



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ESTUDOS ECOLÓGICOS E PATOLÓGICOS DA
INFECÇÃO POR *Polidispyrenia simulii*
(MICROSPORA ; PLEISTOPHORIDAE) EM UMA
COMUNIDADE DE SIMULÍDEOS.

Armando Castello Branco Junior

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À REDACÇÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA PELO CANDIDATO ARMANDO CASTELLO
BRANCO JR., E APROVADA PELA COMISSÃO JULGADORA.

Dissertação apresentada à Universidade
Estadual de Campinas (UNICAMP) para obtenção
do grau de Mestre em Ciências Biológicas
(Ecologia).

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Fernando S. de Andrade

Campinas

1991

B733e

14382/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

AGRADECIMENTOS

A realização desta tese, mais do que fruto de um esforço individual, é o resultado da colaboração de muitas pessoas. A não citação nominal de qualquer um desses colaboradores não significa de modo algum, qualquer ponderação na ajuda prestada, no entanto gostaria de registrar aqui meus agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Carlos Fernando Andrade, pela orientação, amizade e compreensão durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Mohamed Habib, pela co-orientação, amizade e estímulo em todos os momentos.

Aos amigos Ana Tereza, Osvaldo, Heitor e Maria Eugênia, pelo apoio e atenção em diferentes fases do trabalho.

À Profa. Dra. Mary Anne Heide Dolder (Departamento de Biologia Celular, IB/UNICAMP) pelo apoio e atenção na realização dos estudos de microscopia eletrônica, assim como a todos os professores, funcionários e técnicos do Centro de Microscopia Eletrônica, UNICAMP, pela cooperação e assistência.

Aos professores, amigos e funcionários do Departamento de Zoologia, IB/UNICAMP, pelo apoio e amizade durante todos esses anos e, em especial, ao Sr. João Oliveira pela amizade e assistência prestada sempre que necessário.

Ao Sr. Max Ferreira, administrador da Fazenda Cachoeirinha, Morungaba/SP, pela confiança e colaboração durante todo o trabalho.

À minha família, sempre presente, pelo apoio durante toda a minha vida.

À minha esposa Cláudia, amiga, companheira e colega de trabalho, que participou e me apoiou em todos os momentos deste trabalho, especialmente nos mais difíceis.

Dedico este trabalho à uma garota muito especial,
minha esposa Cláudia (Flô)

julho de 1991

ÍNDICE

	página
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO HISTÓRICA	
2.1. SIMULÍDEOS	04
2.2. MICROSPORÍDEOS	11
2.3. EPIZOOTIOLOGIA	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES	24
3.2. ESTUDOS DE CAMPO	
3.2.1. OCORRÊNCIA NATURAL DE <i>Polidispyrenia simulii</i>	
DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES HOSPEDEIRAS	25
3.3. ESTUDOS DE LABORATÓRIO	
3.3.1. SINTOMATOLOGIA EXTERNA E MORFOMETRIA	27
3.3.2. HISTOPATOLOGIA	
3.3.2.1. MICROSCOPIA ELETRÔNICA	28
3.3.2.2. MICROSCOPIA ÓPTICA	29
3.3.3. ESTUDOS DO CICLO DE VIDA DE <i>Polidispyrenia</i>	
<i>simulii</i>	29

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1. ESTUDOS DE CAMPO	
4.1.1. CARACTERIZAÇÃO DO RIACHO	31
4.1.2. OCORRÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES HOSPEDEIRAS	34
4.1.3. OCORRÊNCIA DE <i>Polidispyrenia simulii</i>	36
4.2. SINTOMATOLOGIA EXTERNA	45
4.3. HISTOPATOLOGIA	51
4.3.1. TECIDO ADIPOSEO	51
4.3.2. EPITÉLIO INTESTINAL	54
4.3.3. VASO SANGUÍNEO DORSAL	55
4.3.4. OUTROS TECIDOS	56
4.4. BIONOMIA DE <i>Polidispyrenia simulii</i>	58
5. CONCLUSÕES	67
6. RESUMO	70
7. SUMMARY	72
8. LITERATURA CITADA	74

1. INTRODUÇÃO

Insetos podem ser daninhos como pragas agrícolas, vetores de doenças ou até por incomodarem o homem e suas criações. Assim, podem se constituir no maior problema em termos de produção agrícola, de saúde e bem-estar da população humana e animal, tanto em países desenvolvidos como subdesenvolvidos.

A necessidade de se reduzir os danos causados por esses insetos e se possível até eliminá-los, tem sempre atraído a atenção de pesquisadores, técnicos, administradores e órgãos públicos, além de agências e instituições nacionais e internacionais.

No mundo moderno, os primeiros esforços para se controlar insetos ou artrópodos prejudiciais em geral, se basearam no desenvolvimento e aplicação de pesticidas químicos de largo espectro de ação (décadas de 30 e 40). Infelizmente essa prática causou e ainda tem provocado inúmeros efeitos indesejados tais como, poluição ambiental em quase todos os níveis tróficos, desenvolvimento de resistência dos insetos alvo aos inseticidas químicos e, em alguns casos até o aparecimento de novas pragas.

A partir da década de 60 os esforços foram direcionados, com uma visão mais racional, para o desenvolvimento de métodos mais aceitáveis em termos ambientais. Outros fatores passaram a ser mais considerados além da química dos inseticidas. A Biologia e Ecologia das espécies daninhas e as interações com outros insetos, a sociedade envolvida no problema e a relação custo-benefício, entre outros, constituíram-se em elementos muito importantes resultando no que hoje é conhecido como Manejo Integrado de Pragas (MIP). Esta abordagem pre-

vê a utilização racional de metodologias de controle químico, físico e biológico além de abordagens educacionais e administrativas para reduzir o nível de dano causado pelo inseto prejudicial à patamares aceitáveis para cada caso e para cada região.

Dentre os métodos biológicos está a busca e utilização de agentes bióticos de supressão de populações de insetos considerados daninhos. Esses agentes supressores são seus inimigos naturais; predadores, parasitos e patógenos.

Infecções em insetos são importantes fatores redutores do número de indivíduos nas comunidades. Ocorrem dependentes de densidade e se expressam especialmente sob condições de estresse. Os entomopatógenos são importantes aliados do homem no seu esforço em trocar, ou ao menos reduzir, o uso dos produtos químicos empregados normalmente para o controle de insetos daninhos. Produtos biológicos são em geral mais seletivos e mais seguros em termos ambientais.

A importância das doenças como fatores reguladores de densidades populacionais tem sido demonstrada em estudos patológicos e ecológicos, especialmente de dinâmica populacional.

O conhecimento do ciclo de vida dos patógenos, seu modo de ação, sua influência no desenvolvimento, viabilidade e fertilidade dos hospedeiros, tanto quanto sua ocorrência natural e modo de transmissão entre outros fatores, são indispensáveis para a avaliação do potencial desses entomopatógenos como possíveis agentes no controle de espécies prejudiciais.

Os inseticidas biológicos à base de variedades da bactéria *Bacillus thuringiensis* tiveram como partida estudos básicos como os citados acima. Após vários anos de estudo e pesquisa, esses inseticidas são uma realidade em termos de controle de insetos daninhos,

tanto na agricultura como na saúde pública. Toneladas destas bactérias são fabricadas e usadas anualmente contra insetos.

Vale salientar que não se deve abandonar o estudo de um entomopatógeno por razões como sua pequena viabilidade econômica pois, o que hoje é de difícil realização pode tornar-se mais fácil nos dias de amanhã. O controle de simulídeos conta atualmente com muito poucas opções, voltadas quase exclusivamente para larvicidas. Devido à diversidade da fauna nos ambientes lóticos aonde ocorrem, e ainda problemas operacionais, tem-se hoje apenas dois ou três princípios químicos.

Seguindo-se estas idéias, o presente trabalho pretende avaliar a relação patógeno-hospedeiro de algumas espécies de simulídeos à *Polidispyrenia simulii* (Lutz & Splendore, 1904) Canning & Hazard, 1982, um protozoário microsporídeo de grande ocorrência natural na América do Sul.

Entre as espécies avaliadas, *Simulium pertinax* Kollar, 1832 é o borrachudo mais antropofílico, ocorrendo em todo o território brasileiro. As outras espécies são zoofílicas mas em determinadas condições podem apresentar certa antropofilia.

Serão analisados aspectos ecológicos e patológicos quanto à ocorrência natural de *P. simulii*, seu ciclo de vida, modo de transmissão e influência no desenvolvimento das espécies hospedeiras.

Com esses estudos, o presente trabalho pretende acrescentar informações sobre patologia em simulídeos, uma área ainda pouco explorada para esses insetos, e ainda, avaliar o potencial desse patógeno como agente no controle natural de borrachudos.

2. REVISÃO HISTÓRICA

2.1. SIMULÍDEOS

Os borrachudos ou piúns, como são conhecidos respectivamente no sul e norte do país, são dípteros pequenos, geralmente de cor escura e aspecto corcunda pertencentes à família Simuliidae. Ocorrem em qualquer região do mundo desde que exista água corrente suficiente para atender a criação das fases imaturas. O hábito hematófago da grande maioria desses nematóceros pode colocá-los na categoria de insetos daninhos em muitas áreas do mundo, inclusive no Brasil. De cerca de 1200 espécies de simulídeos descritas no mundo todo, aproximadamente 43 espécies se destacam por causar danos ao homem e a seus animais de criação (Crosskey, 1981). Esses danos podem ser agrupados em dois blocos; as espécies vetoras de doenças e as espécies incômodas devido à perturbação e irritação que suas picadas causam.

Enquadram-se na primeira categoria espécies como *Simulium metallicum* s.l., *S. exiguum* Roubaud e *S. amazonicum* Goeldi na América Latina ou como *S. damnosum* s.l. na África Ocidental. Todas são vetoras da Oncocercose, doença causada pela filária *Onchocerca volvulus* Leuckart, que forma nódulos na pele do homem podendo, em casos extremos, levar à cegueira total, quando as filárias se instalam na parte anterior do olho, entre a córnea e a conjuntiva. Devido a esse fato a doença é também conhecida como "Cegueira-dos-rios". Acredita-se que cerca de 20 milhões de pessoas na África, América Central e América do Sul sofram de Cegueira-dos-rios. Só no oeste africano, ao lon-

go da bacia do rio Volta, estima-se que 1 milhão de pessoas estejam infectadas (Youdeowei & Service, 1983). No início da década de 70, nas regiões de plantação de café na Guatemala havia áreas onde toda a população humana estava infectada e 1% já se encontrava cega (Ogata, 1981).

No Brasil acreditava-se que a Oncocercose estivesse restrita ao extremo norte da Amazônia brasileira, ocorrendo entre os índios Yanomami já a algumas décadas. Entretanto, em 1986 a ocorrência de um caso autóctone no município de Minaçu, no extremo norte do Estado de Goiás, deixou claro que o risco da disseminação da doença para outras regiões existe e é grande. Isto deve-se à migração, especialmente de garimpeiros, das regiões normalmente infestadas para outras partes do país (Shelley, 1988). Outro importante fator na disseminação da Oncocercose é o desenvolvimento do projeto Calha Norte na Amazônia (SUCAM, 1987; Shelley, 1988). O risco aumenta se analisarmos a situação no outro extremo do país, em Missões no Estado do Rio Grande do Sul, onde ocorre a espécie *S. paraguayense* Schrottky tida também como possível vetora da Oncocercose (Coscarón, 1986).

Além da Oncocercose, os borrachudos também são vetores de doenças como a Mansonelose, a Síndrome Hemorrágica de Altamira, e de diversas arboviroses (Kettle, 1985).

Quanto aos animais de criação, estes também sofrem doenças transmitidas pelos borrachudos. A filária *Oncocerca gutturosa* Newmann no gado, o protozoário *Leucocytozoon* Danilewsky em aves de criação e mesmo a Encefalite Equina são alguns exemplos de doenças onde os borrachudos também atuam como vetores (Pessoa & Martins, 1982 e Kettle, 1985).

As espécies de borrachudos que se enquadram na segunda categoria, embora não sejam vetoras, não são menos importantes. A irritação e perturbação provocadas por suas picadas quando em elevadas densidades populacionais causam sérios danos não apenas ao homem mas também aos animais de criação.

Em 1897, ao longo da bacia do rio Mississipi (EUA), os ataques por *Cnephia pecuarum* Riley causaram a morte de centenas de aves em granjas (Bradley, 1935). Fato idêntico ocorreu na Iugoslávia e na Romênia na década de 30 devido ao intenso ataque de *S. columbaschense* Fabricius (Kettle, 1985). Ainda nos Estados Unidos, *C. pecuarum* também foi o responsável pela morte de centenas de mulas em 1931 (Bradley, 1935).

Hunter (1978) relatou que em 1974 o ataque de *Austrosimulium pestilens* Mackerras & Mackerras reduziu em 15% a produção de leite em regiões de Queensland devido à perturbação que causou ao gado leiteiro. Um dos efeitos mais drásticos em termos de danos na indústria de laticínios foi na década de 50, na URSS, onde houve uma queda de 45% da indústria do leite devido ao ataque de *Gnus cholodkovskii*. Além disso os danos quanto à produção de ovos e de carne também foram significativos (Dubitskii, 1981).

Em 1962, o ataque de *S. articum* Malloch, *S. venustum* Say e *S. vittatum* Zetterstedt em áreas ao longo do rio Athabasca, no Canadá, reduziu a produtividade geral da região a níveis extremos, não só pelo seu efeito nos animais de criação mas também no homem. No início da década de 70, ainda no Canadá, ataques maciços dessas mesmas espécies causaram danos na pecuária das regiões norte e noroeste daquele país superiores à US\$ 600.000,00 (Charnetski & Haufe, 1981).

Ambientes perturbados pelo homem podem criar condições mais propícias para o desenvolvimento das formas imaturas dos borrachudos. Nesses casos, os níveis populacionais chegam a ser absurdos. Na década de 50, na URSS, devido à construção de hidroelétricas ao longo do rio Angara, o nível chegou a ponto de serem coletados 1046 borrachudos por minuto por pessoa. Nesses casos a produtividade global da região foi reduzida em 20 a 30% (Dubitskii, 1981).

Os casos de espécies nocivas ao homem pela intensidade de seu ataque são muitos. Por exemplo, *Prosimulium mixtum* Syne & Davies e *S. venustum* no noroeste dos EUA e leste do Canadá; *S. decimatum* Dorogastajskij, Rubtzov & Vlasenko na região dos Montes Urais (URSS); *S. erythrocephala* DeGeer e *S. ornatum* Meigen no nordeste da Eurásia; e *S. orbitale* Lutz, *S. nogueirai* D'Andretta & González e *S. pertinax*, entre outros, no Brasil (Crosskey, 1981 e Coscarón, 1989). Fica bastante evidente a necessidade de controle desses dípteros.

O hábito hematofágico, exclusivo das fêmeas, está relacionado ao desenvolvimento e maturação dos ovários. De acordo com Wenk (1981), após o acasalamento as fêmeas anautógenas fazem vários deslocamentos entre os sítios de alimentação, onde estão os hospedeiros vertebrados e de oviposição, os riachos. Cada repasto sanguíneo está associado a um ciclo oogenético. Esses deslocamentos podem às vezes chegar a alguns quilômetros, como o observado em *S. nogueirai* em áreas do Estado de Santa Catarina (Moreira & Sato, 1988).

A ocorrência de várias populações de simulídeos, compondo comunidades ao longo dos riachos é possível graças à particularidades da biologia e ecologia de cada espécie. Assim, os sítios de oviposição variam de espécie para espécie, mas nota-se no entanto que

as preferências são próximas para espécies dentro do mesmo subgênero. *S. pertinax* e *S. subpallidum* Lutz, 1910 (ambos pertencentes ao subgênero *Chirostilbia*) caracterizam-se por ocorrerem em geral em águas limpas e em riachos de tamanho médio e encachoeirados. Suas larvas e pupas fixam-se preferencialmente às pedras e galhos submersos (Pegoraro & Moreira, 1986 e Coscarón, 1989). Ocorrendo nesses mesmos riachos típicos para *S. pertinax* e *S. subpallidum*, tem-se também *S. (Grenieriella) pruinosum* Lutz, 1910, uma espécie que ocorre nos trechos com cachoeiras. Nesses casos a sua predominância nos substratos é elevada.

A hematofilia de *S. pruinosum* é tida como sendo preferencialmente por equinos, mas tal qual *S. (Hemicnetha) rubrithorax* Lutz, é bem sucedido também no ataque ao homem (Lutz, 1910).

Outra questão associada a *S. pruinosum* é seu possível papel na transmissão do Fogo Selvagem, doença também conhecida como Pênfigo Foliáceo Brasileiro. O Fogo Selvagem, que predomina na região Centro-Oeste do país, é uma doença caracterizada pela erupção de bolhas, descamação da pele e inflamações primárias e secundárias. Acredita-se que até 1989 cerca de 15 mil brasileiros foram acometidos por essa doença (Patrus, 1989). Uma vez que sua predominância é na zona rural (80% dos casos), sugere-se a existência de um vetor alado. Pesquisadores da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais têm sugerido ser *S. pruinosum* o responsável pela transmissão do Fogo Selvagem ao menos na região de Belo Horizonte/MG (Patrus, 1989).

Felizmente *S. subpallidum* e *S. pertinax*, que são espécies muito comuns, não têm sido associadas à transmissão de doença alguma. *S. subpallidum* é tido por apresentar afinidade por sangue de

equinos enquanto *S. pertinax* é a espécie mais antropofílica ocorrendo ambas nas regiões Sul e Sudeste do país.

Os danos causados por *S. pertinax* enquadram-se na segunda categoria já descrita. No Sul do país há relatos da dimensão dos danos. Agricultores do interior gaúcho chegam a ser hospitalizados devido à reação alérgica e infecções secundárias desencadeadas pelo elevado número de picadas (Souza, 1984 e Strieder & Corseull, 1988). Lozovei (1988), Lozovei *et al.* (1989) e Guimarães (1988) relatam danos semelhantes no Paraná, não apenas ao homem mas também aos animais de criação.

