

Parâmetros hematológicos de bovinos da raça Holandesa: influência da tuberculinização comparada

Luiz Carlos Negri Filho¹, Lucas Vinícius de Alcântara Andrade², Pedro Henrique Newbery Chineze³, Mauricio Zampronio Affonso⁴, Marcelo Diniz dos Santos⁵, Flávio Antônio Barca Junior⁶, Alexey Leon Gomel Bogado⁶, Luiz Cesar da Silva⁷, Werner Okano^{7*}

Resumo: A tuberculose bovina é uma importante doença de caráter zoonótico, sendo diagnosticada pela técnica de tuberculinização. O objetivo deste estudo foi avaliar a alteração dos parâmetros hematológicos em bovinos leiteiros submetidos à tuberculinização comparada. Foram analisados os parâmetros hematológicos de 27 fêmeas bovinas leiteiras, hematócrito, concentração de hemoglobina e contagem diferencial de leucócitos. Os parâmetros hematológicos no dia zero (H0) encontravam dentro do intervalo de referência para a espécie. Porém no dia H72 houve diferença estatística para o aumento na contagem de neutrófilos segmentados e bastonetes e diminuição na contagem de linfócitos, eosinófilos e monócitos.

Palavras chaves: hemograma, tuberculinização, bovino.

Hematological parameters of Holstein breed bovines: the influence of by the tuberculin comparative test

Abstract: Bovine tuberculosis is an important zoonotic disease, being diagnosed by the tuberculin test. The aim of this study was to evaluate the changes of hematological parameters in dairy cattle subjected to comparative tuberculin test. Hematological parameters of 27 dairy cows, hematocrit, hemoglobin concentration and differential white blood cells counts were analyzed. Hematological parameters at day zero (H0) were within the normal range for the species. But on H72 was no statistical difference for the increased number of rods and segmented neutrophils and decrease in lymphocytes, eosinophils and monocytes.

Key words: hemogram, tuberculin test, bovine.

¹ Acadêmico de Medicina Veterinária da UNOPAR da Unidade de Araçongas – Paraná, Bolsista PIBIC CNPq

² Médico Veterinário autônomo de Jandaia do Sul – Paraná

³ Acadêmico de Medicina Veterinária da UNOPAR da Unidade de Arapongas – Paraná.

⁴ Mestrando do PPG Saúde e Produção de Ruminantes – UNOPAR UEL

⁵ Prof. Dr. Medicina Veterinária UNIC – Cuiabá – MT e PPG Biociência Animal - UNIC

⁶ Prof. Medicina Veterinária da UNOPAR da Unidade de Arapongas - Paraná

⁷ Prof. Dr. Medicina Veterinária UNOPAR da Unidade de Arapongas – Paraná e PPG Saúde e Produção de Ruminantes – UNOPAR UEL. * vetwerner@gmail.com

Autor para correspondência - * vetwerner@gmail.com

Submetido em 12.10.2014; Aceito em 15. 12. 2014

Introdução

A importância da hematologia como meio semiológico, auxiliando os médicos veterinários a estabelecer diagnósticos, firmar prognósticos e acompanhar os tratamentos das inúmeras enfermidades é reconhecida e consagrada mundialmente (BIRGEL, 1991). A determinação de alguns parâmetros hematológicos permite uma oportuna ação sobre o manejo e saúde dos animais (CAMPOS et al., 2008).

O hemograma é um exame realizado que avalia as células sanguíneas de um paciente, ou seja, as da série branca e vermelha, contagem de plaquetas, reticulócitos e índices hematológicos (KANTEK et al., 2005). São inúmeras as

condições que influenciam o quadro hematológico dos bovinos leiteiros entre eles estão os fatores etários, sexuais, raciais, climáticos, nutricionais, infecciosos e parasitários (PEIXOTO et al., 2002).

Respostas hematológicas em muitas patologias são comumente associadas com alterações de volume, somada a concentração de Hemoglobina celular (Hb) que fornecem a base para a classificação morfológica das anemias (FLAIBAN; BALARIN, 2004).

