, células plasmáticas, e macrófagos teciduais (WEISBROTH, WANG e SCHER, 1973).

Estudando um caso (biópsia) de miíase por *Cuterebra* sp., em indivíduo humano (DELSHAD *et al.*, 2008), foi observado no infiltrado inflamatório neutrófilos e eosinófilos circundando a larva.

Quanto às alterações hematológicas de *P. leucopus* infestados naturalmente com *C. fontinella* (DUNAWAY *et al.*, 1967) há registro de diminuição de eritrócitos e hemoglobina e aumento de leucócitos.

Ensaio realizado com roedores *Tamias striatus* (BENNETT, 1973) infestados experimentalmente com *Cuterebra emasculator* provaram que os tipos de leucócitos sanguíneos variam com o estágio larvar no hospedeiro. O número de linfócitos decresceu com a presença da L₃, e após a saída desta larva do hospedeiro o número destas células aumentaram. Sobre neutrófilos, estes eram em número baixo no início da infestação, e aumentando nos subseqüentes estágios larvais, decrescendo da L₃. O número de monócitos aumentou durante a segunda metade da infestação e os eritrócitos duplicaram em número nos animais parasitados.

2.3 Outros Diptera causadores de miíases

Outras espécies de muscomorfas não Oestridae são também de grande importância médico-veterinária, dentre elas: *Lucilia cuprina*, *Cochliomyia hominivorax*, *Chrysomya bezziana*, todas Calliphoridae; e *Wohlfahrtia magnifica* (Schiner, 1862) e *Sarcophaga haemorrhoidalis*, ambas Sarcophagidae (HALL e SMITH, 1993).

Embora as larvas de *L. cuprina*⁹ sejam parasitas facultativas, certas populações do inseto podem causar miíase cutânea (denominada de bicheira) em animais, principalmente ovinos, resultando em grandes prejuízos econômicos, como perda de peso, lã, fertilidade, e até a morte de animais (TELLAM e BOWLES, 1997). A espécie é cosmopolita, mas as populações que provocam miíases (durante cerca de 7 dias) estão mais presentes na África e Austrália (HALL e SMITH, 1993). A pré-contaminação, do pelo ou pele dos animais, por bactérias é um fator atrativo (odor) para que as fêmeas do inseto depositem ovos, sobre os quais, após 24 horas as L₁ eclodem e dão início a miíase.

Quanto à resposta imune-humoral em raças de ovelhas resistentes ou susceptíveis a dermatite bacteriana e infestadas com larvas de *L. cuprina*, anticorpos IgE foram mais identificados nos tecidos da pele dos animais resistentes a dermatite. (COLDITZ *et al.*, 1994). Semelhantes estudos com excreção e secreção de L₁+L₂+L₃ (O'MEARA, NESSA e SANDEMAN, 1997), demonstraram a presença de anticorpos no soro (IgA, IgM, IgG), tanto em animais susceptíveis como resistentes a miíase. Entretanto, houve uma grande variação individual na especificidade dos anticorpos, provando que a resistência à infestação pode ser independente dos anticorpos do soro. Por outro lado, embora no exsudato das feridas houvesse alto nível de IgG, estes anticorpos reconheceram poucos antígenos em comparação com os anticorpos do soro dos mesmos animais, sugerindo que o exsudato contém poucos anticorpos funcionais.

Em ovinos imunizados com ovalbumina e infestados com larvas de *L. cuprina* (SANDEMAN *et al.*, 1995), imunoglobulinas (IgG total, e IgG específico anti-ovalbumina)

⁹ Podem acidentalmente causar miíase em indivíduos humanos

eram degradadas, ao nível de 60% (IgG total), nos exudatos inflamatório, 6 horas pós-infestação, enquanto para IgG específicos o índice foi de 75%. Ensaio *in vitro* revelaram serem enzimas do extrato bruto de larvas, tripsinas e quiotripsina, responsáveis pela degradação dos anticorpos, fato animador para o desenvolvimento de vacinas, pois a passagem de anticorpos clivados através da matriz peritrófica (membrana que reveste o alimento dentro do intestino médio da larva), teriam acesso a moléculas (antígenos) secretadas pelas células intestinais do inseto imaturo.

A imunização de ovinos, via intradérmica, com antígenos recombinantes de matriz peritrófica: peritrofina 44, 48 e 95 de *L. cuprina* (COLDITZ *et al.*, 2002), provou haver elevação de anticorpos específicos anti-peritrofina na pele (local de inoculação).

Quanto à resposta inflamatória e imunecelular da mífase por *L. cuprina* (BOWLES, GREY e BRANDON, 1992), foi observado na pele de ovinos: neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, e vários linfócitos: B, TCD4⁺, TCD8⁺ e TCR $\gamma\delta$, sendo semelhante à quantificação dos três primeiros tanto na primo quanto nas reinfestações, sugerindo não haver memória imunológica nos animais. Em ovinos susceptíveis e resistentes à dermatite bacteriana, e infestados com larvas de *L. cuprina* havia presença de eosinófilos na pele dos susceptíveis, enquanto que nos animais com baixa taxa de dermatite a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório foi mais intensa (COLDITZ *et al.*, 1994). A presença de neutrófilos e eosinófilos na pele lesada de ovinos infestados experimentalmente com 500 L₁ de *L. cuprina* foi observada durante 8 dias sucessivos (COLDITZ *et al.*, 2005). Semelhantes ensaios, com 100 L₁ de *L. cuprina* (ELHAY *et al.*, 1994) evidenciaram na pele presença de CD45⁺, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, além de linfócitos expressando marcadores de superfície típicos de células T (CD4, CD8, $\gamma\delta$, TCR). Tais células tendo pico máximo 48 horas pós-infestação. Na avaliação dos níveis de mRNA (obtido de tecidos congelados) citocinas IL-6, IL-1 α , IL-1 β , IL-8 tiveram níveis aumentados.

O tráfico de linfócitos através da linfa eferente dos linfonodos pré-escapulares, em ovinos infestados e reinfestados experimentalmente com larvas de *L. cuprina* (BOWLES *et al.*, 1994) foi caracterizado por um aumento de T CD4⁺ em relação a T CD8⁺ nas primeiras 48 horas após o início da lesão, enquanto que após 72 horas as células T CD8⁺ excederam as T CD4⁺. Para a reinfestação, o aumento das T CD8⁺ foi pronunciado e ocorreu durante as primeiras 48h. A porcentagem de linfócitos B, IFN- γ e receptores de IL-2 embora tenham aumentado os níveis foram maiores nos animais reinfestados.

Na tentativa de vacinar ovelhas com macerado total de L₁ (BOWLES *et al.*, 1996), achados histopatológicos da miíase indicaram a presença de CD4+, TCR $\gamma\delta$, e células CD1 (papel especializado na apresentação de antígenos lipídicos), localizadas logo abaixo da epiderme das ovelhas vacinadas. Em uma revisão do tema, sobre miíases em ovinos (NASH *et al.*, 1996), foi postulado que no início da inflamação aguda há grande infiltrado de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e células de Langerhans, acompanhada por linfócitos em discretas áreas adjacentes ao local inflamado. Na pele lesada foram detectadas elevados níveis de citocinas, TNF- α , enquanto linfocinas IL-1 β , IL-6 e IL-8 tinham baixos valores, estes últimos tendo provável envolvimento na homeostase celular da pele.

A infestação experimental de ovinos com 500 L₁ de *L. cuprina* durante sucessivos dias (8 dias) e - aplicação de inseticida no décimo dia - induziu miíase cutânea moderada à grave (COLDITZ *et al.*, 2005). Nos animais, foi detectado, na pele lesada, citocinas pró-inflamatórias: IL-1a, IL-1b, IL-6 e IL-8; além de elevação nas concentrações de cortisol. Entre outros fatores, as citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-6, induziram mudanças no metabolismo energético, na utilização dos aminoácidos, no comportamento e apetite dos animais. Cortisol, IL-6 e consequências metabólicas da resposta na fase aguda são sugeridos como os principais fatores dos efeitos sistêmicos causadores de danos na lã desses animais.

Outra espécie de grande importância médica-veterinária é *C. hominivorax*, cujas larvas são parasitos obrigatórios de mamíferos, (em média, por oito dias), inclusive humanos. A miíase é enzoótica em países do Caribe e América do Sul (exceto Chile) (WYSS, 2000). O sucesso com a erradicação desta mosca, desde o sul dos Estados Unidos da América do Norte (GALVIN e WYSS, 1996) até o Panamá (BERMÚDEZ *et al.*, 2007), resultando em custo/benefício de 1:4, não tem motivado maiores interesses em estudos da interação parasito-hospedeiro. Todavia, há dois tipos de anticorpos monoclonais específicos para distinção de ovos e larvas de *C. hominivorax*, por teste de ELISA, que permite distinguir esta miíase obrigatória de casos de miíases facultativas, tendo com agente etiológico outras espécies de Calliphoridae americanas: *Cochliomyia macellaria*, *Phormia regina*, *Phaenicia sericata*, *Calliphora vicina*, *Chrysomya rufifacies* (FIGAROLA *et al.*, 2001).

Em ensaios experimentais com L₁ de *C. hominivorax* (THOMAS e PRUETT, 1992), em ovinos, IgG específico (usado como antígeno extrato bruto de larvas L₁) foi detectado que persistiu por 2 meses, com pico na terceira semana.

Em adição, outra espécie da mesma família, com aspectos biológicos e patológicos semelhantes a *C. hominivorax* é *C. bezziana*, com zoogeografia limitada ao velho

mundo, particularmente de ocorrência em países da África, Ásia e Austrália (HALL e SMITH, 1993). Não obstante, seu controle não obteve sucesso com o uso da técnica de macho estéril praticada para as moscas da bicheira americana. Por tal efeito a possibilidade de ser produzida uma vacina contra a bicheira por *C. bezziana* tem sido explorada através de ensaios com macerado total de L₁, matriz peritrófica, e cárdia (proventrículo ou porção anterior do intestino médio) de L₃, o que provou induzir reação imunológica, com significativa redução do crescimento das larvas em ovelhas (SUKARSIH *et al.*, 2000).

Dados histopatológicos da infestação natural de bovinos com *C. bezziana* (HUMPHREY, SPRADBERRY e TOZER, 1980), fez menção a intenso infiltrato inflamatório de neutrófilos, com hemorragia e necrose associada ao desenvolvimento das larvas, devendo a fase de cicatrização, quando apresentava eosinófilos e mastócitos, ocorrer subsequentemente. Mudanças hematológicas e bioquímicas foram também registradas no soro: decréscimo de proteínas total e progressivo aumento de globulinas, além de neutrofilia e anemia.

Particularmente na família Sarcophagidae, dois gêneros são mais importantes: *Wohlfahrtia* e *Sarcophaga*, devendo os espécimes adultos fêmeas, de ambos os gêneros, depositarem larvas sobre vertebrados. *W. magnifica* é a mais importante espécie, de ocorrência no velho mundo: Europa, Ásia e África (HALL e SMITH, 1993). Raros estudos sobre a resposta imune-humoral de ovelhas a antígenos de L₃ de *W. magnifica*, usando glândulas salivares, intestino, cárdia, cutícula, macerado total da larva (FARKAS, HORNIX e GYURKOVSKY, 1998), identificou que apenas o antígeno de glândulas salivares foi específico para teste de ELISA. Em um caso de miíase furuncular causado por *W. magnifica*, em criança, altos níveis de anticorpos IgE, e significativa eosinofilia sanguínea foram descritos (TUYGUN *et al.*, 2009).

3 JUSTIFICATIVA

A importância médica e veterinária de *D. hominis* é devida ao fato de seus três estágios larvais serem parasitos cutâneos, isto é, causadores de miíases obrigatórias de mamíferos, inclusive humanos; tendo maior ênfase as consequências do parasitismo à exploração pecuária, determinando elevados prejuízos econômicos, sobretudo à produção de animais bovinos no Brasil. Em adição, a distinção dos aspectos histopatológicos em cada fase larvar e a expressão dos leucócitos sanguíneos na reinfestação experimental, pretende fornecer informações inovadoras que venham alicerçar e ou subsidiar novas pesquisas. A Dissertação tem essencialmente caráter de revelar aspectos básicos ou fundamentais, os quais possam alicerçar princípios aplicativos que venham nortear o controle da dermatobiose, enfermidade que continua enzoótica e endêmica na América Latina.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais

Estudar os aspectos histopatológicos e a expressão de leucócitos sanguíneos do berne em ratos submetidos à reinfestação, associados com a cronologia da miíase e com o desenvolvimento de cada estágio larvar de *D. hominis*.

4.2 Objetivos específicos

Estabelecer parâmetro para o uso do rato/berne como modelo para ensaios experimentais focalizando o inseto e ou a sua relação com o hospedeiro.

Verificar o desenvolvimento das larvas durante a reinfestação.

Usando de parâmetros acima, cronologia e desenvolvimento, avaliar o processo inflamatório na pele lesada e a expressão de leucócitos sanguíneos nos animais.

5 METODOLOGIA

5.1 Obtenção e manutenção das larvas

Larvas de *D. hominis* foram colhidas de bovinos naturalmente infestados, sacrificados em frigoríficos, e usadas para iniciar a criação do inseto em laboratório. Após a coleta, as larvas foram transferidas para frascos de vidro, contendo serragem umedecida (com água destilada), até o transporte para o Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária, do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG. As larvas foram condicionadas, no laboratório, em Béqueres (150 ml), cada um com cinco larvas, contendo serragem esterilizada e umedecida diariamente. Os Béqueres foram tampados com tela de nylon, presa com elástico e mantidos em estufa B.O.D., sob temperatura de 26°C e umidade relativa de 80-90%. Após 48 horas, as pupas formadas foram removidas do fundo do copo e parcialmente enterradas na serragem, de maneira que seus espiráculos fiquem voltados para cima.