No interior e litoral norte do Estado de São Paulo, *S. pertinax* causa problemas não apenas quanto à irritação e perturbação das suas picadas, influenciando na produtividade e no dia-a-dia das comunidades envolvidas, como também reduzindo uma das principais atividades econômicas de algumas regiões, o turismo (Maia-Herzog & Felipe-Bauer, 1986; Araujo-Coutinho *et al.*, 1988; Andrade, 1989 e Andrade & Castello Branco Jr., 1991b). Nas áreas litorâneas, onde o controle químico é uma realidade há mais de trinta anos, existe hoje a premência em se adotar o controle biológico. A espécie alvo, *S. pertinax*, mostra hoje alta resistência ao ingrediente ativo mais usado, o temephos (Andrade & Castello Branco Jr., 1990), sendo que os produtos à base da bactéria *B. thuringiensis israelensis* têm se mostrado a melhor opção para o controle destes dípteros nestas áreas (Andrade & Castello Branco Jr., 1988 e Andrade & Castello Branco Jr., 1991a).

As três espécies comentadas por último, *S. pertinax*, *S. subpallidum* e *S. pruinosum*, ocorrem ao longo do riacho onde foi desenvolvido o presente estudo. Mais uma entre várias regiões onde nunca se efetivou controle algum desses dípteros, embora a população ribeirinha sofra os efeitos das densidades populacionais extremamente elevadas em certas épocas do ano.

2.2. MICROSPORÍDEOS

Os microsporídeos são parasitas unicelulares obrigatórios. Compõe um filo hoje conhecido como Microspora Sprague, 1977, formado por duas classes, Rudimicrosporea Sprague, 1977 e Microsporea Delphy, 1936. Os patógenos de borrachudos são representantes de uma das duas ordens desta última classe, a ordem Microsporida Balbiani, 1882 (Levine et al., 1980).

É importante salientar que esta classificação (Levine et al., 1980) é a aceita pela grande maioria dos pesquisadores na atualidade, embora não seja talvez, a definitiva ainda.

Segundo especialistas, podemos considerar a Microsporidiologia como uma disciplina científica suficientemente distinta dentro da Protozoologia e da Parasitologia (Bulla Jr. & Cheng, 1976).

Os estudos sobre microsporídeos iniciaram-se há mais de um século atrás, quando o interesse pela Febrina no bicho-da-seda era grande. Naquela época, *Nosema bombycis* Naegeli era a única espécie de microsporídeo entomopatogênica descrita.

Um dos grandes impulsos que os estudos de microsporídeos tiveram foi após a 2ª Guerra Mundial, quando o rápido desenvolvimento de resistência de diversos insetos daninhos aos inseticidas químicos empregados, evidenciou como uma das alternativas mais palpáveis o Controle Biológico. Os estudos que até então tinham um cunho muito mais descritivo das espécies encontradas, passaram a ter outras abordagens mais pragmáticas (Sprague & Vavra, 1976).

Numa época posterior (década de 60), vários pesquisadores redescobriram *Encephalitozoon cuniculi* Levaditi, Nicolau & Shoen em roedores e outros animais inclusive no homem, sendo que um novo impulso foi dado aos estudos de microsporídeos, agora com enfoque médico e veterinário (Nelson, 1962; Weiser, 1964; Shadduck & Pakes, 1971 e Canning *et al.*, 1986).

Hoje são mais de 500 espécies de microsporídeos descritas, sendo insetos e crustáceos seus hospedeiros mais comuns (Cheng, 1986; Weiser, 1976b e Maddox, 1987). Embora seja um grupo com um número pequeno de espécies, se comparado a outros grupos como por exemplo os insetos, um problema quase que constante entre os microsporidiologistas é o da classificação. Desde a primeira tentativa de classificação em 1882 por Balbiani até as atuais, os microsporídeos sofreram pelo menos 16 grandes revisões em sua sistemática. De sua primeira posição como uma das ordens da extinta classe Sporozoa até o atual status de filo foi um longo percurso. Logo após Balbiani (1882) ter colocado os microsporídeos dentro do grupo dos protozoários, alguns gêneros já foram delineados. Assim, Thélohan (1892) estabeleceu para a primeira classificação uma família com três gêneros: *Glugea*, *Pleistophora* e *Thelohania*. Infelizmente, Thélohan associou essa família aos "mixosporidies" e não aos "microsporidies" de Balbiani, o que seria mais correto. Deve-se entretanto salientar que aquele autor se baseou na presença de um cisto (atualmente conhecido como vesícula do esporóforo - Canning & Hazard, 1982) como estrutura de valor taxonômico. Este caracter é de grande valor e auxiliou em muito as demais classificações dos microsporídeos.

Gurley, em 1893, introduziu o termo pansporoblasto para designar o plasmódio esporogonial usado por Thélohan, e ainda manteve a associação dos microsporídeos aos mixosporídeos.

Labbé (1899 *apud* Sprague, 1976), sintetizou as contribuições positivas de seus antecessores além de promover melhorias próprias. A ordem passou a chamar-se Microsporidiida, agora não mais associada aos mixosporídeos, mas ainda com uma só família (Nosematidae) e três gêneros; *Nosema*, *Pleistophora* (inicialmente grafado *Plistophora*) e *Thelohanía*. No total já eram descritas 53 espécies sendo que 20 ainda não tinham nome.

Do final do século XIX ao início do século XX, 7 novas classificações foram definidas após a de Labbé (1899 *apud* Sprague, 1976). São elas a de Doflein (1899), de Minchin (1903 e 1922), Perez (1905 e 1908), Stempell (1909) e Auerbach (1910) (*apud* Sprague, 1976). Entre estas, a primeira contribuição de Perez (1905) e a de Stempell (1909), deixaram, segundo Sprague (1976), contribuições mais significativas. A primeira ao separar os gêneros *Glugea* e *Nosema* e definir este último em termos aceitos até hoje. A segunda, ao introduzir o uso de estágios vegetativos como caracteres taxonômicos. A forma e o desenvolvimento de estágios vegetativos foram usados como características a nível de família, o modo de formação do esporo como caracter de gênero e a forma do esporo como caráter das espécies. Assim a ordem Microsporidia passou a ser formada por três famílias; Nosematidae, Plistophoridae e Glugeidae.

Alguns anos após, Kudo (1924) numa tentativa de reunir o maior número possível de dados existentes sobre microsporídeos, redigiu sua célebre monografia. Adotou uma classificação anterior (Léger & Hesse, 1922) com algumas pequenas alterações. Nesse trabalho foram

definidas 4 famílias, 14 gêneros e cerca de 170 espécies descritas.

A história da classificação dos microsporídeos de 1924 até meados da década de 70 foi principalmente uma série de modificações da classificação de Kudo.

Na realidade, já no início dos anos 70, Tuzet e colaboradores (1971) propuseram uma nova classificação que rompia com todas as anteriores utilizando como critério taxonômico a membrana pansporoblástica (atual membrana do esporóforo - Canning & Hazard, 1982). Nessa classificação, Microsporidea era uma classe formada por apenas uma ordem (Microsporida) dividida em duas subordens (Apansporoblastina e Pansporoblastina).

Sprague (1976) propôs uma nova classificação elevando pela primeira vez os microsporídeos à categoria de filo. Na realidade a idéia de que Protozoa seria um conglomerado de filos independentes já era antiga. Em 1969, Sprague já havia proposto a determinação Microspora em um nível sistemático mais elevado, como subfilo.

Em 1980, Levine e colaboradores propuseram a classificação aceita até hoje, onde Protozoa foi dividido em sete filos: Sarcomastigophora, Labyrintomorpha, Apicomplexa, Ascetospora, Myxozoa, Ciliophora e Microspora.

Bulla Jr. & Cheng (1976) sugerem que os microsporídeos são o grupo de parasitas de animais de maior importância quanto ao seu efeito total nos hospedeiros. Isto devido à sua ocorrência comum, sua grande distribuição zoológica, atacando desde outros protozoários até o homem, e graças aos efeitos letais conhecidos em seus hospedeiros.

Têm sido descritos microsporídeos em várias espécies de borrachudos em diversas partes do mundo (Jenkins, 1964 e Roberts & Strand, 1977). Laird e colaboradores (1980) listaram quinze espécies

ocorrendo em dezesseis espécies de simulídeos no hemisfério Norte.

No hemisfério Sul, mais precisamente na América do Sul, Garcia (1989) e Garcia e colaboradores (1989) descreveram microsporídeos em várias espécies de simulídeos argentinos. No Brasil, os primeiros relatos devem ser creditados à Lutz & Splendore (1904 e 1908) que descreveram no início do século microsporídeos em borrachudos da região Sudeste. Estudos realizados pelo presente autor relataram a ocorrência de microsporídeos em várias espécies de simulídeos no Estado de São Paulo (Castello Branco Jr. *et al.*, 1987; Castello Branco Jr. & Andrade, 1988 e Cordeiro & Castello Branco Jr., 1988).

Os microsporídeos ocorrem geralmente nas formas imaturas dos borrachudos (Frost, 1970; Gassouma, 1972; Weiser & Undeen, 1981; Weiser & Prasertphon, 1982; Castello Branco Jr. *et al.*, 1987; Castello Branco Jr. & Andrade, 1988; Cordeiro & Castello Branco Jr., 1988; Garcia 1989 e Garcia *et al.*, 1989) e, com menor frequência em adultos (Undeen, 1981 e Undeen *et al.*, 1984).

Larvas de borrachudos com infecções avançadas de microsporídeos são mais facilmente detectadas devido às formações císticas esbranquiçadas visíveis no abdome das larvas, graças à transparência do tegumento (Strickland, 1911 e 1913).

Em populações de simulídeos, as infecções por microsporídeos ocorrem geralmente em níveis abaixo de 1%, entretanto não são raros os casos onde a prevalência chega a 30% ou 50% (Gassouma, 1972; Weiser & Undeen, 1981 e Maddox, 1987).

Os estudos de microsporídeos em simulídeos têm apresentado uma abordagem ampla. São tratados em geral, a sistemática desses patógenos, técnicas de preparo para microscopia e sua prevalência. Ainda alguns poucos trabalhos versam sobre a influência desses patóge-

nos em diversos aspectos da biologia de seus hospedeiros (Lutz & Splendore, 1904 e 1908; Strickland, 1913; Liu, 1972; Gassouma, 1972; Ezenwa, 1974; Maurand, 1975 ; Weiser & Prasertphon, 1982 ; Undeen *et al.*, 1984 e Garcia *et al.*, 1989).

Entre os microsporídeos de maior distribuição geográfica em simulídeos temos: *Thelophania bracteata* Strickland, *T. fibrata* Strickland, *Pleistophora multispora*, *P. debaisieux* e *Polidispyrenia simulii*. Estas espécies ocorrem tanto em baixas como em altas latitudes e em regiões desde o nível do mar até as grandes altitudes (Weiser & Undeen, 1981).

Polidispyrenia simulii (= *Pleistophora simulii*) é tida como uma das espécies mais comuns ocorrendo em larvas de borrachudos na América do sul (J.J. Garcia - com. pess., 1990). Pode-se considerar que Lutz & Splendore (1908) foram os primeiros a relatar essa espécie ocorrendo em simulídeos no Brasil, tendo as larvas de *S. pertinax* e *S. venustum* como seus hospedeiros. A ocorrência dessa mesma espécie já foi relatada, pelo presente autor, em uma espécie de borrachudo equinofílica, *S. rubrithorax* (Castello Branco Jr. *et al.*, 1987). No presente trabalho, *P. simulii* é tratada desta vez infectando três espécies de borrachudos; *S. pertinax*, *S. pruinatum* e *S. subpallidum*.

2.3. EPIZOOTIOLOGIA

Epizootiologia é a ciência que estuda as causas e formas de doenças em todos os níveis de intensidade em uma população hospedeira (Sinnecker, 1976). A Epizootiologia das doenças de insetos ou "Epizootiologia de Insetos" é uma ciência relativamente nova, sendo considerada um capítulo dentro da Patologia de Insetos (Fuxa & Tanada, 1987). Foi Steinhaus (1949) quem apresentou os princípios dessa nova ciência. Seguiu-se então, uma série de tratados versando sobre aspectos teóricos e práticos dessa ciência (Steinhaus, 1954 e 1957; Weiser, 1963; Tanada, 1959 e 1976; Heimpel, 1969; McLaughlin, 1971; Hazard et al., 1981; Henry & Oma, 1981; Maddox et al., 1981; Wilson, 1983; Maddox, 1987).

Do ponto de vista da dinâmica de uma doença é importante diferenciar-se epizootias de enzootias. Barr (1979) sugere que sejam usados os mesmos critérios médicos de epidemia para o termo epizootia, ou seja, um incomum aumento do número de casos de uma doença em uma população hospedeira. A ecologia quantitativa permite definir o que vem a ser um "incomum aumento". Para tal, é necessário haver um estudo da história da doença em questão, ou seja, sua prevalência e incidência ao longo do tempo.

Segundo Fuxa e Tanada (1987), o significado de epizootia deveria ser considerado do ponto de vista biológico contrastando-se o estado epizootico com o enzoótico de uma doença em uma população. Doenças enzoóticas são aquelas onde geralmente há uma constante e baixa prevalência numa população. Na realidade o fator diferenciador é o tempo. Epizootias são esporádicas e limitadas em sua duração sendo ca-

racterizadas por um aumento repentino na prevalência e incidência, enquanto enzootias podem ter longa duração.

Anderson & May (1979) sugerem ainda que doenças enzooticas estariam em um estado de clímax com a população hospedeira. O agente etiológico e o hospedeiro coexistem, implicando na manutenção da doenças por longos períodos.

Pesquisas em Epizootiologia e Patologia de Insetos constituem a base para o controle microbiano, incorporadas hoje pela filosofia do Manejo Integrado de Pragas.

Os fatores que influenciam o estudo das doenças de insetos podem ser abordados sob 3 aspectos; quanto ao patógeno, ao hospedeiro e por último quanto ao ambiente. O conhecimento da importância de cada um destes aspectos leva a compreensão da dinâmica de uma doença. Essa dinâmica é frequentemente explicada, em parte, por modelos matemáticos (Fine & Sylvester, 1977; Andreadis & Hall, 1979b; Fine, 1975; Anderson & May, 1981; Brown, 1987 e Onstad & Maddox, 1989).

As propriedades mais significativas quanto ao patógeno, em termos epizootiológicos, são: sua patogenicidade e virulência, sua capacidade de sobrevivência ou de persistência e sua capacidade de dispersão.

Aparentemente não existem registros quanto à diferença de virulência entre diferentes linhagens (ou isolados) de microsporídeos (Tanada, 1976). Isto deve-se a falta de métodos para se avaliar as espécies desse grupo. O reverso disso existe hoje em dia para os estudos com bactérias entomopatogênicas, onde bioensaios, estudos serológicos, cromatográficos e de microscopia eletrônica têm sido amplamente utilizados (Habib & Andrade, 1986).

Steinhaus (1949) postulou 4 métodos para aumento da virulência de um patógeno: passagem seriada por diferentes hospedeiros, dissociação em cultura, administração de substância que podem ajudar a aumentar o poder invasivo do patógeno e associação com outros microrganismos a fim de tornar possível a invasão de tecidos do hospedeiro. Há poucos estudos relatando qualquer um desses métodos em microsporídeos. Hazard & Lofgren (1971) relataram um aumento da virulência de *Nosema algerae* Vavra & Undeen após passagem por 20 gerações do pernilongo *Anopheles quadrimaculatus* (Dip.; Culicidae). Tentou-se ainda a adequação de microsporídeos a hospedeiros alternativos. Smirnov (1968) adaptou com sucesso *Thelohania pristiphora* Smirnov, um microsporídeo parasita da vespa *Fristiphora erichsonii* (Hym.; Tenthredinidae), à lagartas de *Malacosoma disstria* e *M. americanum* (Lep.; Lasiocampidae). A virulência permaneceu a mesma após 6 passagens pelos hospedeiros alternativos. Sabe-se que entretanto, a passagem seriada não apenas em hospedeiros alternativos mas também em meios de cultura (no caso de patógenos facultativos) pode levar a perda da virulência (Hall, 1954; Weiser, 1969 e Habib & Andrade, 1986).

A virulência e patogenicidade de um microsporídeo dependem da "dose infectiva" (inóculo), do estágio e estágio de desenvolvimento do hospedeiro, assim como do órgão ou tecido atingido (Weiser, 1963). É óbvio que o estado nutricional e o nível de estresse também estão intimamente relacionados. Em geral há uma relação direta entre a dose e o efeito no hospedeiro; quanto maior a dose, mais agudo será o processo infeccioso. No entanto, doses muito elevadas de esporos de microsporídeos podem desencadear uma infecção generalizada por bactérias, levando o hospedeiro à morte por septicemia sem haver tempo para o desenrolar do processo de microsporidiose (Maddox, 1987).

A patogenicidade dos microsporídeos também está relacionada ao seu modo de invasão do hospedeiro. Microsporídeos instalados no intestino e na musculatura produzem infecções agudas enquanto aqueles que ficam confinados ao tecido adiposo causam, com maior frequência, infecções crônicas (Lipa, 1963 *apud* Tanada, 1976).

Quanto à persistência ou longevidade dos esporos, Kramer (1970) apontou que essa questão era desconhecida para 95% das espécies descritas. Os estudos que existem são em sua maioria de laboratório (Kramer, 1970 e Maddox, 1973). A realidade é que a longevidade dos esporos varia de espécie para espécie e de situação para situação; por exemplo, esporos de *Nosema algerae* tornam-se inviáveis e são mortos após 5 minutos de dessecação (Alger & Undeen, 1970), enquanto os esporos de *Nosema* sp. sobrevivem no solo por pelo menos 12 anos (Weiser, 1956 *apud* Tanada, 1976). Na realidade em alguns casos a persistência em ambientes bióticos (hospedeiro primário ou secundário) pode ser mais importante que a persistência no ambiente abiótico. É o caso de algumas espécies do gênero *Thelophania* que "hibernam" dentro de mosquitos univoltinos (Kellen *et al.*, 1965).