Mycobacterium bovis (*M. bovis*), é membro do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e causa a tuberculose bovina (MICHEL; MULLER; VAN HELDEN, 2010). O teste intradérmico da tuberculina

é reconhecido pela Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) que recomenda duas variações do teste da tuberculina, a inoculação simples ou a comparada, o qual compara a resposta imune para *M. bovis* e *M. avium* (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o quadro hematológico de bovinos leiteiros imediatamente antes da tuberculinização comparada e 72 horas após a inoculação da tuberculina bovina e aviária.

Material e Métodos

Foram utilizadas 27 fêmeas bovina da raça Holandês variedade Preto e Branco com idade que variou de 2 a 7 anos, em lactação, procedentes de uma propriedade de exploração leiteira, tipo B, situada no município de Cambira (23°34'58''S, 51°34'40''W) na mesorregião norte central do Paraná, criados em sistema de *free stall*. A primeira coleta de sangue foi realizada imediatamente antes da primeira inoculação dos alergênicos do teste de tuberculinização comparada, dia 0 (H0),

conforme preconizado pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (BRASIL, 2006). A segunda coleta ocorreu 72 horas (H72) após a primeira, no mês de junho de 2010, após a ordenha das 12 horas. Previamente a cada coleta, realizou-se o exame clínico para descartar qualquer animal doente, conforme CAMPOS et al. (2008). A propriedade é considerada área livre de brucelose e tuberculose pelo PNCEBT, sendo o teste realizado anualmente.

Para as colheitas de sangue, foram utilizadas agulhas descartáveis (25X8mm) através de punção da veia coccígea média, com os animais contidos em canzil metálico, utilizando tubos Vacutainer®, com anticoagulante ácido etilenodiaminotetraacético tripotássico (EDTA K₃) de 5 mL. Imediatamente após cada coleta de sangue, foi realizado o esfregaço sanguíneo e as lâminas foram acondicionadas em caixas plásticas próprias para transporte protegidas da luz solar. Logo após a coleta os tubos foram

identificados e acondicionados em caixa isotérmica contendo gelo reciclável e enviados ao laboratório para análise de hemograma.

Os testes foram realizados no mesmo dia da colheita no Laboratório Lasy, município de Arapongas - PR, utilizando analisador automático (Pentra 60 – Horiba). Os parâmetros aferidos foram: Contagem total de hemácias, teor de hemoglobina, hematócrito, índices hematimétricos absolutos (Volume Corpuscular Médio - VCM, Hemoglobina Corpuscular Média - HCM, Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média - CHCM) e contagem total de leucócitos. A contagem diferencial dos leucócitos foi

realizada em esfregaço sanguíneo corado pelo método de Rosenfeld. Os testes foram realizados do mesmo dia da coleta.

Os dados foram analisados utilizando pacote estatístico Bioestat 5.0 (AYRES et al., 2007) com nível mínimo de significância de 5%, as variáveis hemácias, hemoglobina, hematócrito foram analisadas por ANOVA e as variáveis VCM, HCM, CHCM por Kruskal-Wallis.

Resultados e discussão

Não houve diferença significativa entre H0 e na avaliação H72, para os parâmetros analisados, hemácias, hemoglobina, hematócrito, VGM, HGM e CHGM conforme Tabela 1 e 2, segundo referência de Campos et al. (2008).

Tabela 1 – Valores médios, desvio padrão, intervalo, valores mínimos e máximos dos constituintes do Hemograma, Hemácias (HC), Hemoglobina (Hb) e Hematócrito (Ht) de bovinos inoculados com tuberculina bovina e aviária H0 e H72, de bovinos da raça Holandesa.