Moscas adultas, emergidas no interior dos Béqueres, obtidas a partir de 28 dias do estágio de pupas, foram transferidas, por casais, para tubos de plástico, medindo 2,5 cm de diâmetro por 5,0 cm de comprimento, para fins de acasalamento, do modo como fizera Smith (1973). Tão logo fosse efetivada a cópula, a fêmea foi separada do macho e transferida para frascos de vidro (500 ml), com tampa telada, contendo, cada um, 5-8 insetos foréticos (*Musca domestica*) capturados no campo, nos quais ocorreu a postura dos ovos de *D. hominis*. Os foréticos, que continham ovos foram contidos em frascos de vidros e mantidos em estufa incubadora B.O.D. a 25°C e umidade relativa de 80-90%, durante o período de 7 dias, para a incubação dos ovos.

Para a eclosão das larvas, estas foram estimuladas pela aproximação dos ovos de *D. hominis* à pele de ratos (*Rattus norvegicus*) e, simultaneamente, submetidos a CO₂ expirado por um indivíduo humano. As larvas recém-eclodidas foram coletadas com o auxílio de um pincel e posteriormente utilizadas em ensaios iniciais, para infestação e reinfestação experimental dos roedores.

5.2 Infestação experimental de roedores e coleta de amostras

Todos os ensaios com animais estão de acordo e autorizado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, que já foi aprovado, como protocolo n.106/2009.

Foram utilizados no estudo 20 ratos (machos) *Wistar* (*R. norvegicus*), peso médio de 200 gramas, subdivididos em 4 grupos de cinco animais cada. Dois grupos (1 e 2) foram infestados com 4 larvas de *D. hominis* recém-emergidas, depositadas em 4 distintas áreas da região dorso-lombar. Após 6 dias da infestação (dpi), os roedores foram reinfestados com 4 larvas. Um grupo 3 (controle positivo), serviu para o desenvolvimento, emergência natural das larvas, formação de pupas e viabilidade dos imagos de *D. hominis*, e um grupo 4 (controle negativo). Os ratos foram mantidos, por grupos, em gaiolas de plástico (com tampa de arame), forradas com maravalha (esterelizada), e alimentados com ração balanceada (Labina – Purina) e água *ad libitum*.

Cada rato dos grupos 1-3 foram previamente anestesiados, via intraperitoneal, com uma mistura de 0,64 g/ml de cloridrato de ketamina + 0,02 g/ml de cloridrato de xilazina, na dose de 1,25ml/kg de peso vivo. Em seguida, 4 larvas recém-emergidas foram colocadas na região dorso-lombar/animal, previamente raspada. Após 6 dpi, cada rato dos grupos 1 e 2 foram reinfestados com 4 larvas em distintas áreas (dorso-lombar) da primoinfestação. As datas das biopsias (excisionais) de tecidos cutâneos, contendo a larva, em cada animal, uma da infestação e uma outra da reinfestação ocorreram: 10 dpi e 4 dpr, 28 dpi e 22 dpr (grupo 1); 15 dpi e 9 dpr, 20 dpi e 14 dpr (grupo 2). Também foram feitas biópsia nos animais controle negativo (PEREIRA, LEITE e LEITE, 2001; PEREIRA e LEITE, 2002).

5.3 Exame histopatológico

Os fragmentos de pele biopsiado dos roedores foram fixadas em formol tamponado (CARSON, MARTIN e LYNN, 1973) em PBS pH 7,4 e posteriormente embebido em parafina. Os tecidos foram seccionados com 4 µm de espessura, coradas com hematoxila-

eosina, Dominici, azul de toluidina e tricômico de Mallory; e histologicamente examinados ao microscópio óptico à semelhança de como fizeram Pereira, Leite e Leite (2001).

5.4 Exames de sangue

De todos os grupos de ratos foram também colhidas amostras de sangue, na ponta da cauda, conforme esquema do QUADRO 1, para confecção de esfregaço em lâminas e contagem de leucócitos.

Os esfregaços foram fixados em metanol e corados com May-Grunwald-Giemsa em concordância com estudos prévios em ratos (GONÇALVES *et al.*, 2007). Como previamente definido, um total de 200 células (neutrófilos, eosinófilos, linfócitos pequenos, linfócitos grandes, linfócitos totais e monócitos) por lâmina foram contadas para testes estatísticos não paramétricos (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney U-test) sob o nível de significância de $P < 0,05$, usando o software Graphpad Prism 4.0.

QUADRO 1

Grupo de ratos e intervalo de tempo da coleta das amostras de sangue para contagem específica de leucócitos

GRUPO	IDADES DAS COLETAS
1º grupo (experimental)	6 dpi e 0 dpr; 10 dpi e 4 dpr; 15 dpi e 9 dpr; 20 dpi e 14 dpr; 28 dpi e 22 dpr.
2º grupo (experimental)	6 dpi e 0 dpr; 10 dpi e 4 dpr; 15 dpi e 9 dpr; 20 dpi e 14 dpr; 28 dpi e 22 dpr.
4º grupo (controle negativo)	6, 15 dpb

Abreviatura: dpb: dias pós-biotério; dpi: dias pós-infestação; dpr: dias pós-reinfestação.

6 RESULTADOS

6.1 Susceptibilidade dos roedores

Os hospedeiros controle positivo apresentaram 100% de infestação, 40% deles tinham 4 larvas, e 60% 3 larvas. Neles, o período de desenvolvimento das larvas ocorreu em média de 30 dias. Uma amostra de 15 espécimes de larvas recém-emergidas deram formação a pupas, das quais emergiram adultos férteis.

Nos hospedeiros reinfestados, as larvas estavam no primeiro estágio (L₁) aos 6 dpi e 4 dpr; no segundo estágio (L₂) aos 10 dpi, 15 dpi, 9 dpr e 14 dpr; e terceiro estágio (L₃) aos 20 dpi, 28 dpi e 22 dpr (FIG. 1).

Um sumário do número de larvas que se desenvolveram nos hospedeiros reinfestados está na TABELA 2.

TABELA 2

Número de larvas presente nos animais (5/grupo) na data da biópsia de pele lesada por larvas de *Dermatobia hominis*

Datas das biópsias	Número de animais	Número de larvas Infestação / Reinfestação
6 dpi e 0 dpr	8	4 / -
	2	3 / -
10 dpi e 4 dpr	6	4 / 4
	1	3 / 2
	1	2 / 4
	1	2 / 3
	1	2 / 2
15 dpi e 9 dpr	2	4 / 3
	1	4 / 2
	1	3 / 3
	2	3 / 2
	1	2 / 1
	1	1 / 2
	2	1 / 1
20 dpi e 14 dpr	2	3 / 2
	1	3 / 1
	1	2 / 2
	2	2 / 1
	1	1 / 3
	3	1 / 1
28 dpi e 22 dpr	1	3 / 2
	1	1 / 3
	3	1 / 1

Abreviatura: dpi: dias pós-infestação; dpr: dias pós-reinfestação.

Nota: aos 10 dpi e 4 dpr, 15 dpi e 9 dpr, 20 dpi e 14 dpr, 28 dpi e 22 dpr foram feitas biopsias da lesão da pele com larva da infestação e outra da reinfestação - 5 animais em cada idade.

6.2 Histopatologia da lesão

Na primoinfestação, os fragmentos de pele aos 10 dpi (FIG. 2 e 3), apresentava processo inflamatório exsudativo contendo neutrófilos e eosinófilos, que alcançava o trajeto inicial da invasão da larva, além de espessa camada de neutrófilos ocorria no entorno da L₂, seguidos por marcante número de eosinófilos. Na lesão também foi observado neoformação vascular e produção de fibras colágenas, com fibroblastos e células endoteliais ou prevalência de uma delas. Aos 15 dpi (FIG. 4), a necrose ocupava espessa área em torno da larva, seguido por inúmeros neutrófilos e poucos eosinófilos. Foi possível observar nesta idade neoformações vascular e conjuntiva. Aos 20 dpi (FIG. 5), ocorria acentuada fibrose e redução do infiltrado inflamatório, havendo adjacente à densa camada de necrose, intensa neoformação capilar e produção de fibras colágenas. Aos 28 dpi (FIG. 6), a lesão inflamatória era tênue (delgada faixa) que continha também grande número de plasmócitos, tendo além, extenso contorno de necrose. Em síntese, o processo inflamatório era ascendente até os 20 dpi, decrescendo depois. Nesta cronologia, quanto mais próximo da larva maior era a extensão da área de necrose e inflamação.

Nas frações de pele lesada da reinfestação, aos 4 dpr (FIG. 7) ocorria inflamação exsudativa, com neutrófilos e muitos eosinófilos, estes últimos chegando a formar aglomerados de células. Junto à larva, havia predominância de neutrófilos, seguidos por marcante número de eosinófilos e ausência de neoformação vascular ou conjuntiva. Nesta mesma idade foi identificado também necrose circundando a larva. Aos 9 dpr (FIG. 8), estava mais espessa em torno da L₂, seguida por neutrófilos e muitos eosinófilos, porém visivelmente menos expressivos em número do que aos 4 dpr, além de neoformações vascular intensa e conjuntiva. A inflamação aos 14 dpr (FIG. 9) possuía, sequencialmente, área necrosada mais espessa, próximo a L₂, inúmeros neutrófilos e poucos eosinófilos, além de neoformações vascular intensa e conjuntiva. A histopatologia aos 22 dpr (FIG. 10) evidenciava delgado contorno de infiltrado inflamatório e extensa área de necrose.

Quanto aos mastócitos, nas observações dpi e dpr – embora não tenham sido feitas análises estatísticas – estes tinham menor presença nas áreas inflamadas.

Nos animais controle a pele não apresentava alterações histopatológicas (Fig. 11).

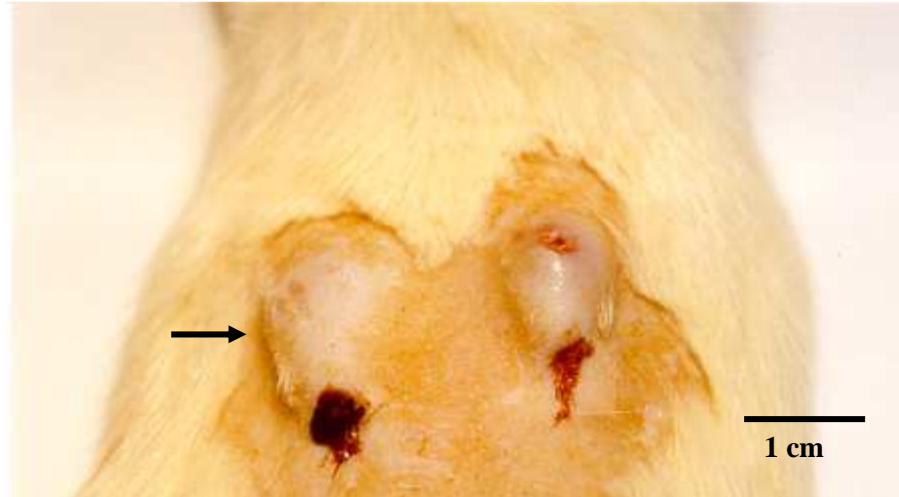


FIGURA 1 – Fotografia da pele do dorso de rato com duas lesões na pele com larvas de *D. hominis* após 28 dias da infestação (seta) e 22 dias da reinfestação.

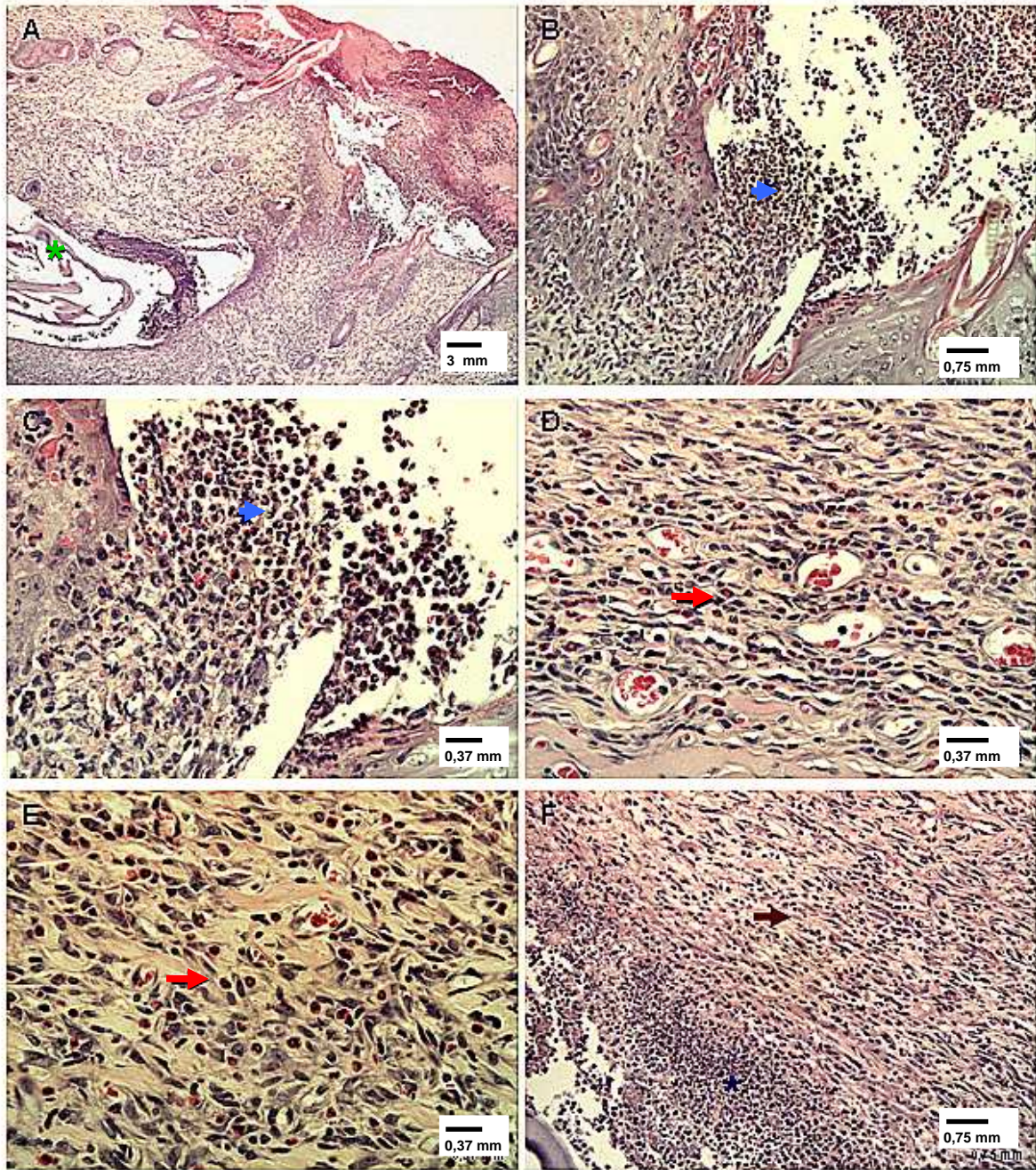


FIGURA 2 - Fotomicrografia de fragmentos de pele de rato experimental infestado com larvas de *D. hominis* aos 10 dias pós-infestação; coloração por HE. (A) Imagem panorâmica. (B) Neutrófilos no orifício de penetração da larva. (C) Detalhe da foto B. (D) Predomínio de eosinófilos próximo a larva. (E) Predomínio de eosinófilos e neoformação vascular e conjuntiva. (F) Neutrófilos e neoformação vascular. Asterisco verde – cutícula da larva; cabeça de seta azul – infiltrado de neutrófilos; seta vermelha – eosinófilos; seta preta – neoformação vascular.