A relativa escassez de estudos sobre a persistência de esporos de microsporídeos no ambiente implica em pouco conhecimento também sobre sua dispersão. Sabe-se que o vento, a chuva, os rios e tantos outros fatores podem dispersar seus esporos, no entanto existem poucos trabalhos direcionados para esse aspecto (Tanada, 1976).

Uma vez que o hospedeiro infectado por microsporídeos torna-se mais susceptível ao ataque de inimigos naturais, seus predadores e parasitos também têm um papel significativo na dispersão dos esporos (Tanada, 1976; Weiser, 1977; Weiser & Undeen, 1981 e Maddox, 1987). Ainda, como muitas vezes as infecções são crônicas, os próprios

hospedeiros atuam como dispersantes. Um exemplo clássico são as larvas de *Choristoneura fumiferana* (Lep.: Tortricidae) infectadas com *N. fumiferanae* Thomson. Estas larvas liberam esporos não apenas em suas fezes mas também no material regurgitado (Wilson, 1981). Outro exemplo é o caso de himenópteros parasitos das lagartas desfolhadoras *Pieris brassicae*, *P. rapae* (Lep.: Pieridae), *Heliothis zea* e *H. virescens* (Lep.: Noctuidae) que também são susceptíveis aos microsporídeos que infectam seus hospedeiros, ajudando na dispersão (Tanada, 1955; Hostounsky, 1970 e Brooks & Cranford, 1972 *apud* Tanada, 1976).

Quanto à Epizootiologia de microsporídeos, um dos fatores de grande importância para a compreensão da dinâmica da doença é seu modo de transmissão. A revisão de Canning (1971) aborda a transmissão de microsporídeos em insetos e em vertebrados. A transmissão "per os" é tida como a principal rota para os insetos, podendo entre tanto as vias transovigênica e transovariana serem também importantes para alguns grupos. É o caso de insetos com larvas aquáticas, para os quais seus microsporídeos podem ser divididos em dois grupos; o primeiro típico por ter transmissão transovariana e o segundo pela transmissão "per os" além da transovigênica (Maddox, 1987).

As recentes descobertas da existência de hospedeiros intermediários no ciclo de microsporídeos de insetos aquáticos (Sweeney *et al.*, 1990 e Andreadis, 1989 e 1990) trouxeram alguma luz na compreensão dos até então confusos ciclos destes patógenos.

Apesar das tentativas de transmissão "per os" terem tido sucesso em poucas espécies de insetos aquáticos (Kellen *et al.*, 1966 *apud* Tanada, 1976; Chapman, 1974; Avery, 1989 e Avery & Undeen, 1990), tem sido demonstrado teórica e experimentalmente que sem a transmissão horizontal, as infecções por microsporídeos desapareceriam

em pouco tempo da população hospedeira, pois só a transmissão vertical não conseguiria sustentar a infecção (Andreadis & Hall, 1979b).

Deve-se salientar ainda a importância de predadores e especialmente parasitos na transmissão da doença. Paillot (1933 apud Tanada, 1976) foi o primeiro a sugerir que o parasito *Apanteles glomeratus* (Hym., Braconidae) transmitia *Perezia legeri* para as larvas de *Pieris brassicae*. Existem muitos outros exemplos, como *Thelohania ephestiae* sendo transmitida por *Bracon hebetor* (Hym., Braconidae) para larvas de *Anagasta kuhniella* (Lep., Pyralidae) (Payne, 1933); ou mesmo *Perezia mesnili* transmitida por *A. glomeratus* para as larvas de *P. rapae* (Lep., Pieridae) (Tanada, 1955 apud Tanada, 1976) e *Nosema* sp. sendo transmitida por *A. marginiventris* (Hym., Braconidae) para larvas de *Spodoptera mauritia* (Lep., Noctuidae) (Laigo & Tamashiro, 1967).

Ainda há os casos onde os adultos machos podem transmitir os microsporídeos para a progênie. É o exemplo de *Choristoneura fumiferana* transmitindo *N. fumiferanae* para seus descendentes (Thomson, 1958) ou de outro caso mais interessante ainda, onde os machos de *Plodia interpunctella* (Lep., Pyralidae) podem transmitir os esporos para as fêmeas e estas os transmitem transovigênicamente para a progênie (Kellen & Lindegren, 1971 apud Tanada, 1976).

É lógico que o sucesso na infecção e desenvolvimento de patogenias também depende do hospedeiro, não apenas de suas condições nutricionais mas também de sua fisiologia, como por exemplo seu pH intestinal, presença de enzimas e íons intestinais e suas respostas imunológicas (Tanada, 1976 e Habib & Andrade, 1986). O conjunto de todos estes fatores do hospedeiro pode definir sua susceptibilidade à diferentes patógenos.

Antigamente, acreditava-se que existia uma especificidade muito grande quanto aos hospedeiros de microsporídeos. Hoje são conhecidas espécies com grande espectro de hospedeiros, em diferentes famílias e ordens, além da existência de hospedeiros alternativos. Estes últimos apresentam significativo papel na manutenção da doença no campo (Weiser, 1963).

Maddox (1987) ressalta que do ponto de vista epizootológico os "protozoários" como um todo formam um grupo diverso e interessante de entomopatógenos, havendo no entanto muitos problemas que precisam ser solucionados. Um deles seria a própria identificação do patógeno.

São necessários ainda estudos não apenas quanto à simples ocorrência instantânea de microsporídeos em determinada espécie hospedeira, mas também estudos de prevalência por longos períodos. Ressalta-se aqui a importância do tempo como fator discriminador de epizootias e enzootias.

O impacto das microsporidioses de insetos, tanto nos indivíduos como nas populações, deve ser bem conhecido a fim de se compreender melhor sua dinâmica para formar subsídios para avaliar seu potencial como agentes no controle de insetos daninhos. Sabe-se hoje que patógenos com uma transmissão eficiente e virulência moderada podem ser agentes mais efetivos no controle biológico (Anderson, 1982 *apud* Maddox, 1987).

3. MATERIAL & MÉTODOS

3.1. IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

As espécies de simulídeos estudadas no presente trabalho, *Simulium (Chirostilbia) pertinax*, *S. (C.) subpallidum* e *S. (Grenieriella) pruinosum* foram identificadas pelo Prof. Dr. Sixto Coscarón do Museu da Faculdade de Ciências Naturais de La Plata, Argentina.

O microsporídeo encontrado nas larvas dos borrachudos, *Polidyspirenia simulii*, foi identificado inicialmente ao nível de gênero pelo presente autor com base nas chaves de Weiser (1977 e 1982) e Hazard e colaboradores (1981). Foi posteriormente identificado a nível específico pelo Prof. Dr. Juan Jose Garcia, do Centro de Estudos de Patologia de Insetos e Vetores (CEPAVE) da Universidade Nacional de La Plata, Argentina.

3.2. ESTUDOS DE CAMPO

3.2.1. OCORRÊNCIA NATURAL DE *Polidispyrenia simulii* E DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES HOSPEDEIRAS

O estudo da ocorrência natural de *P. simulii* em simulídeos foi realizado no período de maio de 1990 à abril de 1991 em um riacho pertencente à bacia do rio Jaguarí no município de Morungaba, Estado de São Paulo, 60 Km à leste do município de Campinas/SP.

O riacho percorre cerca de três km ao longo das encostas da Serra das Cabras, atravessando algumas propriedades rurais onde são desenvolvidas atividades agrícolas, além de criações animais como gado, cavalos, porcos e aves.

A caracterização do riacho foi feita avaliando-se parâmetros como temperatura, pH, velocidade da água, tipo de fundo e vazão em diferentes trechos do riacho. A vazão foi calculada pela fórmula de Leitritz (1959), e todas as medidas foram tomadas periodicamente. Além dessa caracterização do riacho, também foi caracterizada a região quanto à altitude e ao regime de ventos. A direção e intensidade dos ventos ao longo do riacho foram avaliados com o auxílio de um anemômetro manual Schalen, enquanto a altitude foi avaliada com um altímetro Modelo 7000 - YCM.

A ocorrência de *P. simulii* foi avaliada por meio de amostragens mensais em 15 pontos ao longo do riacho. Esses pontos foram demarcados após triagem em toda a extensão do riacho à procura dos criadouros de simulídeos. Em cada um destes pontos, as larvas eram ob-

servadas e uma significativa quantidade (ca. 100 indivíduos) era coletada de seu substrato natural e fixadas imediatamente em álcool 70% para posterior triagem em laboratório.

As larvas eram inicialmente separadas por espécies sob lupa estereoscópica, pela análise do padrão de manchas na cápsula cefálica (Coscarón, S. - com. pess., 1986) e em seguida categorizadas em 3 classes: larvas pequenas, médias e grandes. Essas categorias foram definidas, usando-se como critério a presença e desenvolvimento do histoblasto respiratório. Desse modo, larvas pequenas não apresentam histoblasto respiratório, larvas médias possuem histoblasto respiratório aparente mas não desenvolvido e larvas grandes, histoblasto respiratório bem desenvolvido. Para cada classe foram separadas as larvas com sintomas de microsporidiose segundo as indicações de Weiser (1977 e 1982) e Vavra & Maddox (1976) para avaliação da ocorrência e posterior morfometria. Larvas com sintomas pouco evidentes eram dissecadas e a partir de esfregaços e observação ao microscópio óptico, era feita a confirmação da infecção.

Avaliações periódicas quanto ao nível de infestação das espécies antropofílicas foram feitas com o auxílio de isca humana, sendo os resultados expressos em número de borrachudos por hora por homem. Além disso, informações complementares sobre a infestação por adultos também foram obtidas por meio de entrevistas junto a população ribeirinha do local.

3.3. ESTUDOS DE LABORATÓRIO

3.3.1. SINTOMATOLOGIA EXTERNA E MORFOMETRIA

O estudo da sintomatologia externa foi feito em parte no campo pela comparação entre o comportamento de larvas sadias e infectadas no criadouro natural. No laboratório foi comparado seu comportamento e feita a morfometria de larvas sadias e infectadas.

As observações em laboratório foram feitas em um sistema de criação para borrachudos adaptado do utilizado por Raybould & Grunewald (1975 *apud* Edman & Simmons, 1985). O sistema consistia em um conjunto de calhas de madeira de 10 cm de largura, 1 m de comprimento e bordas de 4 cm de altura, alimentado por um sistema semi-fechado de água. Este consistia de dois reservatórios, um superior com capacidade máxima de 250 l e um inferior de 130 l, sendo que o volume total de água circulante no sistema era de aproximadamente 260 l. O retorno da água para o reservatório superior era garantido por uma bomba elétrica centrífuga. Utilizou-se água de torneira para o abastecimento do sistema, sendo renovada parcialmente (ca. de 5%) a cada 24 hs. Um conjunto de torneiras garantia a alimentação d'água para as rampas com uma vazão constante e conhecida (6 l/min).

As calhas de madeira foram colonizadas separadamente com larvas sadias e doentes de *S. pertinax* e *S. subpallidum* e, após estes atingirem o estágio de pupa, as calhas eram teladas com tecido de organza de malha fina, a fim de capturar-se os adultos que emergissem.

O estudo morfométrico baseou-se na medição do comprimento do corpo de larvas sadias e infectadas das 3 classes etárias (pequenas, médias e grandes) para as espécies hospedeiras. Com o auxílio de ocular de micrometria foi medido o comprimento da base da cápsula cefálica até a extremidade posterior do corpo das larvas.

Também foram comparados o desenvolvimento dos histoblastos respiratórios, das asas, dos balancins e das pernas de larvas sadias e infectadas.

3.3.2. HISTOPATOLOGIA

3.3.2.1. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Larvas e fêmeas adultas de *S. perfinax* foram dissecadas em glutaraldeído a 3% (V/V) em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2) já adicionado cloreto de cálcio 0,1 M e sacarose 0,1 M.

A fixação com glutaraldeído foi por 3 horas sob temperatura ambiente.

O material foi pós-fixado por 1 hora em tetróxido de ósmio 4% e depois em ácido tânico 2% por mais 1 hora.

A desidratação foi feita em gradiente de etanol e acetona e o material embebido em resina epon-araldite (Mollenhauer, 1964).

Os cortes ultra-finos foram tratados com acetato de uranila e citrato de chumbo (Reynolds, 1963) por 20 min. e 2 min. respectivamente, e observados em microscópio eletrônico Zeiss modelo MT-2.

3.3.2.2. MICROSCOPIA ÓPTICA

O material em estudo foi seccionado (cortes semi-finos de $0,5 \mu\text{m}$ de espessura) e processado conforme o exposto anteriormente (3.3.2.1.). Os cortes foram corados com azul de toluidina a 1% por 30 a 60 s. e observados ao microscópio óptico.

3.3.3. ESTUDOS DO CICLO DE VIDA DE *Polidispyrenia simulii*

Foram utilizadas para estes estudos larvas infectadas de *S. pertinax* e *S. subpallidum*.

Os esfregaços de larvas foram processados seguindo-se várias metodologias.

Para a visualização geral utilizou-se coloração com Giemsa em tampão fosfato pH 7,0 (2:1) por 10 a 20 min. (Weiser, 1977; Vavra & Maddox, 1976). Para evidencição de muco procedeu-se à contrastação com nanquim (Weiser, 1977). A hidrólise ácida por 10 a 30 s seguida pela coloração de Giemsa por 10 min foi usada para a coloração específica do núcleo (Weiser, 1976a).

A extrusão do filamento polar foi conseguida por meio de hidrólise ácida à quente (Weiser, 1976a), e seu comprimento medido com o auxílio de ocular de micrometria.

Além destas metodologias também foram obtidos dados da análise ao microscópio óptico e eletrônico do material processado conforme já descrito (3.3.2).

Utilizando-se o sistema para criação de borrachudos, descrito anteriormente (3.3.1.), também abordou-se a possível transmissão vertical de *P. simulii*. Os adultos obtidos neste sistema eram então dissecados e observados ao microscópio óptico além de serem feitos esfregaços.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ESTUDOS DE CAMPO

4.1.1. CARACTERIZAÇÃO DO RIACHO

O riacho estudado corria sobre um leito pedregoso em quase toda sua extensão, apresentando diversos trechos encachoeirados. O pH de suas águas não apresentou variação significativa ao longo do período de estudo, sendo seu valor médio igual a 5,7. No entanto, a temperatura teve grande variação ao longo do ano. Durante o outono e o inverno sua média foi próxima a 12 °C, enquanto que na primavera e no verão, a temperatura média de suas águas foi de 19,4 °C. As vazões médias do riacho no inverno (junho a agosto/90), na primavera (setembro a novembro/90), no verão (dezembro/90 a março/91) e no início do outono (abril/91) foram de 51 l/s, 125 l/s, 190 l/s e 170 l/s, respectivamente. As qualidades físicas e químicas deste curso d'água o caracterizam como ótimo criadouro para *S. perfinax*, a espécie alvo de controle em diversas regiões do Sul e Sudeste do Brasil.

A Figura 01 apresenta a localização e a altitude dos pontos de amostragem ao longo do riacho.

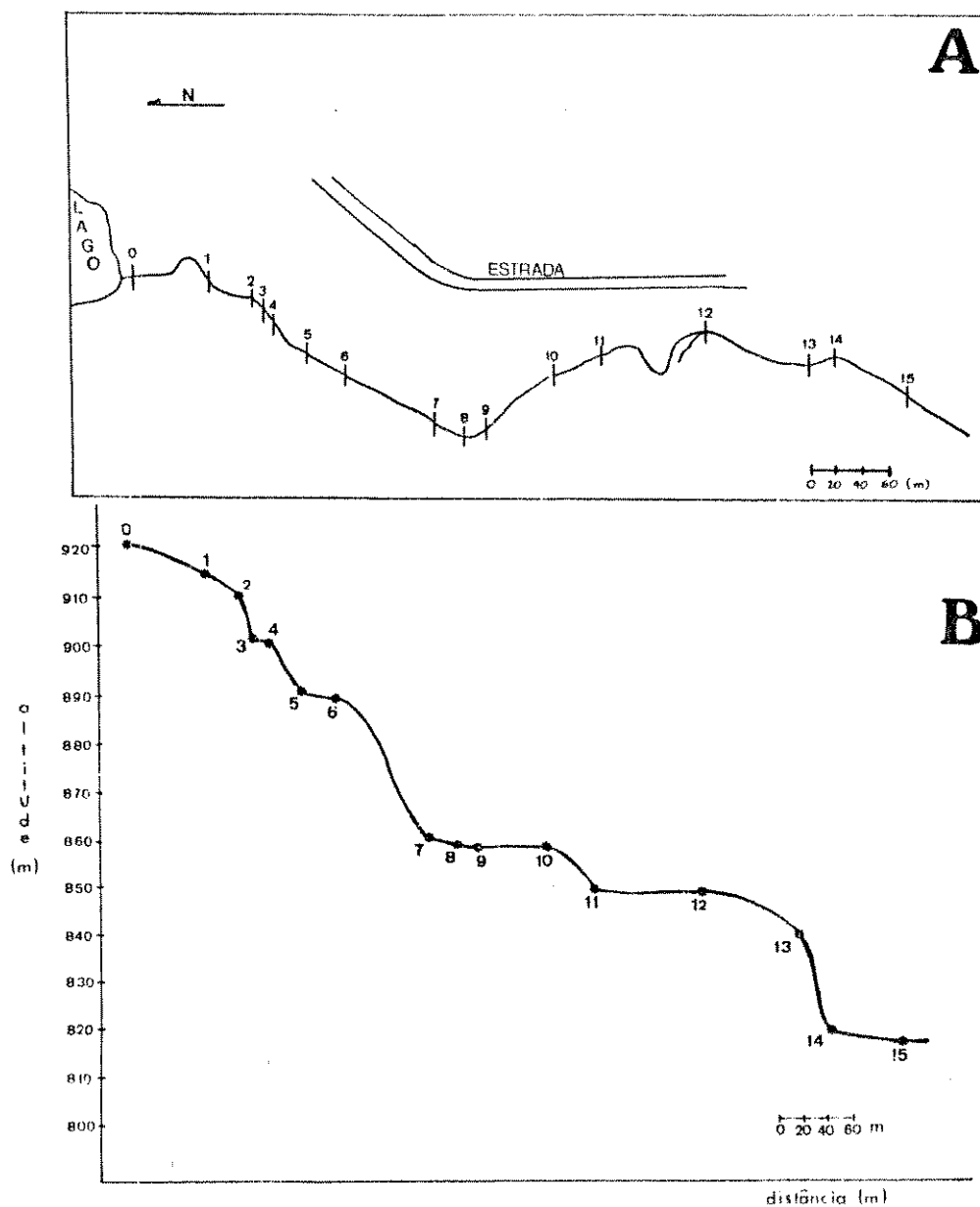


FIGURA 01. Esquema representando a distribuição dos pontos de amostragem (A) e suas altitudes (B) ao longo do riacho estudado.