Parâmetros	<i>HC-H0</i>	<i>HC-H72</i>	<i>Hb-H0</i>	<i>Hb-H72</i>	<i>Ht-H0</i>	<i>Ht-H72</i>
Média	6,13 ^a	6,10 ^a	8,94 ^a	8,96 ^a	27,11 ^a	27,18 ^a
Desvio padrão	0,72	0,65	1,02	1,03	2,51	2,48
Intervalo	3,34	2,87	4,38	4,76	12	10
Mínimo	4,25	4,62	6,42	5,84	20	21
Máximo	7,59	7,49	10,8	10,6	32	31

Tabela 2 - Valores médios, desvio padrão, intervalo, valores mínimos e máximos dos constituintes do Hemograma, Volume Corpuscular Médio (VGM), Hemoglobina Corpuscular Média (HGM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHGM) de bovinos inoculados com tuberculina bovina e aviária H0 e H72, de bovinos da raça Holandesa.

Parâmetros	VGMH0	VGMH72	HGM H0	HGM H72	CHGMH0	CHGMH72
Média	44,40 ^a	44,67 ^a	14,80 ^a	14,93 ^a	33,35 ^a	33,39 ^a
Desvio padrão	3,02	2,95	0,95	0,78	0,50	1,28
Intervalo	11	13	3,5	2,9	2,4	7,7
Mínimo	38,7	41,4	13,2	13,8	31,7	27,5
Máximo	49,7	54,4	16,7	16,7	34,1	35,2

Em relação a comparação entre os dias H0 e H72 houve diferença significativa para neutrófilos ($p < 0,0001$), neutrófilos segmentados ($p < 0,0001$), neutrófilos bastonetes ($p = 0,0389$), eosinófilos ($p = 0,0227$) e linfócitos ($p < 0,0001$), não havendo diferença significativa para monócitos, conforme a Tabela 3 e 4.

Tabela 3 – Valores médios, desvio padrão dos constituintes do leucograma neutrófilos, neutrófilos segmentados, neutrófilos bastões, H0 e H72, de bovinos da Raça Holandesa.

Parâmetros	Neutrófilos		Neutrófilos Segmentados		Bastões	
	H0	H72	H0	H72	H0	H72
Média	4765,18 ^b	8374,43 ^a	4754,46 ^b	8326,00 ^a	10,71 ^b	48,43 ^a
Mediana	4368	7449	4304	7403	0	0
Desvio Padrão	1993,88	3005,80	1998,54	3018,53	32,18	66,74
Intervalo	7126	14188	7126	14236	128	260
Mínimo	1764	3312	1764	3264	0	0
Máximo	8890	17500	8890	17500	128	260

Tabela 4 - Valores médios, desvio padrão dos constituintes do leucograma, Eosinófilos, Linfócitos e Monócitos H0 e H72, de bovinos da Raça Holandesa.

Parâmetros	Eosinófilos		Linfócitos		Monócitos	
	H0	H72	H0	H72	H0	H72
Média	320,57 ^a	88,36 ^b	7569,04 ^a	6273,39 ^b	659,50 ^a	495,96 ^a
Mediana	171	0	4170	2838	471,5	360,5
Desvio padrão	753,54	146,70	8186,66	7448,68	606,75	434,55
Intervalo	4069	508	384,8	31220	2452	1622
Mínimo	0	0	1536	1440	98	48

Máximo	4069	508	39950	32660	2550	1670
--------	------	-----	-------	-------	------	------

Animais criados sob diferentes condições climáticas e de manejo podem apresentar evidentes variações dos elementos constituintes no exame de hemograma. No presente trabalho os parâmetros utilizados foram os descritos por CAMPOS et al. (2008) para a região sul do Brasil.

Segundo JAIN (1993), alguns fatores podem influenciar os valores de referência para a interpretação dos referidos parâmetros, tais como: espécie, sexo, raça, idade, estado fisiológico e hora do dia. Os grupos estudados H0 e H72 não tiveram alterações nas variáveis citadas por JAIN (1993) exceto pelo estado fisiológico quando desafiados pela inoculação da tuberculina bovina e aviária.

KILLICK et al. (2011) estudando 16 bovinos sabidamente positivos no exame de tuberculinização e um grupo controle compararam a contagem total de hemácias e não encontraram diferença significativa

entre os grupos. O mesmo ocorrendo entre H0 e H72 do presente trabalho.