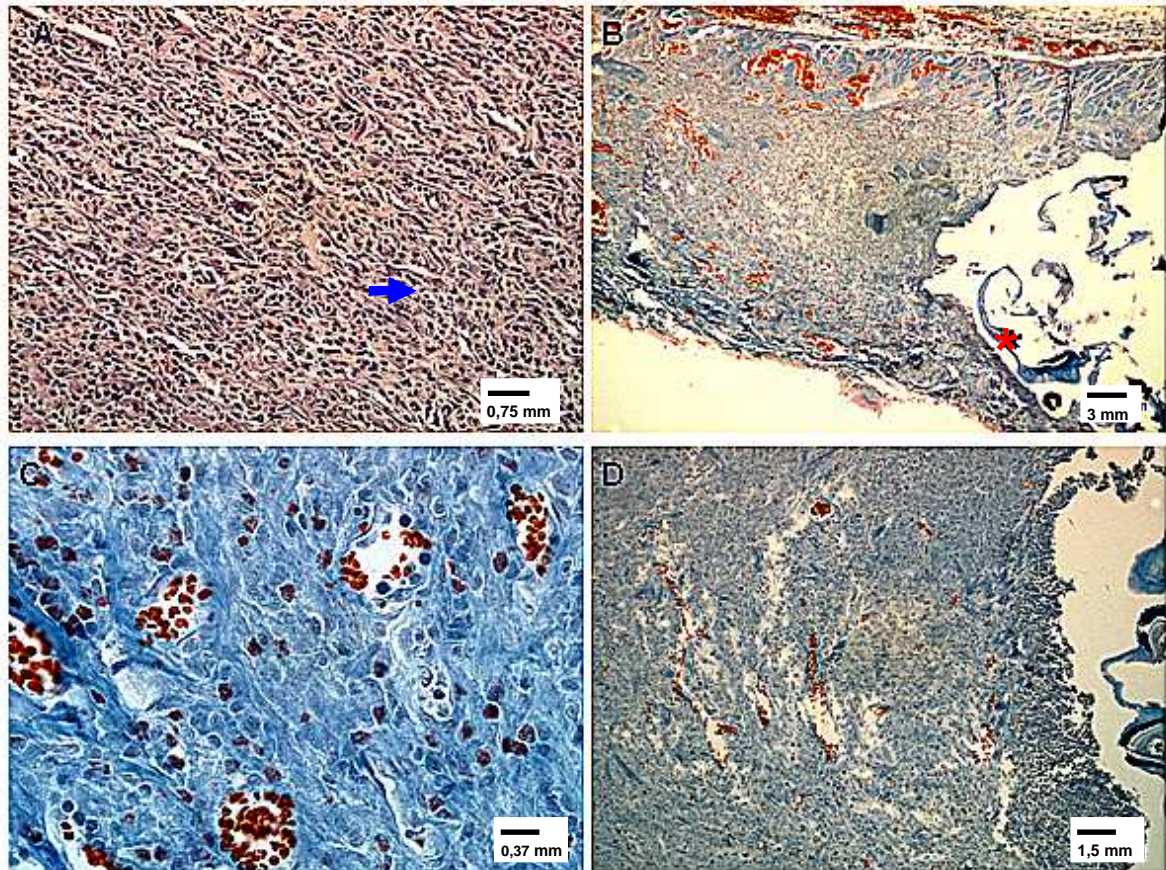


FIGURA 3 - Fotomicrografia de fragmentos de pele de rato experimental infestado com larvas de *D. hominis* aos 10 dias pós-infestação. (A) Neof ormação vascular e conjuntiva; coloração por HE. (B) Neof ormação conjuntiva; coloração por tricrômico de Mallory. (C) Neof ormação conjuntiva; coloração por tricrômico de Mallory. (D) Neof ormação conjuntiva; tricrômico de Mallory. Seta azul – neof ormação vascular; asterisco vermelho – cutícula da larva.

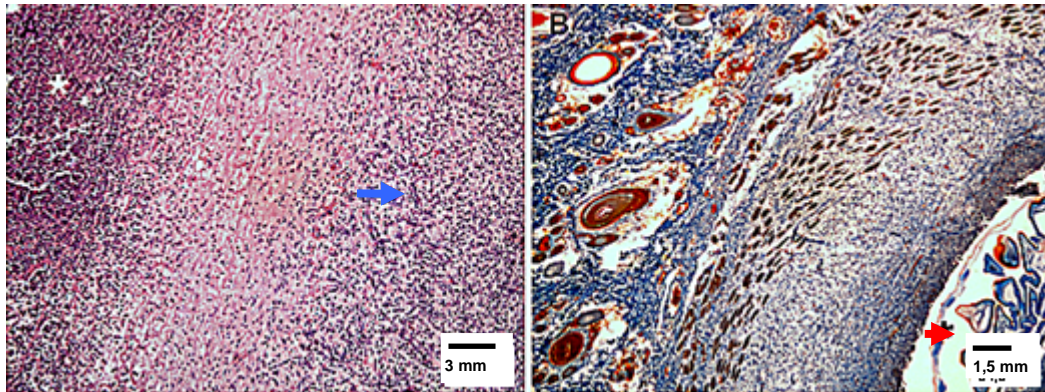


FIGURA 4 - Fotomicrografia de fragmentos de pele de rato experimental infestado com larvas de *D. hominis* aos 15 dias pós-infestação. (A) Imagem panorâmica; coloração por HE. (B) Necrose e neoformação vascular e conjuntiva; coloração por tricrômico de Mallory. Asterico branco – necrose; seta azul – neoformação vascular; seta vermelha – cutícula da larva.

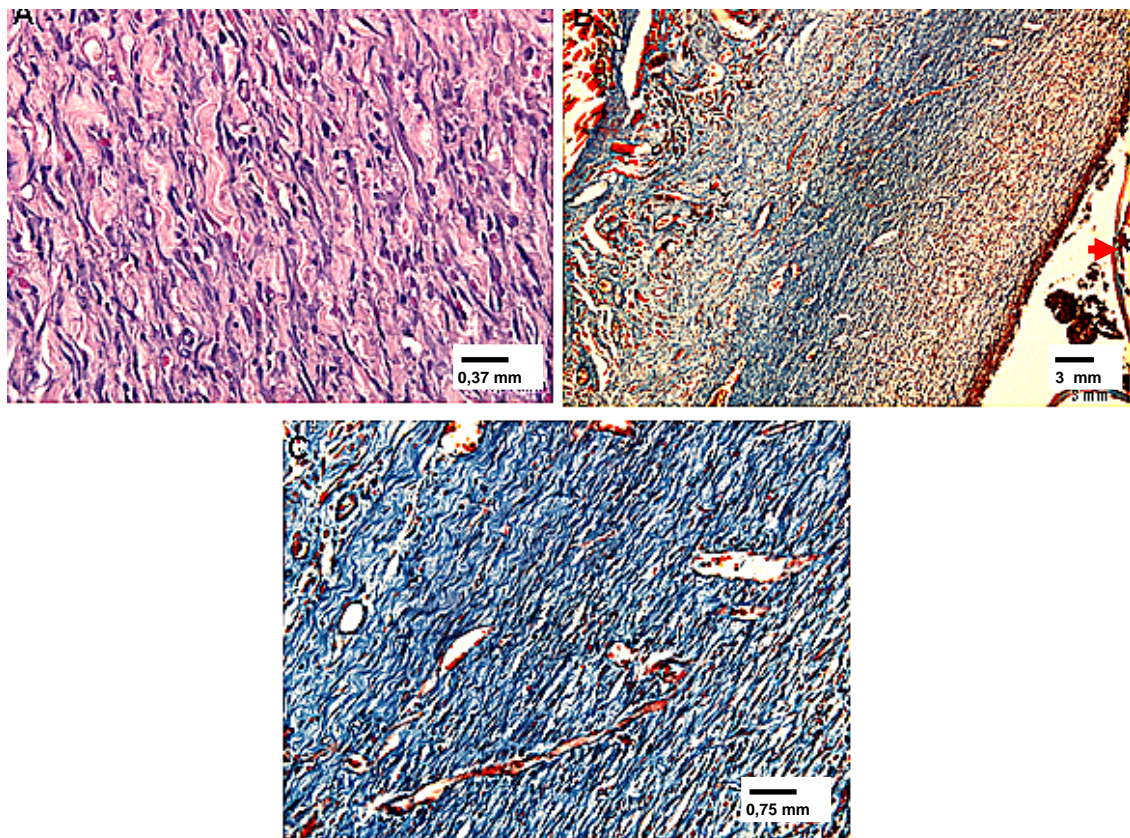


FIGURA 5 - Fotomicrografia de fragmentos de pele de rato experimental infestado com larvas de *D. hominis* aos 20 dias pós-infestação. (A) Fibrose intensa; coloração por HE. (B) Imagem panorâmica; coloração por tricrômico de Mallory. (C) Fibrose intensa; coloração por tricrômico de Mallory. Seta vermelha – cutícula da larva.

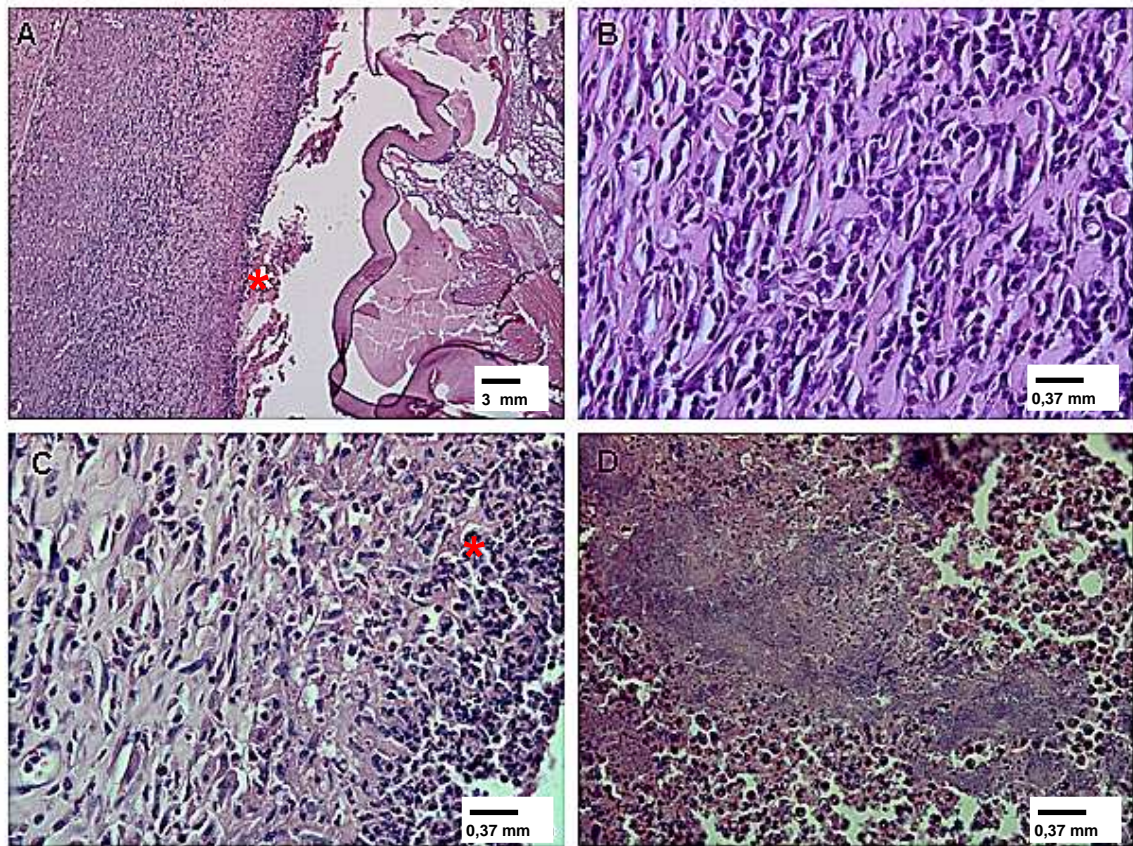


FIGURA 6 - Fotomicrografia de fragmentos de pele de rato experimental infestado com larvas de *D. hominis* aos 28 dias pós-infestação; coloração por HE. (A) Necrose junto à larva. (B) Infiltrado de plasmócitos. (C) Fibrose e necrose. (D) Necrose, ao centro colônia de bactérias. Asterisco vermelho – necrose.