Ao longo dos três quilômetros de extensão do riacho, desde sua nascente até a foz no rio Jaguari, foram localizados criadouros de borrachudos apenas nos primeiros 700 m a partir da sua nascente (ponto 0). Na realidade, nos cerca de 800 m após o último ponto apresentado (ponto 15), havia ainda três outras estações de coleta, já em uma área de planície. A ação das chuvas e do próprio homem eliminaram estes pontos logo nos primeiros meses de amostragem.

Praticamente toda a extensão do riacho demarcada pelos pontos de amostragem era margeada por uma típica mata ciliar, com o dossel chegando às vezes próximo a 20 m de altura. Apenas o ponto 0 se localizava em área desprovida de mata ciliar. Este ponto era a juzante do lago formador do riacho, sendo uma rampa de concreto de 2,2 m de largura por 25 m de comprimento. A única vegetação em suas margens eram gramíneas, cujas raízes ficavam expostas na água, transformando-se em ótimo substrato para fixação de larvas e pupas de borrachudos. Estes não só se fixavam nesta vegetação como também no leito da rampa. Nos demais pontos de amostragem, larvas e pupas também fixavam-se à vegetação marginal e/ou à pedras e galhos submersos.

Devido a ação das chuvas, alguns pontos tornaram-se inacessíveis em algumas coletas, como por exemplo os pontos de amostragem 2, 3 e 12 em fevereiro/91.

4.1.2. OCORRÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES HOSPEDEIRAS

As Figuras 02 a 05 mostram a ocorrência anual e distribuição relativa das três espécies de simulídeos ao longo do riacho. Larvas de *S. pertinax* e *S. pruinosum* apresentaram uma distribuição relativamente uniforme ao longo do curso d'água, sendo que esta última espécie sobressaiu-se em alguns trechos, como no ponto de amostragem 4. As larvas de *S. subpallidum* tiveram, ao contrário das outras espécies, uma distribuição restrita a alguns trechos. Os pontos 0 e 1 mostraram sempre uma maior ocorrência desta espécie enquanto que nos demais pontos, sua presença quando detectada, era em níveis baixos.

A quantidade de larvas amostradas realça a abundância de *S. pertinax* e *S. pruinosum*, pois foram coletadas mais de 8.000 larvas da primeira espécie e quase 6.000 da segunda. Contrastando essa abundância, tem-se as 1.710 larvas de *S. subpallidum* coletadas ao longo do período de estudo.

Ainda associado à abundância, é interessante salientar que pelo fato das larvas de *S. pertinax* e *S. subpallidum* terem dimensões muito próximas para qualquer classe de tamanho, podem possuir nichos muito parecidos. Isto levaria a uma competição e possível partilha de recursos, como por exemplo pelo substrato para fixação. Na maioria dos pontos, as larvas de *S. pertinax* parecem ter maior sucesso nesta competição, uma vez serem relativamente mais comuns ao longo de todo o riacho.

A abundância e distribuição dos adultos de borrachudos também foram abordadas, mas apenas para as espécies antropofílicas, ou seja, *S. pertinax* e *S. subpallidum*. Os níveis de

ataque destas duas espécies junto à população ribeirinha oscilava muito dependendo do regime das chuvas, atingindo níveis que comprometiam o bem-estar daquela população e até mesmo sua produtividade. Estas situações de elevada densidade de adultos de borrachudos ($\bar{x}$ = 271 borrachudos/hora/homem) contrastava com ocasiões onde a presença destes dípteros nem era notada pela população residente.

Constatou-se uma grande influência do regime de ventos na área quanto à distribuição dos adultos de simulídeos. Na ausência de ventos, os ataques restringiam-se quase que apenas aos dez primeiros pontos de amostragem, sendo que a população residente na planície não sentia a presença dos borrachudos. Em ocasiões onde os ventos sopravam encosta abaixo (quadrante NNE-NNO), os borrachudos chegavam até a planície, atingindo áreas a cerca de 1 quilômetro de distância do último ponto de coleta e criação. Os ventos naquela região oscilaram quanto à intensidade, variando desde uma leve aragem (0,5 m/s) até rajadas superiores a 3 m/s.

São muitos os fatores que influenciam a dinâmica dos sistemas aquáticos, especialmente nos ambientes lóticos. Os organismos destes sistemas estão sujeitos a variações sazonais, que muitas vezes podem alterar toda sua dinâmica populacional (Reisen, 1977 e Wallace & Merrit, 1980).

Salienta-se aqui a influência do regime de chuvas não só na distribuição dos adultos de borrachudos, mas especialmente na distribuição de suas populações larvais. Variações no fluxo d'água do riacho ou alterações quanto à qualidade e quantidade do seston são alguns dos fatores relacionados à migração das

populações larvais dos simulídeos ao longo do riacho. O desprendimento da larva do local onde encontrava-se fixada e sua deriva riacho abaixo até um novo local para fixação é um comportamento comum desses dípteros.

Não apenas fatores abióticos como o fluxo d'água podem provocar migração das larvas, mas também fatores bióticos como a competição pelo substrato de fixação e a defesa do território provocam este tipo de comportamento. Este aspecto também foi observado neste trabalho, especialmente em condições de laboratório, sendo abordado com maiores detalhes mais adiante.

As ocorrências e distribuições verificadas ao longo do riacho estudado são, em grande parte, o resultado deste comportamento.

4.1.3. OCORRÊNCIA DE *Polidispyrenia simulii*

A ocorrência natural de *P. simulii* nas três espécies de borrachudos (*S. pertinax*, *S. subpallidum* e *S. pruinosa*) foi obtida após a triagem de mais de 16.000 larvas. As Figuras 02 a 05 mostram essa prevalência para todo o período de estudo (maio/90 a abril/91), ponto a ponto. Em alguns pontos, a doença deixou de ser detectada durante vários meses (primavera) em todas as espécies hospedeiras, chegando entretanto a ocorrer em níveis superiores a 50% em certas épocas (inverno e verão). É provável que a primavera seja a estação mais favorável para a formação do seston, devido à ação conjunta de vários fatores tais como temperatura e comprimento do dia, garantindo um bom estado nutricional

das larvas de borrachudo e assim desfavorecendo a ocorrência da doença.

Larvas de *S. pertinax* foram as únicas hospedeiras em que *P. simulii* foi detectado durante todo o período de estudo. Analisando-se os resultados de prevalência, nota-se que a microsporidiose atinge frequentemente estados de epizootia nesta espécie hospedeira. O ponto de amostragem 11 representa bem esta situação, onde nos meses de março e abril/91 a prevalência atingiu níveis superiores a 40%, enquanto que nos outros meses havia atingido no máximo valores próximos a 16%. Situações semelhantes podem ser observadas em outros pontos, como nos pontos 8, 9 e 10 (Figura 04).

No total, foram coletadas e triadas 8.589 larvas de *S. pertinax*, sendo 43,3% de larvas pequenas, 40% de larvas médias e 16,7% de larvas grandes. Do total de larvas doentes de *S. pertinax*, 69% eram larvas pequenas, 21,2% eram larvas médias e 9,8% eram grandes. Estas frequências indicam que indivíduos pequenos são muito mais afetados pela doença do que indivíduos grandes. A diferença do nível de infecção entre cada classe de tamanho pode ser atribuída à mortalidade em cada uma destas.

Conforme o exposto por Andreadis (1983) e Maddox (1987), níveis de infecção diferenciados ao longo do estágio larval do hospedeiro indicam que a manutenção da doença na população hospedeira ocorra devido a um mecanismo de transmissão horizontal. Assim, a variação nos níveis de infecção entre as classes, detectada no presente estudo (Tabela 01), indicam que a manutenção da infecção por *P. simulii* em larvas de *S. pertinax* também seja devida a um mecanismo de transmissão horizontal.

TABELA 01. Porcentagem de infecção por *P. simulii* em larvas de *S. pertinax*, *S. subpallidum* e *S. pruinosum*.

	pequenas	larvas médias	grandes
<i>S. pertinax</i>	8,82	3,00	3,27
<i>S. subpallidum</i>	13,60	5,89	2,20
<i>S. pruinosum</i>	0,12	0,37	0,70

A microsporidiose também ocorreu em larvas de *S. subpallidum* da mesma forma que em *S. pertinax*, ou seja, em frequentes estados epizooticos. O ponto de amostragem 0 evidencia esta situação, onde a prevalência atingiu níveis superiores a 50% durante o inverno, enquanto que nas demais estações do ano, os níveis de ocorrência eram, em média, inferiores a 10%. Situações semelhantes ocorreram nos pontos 1 e 5 (Figuras 02 e 03).

Das 1.710 larvas de *S. subpallidum* analisadas, 40,5% eram pequenas, 35,7% eram médias e o restante larvas grandes (23,8%). Do total das larvas infectadas de *S. subpallidum*, 67,6% eram larvas pequenas, 25,9% eram larvas médias e 6,5% eram larvas grandes. Da mesma maneira que em *S. pertinax*, as larvas pequenas de *S. subpallidum* parecem ser as mais afetadas pela doença, sendo que a diferença entre os níveis de infecção em cada classe de tamanho também pode ser atribuída à mortalidade. Analisando-se os resultados quanto à frequência da infecção nas classes de tamanho (Tabela 01), tem-se que há variação nos níveis da

doença. Assim, um mecanismo de transmissão horizontal ("per os") também parece ser o responsável pela manutenção da microsporidiose neste hospedeiro no campo. A existência de hospedeiros intermediários não pode ser excluída, embora pouco provável nos ambientes lóticos, apesar de ter sido demonstrada a sua importância no ciclo de alguns microsporídeos patogênicos à culicídeos (Andreadis, 1989 e 1990 e Avery & Undeen, 1990).

Enquanto as larvas de *S. pertinax* e *S. subpallidum* revelaram-se susceptíveis a *P. simulii*, foram raros os casos de detecção do patógeno em *S. pruinosum*, apesar de suas larvas ocorrerem em praticamente todo o riacho. Das 5.772 larvas coletadas e triadas desta espécie, apenas em 15 indivíduos (0,23%) foi detectada a presença de *P. simulii*, revelando a sua baixa susceptibilidade.

Apesar da relativa escassez de estudos sobre a prevalência de microsporidioses em populações de simulídeos, pode-se assumir que a prevalência da doença causada por *P. simulii* em larvas de *S. pruinosum* esteja dentro dos padrões encontrados para a maioria dos estudos existentes, ou seja, infecções ocorrendo em níveis inferiores a 1% na população hospedeira (Weiser & Undeen, 1981 e Maddox, 1987). Da mesma maneira, epizootias por microsporídeos são raras em culicídeos, sendo comum as infecções ocorrerem também em níveis inferiores a 1% (Chapman, 1974; Castillo, 1980 e Maddox, 1987). Assim as freqüentes epizootias detectadas em larvas de *S. pertinax* e *S. subpallidum*, reveladas no presente trabalho, representam uma exceção dentro do contexto de microsporidioses em dípteros aquáticos.

Estudos com outros hospedeiros vêm demonstrando que as infecções por microsporídeos causam efeitos sub-letais em adultos originados de estágios imaturos infectados, diminuindo sua fertilidade e longevidade (Gaugler & Brooks, 1975; Grundler et al., 1987; Maddox, 1987 e Andreadis, 1990). Assim, o fato de *P. simulii* ocorrer em *S. pertinax* e *S. subpallidum* em frequentes epizootias, deve influenciar a dinâmica populacional destas espécies hospedeiras, provavelmente reduzindo a sua taxa reprodutiva. A confirmação desta hipótese aumentaria a possibilidade do uso de microsporídeos como suporte aos programas de Manejo Integrado. Considerando-se ainda o fato de que em populações de *S. pertinax* do litoral Norte do Estado de São Paulo não se detectou microsporidiose alguma, em avaliações periódicas feitas pelo presente autor, a introdução de *P. simulii* naquelas áreas também poderia auxiliar no controle natural desta espécie.

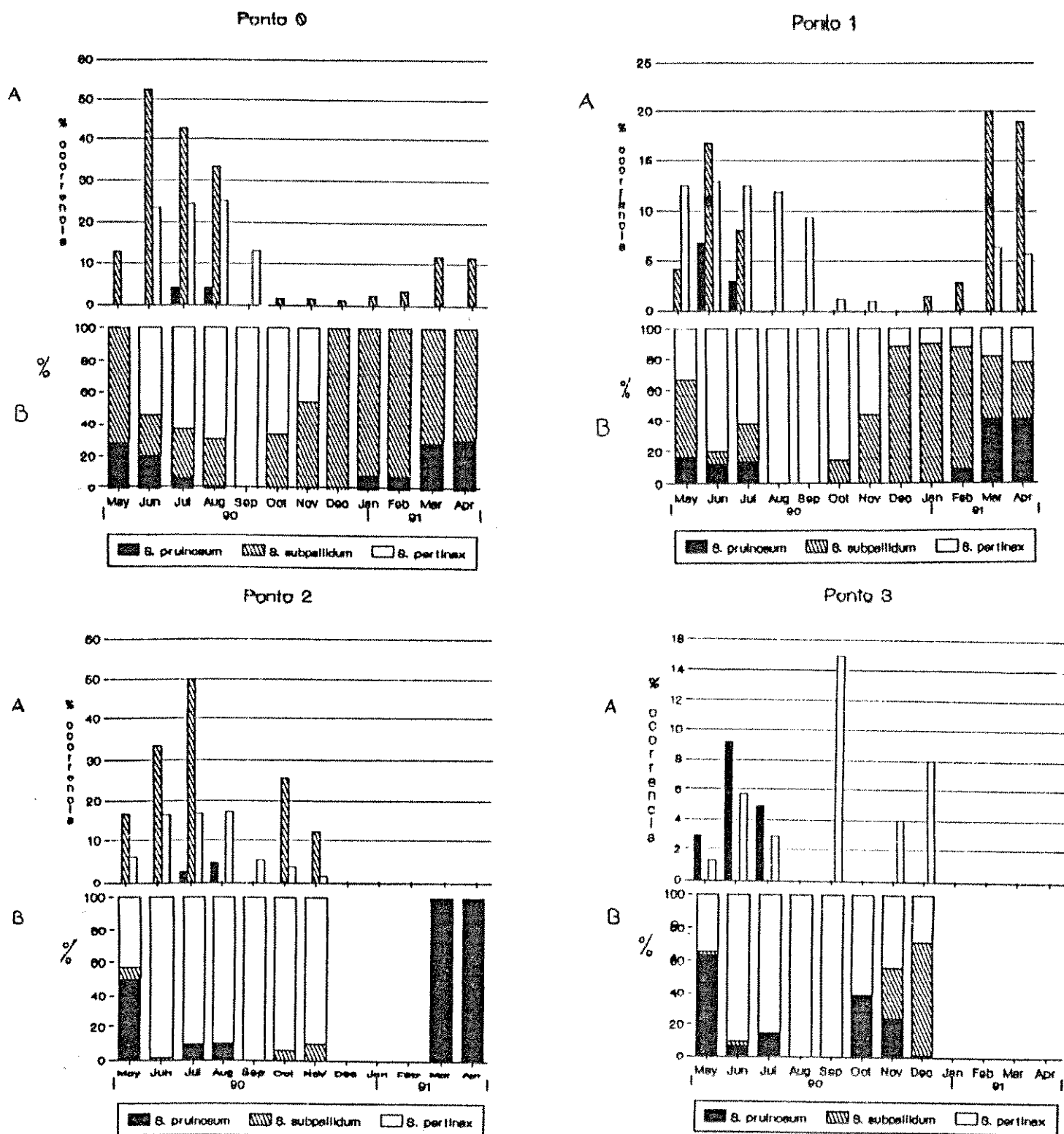


FIGURA 02. Porcentagem de ocorrência de *P. simulii* em larvas de simuliídeos (A) e frequência relativa de indivíduos coletados durante o período de estudo (B), nos pontos de amostragem 0, 1, 2 e 3.