CAMPOS et al. (2008) avaliaram que os valores médios dos parâmetros hematológicos no verão e inverno, e demonstraram que as condições de verão influenciaram a dinâmica sanguínea na maioria dos parâmetros estudados. No período estudado não houve variação na estação do ano.

O número de eritrócitos totais, a concentração de hemoglobina e o hematócrito podem sofrer alterações durante o parto (JAIN, 1993). A mensuração do hematócrito pode apresentar variação severa em casos de desidratação, pois há hemoconcentração (JAIN, 1993; THRALL, 2004). Segundo ANOSA; OGBODU (1979) devido a diminuição do consumo de água no periparto ocorre a hemoconcentração. O período que ocorre depois do nascimento chamado de pós-parto na espécie bovina é marcado por uma rápida alteração do

quadro hematológico, sendo ainda caracterizadas por uma grande susceptibilidade as doenças (RADOSTITS et al., 2010). Nenhum animal do presente estudo estava no periparto.

As alterações hematológicas relacionadas à lactação podem variar entre rebanhos e os baixos parâmetros eritrocitários durante este período podem estar relacionados com o nível de produção leiteira, com a nutrição do animal (MANSTON et al., 1975). Em geral, quanto maior é a produção leiteira, menores são os valores dos parâmetros eritrocitários (JAIN, 1993). O manejo nutricional foi mantido entre H0 e H72, não havendo influência do mesmo nos parâmetros estudados.

As alterações nos constituintes celulares do sangue durante a gestação, parto e lactação em vacas leiteiras estão intimamente relacionadas com o cortisol, o hormônio do estresse (JACOB et al., 2001). CAMPOS et al. (2008) não encontraram correlações significativas

entre o cortisol plasmático e a maioria dos parâmetros hematológicos avaliados. MEYER et al. (1995), que afirmam que o hematócrito pode ser alterado, dentre outros fatores, pela atividade muscular prévia e manejo. A rotina dos animais entre a ordenha e as instalações de *free stall*, onde foi realizada a coleta de sangue não foi alterada.

SAUT; BIRGEL (2008) ao analisarem bovinos com retenção de anexos fetais não encontraram diferença estatística para os constituintes do eritrograma, exceto ao número de hemácias, que entre o 10º e 30º dia de puerpério teve diminuição do número de hemácias indicando anemia. Nenhum animal do estudo apresentava retenção dos anexos fetais.

Os valores normais do número de hemácias, da concentração de hemoglobina, do volume globular e dos índices hematimétricos demonstram que a tuberculinização não causa alteração na hematimetria dos animais avaliados. Os

parâmetros hematológicos estudados encontram-se dentro dos valores de referência para a espécie bovina (CAMPOS et al., 2008).

A parição determinava intensas modificações no leucograma, sendo que essas alterações, caracterizadas por leucocitose devido a neutrofilia e eosinopenia (FAGLIARI, 1998). No presente estudo houve neutrofilia e eosinopenia, no entanto nenhum animal era recém parido.

A linfocitose persistente nos casos pré-tumorais é caracterizada pelo acréscimo no nível de linfócitos B circulantes, com um aumento de 40 a 80% em relação aos valores normais de referência, e nem sempre precede a forma tumoral (BURNY et al., 1985). No presente estudo houve linfocitose porém em nenhum dos animais observou-se linfoblasto imaturo.

KILLICK et al. (2011) analisando o perfil hematológico de oito bovinos sabiamente positivos para tuberculose e

oito sabiamente negativos não encontraram diferença estatística na contagem de glóbulos brancos entre os grupos ($p=0,18$). No entanto encontraram aumento significativo no número de linfócitos ($p=0,0001$) e decréscimo nos monócitos ($p=0,002$) em animais tuberculosos em relação aos negativos. Na presente pesquisa também houve decréscimo do número de monócitos, assim como de linfócitos, diferindo da contagem aumentada do autor supra citado. Por outro lado ainda segundo KILLICK et al. (2011) nenhuma diferença estatística foi observada em eosinófilos e neutrófilos entre o grupo estudado ($p=0,51$ e $p=0,37$, respectivamente). Já na presente pesquisa houve diferença significativa tanto em eosinófilos que decresceu a sua contagem e assim como houve aumento na contagem de neutrófilos.