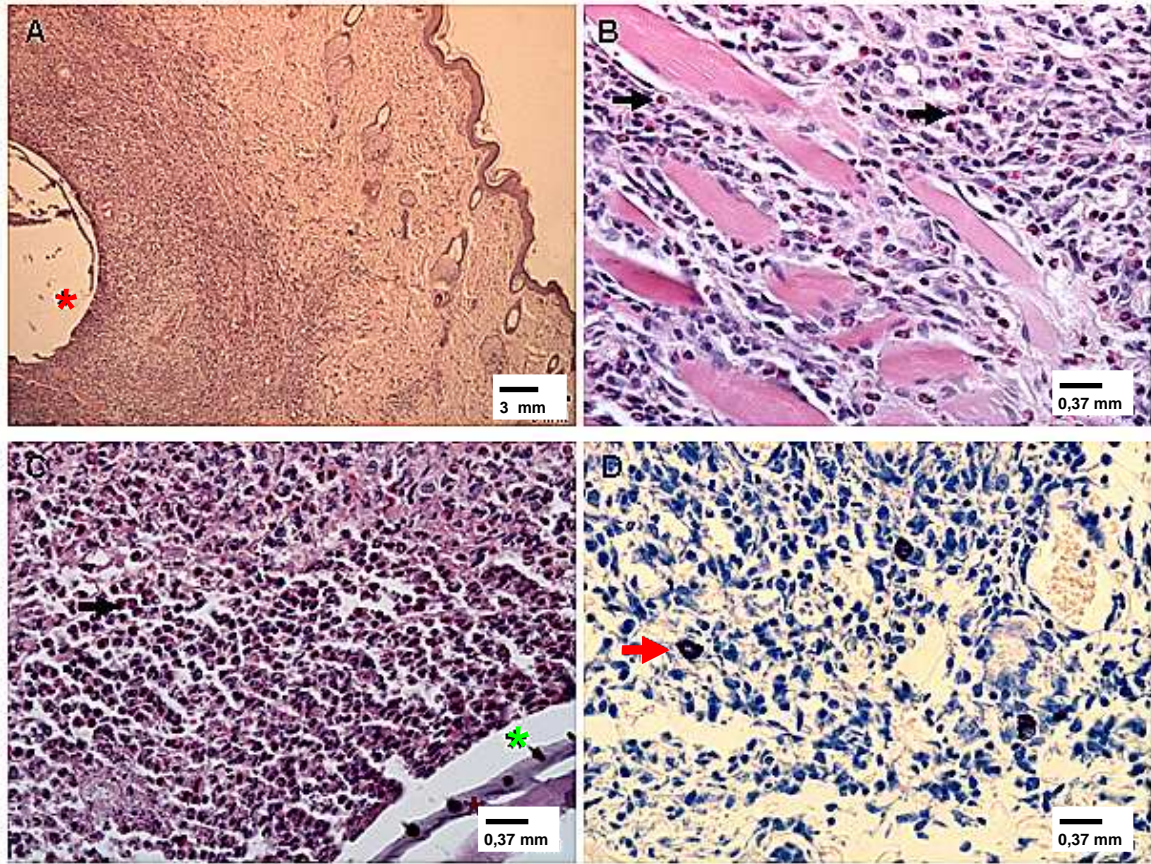


FIGURA 7 - Fotomicrografia de fragmentos de pele de rato experimental infestado com larvas de *D. hominis* aos 4 dias pós-reinfestação. (A) Imagem panorâmica; coloração por HE. (B) Predomínio de eosinófilos; coloração por HE. (C) Infiltrado inflamatório com predomínio de eosinófilos; coloração por HE. (D) Mastócitos na área inflamada; coloração por azul de toluidina. Asterisco vermelho – local de implantação da larva; seta preta – eosinófilo; asterisco verde – cutícula da larva evidenciando os espinhos; seta vermelha – mastócito.

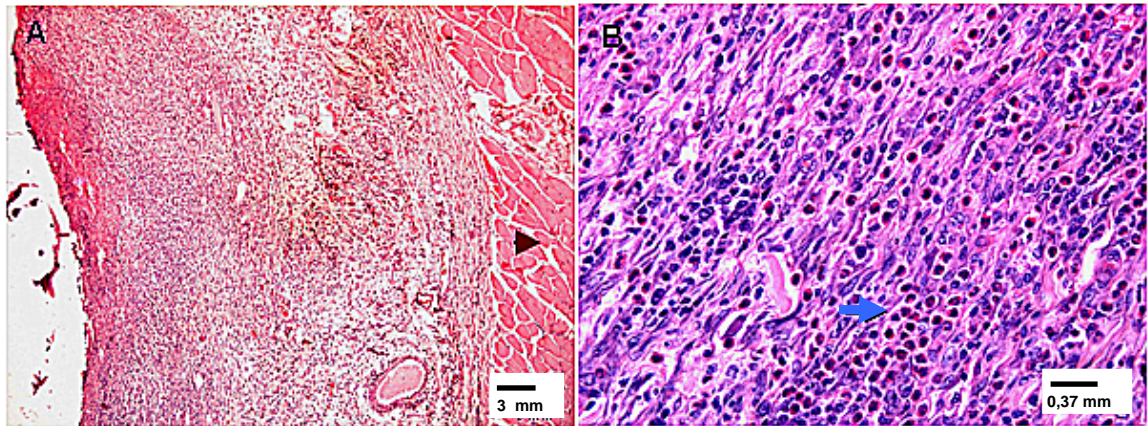


FIGURA 8 - Fotomicrografia de fragmentos de pele de rato experimental infestado com larvas de *D. hominis* aos 9 dias pós-reinfestação; coloração por HE. (A) Imagem panorâmica. (B) Predomínio de eosinófilos. Cabeça de seta preta – músculos; seta azul – eosinófilos.

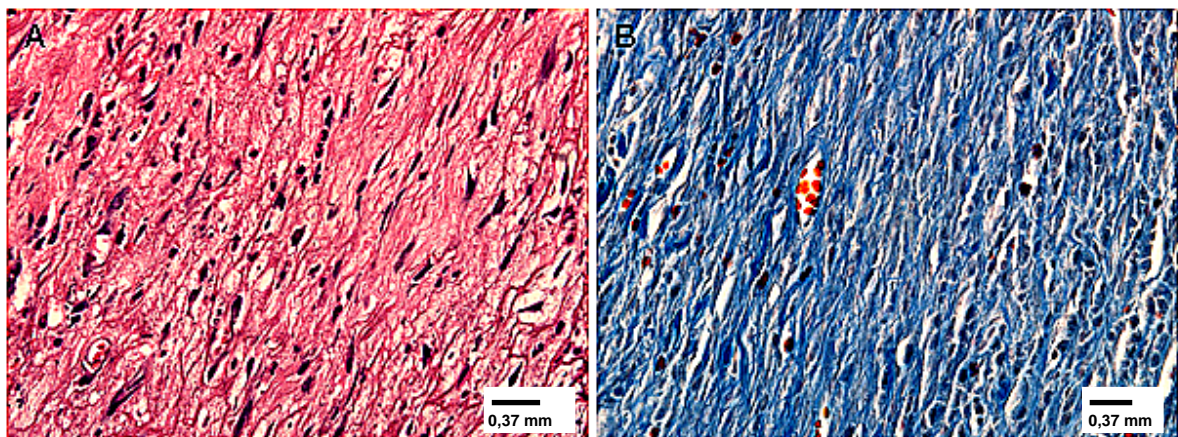


FIGURA 9 - Fotomicrografia de fragmentos de pele de rato experimental infestado com larvas de *D. hominis* aos 14 dias pós-reinfestação. (A) Fibrose intensa; coloração por HE. (B) Fibrose intensa; coloração por tricrômico de Mallory.

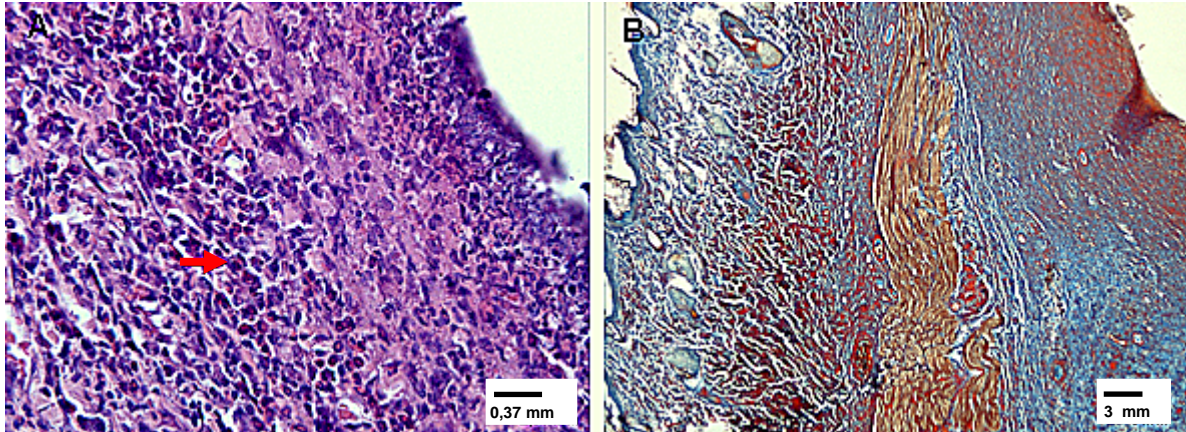


FIGURA 10 - Fotomicrografia de fragmentos de pele de rato experimental infestado com larvas de *D. hominis* aos 22 dias pós-reinfestação. (A) Necrose com infiltrado de eosinófilos e neutrófilos; coloração por HE. (B) Fibrose; coloração por tricrômico de Mallory. Seta vermelha – eosinófilos.

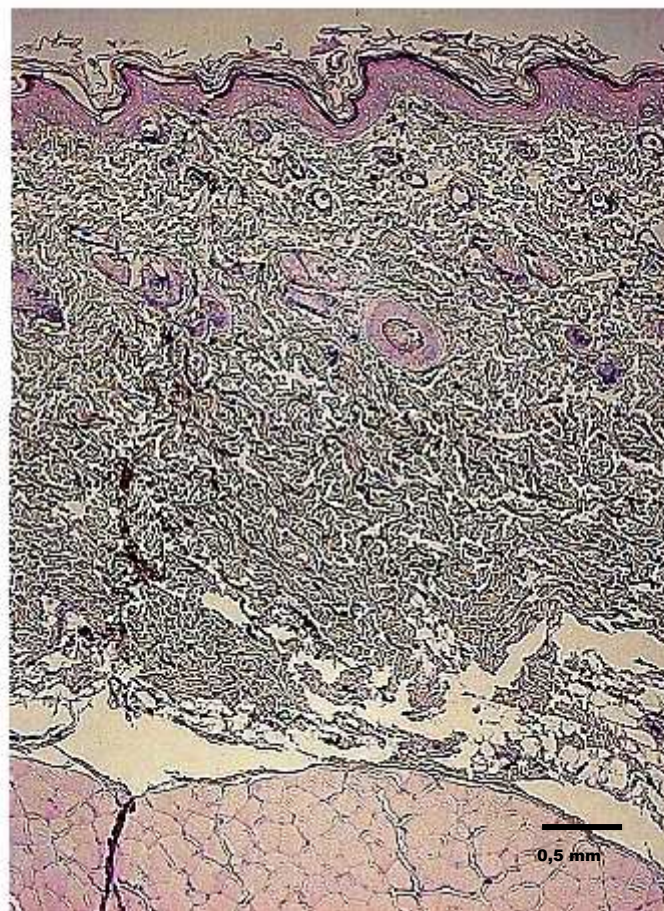


FIGURA 11 - Fotomicrografia da pele de rato controle, sem miíse por *D. hominis*.

6.3 Expressão de leucócitos sanguíneos

Levando em consideração as datas corespondentes a infestação e reinfestação, isto é dpi e dpr, a TAB. 3 indica os valores numéricos dos leucócitos. Como para os estudos hematológicos os ratos estavam igualmente infestados e reinfestado, foi convencinado indicar nas tabelas e nos gráficos dpi=dpr.

O número de neutrófilos (FIG. 12) foi significativamente diferente quando comparado pelo teste Kruskal-Wallis com número progressivo maior para 6 dpi = 0 dpr, controle, 20 dpi = 14 dpr, 10 dpi = 4 dpr, 28 dpi = 22 dpr, 15 dpi = 9 dpr. Quando comparados o número de células entre os grupos, pelo teste Mann Whitney os neutrófilos foram significativos: pró 10 dpi = 4dpr versus controle negativo e 6 dpi = 0 dpr, pró 15 dpi = 9 dpr versus controle negativo e 6 dpi = 0 dpr, pró 20 dpi = 14 dpr versus 6 dpi = 0 dpr, pró 28 dpi = 22 dpr versus controle negativo e 6 dpi = 0 dpr.

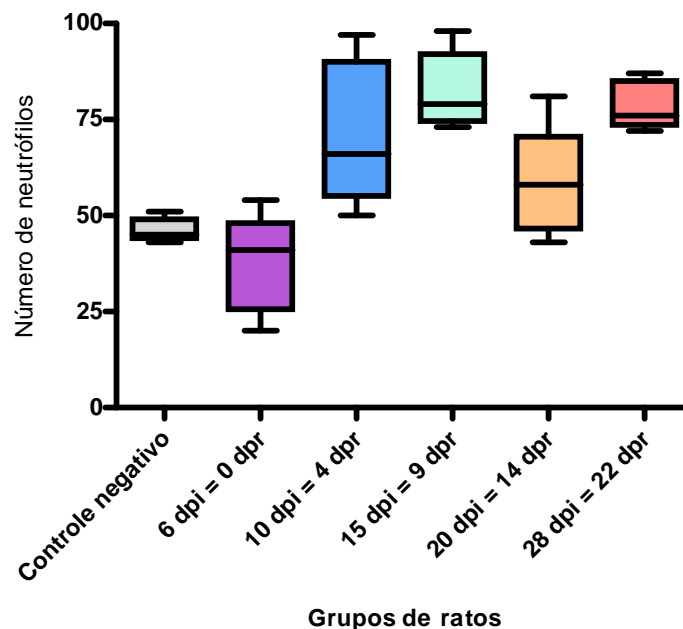


FIGURA 12 - Número de neutrófilos do sangue de ratos controle e reinfestados com larvas de *Dermatobia hominis*.