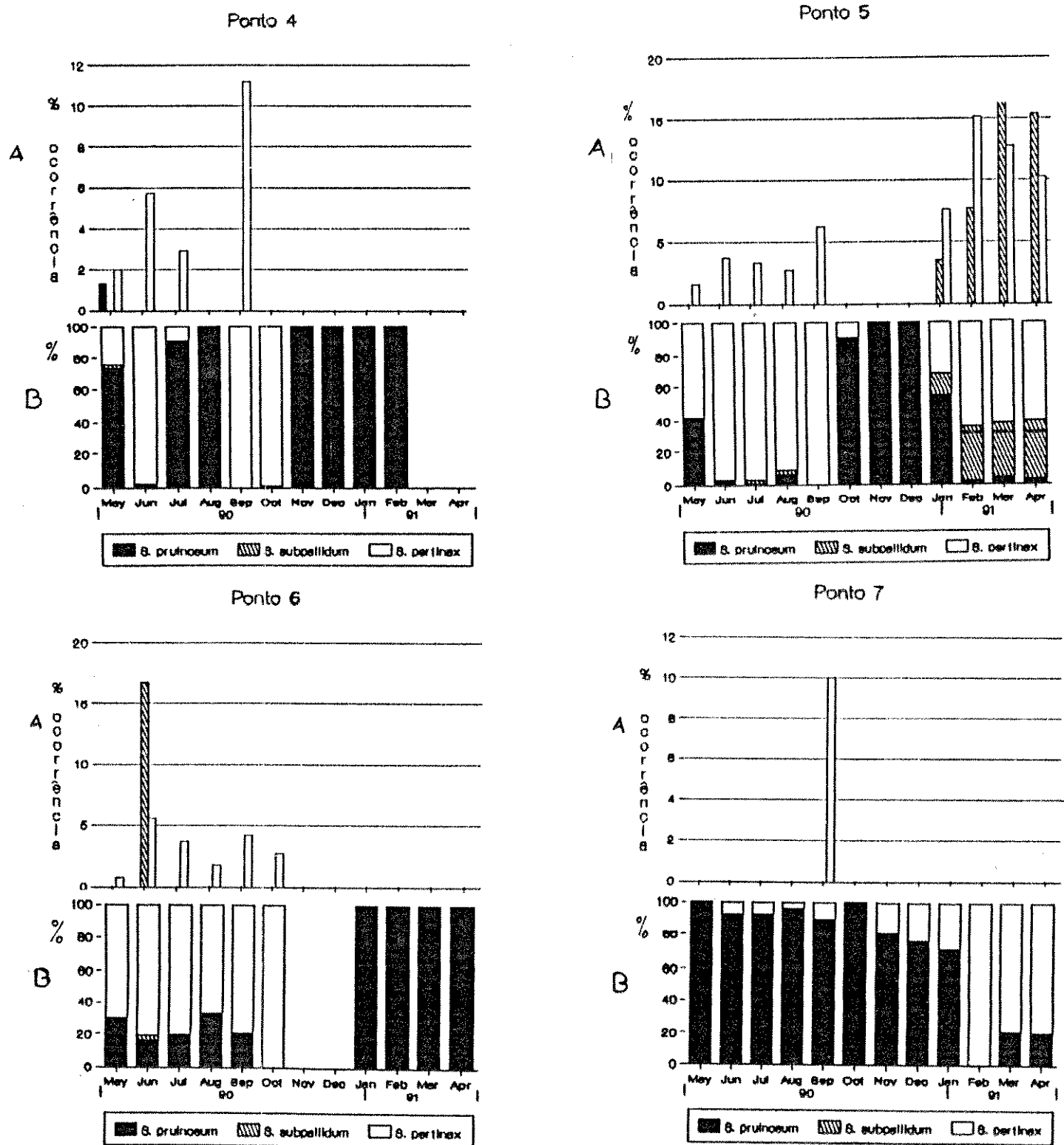
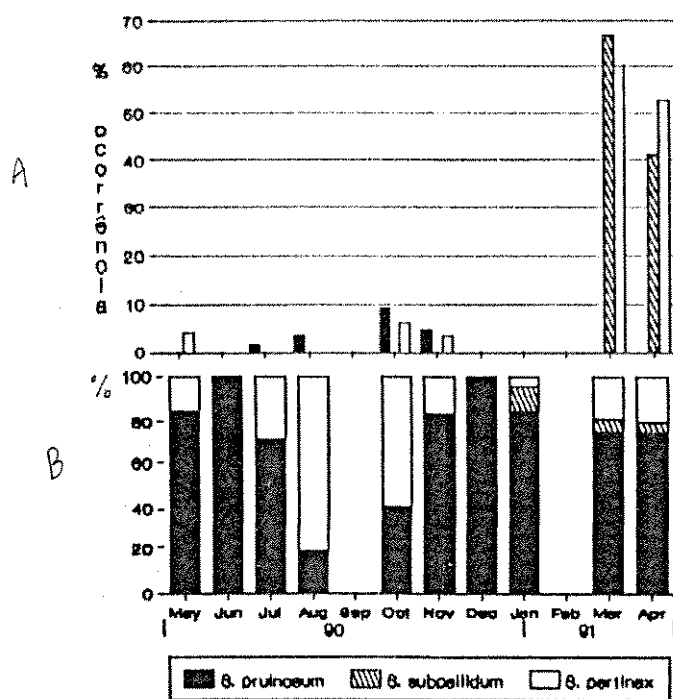
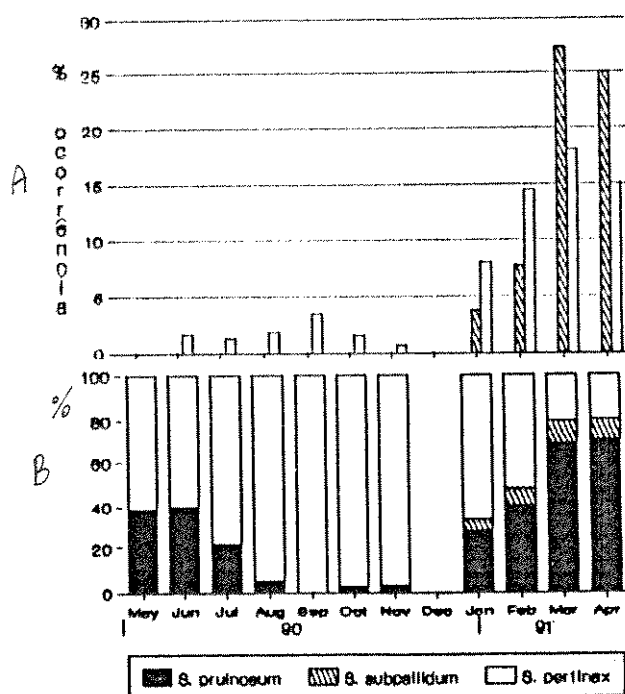


FIGURA 03. Porcentagem de ocorrência de *P. simulii* em larvas de simuliídeos (A) e frequência relativa de indivíduos coletados durante o período de estudo (B), nos pontos de amostragem 4, 5, 6 e 7.

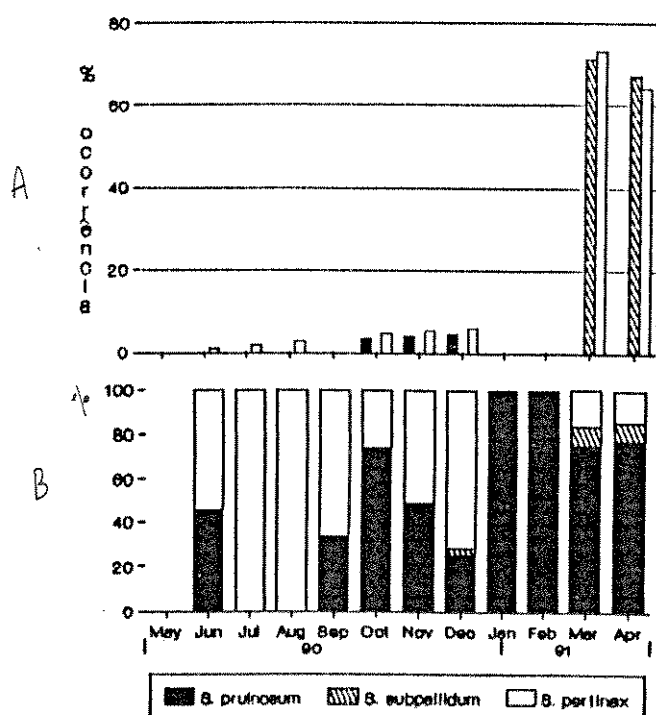
Ponto 8



Ponto 9



Ponto 10



Ponto 11

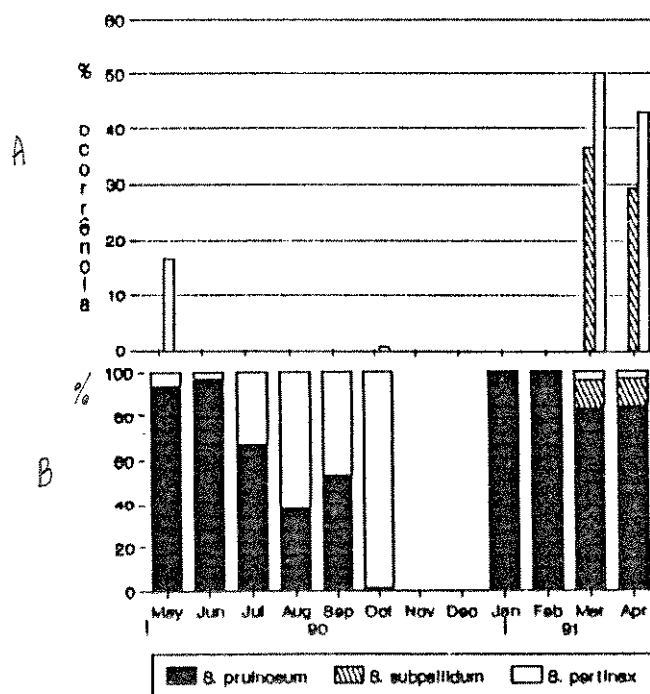
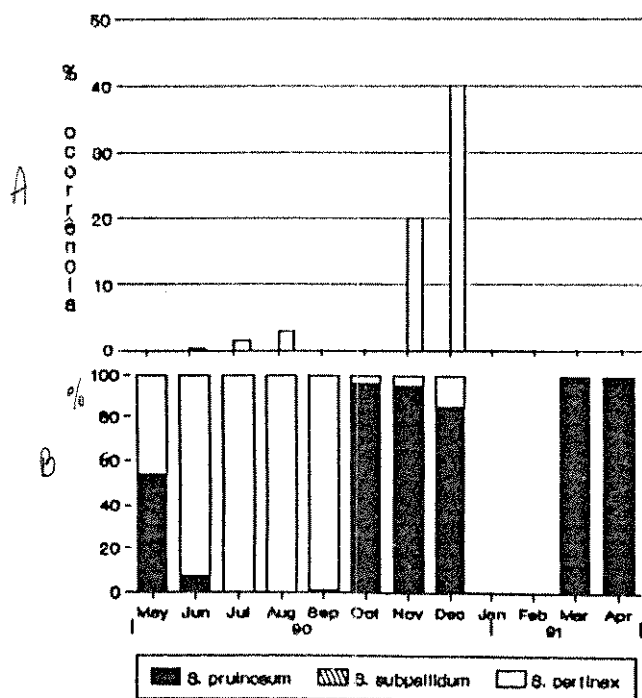
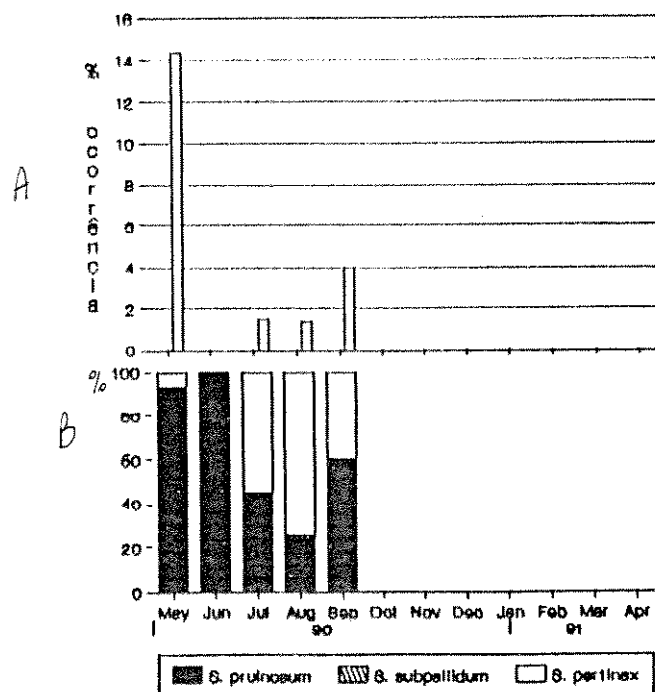


FIGURA 04. Porcentagem de ocorrência de *P. simulii* em larvas de simuliídeos (A) e frequência relativa de indivíduos coletados durante o período de estudo (B), nos pontos de amostragem 8, 9, 10 e 11.

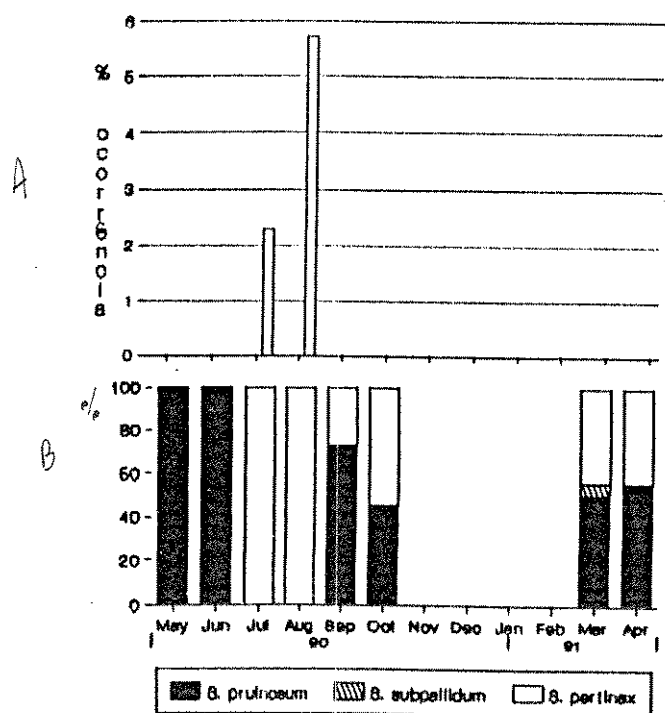
Ponto 12



Ponto 13



Ponto 14



Ponto 15

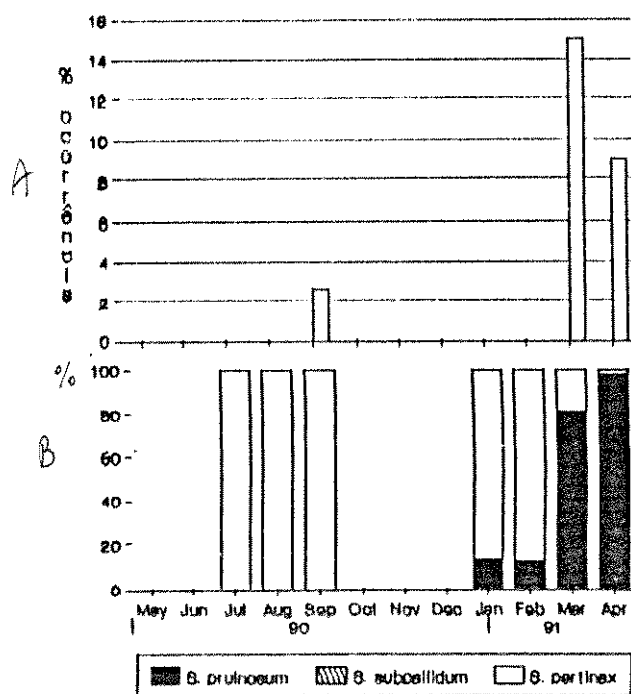


FIGURA 05. Porcentagem de ocorrência de *F. simulii* em larvas de simuliídeos (A) e frequência relativa de indivíduos coletados durante o período de estudo (B), nos pontos de amostragem 12, 13, 14 e 15.

4.2. SINTOMATOLOGIA EXTERNA

A Patologia de Insetos envolve, entre outros estudos, a análise dos sintomas apresentados pelo hospedeiro, especialmente os externos. A partir de tais estudos é possível a elaboração de manuais e atlas de identificação de patógenos, ferramentas indispensáveis nos primeiros passos na procura por agentes bióticos de controle de insetos daninhos.

Os resultados obtidos no presente estudo são provenientes de observações em larvas de *S. pertinax* e *S. subpallidum*.

Infecções por microsporídeos, especialmente em simuliídeos, são facilmente detectáveis devido ao contraste da larva infectada no seu criadouro. A primeira característica evidente é a formação globular esbranquiçada, às vezes condensada no final do abdome da larva e às vezes ocupando toda a extensão de seu corpo. É observado com frequência o abdome muito distendido.

Uma das características das larvas sadias dos simuliídeos estudados foi a rápida resposta comportamental face a qualquer estímulo mecânico e/ou físico-químico. Esta resposta é devida em grande parte ao relativo alto nível de acetilcolinesterase encontrado em seu organismos (Cupp, 1981). Larvas infectadas, por sua vez, apresentaram-se quase que apáticas, tendo uma resposta comportamental muito lenta a estes estímulos.

Normalmente, nas larvas sadias observadas, qualquer alteração no fluxo da lâmina d'água que as recobre ou qualquer leve toque provoca como resposta imediata uma retração de todo o corpo da larva e conseqüente deslocamento para outra área do criadouro. Aumen-

tando-se a intensidade e frequência do estímulo, tem-se normalmente como resposta o desprendimento da larva do substrato e seu deslocamento riacho abaixo (Waters, 1972 e Reisen, 1977).

Indivíduos infectados demonstraram pequena retração do corpo apenas após vários toques. Alterações no fluxo da lâmina d'água também resultaram em raras respostas. Uma das consequências imediatas deste comportamento é que larvas infectadas por microsporídeos possivelmente tornam-se mais susceptíveis ao ataque de predadores e parasitas. Foi observado, sob condições de campo e laboratório, que as larvas sadias de simulídeos competem fortemente por locais no substrato que melhor permitem o fluxo de água em seus leques cefálicos, otimizando assim a alimentação. Tal fato tem sido igualmente reportado em outras comunidades de simulídeos (Reisen 1977; Harding & Colbo, 1981 e Ruas Neto & Matias, 1985). A infecção pelo microsporídeo e consequente alteração das respostas comportamentais, mostrou também prejudicar a capacidade das larvas de competir por microhabitats no substrato.

É importante salientar que em momento algum foi observada qualquer alteração no hábito alimentar das larvas infectadas quanto ao movimento dos leques cefálicos, que permaneceu normal em comparação ao de larvas sadias. Tal fato sugere que a despeito das larvas infectadas terem menores condições de ocupar locais mais adequados para alimentação, não parecem compensar sua atividade filtradora. Além disso, o não comprometimento dos movimentos dos leques cefálicos sugere que ao menos os sistemas nervoso e muscular envolvidos na atividade filtradora não são afetados.