Bovinos infectados pelo *M. bovis* tem um quadro hematológico típico de infecções crônica, como leucopenia e anemia. (SMITH, 2006). Animais não

tuberculosos submetidos a tuberculinização apresentam aumento significativo de contagem de linfócitos do que animais tuberculosos, porém dentro dos parâmetros da normalidade (BEECHLER, ZOLLER, EZENWA, 2009). No presente estudo houve aumento do número de linfócitos quando desafiados pela tuberculinização.

PALMER; WATERS; THACKER (2007) demonstram a participação dos neutrófilos no estágio inicial da formação do granuloma tuberculoso. Fato este que pode explicar o estímulo alergênico dado no local da inoculação das tuberculinas bovina e aviária com conseqüente aumento das células neutrofílicas observadas no presente estudo.

O exame histológico das biópsias das reações positivas e inconclusivas tuberculinização comparada revelou edema, raros polimorfonucleares, reação inflamatória com predominância de células mononucleares em processo de diferenciação para macrófagos, com alguns deles alongados com características de

células epitelióides. Algumas reações evidenciaram células gigantes do tipo Langhans, restos celulares e discreta vasculite com áreas de necrose não delimitadas (ALMEIDA et al., 2006). Fato este poderia explicar a diminuição com significância estatística do número de monócitos.

Diferentes protocolos de imunização para doenças de controle não obrigatório (ex. leucose, diarreia viral bovina, rinotraqueíte bovina infecciosa, e ou diferentes programas de controle de parasitas) são adotados para cada rebanho. É possível que estes rebanhos apresentem alterações nas variáveis hematológicas principalmente no que se refere às células brancas (CAMPOS et al., 2008). Durante o experimento o único desafio dos animais foi a realização da tuberculinização, demonstrando ser possível que o aumento dos valores de neutrófilos, linfócitos e monócitos e o decréscimo de eosinófilos estariam ligados a inoculação dos alergênicos.

Conclusão

Nas condições da presente pesquisa houve diferença significativa entre H0 e H72 para aumento de neutrófilos segmentados e bastonetes, e decréscimo para a contagem de linfócitos eosinófilos e monócitos. Não houve alteração na série vermelha.

Agradecimentos

A UNOPAR, UNIC, KROTON, PIBIC CNPq e Funadesp pelo apoio financeiro.

Referencias bibliograficas

ALMEIDA, F.F.C.; MADRUGA, C.R.; SOARES, C.O.; FERNANDES, M.C.; CARVALHO, N.M.; JORGE, K.S.G.; OSÓRIO, A.L.A.R. Resposta imune específica de bovinos experimentalmente sensibilizados com inóculos inativados de *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium avium*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 4, p. 195-200, 2006.

ANOSA, V. O.; OGBOGU, D. A. The effect of parturition on the blood picture of sheep. **Research in Veterinary Science**, Amsterdam, v. 26, n. 3, p. 380-382, 1979.

AYRES, M., AYRES JR, M., AYRES, D.L., SANTOS, A. A. S. BioEstat 5.3. Sociedade Civil Mamirauá, 2007. 380p.

BEECHLER, B.R.; JOLLES, A.E., EZENWA, V.O. Evaluation of hematologic values in free-ranging African buffalo (*Syncerus caffer*). **Journal of Wildlife Diseases**, Lawrence, v. 45, n.1, pp. 57–66, 2009.

BIRGEL, E.H. Hematologia clínica veterinária. In: BIRGEL, E.H., BENESI, F.J. Patologia clínica veterinária. São Paulo: **Sociedade Paulista de Medicina Veterinária**, p.2-34, 1991.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Saúde Animal. 2006. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). Manual Técnico. Brasília:MAPA/DAS/DSA/2006, 188p.