TABELA 3

Número total (N), média (X), mediana (M) e desvio padrão (DP) de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos pequenos, linfócitos grandes, linfócitos totais e monócitos no sangue de ratos controle negativo, e reinfestados com larvas de *D. hominis*.

Grupo	Neutrófilo				Eosinófilo				Linfócito pequeno				Linfócito grande				Linfócitos totais				Monócito			
	N	X	M	DP	N	X	M	DP	N	X	M	DP	N	X	M	DP	N	X	M	DP	N	X	M	DP
Controle	231	46,2	45	3	23	4,6	4	2,3	152	30,4	29	6,9	582	116,4	119	9,4	734	146,8	148	2,7	12	2,4	2	2,3
6 dpi = 0 dpr	189	37,8	42	12,8	96	19,2	17	7,9	138	27,6	22	22,5	547	109,4	100	23,7	685	137	140	14,3	30	6	1	11,2
10 dpi = 4 dpr	355	71	66	18,4	50	10	8	8	131	26,2	18	17,5	464	92,8	90	21	595	119	116	18,8	0	0	0	0
15 dpi = 9 dpr	412	82,4	79	10	49	9,8	9	5,1	167	33,4	31	18	367	73,4	82	17,5	534	106,8	113	13,3	5	1	1	1
20 dpi = 14 dpr	294	58,8	60	14,3	47	9,4	9	2,9	196	39,2	41	14,5	449	89,8	90	10,2	645	129	131	11,9	14	2,8	0	4,4
28 dpi = 22 dpr	397	79,4	76	6,6	21	4,2	3	4,6	120	24	23	9,7	453	90,6	87	15,4	573	114,6	122	14	9	1,8	0	4

Abreviatura: dpi: dias pós-infestação; dpr: dias pós-reinfestação.

Os eosinófilos (FIG. 13) aumentaram significativamente na seguinte progressão ascendente: 28 dpi = 22 dpr, controle, 20 dpi = 14 dpr, 15 dpi = 9 dpr, 10 dpi = 4 dpr, 6 dpi = 0 dpr. Diferenças significativas foram encontradas entre o número de eosinófilos: pró 6 dpi = 0 dpr versus controle negativo, 20 dpi = 14 dpr e 28 dpi = 22dpr; pró 15 dpi = 9 dpr versus controle negativo.

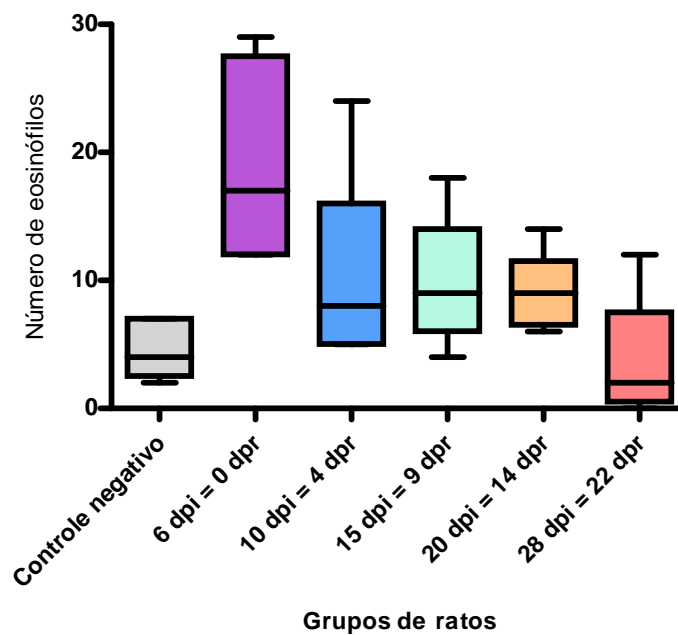


FIGURA 13 - Número de eosinófilos do sangue de ratos controle e reinfestados com larvas de *Dermatobia hominis*.

O número de linfócitos pequenos (FIG. 14) não foi significativamente diferente quando comparados pelos testes Kruskal-Wallis ou Mann Whitney. Enquanto os linfócitos grandes (FIG. 15) foram expressivos e número seguindo a ordem: 15 dpi = 9 dpr, 20 dpi = 14 dpr, 28 dpi = 22 dpr, 10 dpi = 4 dpr, 6 dpi = 0 dpr, controle. Entre os grupos o número de linfócitos grandes foi significativo: pró controle negativo versus 15 dpi = 9 dpr, 20 dpi = 14 dpr e 28 dpi = 22 dpr; pró 6 dpi = 0dpr versus 15 dpi = 9 dpr.

Para os linfócitos totais (pequenos e grandes) (FIG. 16) ocorreu aumento significativo na seguinte ordem: 15 dpi = 9 dpr, 28 dpi = 22 dpr, 10 dpi = 4 dpr, 20 dpi = 14 dpr, 6 dpi = 0 dpr, controle. Em análise dos linfócitos totais (nos diferentes períodos) foi

observado significância: pró controle negativo versus 10 dpi = 4 dpr, 15 dpi = 9 dpr, 20 dpi = 14 dpr e 28 dpi = 22 dpr; pró 6 dpi = 0dpr versus 15 dpi = 9 dpr.

Não houve diferença significância para a quantificação ds monócitos (FIG. 17).

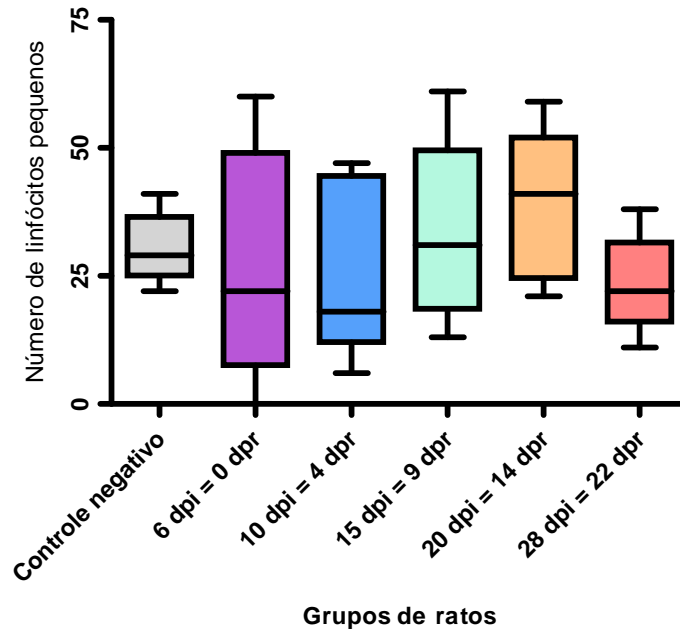


FIGURA 14 - Número de linfócitos pequenos do sangue de ratos controle e reinfestados com larvas de *Dermatobia hominis*.

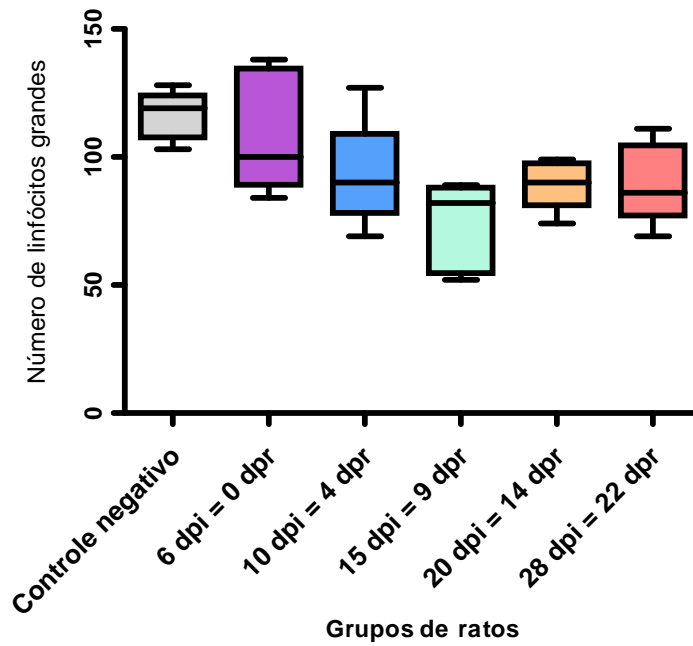


FIGURA 15 - Número de linfócitos grandes do sangue de ratos controle e reinfestados com larvas de *Dermatobia hominis*.

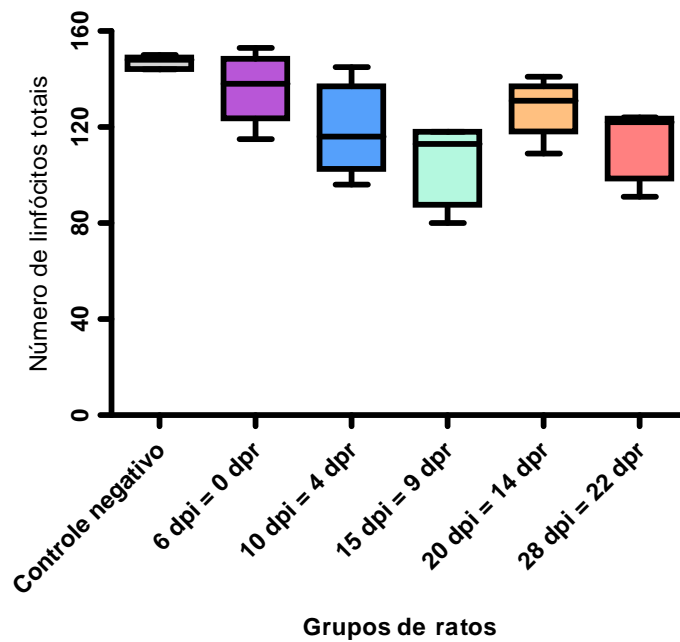


FIGURA 16 - Número de linfócitos totais do sangue de ratos controle e reinfestados com larvas de *Dermatobia hominis*.

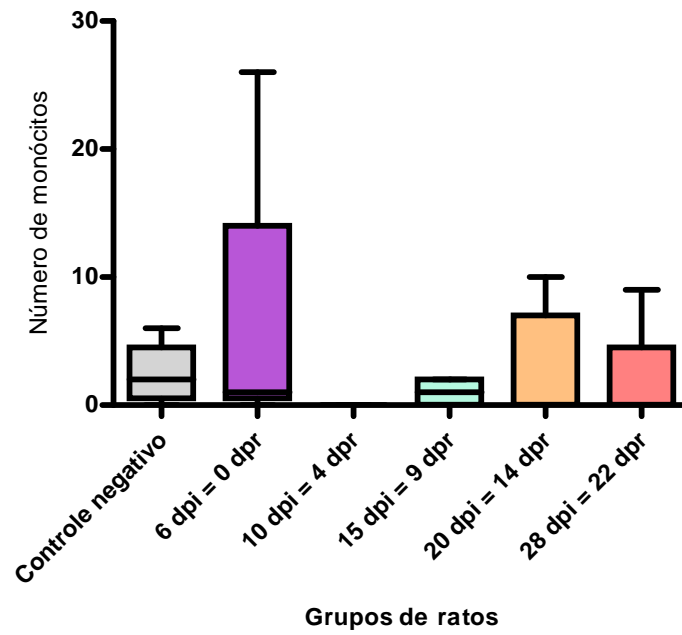


FIGURA 17- Número de monócitos do sangue de ratos controle e reinfestados com larvas de *Dermatobia hominis*.

7 DISCUSSÃO

Paralelamente com fazem outros agentes causadores de míases cutânea, larvas de *D. hominis* dá início a penetração na pele íntegra do mamífero utilizando simultaneamente de mecanismos físicos, pelas maxilas e espinhos da cutícula (DE FILIPPIS e LEITE, 1997) e, químicos, por prováveis moléculas de secreção-excreção (PIRES *et al.*, 2007; BRANT *et al.* 2010) - até então mais estudadas em outras espécies de Oestridae, ex: *H. lineatum* e *H. bovis* (COLWELL *et al.*, 2006). No processo, que dilaceram e liquefazem os tecidos do hospedeiro, a larva L₁, que não migra pelo mamífero, ao contrário do que praticam espécies de *Cuterebra* e *Hypoderma* (SLANKY, 2007; COLWELL *et al.*, 2006), se fixa na derme profunda e sofre desenvolvimento por metamorfoses ou mudança de L₁ para L₂ e desta para L₃. Esta, espontaneamente, sai do hospedeiro aos 30 dpi, devendo a lesão cutânea sofrer cicatrização nos 10 dias subsequentes (PEREIRA, LEITE e LEITE, 2001).

Larvas de *D. hominis* tem ainda a capacidade de exercer parasitismo em múltiplos hospedeiros, de diferentes ordens, fato que continua sendo um desafio interpretativo, pois usualmente os Oestridae perpetram o parasitismo hospedeiro-específico (PAPE, 2006). É bem provável que os estágios larvais de *D. hominis* tenham iniciado o hábito de parasitar mamíferos desde o Paleoceno (60 milhões de anos atrás), quando então o inseto já coexistia com ancestrais de mamíferos, pois tal período registra a presença de fósseis do invertebrado (TOWNSEND, 1942) e o surgimento de roedores primitivos (ZUMPT, 1957; KOWALSKI, 1981).