Um dos sintomas mais evidentes foi quanto ao desenvolvimento larval. Indivíduos infectados apresentaram um retardo no seu desenvolvimento do ponto de vista fisiológico. A Tabela 02 apresenta

os resultados obtidos quanto ao comprimento do corpo de larvas de *S. pertinax* e *S. subpallidum*. A diferença entre larvas sadias e infectadas de ambas as espécies foi significativa ($P < 0,05$), tanto para larvas pequenas como médias.

TABELA 02. Comprimento médio (mm) do corpo de larvas de diferentes tamanhos de *S. pertinax* e *S. subpallidum*. (S=sadia; I= infectada; n= nº de indivíduos; $\bar{x}$ = média; s^2 = variância; * = diferença significativa entre os valores).

	<i>S. pertinax</i>							<i>S. subpallidum</i>													
	pequenas			médias				grandes			pequenas			médias			grandes				
	S	I		S	I			S	I		S	I		S	I		S	I			
n	27	115		19	72		22	12		48	36		48	07		30	06				
$\bar{x}$	3,05	*	5,52		4,42	*	5,96		5,44	5,62		2,06	*	4,85		4,09	*	4,72		4,66	5,17
s^2	0,22		0,83		0,26		0,57		0,15	0,40		0,13		0,28		0,11		0,15		0,11	0,26

Para *S. pertinax*, a diferença entre larvas pequenas, sadias ou doentes, foi de cerca de 80%, enquanto que para larvas médias foi de 35%. Larvas grandes não apresentaram diferença significativa entre indivíduos sadios e doentes.

Para *S. subpallidum*, larvas pequenas infectadas chegam a ser quase 150% maiores que as sadias, enquanto que a diferença entre as larvas médias foi de 15%. Larvas grandes também não apresentaram diferença significativa entre indivíduos sadios e doentes.

Os resultados obtidos aqui não coincidem com os de Strickland (1911), que foi o primeiro a registrar alterações morfofomé-

tricas em simulídeos infectados por microsporídeos. Strickland relata exatamente o oposto ao observado no presente trabalho. Esta diferença provavelmente se deve à não comparação entre larvas sadias e doentes de mesma idade fisiológica, por aquele autor.

Maurand em 1975, estudando larvas de *S. ornatum* infectadas por microsporídeos, chegou a conclusões semelhantes às do presente trabalho, ou seja, a infecção por microsporídeos acarreta um retardo no desenvolvimento larval. Maurand constatou inclusive a ocorrência de mais quatro estádios larvais em *S. ornatum*. Este fenômeno de retardo do desenvolvimento é conhecido por metatetelia, termo proposto por Strickland em 1911.

Outra importante observação é quanto aos histoblastos torácicos, também conhecidos como discos imaginais. Larvas de borra-chudos apresentam seis pares de histoblastos torácicos: três pares correspondendo às pernas, um par às asas, um par aos balancins e um par ao aparelho respiratório das pupas. Este último é utilizado na classificação das larvas em diferentes tamanhos (pequena, média e grande).

Larvas infectadas apresentaram diferença no desenvolvimento dos histoblastos quando comparados aos de larvas sadias. Os histoblastos apresentaram-se sempre menores em indivíduos infectados independente do tamanho das larvas. A Figura 06 torna mais fácil a visualização destes resultados quanto aos histoblastos respiratórios.

Apesar do processo de metatetelia, todos os adultos analisados originados de larvas infectadas emergiram sem alterações morfológicas externas aparentes. A análise dos resultados em adultos será abordada nos próximos itens (4.3 e 4.4).

O processo de metatetelia pode ser explicado levando-se em consideração que a ação do patógeno no tecido adiposo provavelmente o comprometa de modo que este não exerça plenamente as suas funções metabólicas, incluindo a síntese e o armazenamento de lipoproteínas e glicogênio. Assim, as células cerebrais possivelmente fiquem sem receber o estímulo responsável pelo desencadeamento do processo neuro-endócrino da ecdise, ou então que o limiar de estímulo cerebral demore a ser atingido. Esta hipótese vem sendo estudada a algum tempo sendo inclusive formulada para outros patógenos de simulídeos, especialmente mermitídeos (Fisher & Sanborn, 1964; Liu, 1972; Gordon *et al.*, 1973; Maurand, 1975; Cupp, 1981; Weiser & Undeen, 1981 e Petersen, 1985).

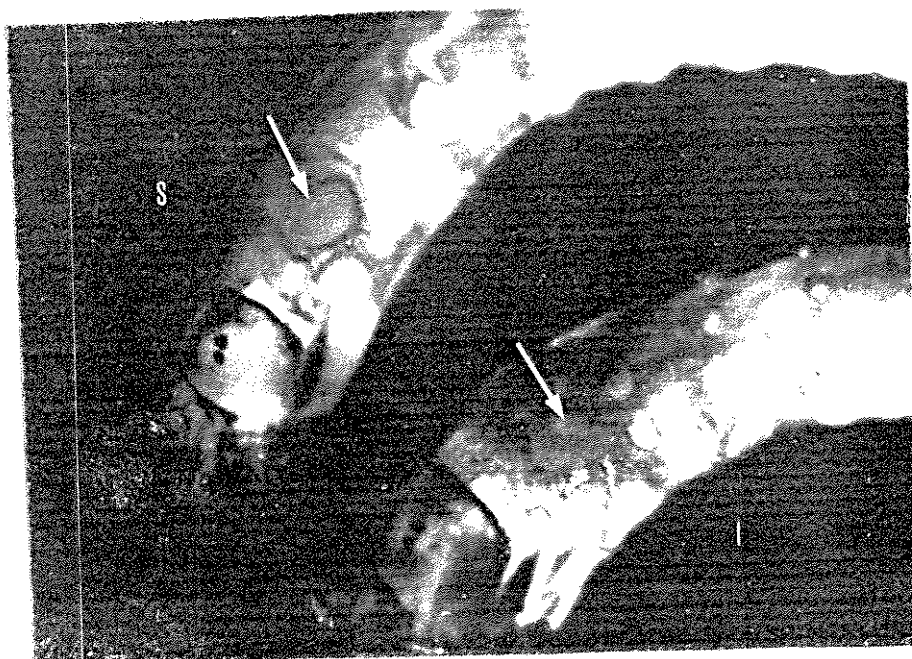


FIGURA 06. Histoblastos respiratórios (setas) de larvas de *S. subpallidum*. (S) = sadia ; (I) = infectada por *F. simulii* (140x).

4.3. HISTOPATOLOGIA

O estudo histopatológico desenvolvido no presente trabalho concentrou-se em alguns tecidos e sistemas de larvas de *S. pertinax* afetados direta ou indiretamente por *P. simulii*.

A infecção por um microsporídeo em seu hospedeiro invertebrado e, em especial em larvas de borrachudos, é tida por ocorrer de duas maneiras: via horizontal, pela ingestão de esporos ou via vertical, transovarianamente. Em qualquer um dos casos as células infectantes alcançam a hemolinfa e são levadas por ela a todos os tecidos do hospedeiro, infectando os susceptíveis (Weiser, 1976b). Uma vez no hospedeiro, as diferentes espécies de microsporídeos podem ter um ou mais tecidos alvo, onde se concentram e se desenvolvem. O mecanismo desta seleção ainda não é bem conhecido para a grande maioria das interações entre os microsporídeos e seus insetos hospedeiros.

4.3.1. TECIDO ADIPOSEO

As larvas sadias de *S. pertinax* apresentam reservas lipídicas na forma de tecido adiposo subepidérmico e na cavidade do corpo (tecido adiposo visceral). O primeiro constitui-se de uma fina camada de células ao longo de todo o corpo da larva, e o segundo é composto por massas maiores de células adiposas com núcleos esféricos.

O tecido adiposo visceral foi o único sítio da infecção por *P. simulii* no hospedeiro, enquanto o tecido subepidérmico permaneceu íntegro.

As massas adiposas adquirem uma coloração esbranquiçada, às vezes ocupando toda a extensão da larva, desde o final do abdome até o tórax. O tecido adiposo torna-se hipertrofiado e acaba ocupando quase toda a hemocela da larva (Figura 07).



FIGURA 07. Corte transversal de larva de *S. pertinax* infectada por *P. simulii*. A: (TA) = tecido adiposo infectado ; (VD) = vaso dorsal (102,5x). B: Detalhe do tecido adiposo infectado. (E) = esporo (2.040x).

A hipertrofia das células hospedeiras é uma clara resposta do tecido ao agente microbiano infectante. Tal crescimento celular retarda a sua lise e consequente liberação de esporos para outros tecidos. Assim, a infecção tenderia a ficar restrita a menos células susceptíveis (Weiser, 1976b e 1977; Weissenberg, 1976).

A hipertrofia no tecido hospedeiro, revelada no presente trabalho, demonstra ainda tratar-se de um caso de formação de xenoma. Este termo foi aplicado por Maurand (1973 *apud* Weiser, 1976b) e redefinido por Weissenberg (1976), passando a ser considerado como um aumento localizado de tecido como resultado ao estímulo de parasitas intracelulares.

A Figura 14 (4.4.) revela que *P. simulii*, nas células adiposas de larvas de *S. pertinax* forma um xenoma sincicial, onde as membranas plasmáticas das células infectadas são dissolvidas resultando num sincício progressivamente ocupado pelo microsporídeo. É possível notar a presença de vários núcleos das células hospedeiras num único lobo. Esta configuração confirma os resultados obtidos por Maurand (1973 *apud* Weiser, 1976b) em estudos com *P. simulii* em simuliídeos na França.

Weiser (1976b) relata que em infecções por microsporídeos que apresentam um mecanismo de invasão e desenvolvimento no tecido hospedeiro como o apresentado no presente trabalho, têm seus esporos liberados apenas após a morte do inseto.

A consequência imediata da infecção estabelecer-se no tecido adiposo, além das diversas alterações celulares, é que as reservas energéticas ficam seriamente comprometidas, interferindo no desenvolvimento do hospedeiro e colaborando em parte para o fenômeno da metatetelia.

4.3.2. EPITÉLIO INTESTINAL

No presente trabalho também foram feitas observações sobre as possíveis alterações no epitélio do intestino médio.

Não foram encontrados esporos ou qualquer outra fase do ciclo de *P. simulii* nas células do epitélio intestinal, no entanto este foi afetado indiretamente pela infecção. O tecido adiposo hipertrofiado chega a comprimir o epitélio, reduzindo sua luz. As Figuras 09 e 10 revelam as alterações ocorridas neste tecido quando comparado ao epitélio de uma larva sadia (Figura 08). Nota-se uma completa dissociação do arranjo epitelial. As células assumem uma disposição irregular, inclusive com redução do seu volume citoplasmático. Uma das consequências disto seria a perda da capacidade de absorção de nutrientes pelo intestino.

O epitélio intestinal, apesar de ser uma das vias de acesso do microsporídeo ao hospedeiro, não é tido por ser um sítio de multiplicação destes patógenos (Weiser, 1976b e Weiser & Undeen, 1981). Tanto quanto em algumas viroses, como a causada pelo vírus da Poliedrose Nuclear em larvas de lepidópteros a não infecção do epitélio intestinal quando da invasão pelo patógeno parece ser um caráter adaptativo. Em infecções onde há a destruição desse tecido, como no

caso da Poliedrose Citoplasmática, ocorre uma rápida invasão da hemocela por bactérias facultativamente patogênicas e uma menor multiplicação do patógeno (Andrade, com. pes., 1991).

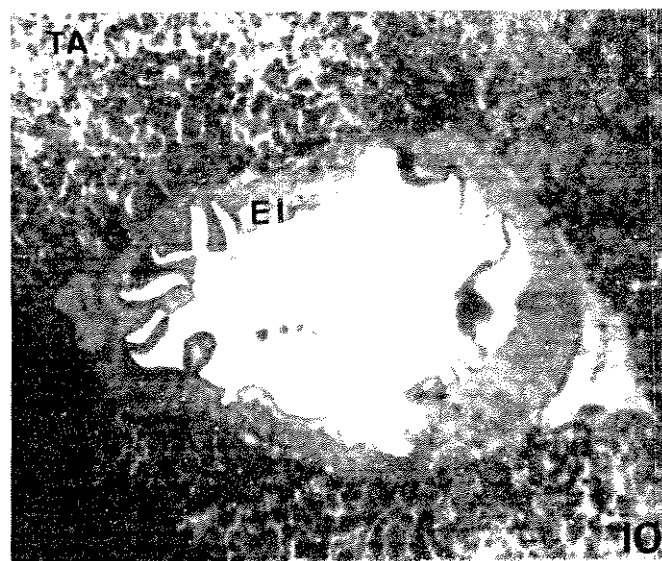
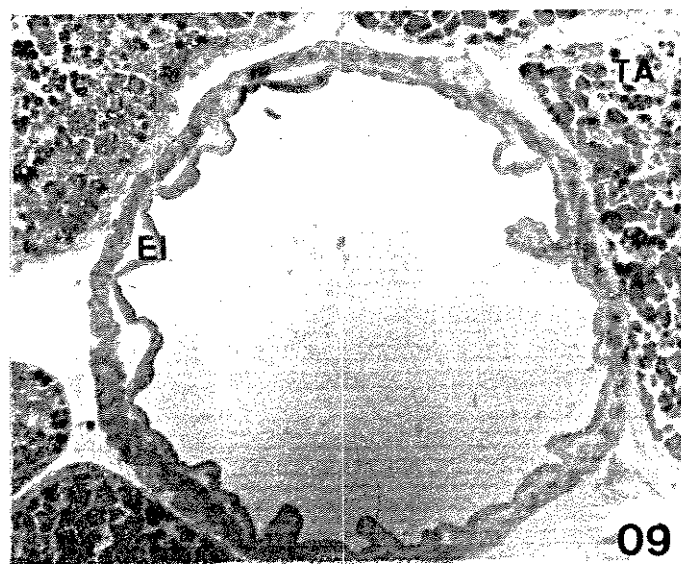
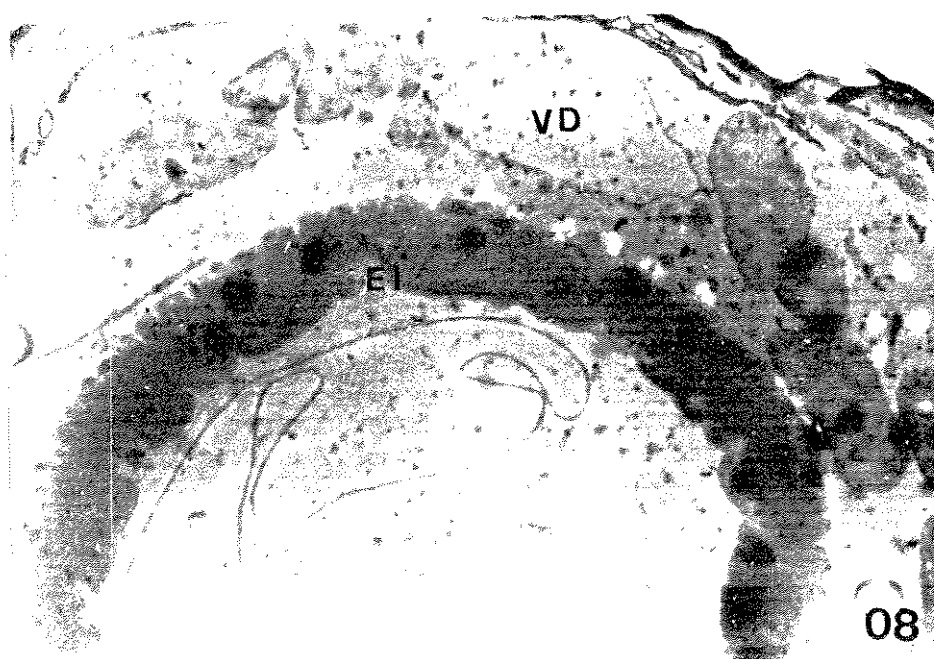
4.3.3. VASO SANGUÍNEO DORSAL

Não foram encontrados esporos ou quaisquer outras formas do ciclo de *P. simulii*, tanto nas células musculares do vaso dorsal como na sua luz.

Foi observado um nítido aumento da luz do vaso dorsal em larvas infectadas (Figura 07) quando comparado com o vaso dorsal de uma larva sadia (Figura 08). Embora não tenham sido encontrados registros quanto a esta alteração, uma possível hipótese para explicá-la é o fato de que à semelhança das infecções por mermitídeos (Condon & Gordon, 1977), exista uma diminuição do glicogênio e de outros metabólitos disponíveis para os processos fisiológicos larvais. Assim, uma maneira de se suprir esta redução nutricional seria por meio de uma compensação no sistema circulatório. A hipertrofia do tecido adiposo, por sua vez, ocupando virtualmente toda a hemocela, poderia ainda ser responsável pelas alterações observadas no vaso sanguíneo dorsal.

4.3.4. OUTROS TECIDOS

Foram analisados ainda glândulas salivares, túbulos de Malpighi, musculatura, epiderme e gânglios nervosos de larvas de *S. pertinax*. Em fêmeas adultas originadas de larvas infectadas foram analisados os sistemas digestivo e reprodutor, além da musculatura e tecido adiposo. Em todos estes tecidos e sistemas não foi detectado qualquer indício de infecção por *P. simulii* ou alteração significativa em suas estruturas.



FIGURAS 08 A 10. Corte transversal de larvas de *S. pertinax*. (EI) = epitélio intestinal ; (VD) = vaso dorsal ; (TA) = tecido adiposo. 08. Larva sadia (460x). 09. Larva infectada por *P. simulii* (530x). 10. Larva infectada por *P. simulii* (470x)

4.4. BIONOMIA DE *Polidispyrenia simulii*

Os esporos de *P. simulii* encontrados nas larvas hospedeiras estudadas mediram $6,3 \mu\text{m}$ ($s=0,41$) de largura por $8,27 \mu\text{m}$ ($s=0,48$) de comprimento [$n=43$] em média. O gênero *Polidispyrenia* é tido por apresentar certa variação nas dimensões dos esporos (Weiser, 1977). Assim, os valores obtidos para esta linhagem, apesar de diferirem dos obtidos por Maurand (1975) são compatíveis aos obtidos por Marino e colaboradores (1979) e Garcia e colaboradores (1989) para *P. simulii* em larvas de diversas espécies de borrachudos na Argentina.