- BURNY, A.; BRUCK, C.; CLEUTER, Y.; COUEZ, D.; DESCHAMPS, J.; GREGOIRE, D.; GHYSDAEL, J.; KETTMANN, R.; MAMMERICKX, M.; MARBAIX, G.; PORTELLE, D. Bovine Leukaemia Virus and Enzootic Bovine Leukosis. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.52, p.133-144, 1985.
- CAMPOS, R.; LACERDA, L.A.; TERRA, S.R.; GONZÁLEZ, F.H.D. Parâmetros hematológicos e níveis de cortisol plasmático em vacas leiteiras de alta produção no Sul do Brasil. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 45, n. 5, p. 354-361, 2008.
- FAGLIARI, J.J.; SANTANA, A.E.; LUCAS, F.A. et al. Constituintes sanguíneos de bovinos recém-nascidos das raças Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*) e de bubalinos (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.50, p.253-262, 1998.
- FLAIBAN, K. K. M. C.; BALARIN, M. R. S. Semina Ciências Agrárias, Londrina, v. 25, n. 2, p.125-130, 2004.
- JACOB, S. K.; RAMNATH, V.; PHILOMINA, P. T.; RAGHUNANDHANAN, K. V.; KANNAN, A. Assessment of physiological stress in periparturient cows and neonatal calves. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, New Delhri, v. 45, n. 2, p. 233-238, 2001.
- JAIN, N. C. Essentials of veterinary hematology. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417 p.
- KANTEK GARCIA-NAVARRO, C. E. Manual de Hematologia Veterinária. 2ed. São Paulo: Varela, 2005. p.206.
- KILLICK KE, BROWNE JA, PARK SD, MAGEE DA, MARTIN I, MEADE, K.G.; GORDON, S.V.; GORMLEY, E.; O'FARRELLY, C.; HOKAMP, K.; MACHUGH, D.E. Genome-wide transcriptional profiling of peripheral

blood leukocytes from cattle infected with *Mycobacterium bovis* reveals suppression of host immune genes. **BMC Genomics**, London, v. 12, n. 611. p. 1-18, 2011.

MANSTON, R.; RUSSELL, A. M.; DEW, S. M.; PAYNE, J. M. The influence of dietary protein upon blood composition in dairy cows. **Veterinary Record**, London, v. 96, n. 23, p. 497-502, 1975.

MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L.J. Medicina de laboratório veterinária – Interpretação e diagnóstico. 1ª Ed. São Paulo: Roca LTDA, 308p. 1995.

MICHEL AL, MULLER B, VAN HELDEN PD. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: a problem, or not? **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 140, n 3–4, p. 371–381, 2010.

PALMER MV, WATERS WR, THACKER TC. Infected with *Mycobacterium bovis* lesion development and immunohistochemical changes in granulomas from cattle experimentally. **Veterinary Pathology**, Los Angeles, v. 44, n. 6, p. 863-874, 2007.

PEIXOTO, A. P. C.; COSTA, J. N.; KOHAYAGAWA, A.; TAKAHIRA, R. K.; SAITO, M. E. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**. Salvador, v. 3, n. 1, p. 16-20, 2002.

RADOSTITS, O. M. et al. Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 1.737p.

de la RUA-DOMENECH R, GOODCHILD AT, VORDERMEIER HM, HEWINSON RG, CHRISTIANSEN KH. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. **Research in Veterinary Science**, Amsterdam, v. 81, n. 2, p. 190–210, 2006.

SAUT, J.P.E.; BIRGEL JUNIOR, E.H. Influência da retenção dos anexos fetais no hemograma de fêmeas bovinas da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.60, n.6, p.1315-1322, 2008

SMITH, Bradford P. Tratado de medicina interna de grandes animais. São Paulo: Manole, 2006. 3 ed. v 2. 1784p.

THRALL, A.M. Veterinary Hematology stand Chemical Chemistry Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 518p., p.301-328. 2004.