O uso de murídeos como modelo experimental para *D. hominis* tem dado contribuições, ainda incipiente, para o entendimento da relação parasito-hospedeiro (LELLO, 2006). Em decorrência deste fato e em função da necessidade de se obter informações adicionais sobre o tema, esta Dissertação, como continuação de um trabalho prévio (PEREIRA, LEITE e LEITE, 2001), tenta responder indagações motivadas também por outros estudos já divulgados pelo Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG (PEREIRA e LEITE, 2002; GONÇALVES *et al.*, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2009; CARDOSO *et al.*, 2009; LEITE, NASCIMENTO e SERAFIM, 2010). Outrossim, relevante, associado ao experimento agora em foco, é a evidência da permanente susceptibilidade de mamíferos as reinfestações naturais por larvas de *D. hominis* e de outros oestrideos, pré-requisito também requerido por outras espécies de parasitos, tanto helmintos (HOTEZ *et al.*, 2008) como protozoários (ARIZONO *et al.*, 2007).

Comprender melhor o processo de imunomodulação e imunoregulação entre hospedeiro-parasito tem sido uma suscitação permanente (HOSTE, TORRES-ACOSTA e AGUILAR-CABALLERO, 2008; OKWOR e UZONNA, 2009; HEWITSON, GRAINGER e MAIZELS, 2009) que requer também o entendimento de aspectos do curso inflamatório (associado à citologia hematológica) como agora é preliminarmente apresentado nesta Dissertação.

A positividade de 100% de infestação nos ratos (presentes dados) até 6 dpi, tendo 40% deles 4 L₁ e 60% 3 L₁ e a ocorrência das metamorfoses das larvas depois de 6 dpi (L₁ para L₂) e 15 dpi (L₂ para L₃) confirmam os resultados prévios utilizando rato como modelo de infestação experimental por larvas de *D. hominis* (PEREIRA e LEITE, 2002).

O parasitismo por *D. hominis* (agora apresentado) indica que a presença da L₁ da primoinfestação (no início da infestação) influenciou no desenvolvimento da L₁ da reinfestação (menor número de larvas viáveis). Este fato pode ter sido corroborado também pela L₂ recém-formada (da primoinfestação), isto é, depois de 6 dpi. No caso particular dos achados histopatológicos, a pele apresentava um processo inflamatório contendo neutrófilos e eosinófilos aos 10 dpi, contrastando com a inflamação aos 4 dpi que era mais rica em neutrófilos e abundantes eosinófilos, estes últimos chegando a formar aglomerados de células.

Os tecidos da pele lesados pela L₂ aos 15 dpi apresentavam inúmeros neutrófilos e alguns eosinófilos, além de neoformação vascular intensa e conjuntiva. Este processo embora semelhante ao que ocorreu aos 9 dpi, se distinguia nesta data pelo predomínio de eosinófilos, porém menor em número que aos 4 dpi. A reação rica em eosinófilos ocorrida principalmente no início da reinfestação pode estar associada com a imunidade adquirida. A eosinofilia provavelmente é uma resposta aos produtos quimiotáticos das glândulas salivares e intestino médio secretados/excretados pelas larvas de *D. hominis*.

A intensa fibrose e redução do infiltrado de neutrófilos e eosinófilos verificada aos 14 dpi e 20 dpi foram mais expressivas aos 20 dpi. Aos 28 dpi e 22 dpi os aspectos histológicos não mostram distinções.

No contexto geral o processo inflamatório da infestação continha tipos celulares já referidos para dermatobiose natural, por L₃, em humano, citados por Grogan *et al.* (1987). Comparando com prévios estudos experimentais, à análise histopatológica dos dpi (de agora) têm dissemelhança à presença de mastócitos (exceto basófilos) em coelhos (LELLO, OLIVEIRA-SEQUEIRA e PERAÇOLI, 1999); e marcante número de macrófagos, mastócitos e linfócitos citado em ratos infestados (PEREIRA, LEITE e LEITE, 2001).

Se comparado (os nossos relatos) com o único registro de reinfestação de roedores (camundongos) por *D. hominis* – após retirada de 4-5 larvas aos 5dpi e reinfestação 30 dias depois (LELLO e ROSIS, 2003) - os aspectos celulares da inflamação não é tão distinto, considerando o período de 0-18 dpi estudado pelos mencionados autores. Confrontando com outras miíases, semelhantes resultados foram descritos para ovinos reinfestados com *O. ovis* (YACOB *et al.*, 2004) e para bovinos reinfestados com *H. lineatum* (LÓPEZ *et al.*, 2005), diferindo, respectivamente, pelo acúmulo de mastócitos, e presença de linfócitos.

Quanto aos neutrófilos na lesão, estes também foram identificados na dermatobiose, ratos infestados (PEREIRA, LEITE, e LEITE, 2001) e camundongos reinfestados (LELLO e ROSIS, 2003); roedores *P. leucopus* com *C. fontinella* (PAYNE e COSGROVE, 1966); ovinos infestados e reinfestados (BOWLES, GREY e BRANDON, 1992) ou reinfestados, por dias sucessivos, com *L. cuprina* (COLDITZ *et al.*, 2005); e humano infestado com *Cuterebra* sp. (DELSHAD *et al.*, 2008). Os nossos resultados indicam que a presença de neutrófilos, sobretudo no início da infestação, pode estar relacionada com uma resposta não específica da imunidade inata.

Sobre a eosinofilia cutânea, esta tem sido uma constante nos relatos da dermatobiose, referida em: coelhos imunizados ou não se seguindo a infestação (LELLO, MOTA e PERAÇOLI, 1980), humanos naturalmente infestados (GROGAN *et al.*, 1987), bovinos (OLIVEIRA-SEQUEIRA *et al.*, 1996), ratos infestados (PEREIRA, LEITE, e LEITE, 2001; PEREIRA e LEITE, 2002) e camundongos reinfestados (LELLO e ROSIS, 2003). Em miíase por outros dípteros, eosinofilia também está presente nos tecidos da pele: de em *P. leucopus* infestado com *C. fontinella* (PAYNE e COSGROVE, 1966), coelhos infestados com *C. buccata* (WEISBROTH, WANG e SCHER, 1973); ovinos com *L. cuprina* infestados e reinfestados (BOWLES, GREY e BRANDON, 1992) ou apenas infestados (ELHAY *et al.*, 1994; TABOURET *et al.*, 2003); bovinos infestados e reinfestados com *Hypoderma* (LÓPEZ *et al.*, 2005; BOULARD, 2006); e em humano infestado com *Cuterebra* sp. (DELSHAD *et al.*, 2008). Eosinofilia é também descrita na mucosa naso-faríngeal em ovinos com *O. ovis*, tanto naturalmente infestados (VAN-KHANH *et al.*, 1996) como reinfestados (YACOB *et al.*, 2004). Assim com Oliveira-Sequeira *et al.* (1996) e Pereira e Leite (2002) este trabalho sugere que o grande número de eosinófilos nos fragmentos de pele parasitada podem ser importantes mediadores da resposta aos danos causados pelas larvas.

Células mastocíticas estão sempre associadas à miíase por *D. hominis* (GROGAN *et al.*, 1987; OLIVEIRA-SEQUEIRA *et al.*, 1996; PEREIRA, LEITE, e LEITE, 2001). Sob a

modulação destas células na lesão da pele, elas ocorreram mais no início da infestação em bovinos (OLIVEIRA-SEQUEIRA *et al.*, 1996) e aos 4 e 20 dpi em ratos (PEREIRA e LEITE, 2002), fato que não se repetiu no atual experimento, provavelmente devido a simultaneidade da infestação e reinfestação dos animais. O envolvimento de mastócitos em outras miíases foi relatado na mucosa de pequenos ruminantes com infestação por *O. ovis*: ovinos (VAN-KHANH *et al.*, 1996; TABOURET, *et al.*, 2003), ovinos e caprinos (VAN-KHANH *et al.*, 1999) e em animais reinfestados experimentalmente (YACOB *et al.*, 2004). Embora estas células tenham múltiplas funções, várias delas ainda desconhecidas, os mastócitos podem ter atividade imunoregulatória e participar da resposta dos hospedeiros contra alergia e doenças causadas por helmintos (COSTA, WELLER e GALLI, 1997).

Em relação à contagem dos neutrófilos sanguíneos, estudos prévios realizados com ratos (GONÇALVES *et al.*, 2007) verificaram aos 28 dpi número expressivo de tais células, contrastando com o presente trabalho que notou maior número aos 15 dpi = 9 dpr. Dados semelhantes foram demonstrados por Bennet (1973), em ensaios com *C. emasculator* em roedor silvestres *T. striatus*, que relataram número pequeno de leucócitos no início da infestação, aumentando nos estágios subsequentes, e decrescendo com a presença da L₃. Pesquisas realizadas com ovinos resistentes e susceptíveis a dermatite bacteriana (COLDITZ *et al.*, 1994) e infestados com *L. cuprina* por 8 dias consecutivos (COLDITZ *et al.*, 2005) diferiram do presente estudo, respectivamente, por não apresentarem expressão na contagem das células, e revelarem aumento dos neutrófilos nos 2, 3, 11, 13 e 15 dpi.

Quanto ao número significativo de eosinófilos sanguíneos nos ratos aos 6 dpi, o artigo de Gonçalves *et al.* (2007) não mostrou tal ocorrência na mesma data. Dissemelhança com a presente Dissertação são os resultados de picos eosinófilos em ovinos após reinfestação com *O. ovis* (YACOB *et al.*, 2004; JACQUIET *et al.*, 2005); ovinos infestados (resistentes ou não a dermatite bacteriana) (COLDITZ *et al.*, 1994) ou reinfestados com *L. cuprina* (COLDITZ *et al.*, 2005) tiveram aumento das células logo após a infestação, e significância nos 3, 7 e 15 dpi, respectivamente.

A falta de número expressivo de linfócitos pequenos sanguíneos (neste estudo), contrasta com os resultados de Gonçalves *et al.* (2007) que revelaram significância das células aos 10 dpi. Quanto aos linfócitos grandes e totais, do sangue, houve significância no dia da reinfestação em contraste com Gonçalves *et al.* (2007) e Colditz *et al.* (1994) que não observaram número expressivo das mencionadas células. Os dados agora apresentados se mostraram semelhantes a outros realizados com *T. striatus* infestados com *C. emasculator* no

qual foi detectado decréscimo do número de linfócitos com a presença da L₃ (BENNET, 1973). Aumento de leucócitos totais foi identificado em animais infestados naturalmente com *C. fontinella* (DUNAWAY *et al*, 1967).

Quanto ao número de monócitos, o presente estudo não mostrou diferença significativa, dados que diferem da descrição de Bennet (1973), quando registrou aumento de tais células na segunda metade da infestação de roedores silvestres com *C. fontinella*.

8 CONCLUSÃO

1 No presente estudo foi comprovada a viabilidade de *R. norvegicus* como modelos experimentais para larvas de *D. hominis*.

2 O parasitismo por L₁ de *D. hominis* indicou que as larvas da primoinfestação influenciaram no desenvolvimento da L₁ da reinfestação.

3 A lesão da pele da reinfestação foi distinta da causada pela infestação (primoinfestação), principalmente no início (4 dpr), por marcante eosinofilia.

4 A resposta sistêmica dos hospedeiros durante a infestação-reinfestação, através do exame de células da circulação sanguínea, mostrou que neutrófilos, eosinófilos, linfócitos grandes (ativados) e totais (grandes e pequenos = inativos) aumentaram significativamente em número.

5 Apesar da intensa resposta imune do hospedeiro, o parasita provavelmente possui um eficiente mecanismo de escape, secretando substâncias capaz de alunar os efeitos da resposta imune.

6 A partir dos dados acima referidos, ensaios complementares, em laboratório e ao nível de campo, serão conduzidos para fins de esclarecimentos adicionais da relação parasito-hospedeiro durante e após a dermatobiose.

9 REFERÊNCIAS

ANGULO-VALADEZ, C. E.; CEPEDA-PALACIOS, R.; ASCENCIO, F.; JACQUIET, P.; DORCHIES, P.; RAMÍREZ-ORDUÑA, J. M.; LÓPEZ, M. A. IgG antibody response against salivary gland antigens from *Oestrus ovis* L. larvae (Diptera: Oestridae) in experimentally and naturally infected goats. *Veterinary Parasitology*, v. 161, n. 3-4, p. 356-359, 2009.

ANGULO-VALADEZ, C. E.; SCALA, A.; GRISEZ, C.; PREVOT, F.; BERGEAUD, J. P.; CARTA, A.; CEPEDA-PALACIOS, R.; ASCENCIO, F.; TEREFE, G.; DORCHIES, P.; JACQUIET, P. Specific IgG antibody responses in *Oestrus ovis* L. (Diptera : Oestridae) infected sheep: Associations with intensity of infection and larval development. *Veterinary Parasitology*, v. 155, n. 3-4, p. 257-263, 2008.

ARIZONO, N.; NAKANIHSI, K.; HORII, T.; TANABE, K. Progress in the molecular biology of malaria and the immunology of nematode infections. *Trend in Parasitology*, v. 23, n. 4, p. 175-181, 2007.

BANEGAS, A. D.; MOURIER, H. Laboratory observations on the life history and habits of *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae). I. Mating Behavior. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 60, n. 5, p. 878-881, 1967.

BARBOSA, C. G.; SANAVRIA, A.; BARBOSA, M. D. P. R. C. Alterações hematológicas em bovinos infestados experimentalmente com larvas de *D. hominis* (Diptera: Cuterebridae). *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, v. 12, n. 2, p. 61-67, 2003.

BARON, R. W.; COLWELL, D. D. Enhanced resistance to cattle grub infestation (*Hypoderma lineatum* de Vill.) in calves immunized with purified hypodermin A, B, and C plus monophosphoryl lipid A (MPL). *Veterinary Parasitology*, v. 38, n. 2-3, p. 185-197, 1991a.