O filamento polar apresentou cerca de $70 \mu\text{m}$ de comprimento. A Figura 12 mostra um esporo com o seu filamento parcialmente extrudido.

A sequência do desenvolvimento do microsporídeo *P. simulii* nas larvas dos borrachudos estudados, desde a célula infectante até a formação de esporos maduros, é apresentada na Figura 11.

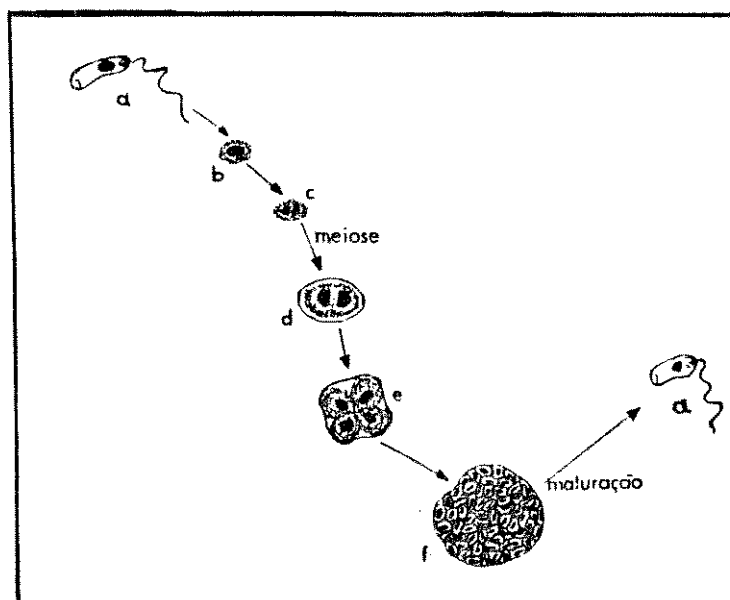


FIGURA 11. Esquema representando o ciclo de vida de *P. simulii*.
 (a) = esporo maduro; (b) = célula infectante; (c) = meronte
 com arranjo diplocariótico; (d) a (f) = esporogonia.

O ciclo de vida dos microsporídeos, de uma maneira geral, pode ser dividido em duas fases básicas: a merogonia e a esporogonia. A merogonia inicia-se logo após a entrada da célula infectante na célula hospedeira, compreendendo suas primeiras divisões e terminando com a formação da membrana da vesícula do esporóforo. A fase seguinte, esporogonia, consiste na formação de esporos a partir dos merontes. Este processo se dá a partir da formação da vesícula do esporóforo até a completa maturação dos esporos. Cada meronte dará origem a um saco de esporos (vesícula do esporóforo). As vesículas abrigam um número determinado de esporos característico de cada gênero de microsporídeo (Weiser & Undeen, 1981). A vesícula do esporóforo de *P. simulii* apresenta uma conformação de mórula abrigando 68 esporos ou mais (Figura 12). As vesículas são facilmente rompidas na preparação de es-

fregação para observação de microsporídeos, liberando assim seus esporos. Estes apresentam apenas um núcleo, sendo esse também um caracter taxonômico. A Figura 13 revela divisões celulares no início da esporogonia.

Quanto à ultraestrutura das fases do ciclo de vida de *P. simulii*, a Figura 14 revela vários merontes em arranjo diplocariótico, envoltos por uma fina membrana. Numerosas membranas da célula hospedeira, provavelmente cisternas do retículo endoplasmático ou do complexo de Golgi, encontram-se próximas aos merontes assim como certa quantidade de mitocôndrias. Este arranjo coincide com o observado por Canning & Hazard (1982) quando na proposta para a designação do novo gênero *Folidispyrenia*, e corresponderia a um aumento geral do metabolismo celular.

Não se detectou a divisão de merontes, mas a consequente formação de esporoblastos (ou esporontes) indica que tais divisões ocorram. Na esporogonia já se detecta uma segunda membrana contornando todos os esporoblastos; é a membrana que originará a vesícula do esporóforo (Figura 14). São visíveis ainda inúmeras vesículas de secreção e, mais raramente, secreção na forma tubular, ambas oriundas do metabolismo do patógeno (Figuras 14 e 15).

A visualização de complexos sinaptonêmicos logo nos primeiros estágios da esporogonia (Figura 15) evidencia a ocorrência de meiose no início desta fase. Isto levará inevitavelmente à formação de esporos haplóides. Deste fato decorre que uma "fusão sexual" deve ocorrer em algum passo do ciclo de vida deste patógeno. Esses resultados corroboram o exposto por Loubés (1979) e Canning & Hazard (1982) em estudos com *P. simulii*.

As implicações do arranjo diplocariótico e da meiose nos merontes vêm sendo abordadas com o objetivo de melhor conhecer-se o ciclo de vida de várias espécies de microsporídeos (Hazard & Brookbank, 1984; Hazard et al., 1979 e Hazard et al., 1985).

A idéia de que os ciclos de microsporídeos de hospedeiros aquáticos sejam muito mais complexos do que se pensa, vem se solidificando a algum tempo. A maioria dos estudos tem sido feita com pernilongos devido a relativa facilidade de manutenção e criação destes dípteros em condições de laboratório (Hazard et al., 1979; Andreadis, 1983; Hazard et al., 1985; Andreadis, 1989 e Avery, 1989). Estudos com hospedeiros simulídeos têm sido pouco desenvolvidos, devido especialmente à dificuldade de sua manutenção em condições de laboratório, no entanto devem auxiliar em muito a compreensão desses ciclos.

A ultraestrutura do esporoblasto em fase final de desenvolvimento e do esporo maduro são revelados nas Figuras 16 e 17. Uma membrana externa (exósporo) precede uma membrana interna (endósporo) abrigando o núcleo do esporo, seu plasmalema, estruturas lamelares do polaroplasto (retículo endoplasmático e complexo de Golgi) e todo o conjunto do filamento polar. Nota-se ainda que o filamento de *P. simulii* é monomórfico, ou seja, apresenta o mesmo diâmetro em toda a sua extensão. Isso é constatado pela homogeneidade do diâmetro das

voltas do filamento dentro do esporo. Ainda pode-se observar a presença de um grande vacúolo na extremidade posterior do esporo. Em muitos casos pode-se ver a membrana da vesícula do esporóforo abrigando vários esporos.

Todos os resultados apresentados até aqui quanto ao ciclo de vida de *P. simulii*, se referem a larvas de *S. pertinax* e *S. subpallidum* como hospedeiros. Além disso, quatorze fêmeas adultas de *S. pertinax* originadas de larvas infectadas também foram analisadas. Tanto ao nível de microscopia óptica como eletrônica não se detectou a presença de esporos ou de qualquer outra forma (merontes e esporoblastos) em qualquer tecido do adulto, inclusive nos ovários.

Salienta-se aqui a análise dos ovários devido ao fato de que a maioria dos microsporídeos que apresentam transmissão vertical, a apresentam transovarianamente. Além disso, o comportamento das larvas recém eclodidas de simulídeos impede que a transmissão vertical seja transovigênica, visto que elas não comem o córion do ovo após sua eclosão.

Convém salientar que todos os estudos sobre a transmissão vertical de microsporídeos vêm sendo feitos tendo-se como hospedeiros dípteros culicídeos. Nestes estudos têm sido encontrados esporos nos oenócitos de fêmeas adultas, enquanto larvas infectadas que originariam machos não chegam à fase adulta (Andreadis & Hall, 1979a; Lord et al., 1981; Becnel et al., 1986 e Andreadis, 1983 e 1988).

Quanto à transmissão vertical em simulídeos, o único registro existente é a nota de Undeen (1981), onde esporoblastos foram encontrados em esfregaços de fêmeas adultas de *S. vittatum*, originadas de larvas submetidas a uma dose diária de esporos de *Tuzetia debaisieuxi*. Esse autor relata entretanto que as formas encontradas nos adultos eram muito diferentes das de *T. debaisieuxi* usadas nos inóculos, podendo até serem esporos de outro microsporídeo.

O resultado das observações em adultos, no presente trabalho, leva a sugerir a não existência de transmissão vertical de *F. simulii* nos simulídeos estudados, ou então que ela ocorra em frequências muito reduzidas. A mesma conclusão foi obtida por Strickland (1911) em seus estudos com *S. ornatum*.

A transmissão vertical de microsporídeos é considerada comum entre dípteros culicídeos. Apesar disso, estudos de modelagem matemática têm levado à conclusão de que a manutenção de uma infecção no campo, como a de microsporídeos em geral, deve-se muito mais à transmissão horizontal do que à vertical, sendo que em alguns casos, esta última não seria capaz de manter sozinha uma microsporidiose por muito tempo nas populações hospedeiras (Fine, 1975; Andreadis & Hall, 1979b; Anderson & May, 1981 e Brown, 1987).

Uma vez que as pupas e fêmeas adultas estudadas no presente trabalho estavam livres de qualquer indício de infecção, permanece em aberto o mecanismo pelo qual livram-se do microsporídeo, visto terem se originado de larvas seguramente infectadas. A hipótese mais plausível é que durante o estágio de pupa, devido a todo um rearranjo de tecidos e alterações fisiológicas, a infecção é debelada, sendo eliminadas todas as suas formas junto com os resíduos metabólicos durante a metamorfose. Exemplos de infecções por microrganismos patogê-

nicos sendo debeladas no estágio pupal devido ao processo histolítico característico dessa fase são conhecidos em dípteros muscóides (Balzan, 1937 *apud* Wigglesworth, 1972). Além disso, microrganismos não patogênicos, como algumas bactérias, também são destruídos no processo de histólise na pupa de vários lepidópteros e ortópteros (Metalnikov, 1908 e Tauber, 1940 *apud* Wigglesworth, 1972).

Acredita-se que com os resultados deste trabalho, aqui descritos, novos esclarecimentos e novas dúvidas tenham sido sugeridos quanto ao conhecimento dos diferentes aspectos investigados desse patógeno tão amplamente distribuído entre os simulídeos da América do Sul e ainda tão pouco conhecido.

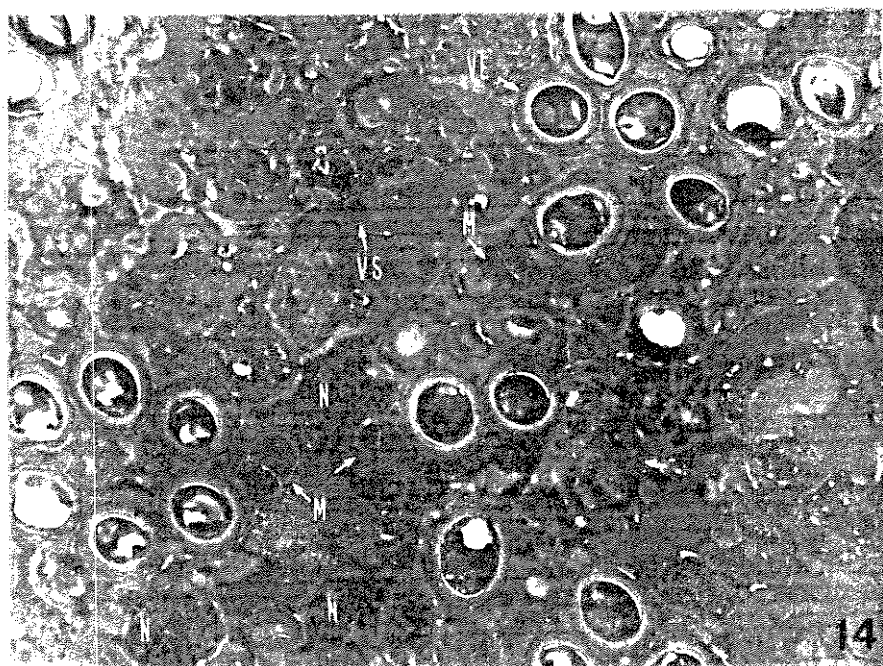
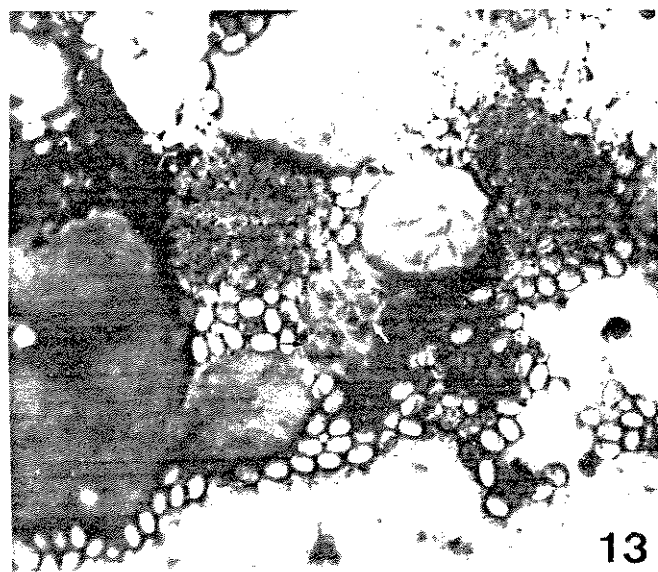
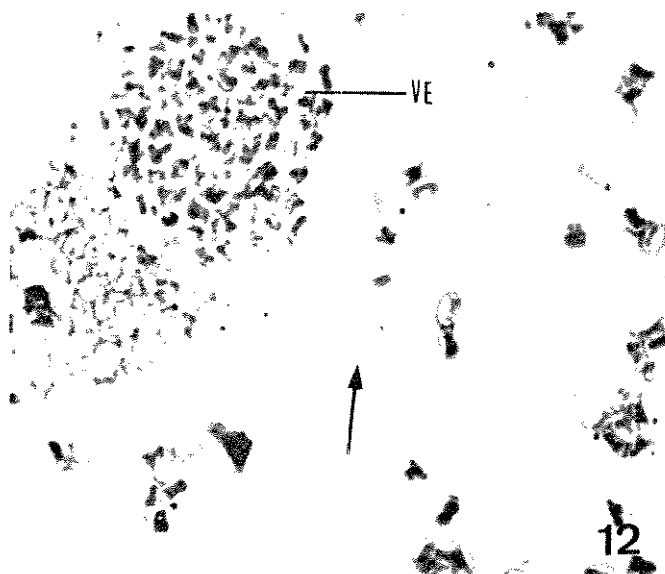


FIGURA 12. Esporo de *P. simulii* com filamento polar parcialmente extrudido (seta); (VE) = vesícula do esporóforo com aspecto de mórula (1.300x).

FIGURA 13. Divisões celulares no início de esporogonia de *P. simulii* (setas) (950x).

FIGURA 14. Aspecto geral de xenoma sincicial em tecido adiposo infectado por *P. simulii*. (N) = núcleo da célula hospedeira; (M) = meronte em arranjo diplocariótico; (VS) = vesícula de secreção; (VE) = vesícula do esporóforo (4.325x).

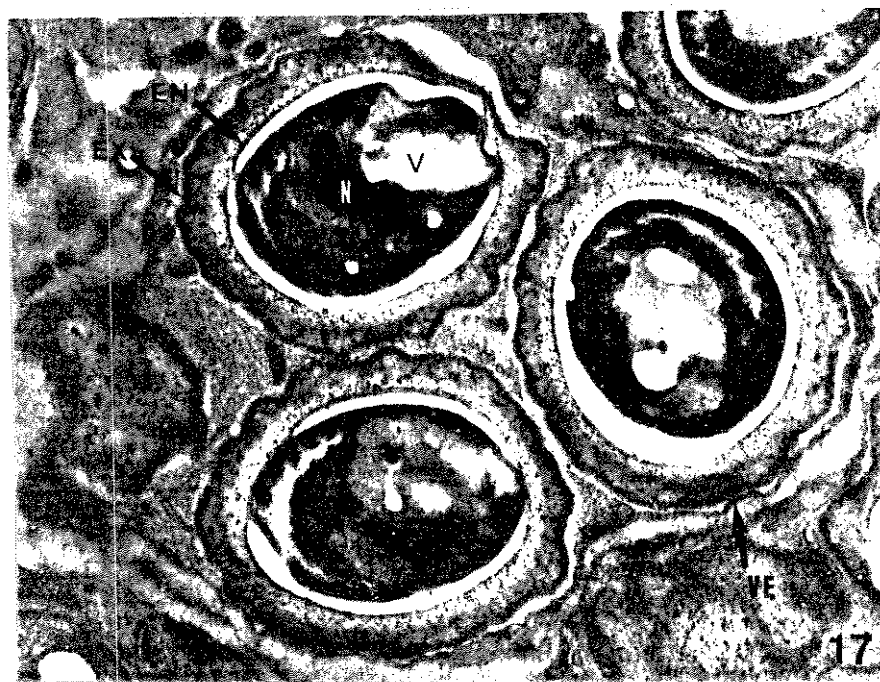
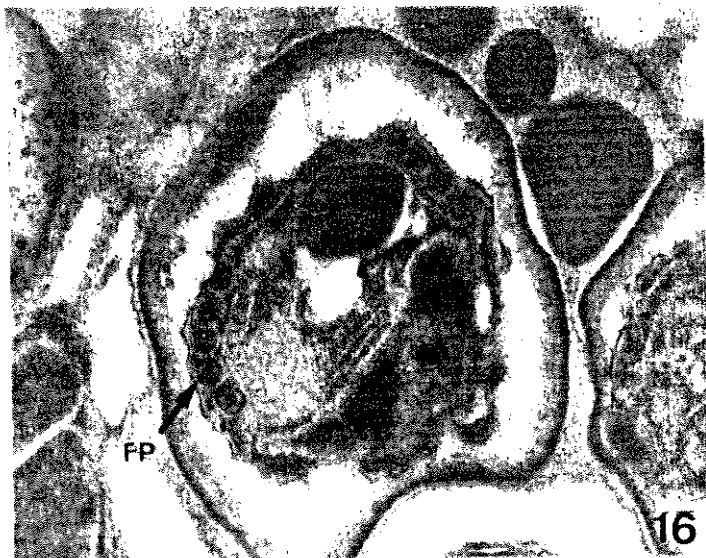


FIGURA 15. Meronte de *P. simulii* evidenciando complexos sinaptonêmicos (setas); (VS) = vesícula de secreção; (ST) = secreção tubular (13.200x).