BARON, R. W.; COLWELL, D. D. Mammalian immune responses to myiasis. *Parasitology Today*, v. 7, n. 12, p. 353-355, 1991b.

BENNET, G. F. Some effects of *Cuterebra emasculator* Fitch (Diptera: Cuterebridae) on the blood an activity of its host, the eastern chipmunk. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 9, n.1, p. 85-93, 1973.

BERMÚDEZ, S. E.; ESPINOSA, J. D.; CIELO, A. B., CLAVEL, F.; SUBÍA, J.; BARRIOS, S.; MEDIANERO, E. Incidence of myiasis in Panama during the eradication of *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel 1858, Diptera: Calliphoridae) (2002-2005). *Memórias do Instituto Oswald o Cruz.*, v. 102, n. 6, p. 675-679, 2007.

BOULARD, C. Anatomie et histologie du tube digestif de la larve d' *Hypoderma bovis* (Diptères Oestriiformes). *Annales de la Société Entomologique de France*, v. 5, p. 371-387, 1969.

BOULARD, C. Etude préliminaire d'une colagénase brute extraite de la larve de premier stade d' *Hypoderma lineatum* (De Villers). *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences. Série D: Sciences naturelles*, v. 270, n. 10, p. 1349-1351, 1970.

BOULARD, C. Larval-host parasite relationships. Part A: Hypodermatinae host-parasite interactions. In: COLWELL, D. D.; HALL, M. J. R.; SCHOLL, P. J. *The Oestrid flies: Biology, host-parasite relationships, impact and management*. Oxfordshire: CABI International, 2006. cap. 11, p. 167-179.

BOULARD, C.; WEINTRAUB, J. Immunological responses of rabbits artificially infested with the cattle grubs *Hypoderma bovis* (L.) and *H. lineatum* (De Vill.) (Diptera: Oestridae). *International Journal for parasitology*, v. 3, n. 3, p. 379-386, 1973.

BOULARD, C.; SORIA, J.; SORIA, C. Possibilité d'emploi de la réaction d'hémagglutination passive pour le diagnostic de l'hypodermose, en utilisant comme antigène une collagénase brute extraite des larves de 1er stade. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences. Série D: Sciences naturelles*, v. 270, n. 15, p. 1965-1968, 1970.

BOWLES, V. M.; GREY, S. T.; BRANDON, M. R. Cellular immune responses in the skin of sheep infected with larvae of *Lucilia cuprina*, the sheep blowfly. *Veterinary Parasitology*, v. 44, n. 1-2, p. 151-162, 1992.

BOWLES, V.M.; MEEUSEN, E. N. T.; CHANDLER, K.; VERHAGEN, A.; NASH, A. D.; BRANDON, M. R. The immune response of sheep infected with larvae of the sheep blowfly *Lucilia cuprina* monitored via efferent lymph. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 40, n. 4, p. 341-352, 1994.

BOWLES, V. M.; MEEUSEN, E. N. T.; YOUNG, A. R.; ANDREWS, A. E.; NASH, A. D.; BRANDON, M. R. Vaccination of sheep against larvae of the sheep blowfly (*Lucilia cuprina*). *Vaccine*, v. 14, n. 14, p. 1347-1352, 1996.

BRANT, M.P; GUIMARÃES S.; SOUZA-NETO J.A.; RIBOLLA P.E.; OLIVEIRA-SEQUEIRA T.C. Characterization of the excretory/secretory products of *Dermatobia hominis* larvae, the human bot fly. *Veterinary Parasitology*, v. 168, n. 3-4, p. 304-311, 2010.

CARDOSO, P. J. G.; LEITE, V. H. R.; LEITE, L. H. R.; LEITE, A. C. R. Lymphadenopathy and expression of nodal mast cells and eosinophils in the myiasis by human bot fly. *Journal of Medical Entomology*, v. 46, n. 6, p. 1514-1518, 2009.

CARLSON, R. W. Instar, stadium and stage definitions to fit usage. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 76, n. 3, p. 319, 1983.

CARPENTER, G. H.; HEWITT, T. R.; REDDIN, T. K. The warble-flies: fourth report on experiments and observations as to life history and treatment. *Journal of Department of Agriculture and Technical Instruction for Ireland*, v. 15, n.1, p. 105-132, 1914.

CARSON, F. L.; MARTIN, J. H.; LYNN, J. A. Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 59, n. 3, p. 365-373, 1973.

CATTS, E. P. Biology of new world bot flies: Cuterebridae. *Annual Review of Entomology*, v.27, p. 313-338, 1982.

COLDITZ, I. G.; LAX, J.; MORTIMER, S. I.; CLARKE, R. A.; BEH, K. J. Cellular inflammatory responses in skin of sheep selected for resistance or susceptibility to fleece rot and fly strike. *Parasite Immunology*, v. 16, n. 6, p. 289-296, 1994.

COLDITZ, I. G.; WALKDEN-BROWN, S. W.; DALY, B. L.; CROOK, B. J. Some physiological responses associated with reduced wool growth during blowfly strike in Merino sheep. *Australian Veterinary Journal*, v. 83, n. 11, p. 695-699, 2005.

COLDITZ, I. G.; WATSON, D. L.; EISEMANN, C. H.; TELLAM, R. L. Production of antibodies to recombinant antigens from *Lucilia cuprina* following cutaneous immunisation of sheep. *Veterinary Parasitology*, v. 104, n. 4, p. 345-350, 2002.

COLWELL, D. D. Stage specific mortality and humoral immune responses during pulse and trickle infestations of the common cattle grub, *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae). *Veterinary Parasitology*, v. 99, n. 3, p. 231-239, 2001.

COLWELL, D. D.; HALL, M. J. R.; SCHOLL, P. J. *The Oestrid flies: Biology, host-parasite relationships, impact and management*. Oxfordshire: CABI International, 2006. 359p.

COLWELL, D. D.; LÓPEZ, C.; DIEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P.; PANADERO, R. Impact of previous infestation on dynamics of circulating hypodermin C in cattle artificially infested with *Hypoderma lineatum* (Diptera : Oestridae). *Veterinary Parasitology*, v. 154, n.

1-2, p. 114-121, 2008.

COSTA, J. J.; WELLER, P. F.; GALLI, S. J. The cells of the allergic response, mast cells, basophils, and eosinophils. *The Journal of the American Medical Associations*, v. 278, n. 22, p. 1815-1822, 1997.

DACAL, V.; COLWELL, D. D.; LÓPEZ, C.; PÉREZ, V.; VÁZQUEZ, L.; CIENFUEGOS, S.; DÍAZ, P.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P.; PANADERO, R. Local and systemic cytokine responses during larval penetration in cattle experimentally infested with *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 131, n. 1-2, p. 59-64, 2009.

DE FILIPPIS, T.; LEITE, A. C. R Scanning electron microscopy studies on the first-instar larva of *Dermatobia hominis*. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 11, n. 2, p. 165-171, 1997.

DELSHAD, E.; RUBIN, A. I.; ALMEIDA, L.; NIEDT, G. W. *Cuterebra* cutaneous myiasis: case report and world literature review. *International Journal of Dermatology*, v. 47, n. 4, p. 363-366, 2008.

DORCHIES, P.; TABOURET, G.; HOSTE, H.; JACQUIET, P. Larval-host parasite relationships. Part D: Oestrinae host-parasite interactions. In: COLWELL, D. D.; HALL, M. J. R.; SCHOLL, P. J. *The Oestrid flies: Biology, host-parasite relationships, impact and management*. Oxfordshire: CABI International, 2006. cap. 11, p. 191-200.

DUNAWAY, P. B.; PAYNE, J. A.; LEWIS, L. L.; STORY, J. D. Incidence and effects of *Cuterebra* in *Peromyscus*. *Journal of Mammalogy*, v. 48, n. 1, p. 38-51, 1967.

DUNN, L. H. Rearing the larvae of *Dermatobia hominis* Linn., in man. *Psyche*, v. 37, n. 4, p. 327-342, 1930.

ELHAY, M. J.; HANRAHAN, C. F.; BOWLES, V. M.; SEOW, H.; ANDREWS, A. E.; NASH, A. D. Cytokine mRNA expression in skin in response to ectoparasite infection. *Parasite Immunology*, v. 16, n. 9, p. 451-461, 1994.

EVANGELISTA, L. G.; LEITE, A. C. R. Optical and ultrastructural of midgut and salivary glands of first instar of *Dermatobia hominis* (Diptera: Oestridae). *Journal of Medical Entomology*, v. 42, n. 3, p. 218-223, 2005.

FARKAS, R.; HORN, S.; GYURKOVSKY, M. Preliminary studies on humoral immune response of sheep to wohlfahrtiosis. *Veterinary Parasitology*, v. 75, n. 2-3, p. 279-284, 1998.

FIGAROLA, J. L.; SKODA, S. R.; BERKEBILE, D. R.; FOSTER, J. E. Identification of screwworms, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) (Diptera: Calliphoridae), with a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay (MAB-ELISA). *Veterinary Parasitology*, v. 102, n. 4, p. 341-354, 2001.

FRANÇA, J. L.; VASCONCELLOS, A. C. *Normalização de publicações técnico-científicas*. 8. ed. rev. e ampl. Belo Horizonte: UFMG, 2009. 258 p.

GALVIN, T. J.; WYSS, J. H. Screwworm eradication program in Central America. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 791, p. 233-240, 1996.

GINGRICH, R. E.; BARRET, C. C. Natural and acquired resistance in rodent hosts to myiasis by *Cuterebra fontinella* (Diptera: Cuterebridae). *Journal of Medical Entomology*, v. 13, n. 1, p. 61-65, 1976.

GOMES, C. C. G.; TRIGO, J. R.; EIRAS, A. E. Sex pheromone of the american warble fly, *Dermatobia hominis*: The role of cuticular hydrocarbons. *Journal of Chemical Ecology*, v. 34, n. 5, p. 636-646, 2008.

GONCALVES, J. M.; NASCIMENTO, M. F. A.; BREYNER, N. M.; FERNANDES, V. C.; GÓES, A. M.; LEITE, A. C. R. Spleen cell proliferation during and after skin myiasis by human bot fly *Dermatobia hominis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 51, n. 3, p. 149-154, 2009.

GONÇALVES, J. M.; PEREIRA, C. T.; EVANGELISTA, L. G.; LEITE, C. R. Expression of circulating leucocytes before, during and after myiasis by *Dermatobia hominis* in experimentally infected rats. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 49, n. 5, p. 289-292, 2007.

GROGAN, T. M.; PAYNE, C. M.; PAYNE, T. B.; SPIER, C.; CROMEY, D. W.; RANGEL, C.; RICHTER, L. Cutaneous myiasis: immunohistologic and ultrastructural morphometric features of human botfly lesion. *The American Journal of Dermatopathology*, v. 9, n. 3, p. 232-239, 1987.

GUIMARÃES, J. H. Nota sobre os hábitos dos machos de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr.) (Diptera, Cuterebridae). *Papéis avulsos de Zoologia, São Paulo*, v. 18, p. 277-279, 1966.

GUIMARÃES, J. H.; PAPAVERO, N. Myiasis caused by obligatory parasites. VI. *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr.) (Cuterebridae). In: GUIMARÃES, J. H.; PAPAVERO, N. *Myiasis in man and animals in the Neotropical region*. São Paulo: Plêide, 1999. cap.11, p.257-302.

HALL, M. J. R.; SMITH, K. G. V. Diptera causing myiasis in man. In: LANE, R. P.; CROSSKEY, R. W. *Medical insects and arachnids*. London: Chapman & Hall, 1993. cap. 12, 429-469.

HALL, M.; WALL, R. Myiasis of humans and domestic animals. *Advances in Parasitology*, v.35, p. 257-333, 1995.

HEWITSON, J. P.; GRAINGER, J. R.; MAIZELS, R. M. Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 167, n. 1, p. 1-11, 2009.

HOSTE, H.; TORRES-ACOSTA, J. F.; AGUILAR-CABALLERO, A. J. Nutrition-parasite interactions in goats: is immunoregulation involved in the control of gastrointestinal nematodes? *Parasite Immunology*, v. 30, n. 2, p. 79-88, 2008.

HOTEZ, P. J.; BETHONY, J. M.; OLIVEIRA, S. C.; BRINDLEY, P. J.; LOUKAS, A. Multivalent anthelmintic vaccine to prevent hookworm and schistosomiasis. *Expert Review of Vaccines*, v. 7, n. 6, p. 745-752, 2008.

HUMPHREY, J. D.; SPRADBERRY, J. P.; TOZER, R.S. *Chrysomya bezziana*: pathology of old world screw-worm fly infestations in cattle. *Experimental parasitology*, v. 49, n. 3, p. 381-397, 1980.

HUNTER, D. M.; WEBSTER, J. M. Determination of the migratory route of botfly larvae, *Cuterebra grisea* (Diptera: Cuterebridae) in deermice. *International Journal for Parasitology*, v. 3, n. 3, p. 311-316, 1973.

JACQUIET, P.; NGOC, T. T. T.; NOUVEL, X.; PREVOT, F.; GRISEZ, C.; YACOB, H. T.; BERGEAUD, J. P.; HOSTE, H.; DORCHIES, P.; TABOURET, G. Regulation of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) populations in previously exposed and naive sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 105, n. 1-2, p. 95-103, 2005.

JAMES, M.T. The flies that cause myiasis in man. *United States Department of Agriculture Miscellaneous Publications*, v. 631, p. 100-104, 1947.

JOBSEN, J.A.; MOURIER, H. The morphology of the larval istars and pupa of *Dermatobia hominis* L. Jr. (Diptera: Cuterebridae). *Entomologische Berichten*, v. 32, n. 11, p. 218-224, 1972.

KOWALSKI, K. *Mamíferos*: manual de teriologia. Madrid: H. Blune Ediciones, 1981.

LEITE, A. C. R.; WILLIAMS, P. The life cycle of *Metacuterebra apicalis* (Diptera: Cuterebridae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 83, n. 4, p. 485-491, 1988.

LEITE, A. C. R.; NASCIMENTO, M. F. A; SERAFIM, L. R. Implantation of human bot fly larvae in host skin. *Journal of Medical Entomology*, v. 47, n. 1, p. 95-98, 2010.

LELLO, E. Larval-host parasite relationships. Part B: Cuterebrinae host-parasite interactions. In: COLWELL, D. D.; HALL, M. J. R.; SCHOLL, P. J. *The Oestrid flies: Biology, host-parasite relationships, impact and management*. Oxfordshire: CABI International, 2006. cap. 11, p. 179-189.

LELLO, E.; BOULARD, C. Rabbit antibody responses to experimental infestation with *Dermatobia hominis*. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 4, n. 3, p. 303-309, 1990.

LELLO, E.; PERAÇOLI, M. T. Cell-mediated and humoral immune responses in immunized and/ or *Dermatobia hominis* infested rabbits. *Veterinary Parasitology*, v. 47, n. 1-2, p. 129-138, 1993.

LELLO, E.; ROSIS, M. B. Inflammatory reation to the human bot-fly, *Dermatobia hominis*, in infested and reinfested mice. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 17, n. 1, p. 55-60, 2003.

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* (Diptera: Cuterebridae). *Ciência e Cultura*, v. 32, n. 4, p. 458-462, 1980.

LELLO, E.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; PERAÇOLI, M. T. S. Inflammatory response in *Dermatobia hominis* infested rabbits. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 8, n. 2, p. 87-91, 1999.

LÓPEZ, C.; COLWELL, D. D.; PANADERO, R.; PAZ, A.; PÉREZ, J.; MORRONDO, P.; DÍEZ, P.; CASCALLANA, J. L.; SANTAMARÍA, V.; BRAVO, A. Skin immune responses in cattle after primary and secondary infections with *Hypoderma lineatum* (Diptera:

Oestridae) larvae. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 108, n. 3-4, p. 285-294, 2005.

MOIRÉ, N. Hypodermin A and inhibition of lymphocyte proliferation. *Parasitology Today*, v. 14, n. 11, p. 455-457, 1998.

MOIRÉ, N.; NICOLAS-GAULARD, I.; LE VERN, Y.; BOULARD, C. Enzymatic effect of hypodermin A, a parasite protease, on bovine lymphocyte membrane antigens. *Parasite Immunology*, v. 19, n.1, p. 21-27, 1997.

MOTA, N. G. S.; PERAÇOLI, M. T. S.; LELLO, E. Anticorpos circulantes em coelhos imunizados obtidos de larvas de *D. hominis* Linnaeus (Diptera: Cuterebridae). *Ciência e Cultura*, v. 32, n. 4, p. 453-457, 1980.

MOYA-BORJA, G. E. Estudios sobre la biología, morfología y esterilización del tórsalo, *Dermatobia hominis* (L., Jr.). Turrialba, Instituto interamericano de Ciências Agrícolas de la O. E. A. Centro de Enseñanza e Investigación. 63p. (Tesis, Magister Scientiae). 1966.

NASH, A. D.; EGAN, P. J.; KIMPTON, W.; ELHAY, M. J.; BOWLES, V. M. Local cell traffic and cytokine production associated with ectoparasite infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 54, n. 1-4, p. 269-279, 1996.

NEEL, W.W.; URBINA, O.; ALBA, E. V. J. Ciclo biológico del tórsalo (*Dermatobia hominis*, L. Jr.) em Turrialba, Costa Rica. *Turrialba*, v.5, n. 3, p. 91-104, 1955.

NEIVA, A. Algumas informações sobre o Berne. *Chácaras e Quintaes*, v.2, n.1, p.3-8, 1910.

NEIVA, A.; GOMES, J. F. Biologia da mosca do berne (*Dermatobia hominis*) observada em toda as suas fases. *Anais Paulistas de Medicina e Cirurgia*, v. 3, n.9, p.197-209, 1917.

NICOLAS-GAULARD, I.; MOIRE, N.; BOULARD, C. Effect of the parasite enzyme, hypodermin A on bovine lymphocyte proliferation and interleukin-2 production via the prostaglandin pathway. *Immunology*, v. 85, n.1, p. 160-165, 1995.

OKWOR, I.; UZONNA, J. Vaccines and vaccination strategies against human cutaneous leishmaniasis. *Human Vaccines*, v. 5, n. 5, p. 229-301, 2009.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; SEQUEIRA, J. L.; SCHMITT, F. L.; LELLO, E. Histological and immunological reactions of cattle skin to first-instar larvae of *Dermatobia hominis*. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 10, n. 4, p. 323-330, 1996.

O'MEARA, T. J.; NESSA, M.; SANDEMAN, R. M. Antibody responses to *Lucilia cuprina* in sheep selected for resistance or susceptibility to *Lucilia cuprina*. *Parasite Immunology*, v. 19, n. 12, p. 535-543, 1997.

PANADERO, R.; DACAL, V.; LÓPEZ, C.; VÁZQUEZ, L.; CIENFUEGOS, S.; DÍAZ, P.; MORRONGO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P. Immunomodulatory effect of *Hypoderma lineatum* antigens: in vitro effect on bovine lymphocyte proliferation and cytokine production. *Parasite Immunology*, v. 31, n. 2, p. 72-77, 2009.

PAPE, T. Phylogeny of Oestridae (Insecta: Diptera). *Systematic Entomology*, v. 26, p. 133-171, 2001.

PAPE, T. Phylogeny and evolution of bot flies. In: COLWELL, D. D.; HALL, M. J. R.; SCHOLL, P. J. *The Oestrid flies: Biology, host-parasite relationships, impact and management*. Oxfordshire: CABI International, 2006. cap. 3, p. 20-50.

PAYNE, J. A.; COSGROVE, G. E. Tissue changes following *Cuterebra* infestation in rodents. *The American Midland Naturalist*, v. 75, n. 1, p. 205-213, 1966.

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 as larvas desse parasita (Diptera: Cuterebridae). *Ciência e Cultura*, v. 32, n. 11, p. 1537-1541, 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 lesion from larvae of the bot fly *Dermatobia hominis*. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 15, n. 1, p.22-27, 2001.

PIRES, F. A.; MOYA-BORJA, G. E.; BARREIRA, J. D.; PINHO, R. T.; ALVES, C. R. The main proteinases in *Dematobia hominis* second and third instars larvae are serine-proteinases. *Veterinary Parasitology*, v. 145, n. 3-4, p. 326-331, 2007.

PRUETT, J. H.; BARRET, C. C. Development by the laboratory rodent host of humoral antibody activity to *Cuterebra fontinella* (Diptera: Cuterebridae) larval antigens. *Journal of Medical Entomology*, v. 20, n. 2, p. 113-119, 1983.

RONCALLI, R. A. The biology and the control of *Dermatobia hominis*, the tropical warble-fly of Latin América. *Preventive Veterinary Medicine*, v.2, p.569-578, 1984.

SANCHEZ-ANDRADE, R.; ROMERO, J. L.; SUÁREZ, J. L.; PEDREIRA, J.; DÍAZ, P.; ARIAS, M.; PAZ-SILVA, A.; PANADERO, R.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P.; SCALA, A. Comparison of *Oestrus ovis* metabolic and somatic antigens for the immunodiagnosis of the zoonotic myiasis oestrosis by immunoenzymatic probes. *Immunological Investigations*, v. 34, n. 1, p. 91-99, 2005.

SANCHO, E.; CABALLERO, M.; RUÍZ-MARTINEZ, I. The associated microflora to the larvae of human bot fly *Dermatobia hominis* L. Jr. (Diptera: Cuterebridae) and its furuncular lesions in cattle. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 91, n. 3, p. 293-298, 1996.

SANDEMAN, R. M.; CHANDLER, R. A.; TURNER, N.; SEATON, D. S. Antibody degradation in wound exudates from blowfly infections on sheep. *International Journal for Parasitology*, v. 25, n. 5, p. 621-628, 1995.

SLANSKY, F. Insect/mammal associations: effects of cuterebrid bot fly parasites on their hosts. *Annual review of Entomology*, v. 52, p. 17-36, 2007.

SMITH, D. H. A technique for the laboratory mating of rodent bot flies (Diptera: Cuterebridae). *Journal of Medical Entomology*, v. 10, n. 5, p. 481, 1973.

SUÁREZ, J. L.; SCALA, A.; ROMERO, J. A.; PAZ-SILVA, A.; PEDREIRA, J.; ARIAS, M.; DÍAZ, P.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R. Analysis of the humoral immune response to *Oestrus ovis* in ovine. *Veterinary Parasitology*, v. 134, n. 1-2, p. 153-158, 2005.

SUKARSIH; PARTOUTOMO, S.; SATRIA, E.; WIJFFELS, G.; RIDING, G.; EISEMANN, C.; WILLADSEN, P. Vaccination against the Old World screwworm fly (*Chrysomya bezziana*). *Parasite Immunology*, v. 22, n. 11, p. 545-552, 2000.

TABOURET, G.; LACROUX, C.; ANDREOLETTI, O.; BERGEAUD, J. P.; HAILUTOLOSA, Y.; HOSTE, H.; PREVOT, F.; GRISEZ, C.; DORCHIES, P.; JACQUIET, P. Cellular and humoral local immune responses in sheep experimentally infected with *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae). *Veterinary Research*, v. 34, n. 2, p. 231-241, 2003.

TELLAM, R. L.; BOWLES, V. M. Control of bowfly strike in sheep: current strategies and future prospects. *International Journal for Parasitology*, v. 27, n. 3, p. 261-273, 1997.

THOMAS, D. B.; PRUETT, J. H. Kinetic development and decline of antiscrewworm (Diptera: Calliphoridae) antibodies in serum of infested sheep. *Journal of Medical Entomology*, v. 29, n. 5, p. 870-873, 1992.

TOWNSEND, C. H. T. *Manual of miology: general consideration of the oestromuscaria*. São PAULO: Charles Townsend e Filhos, 1942, v. 12, 365p.

TUYGUN, N.; TAYLAN-ÖZKAN, A.; TANIR, G.; MUMCUOGLU, K. Y. Furuncular myiasis in a child caused by *Wohlfahrtia magnifica* (Diptera: Sarcophagidae) associated with eosinophilia. *The Turkish Journal of Pediatrics*, v. 51, p. 279-281, 2009.

VAN-KHANH, N.; BOURGES, N.; CONCORDET, D.; DORCHIES, P. Mastocytes et éosinophiles de la muqueuse respiratoire du mouton infesté par *Oestrus ovis* (Linné, 1761). *Parasite*, v. 3, p. 217-221, 1996.

VAN-KHANH, N.; JACQUIET, P.; DURANTON, C.; BERGEAUD, J. P.; PREVOT, F.; DORCHIES, P. Réactions cellulaires des muqueuses nasales et sinusales des chèvres et des moutons à l'infestation naturelle par *Oestrus ovis* Linné 1758 (Diptera: Oestridés). *Parasite*, v. 2, p. 141-149, 1999.

WEISBROTH, S. H.; WANG, R.; SCHER, S. Immune and pathologic consequences of spontaneous *Cuterebra* myiasis in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Laboratory Animal Science*, v. 23, n. 2, p. 241-247, 1973.

WOOD, D. M. Oestridae. In: McALPINE, J. F. *Manual of Nearctic Diptera*. Ottawa: Research Branch Agriculture Canada, 1987. v. 2, p. 1147-1158.

WYSS, J. H. Screwworm eradication in the Americas. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 916, p. 186-193, 2000.

YACOB, H. T.; JACQUIET, P.; PREVOT, F.; BERGEAUD, J. P.; BLEUART, C.; DORCHIES, P.; HOSTE, H. Examination of the migration of first instar larvae of the parasite *Oestrus ovis* (Linne 1761) Diptera: Oestridae in the upper respiratory tract of artificially infected lambs and daily measurements of the kinetics of blood eosinophilia and mucosal inflammatory response associated with repeated infection. *Veterinary Parasitology*, v. 126, n. 3, p. 339-347, 2004.

ZUMPT, F. Some remarks on the classification of the Oestridae s. lat. (Diptera). *Journal of the Entomological Society of Southern Africa*, v. 20, p.154-161, 1957.

ZUMPT, F. *Myiasis in man and animal in the Old World*. London: Butterworth, 1965. 276p.

ANEXO A - Lista de espécies de insetos e mamíferos, com seus respectivos autores

A.1 Insetos

Calliphora vicina (Robineau-Desvoidy, 1830)

Cochliomyia hominivorax (Coquerel, 1858)

Cochliomyia macellaria (Fabricius, 1775)

Chryzomya bezziana (Villeneuve, 1914)

Chryzomya rufifacies (Macquart, 1843)

Cuterebra buccata (Fabricius, 1775)

Cuterebra emasculator (Fitch, 1856)

Cuterebra fontinella (Clark, 1827)

Dermatobia hominis (Linnaeus Jr. 1781)

Hypoderma bovis (Linnaeus, 1758)

Hypoderma lineatum – (De Villers, 1789)

Lucilia cuprina (Wiedmann, 1830)

Musca domestica (Linnaeus, 1758)

Oestrus ovis (Linnaeus, 1761)

Phaenicia sericata (Meigen, 1826)

Phormia regina (Meigen, 1826)

Sarcophaga haemorrhoidalis (Fallen, 1816)

Wohlfahrtia magnifica (Schiner, 1862)

A. 2 Mamíferos

Gerbillus gerbillus (Olivier, 1801)

Mus musculus (Linnaeus, 1758)

Oryctolagus cuniculus (Linnaeus, 1758)

Peromyscus boylii (Baird, 1855)

Peromyscus leucopus (Rafinesque, 1818)

Peromyscus pectoralis (Osgood, 1904)

Rattus norvegicus (Berkenhout, 1769)

Sigmodon hispidus (Say e Ord, 1825)

Tamias striatus (Linnaeus, 1758)