FIGURAS 16 E 17. Esporos de *P. simulii*. (FP) = filamento polar; (EX) = exósporo ; (EN) = endósporo ; (N) = núcleo do esporo; (V) = vacúolo posterior; (VE) = vesícula do esporóforo (23.320x e 16.720x , respectivamente).

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem elaborar conclusões de ordem geral referentes à ecologia da relação patógeno-hospedeiro, além de outras referentes ao aspecto patológico da doença causada por *Folidispyrenia simulii* nos borrachudos estudados.

1. As três espécies de borrachudos avaliadas, *Simulium pertinax*, *S. subpallidum* e *S. pruinosum*, sofrem a doença.
2. A infecção, quando detectada, ocorre em níveis baixos em larvas de *S. pruinosum*, enquanto epizootias de *F. simulii* são frequentes em larvas de *S. pertinax* e *S. subpallidum*.
3. O inverno e o outono são as épocas do ano mais estressantes para as larvas de simúlídeos, de forma a favorecer o aparecimento de epizootias da microsporidiose estudada.
4. As larvas pequenas de *S. pertinax* e de *S. subpallidum* são mais afetadas pela doença do que larvas médias e grandes.

5. Os níveis de infecção diferenciados em larvas, além da não detecção do patógeno em pupas e adultos originados de indivíduos infectados, indicam que a manutenção da doença seja devida a um mecanismo de transmissão horizontal.
6. A microsporidiose por *P. simulii* causa um retardo significativo no desenvolvimento dos indivíduos infectados, fenômeno conhecido como metatetelia; além de provocar alterações nas respostas comportamentais das larvas infectadas.
7. O tecido adiposo visceral é o sítio principal da infecção nas larvas hospedeiras.
8. O epitélio intestinal médio e o vaso sanguíneo dorsal das larvas de borrachudos são estruturas atingidas indiretamente pela infecção por *P. simulii*, apresentando alterações histopatológicas.
9. Um mecanismo de debelação da doença, ainda não bem conhecido, ocorre durante o estágio de pupa do hospedeiro, liberando o adulto emergente da infecção.

10. A evidenciação de meiose na merogonia de *P. simulii* revela que seu ciclo de vida é complexo, à semelhança de outros microsporídeos patogênicos à hospedeiros aquáticos, apresentando estruturas e arranjos típicos do grupo de microsporídeos dimórficos.
11. A microsporidiose causada por *P. simulii* não representa importante fator de controle populacional das espécies hospedeiras estudadas, se considerado seu efeito direto sobre a mortalidade nos estágios de larva, pupa e adulto.

6. RESUMO

No presente trabalho foi avaliada a ocorrência natural da microsporidiose causada por *Polidispyrenia simulii* em uma comunidade de simulídeos composta por três espécies, *Simulium pertinax*, *S. subpallidum* e *S. pruinosum*, em um riacho pertencente à bacia do rio Jaguari, no município de Morungaba, SP.

Os resultados obtidos a partir de amostragens periódicas de larvas ao longo de um ano revelaram que as três espécies de simulídeos são susceptíveis à *P. simulii*, sendo que este ocorre em frequentes epizootias nas populações larvais de *S. pertinax* e *S. subpallidum*, enquanto sua presença em *S. pruinosum* foi detectada muito raramente.

As frequências de infecção em larvas pequenas, médias e grandes indicam que larvas pequenas são mais afetadas pela doença. Além das frequências de infecção diferenciadas nas três classes de tamanho, a ausência da infecção em pupas e adultos originados de indivíduos infectados indicam que a manutenção da doença no campo deve-se em grande parte a um mecanismo de transmissão horizontal.

Estudos de laboratório revelaram que a infecção por *P. simulii* provoca o fenômeno de metatetelia nos indivíduos doentes, além de alterações nas respostas comportamentais destas. Estas alterações provavelmente comprometem a capacidade de competição por substrato para fixação e sítios de alimentação, além de aumentar a susceptibilidade dos indivíduos infectados a outros inimigos naturais, como predadores e parasitas.

Estudos histopatológicos, tanto a nível de microscopia óptica como eletrônica, revelaram que *P. simulii* infecta exclusivamente o tecido adiposo visceral das larvas, provocando sua hipertrofia com formação de xenoma sincicial. A infecção afeta indiretamente o epitélio intestinal médio e o vaso sanguíneo dorsal das larvas. No primeiro caso, provoca um total desarranjo das células epiteliais, inclusive reduzindo a luz do intestino, influenciando assim na absorção de nutrientes. No segundo caso, há um aumento da luz do vaso sanguíneo dorsal.

Nenhum sinal de infecção ou qualquer alteração histopatológica foi detectado nos demais tecidos e sistemas tanto de larvas infectadas como de pupas e adultos originados de indivíduos doentes. Neste último caso, um mecanismo de eliminação da doença deve ocorrer durante o estágio de pupa do hospedeiro, de forma a livrar o adulto da doença.

Estudos bionômicos de *P. simulii* revelaram a existência de arranjos diplocarióticos na fase de merogonia, assim como evidências da ocorrência de meiose ainda nesta fase. Estes resultados mostram que o ciclo de *P. simulii* é complexo, à semelhança de outros microsporídeos patogênicos à dípteros aquáticos.

7. SUMMARY

The present work was undertaken to investigate natural occurrence of *Polidispyrenia simulii* (Microsporida; Pleistophoridae) in larvae populations of blackfly and to study ecological and pathological aspects of the pathogen-host relation. This work was undertaken under field and laboratory conditions. Field work was done with *Simulium pertinax*, *S. subpallidum* and *S. pruinatum* larvae while laboratory work was done with larvae, pupae and adults of *S. pertinax* and *S. subpallidum*.

All these species occurred in a stream nearby Morungaba/SP, a city located 60 km easterly from Campinas/SP.

All the species investigated were susceptible to *P. simulii*. The pathogen occurred frequently in epizootic levels in *S. pertinax* and *S. subpallidum* larvae while it was uncommon in *S. pruinatum* larvae.

The infection frequencies of *P. simulii* in the larvae of different sizes suggests that small larvae are the most affected by the disease.

The different infection levels in the size classes and the fact that pupae and adults originated from infected individuals were free of infection indicate that the microsporidiosis is maintained in the field population by a mechanism of horizontal transmission.

Laboratory studies showed that the microsporidiosis caused metatetely in infected larvae, and that the behavioural responses of the infect individuals were altered.

Histopathological studies showed that *P. simulii* infected only the fat body causing syncytial xenomas and hypertrophy of that tissue. The midgut and the dorsal vessel were affected undirectly, showing disturbance in the cells arrangement. There were no signs of infection in the other tissues and systems of infected larvae, pupae and adults originated from infected individuals. This fact suggests that the disease must be eliminated during the pupal development.

Bionomic studies of *P. simulii* showed a diplokarya arrangement and meiosis in the sporogonial plasmodia producing haploid spores. This fact indicated that life cycle of this pathogen must be complex, as the others microsporidia pathogenic to aquatic hosts.

B. LITERATURA CITADA

- Alger, N.E. & A.H. Undeen. 1970. The control of a microsporidian, *Nosema* sp., in an anopheline colony by an egg-rinsing technique. J. Inv. Pathol., 15: 321-327.
- Anderson, R.M. & May, R.M. 1979. Population biology of infectious diseases: part I. Nature, 280: 361-367.
- Anderson, R.M. & May, R.M. 1981. The population dynamics of micro-parasites and their invertebrate hosts. Phil. Trans. Roy. Soc. London, 221: 451-524.
- Andrade, C.F.S. 1989. Ecologia de supressão de populações de culicídeos e simuliídeos. Tese de Doutorado / UNICAMP, 253 pp.
- Andrade, C.F.S. & A. Castello Branco Jr. 1988. Influência do tipo de criadouro no controle de *Simulium pertinax* Kollar, 1832 (Diptera Simuliidae). I. Sime. Nac. Contr. Biol. Pragas e Vetores (Rio de Janeiro/RJ). Resumos: 47.
- Andrade, C.F.S. & A. Castello Branco Jr. 1990. Methods for field detection of resistance to temephos in simuliids - Larval esterase level and topical application to adults. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 85: 291-298.
- Andrade, C.F.S. & A. Castello Branco Jr. 1991a. Susceptibilidade de populações de *Simulium pertinax* Kollar, 1832 (Culicomorpha, Simuliidae) ao temephos e a um formulado à base de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Rev. Saúde Pública, 25 (no prelo).
- Andrade, C.F.S. & A. Castello Branco Jr. 1991b. O borrachudo vai à escola? Relato de uma experiência de ensino como suporte ao Manejo Integrado de Pragas. Rev. Ens. Ciências, 24 (no prelo).
- Andreadis, T.G. 1983. Life cycle and Epizootiology of *Amblyospora* sp in the mosquito, *Aedes cantator*. J. Protozool., 30: 509-518.
- Andreadis, T.G. 1988. Comparative susceptibility of the copepod *Acanthocyclops vernalis* to a microsporidian parasite, *Amblyospora connecticus*, from the mosquito *Aedes cantator*. J. Inv. Pathol., 52: 73-77.
- Andreadis, T.G. 1989. Infection of a field population of *Aedes cantator* with a polymorphic microsporidium, *Amblyospora connecticus* via release of the intermediate copepod host, *Acanthocyclops vernalis*. J. Am. Mosq. Control Assoc., 5: 81-85.
- Andreadis, T.G. 1990. Epizootiology of *Amblyospora connecticus* (Microsporida) in field populations of the Saltmarsh mosquito, *Aedes cantator*, and the cyclopoid copepod, *Acanthocyclops vernalis*. J. Protozool., 37: 174-182.

- Andreadis, T.G. & D.W. Hall 1979a. Development, ultrastructure, and mode of transmission of *Amblyospora* sp. in the mosquito. J. Protozool., 26: 444-452.
- Andreadis, T.G. & D.W. Hall 1979b. Significance of transovarial infections of *Amblyospora* sp. (Microsp.: Thelohanidae) in relation to parasite maintenance in the mosquito *Culex salinarius*. J. Inv. Pathol., 34: 152-157.
- Araújo-Coutinho, C.J.F.C.; Maia-Herzog, M. & B.C. Souza 1988. Levantamento das espécies do gênero *Simulium* Latreille (Diptera, Simuliidae) no litoral norte do Estado de São Paulo. Rev. Bras. Entomol., 32: 11-17.
- Avery, S.W. 1989. Horizontal transmission of *Parathelohania obesa* (Protozoa : Microsporidia) to *Anopheles quadrimaculatus* (Diptera : Culicidae). J. Inv. Pathol., 53: 424-426.
- Avery, S.W. & A.H. Undeen 1990. Horizontal transmission of *Parathelohania anophelis* to the copepod, *Microcyclops varicans*, and the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. J. Inv. Pathol., 54: 98-105.
- Balbani, G. 1882. Sur les microsporidies au psorospermies des articules. C. R. Acad. Sci., 95: 1168-1171.
- Barr, A.R. 1979. Epidemiological concepts for entomologists. Bull. Entomol. Soc. Am., 25: 129-130.
- Becnel, J.J.; Hazard, E.I. & T. Fukuda 1986. Fine structure and development of *Pilosporella chapmani* (Microspora: Thelohanidae) in the mosquito *Aedes triseriatus* (Say). J. Protozool., 33: 60-66.
- Bradley, G.H. 1935. Notes on the southern buffalo gnat *Eusimulium pecuarum* (Riley) (Diptera: Simuliidae). Proc. Ent. Soc. Washington 32: 60-64.
- Brown, G.C. 1987. Modeline. Em: Epizootiology of Insect Diseases. Fuxa, J.R. & Y. Tanada eds. John Wiley & Sons, 555 pp.
- Bulla Jr., L.A. & T.C. Cheng 1976. Comparative Pathobiology vol. 2 Systematics of the Microsporidia. Plenum Press, 510 pp.
- Canning, E.U. 1971. Transmission of Microsporidia. Proc. 4th Int. Colloq. Insect Pathol.: 415-424.
- Canning, E.U. & E.I. Hazard 1982. Genus *Pleistophora* Gurley, 1893: An assemblage of at least three Genera. J. Protozool., 29: 39-49.
- Canning, E.U.; Lom, J. & I. Dykora 1986. The Microsporidia of Invertebrates. Academic Press, NY e Londres, 289 pp.

- Castello Branco Jr., A. & C.F.S. Andrade 1988. Novo registro da ocorrência de microsporídeos e mermitídeos em populações de simuliídeos. II Sem. Nac. Vet. Urb. e Anim. Sinantr. / III Reunião Bras. Simuliídeos (Porto Alegre/RS), Resumos: 63-64.
- Castello Branco Jr., A., Cecílio, A.T.B.; Donato, J.L.; Mendeleck, E.; Moreira, L.F.D.P. & N.S. Cordeiro. 1987. Ocorrência de microsporídeos e mermitídeos em populações de Simuliidae. V Enc. Int. Est. Pesq. / UNICAMP. Resumos: 24.
- Castillo, J.M. 1980. Microsporidian pathogens of Culicidae (mosquitos). Bibliography on pathogens of medically important arthropods. Bull. Wld. Hlth. Org., 52(supl.): 33-46.
- Chapman, H.C. 1974. Biological control of mosquito larvae. Ann. Rev. Entomol., 19: 33-59.
- Charnetski, W.A. & W.O. Haufe 1981. Control of *Simulium arcticum* Malloch in Northern Alberta, Canada. Em: Blackflies - The future for biological methods in integrated control. Laird, M. ed. Academic Press, 398 pp.
- Cheng, T.C. 1986. General Parasitology. 2ª edição. Academic Press, NY e Londres, 827 pp.
- Condon, W.J. & R. Gordon 1977. Some effects of Mermithidae parasitism on the larval blackflies *Prosimulium mixtum fuscum* and *Simulium venustum*. J. Invert. Pathol., 29: 56-62.
- Cordeiro, N.S. & A. Castello Branco Jr. 1988. Developmental cycle and histopathological studies of *Thelohanía* sp. (Microsporida: Thelohanidae) in larval blackflies (Diptera: Simuliidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 83(supl.): 232.
- Coscarón, S. 1986. Estado actual de los conocimientos biológicos, ecológicos y taxonómicos de los simulidos en la Región Neotropical. I Sem. Vet. Urb. e Anim. Sinantr. (São Paulo/SP). Resumos: 19-20.
- Coscarón, S. 1989. Los estudios ecológicos en simulídeos Neotropicales (Diptera: Insecta). Anais XI Congr. Bras. Entomol. (Campinas / SP), 2: 69-89.
- Crosskey, R.W. 1981. Geographical distribution of simuliidae. Em: Blackflies - The future for biological methods in integrated control. Laird, M. ed. Academic Press, 398 pp.
- Cupp, E.W. 1981. Blackfly physiology. Em: Blackflies - The future for biological methods in integrated control. Laird, M. ed. Academic Press, 398 pp.
- Dubitskii, A.M. 1981. Blackfly control occasioned by major hydroelectric projects in the URSS from 1955-1965. Em: Blackflies - The future for biological methods in integrated control. Laird, M. ed. Academic Press, 398 pp.

- Edman, J.D. & K.R. Simmons 1985. Rearing and colonization of black flies (Diptera: Simuliidae). J. Med. Entomol., 22: 1-17.
- Ezenwa, A.O. 1974. Studies on host-parasite relationships of Simuliidae with mermithids and microsporidians. J. Parasitol., 60: 809-813.
- Fine, P.E.M. 1975. Vectors and vertical transmission: an epidemic perspective. Ann. N.Y. Acad. Sci., 266: 173-194.
- Fine, P.E.M. & E.S. Sylvester 1977. Calculation of vertical transmission rates of infection, illustrated with data on an aphid-born virus. The Am. Nat., 112: 781-786.
- Fisher, F.M.Jr. & R.C. Sanborn 1964. *Nosema* as a source of juvenile hormone in parasitized insects. Biol. Bull. U.S.A., 126: 235-252.
- Frost, S. 1970. Microsporidia (Protozoa: Microsporidia) in Newfoundland blackfly larvae (Dipt.: Simul.). Can. J. Zool., 48: 890-891.
- Fuxa, J.R. & Y. Tanada 1987. Epidemiological concepts applied to insect epizootiology. Em: Epizootiology of Insect Diseases. Fuxa, J.R. & Y. Tanada eds. John Wiley & Sons, 555 pp.
- Garcia, J. J. 1989. *Helmichia simuliae* sp. nov. (Microspora, Thelohanidae), una nueva especie de Microsporidio patogena de larvas de simulidos de la Republica Argentina. Neotropica, 35: 71-79.
- Garcia, J.J.; Hazard, E.I. & T. Fukuda 1989. Preliminary report of Microsporidia in Simuliidae larvae from Argentina. J. Am. Mosq. Cont. Assoc., 5: 64-69.
- Gassouma, M.S.S. 1972. Microsporidian parasites of *S. ornatum* Mg in South England. Parasitology, 65: 27-45.
- Gaugler, R.R. & W.M. Brooks 1975. Sublethal effects of infection by *Nosema heliothidis* in the Corn Earworm, *Heliothis zea*. J. Inv. Pathol., 26: 57-63.
- Gordon, R.; Ebsary, B.A. & G.F. Bennett 1973. Potentialities of mermithid nematods for the biocontrol of blackflies (Diptera: Simuliidae) - A Review. Exp. Parasitol., 33: 226-238.
- Grundler, J.A.; Hostetter, D.L. & A.J. Keaster 1987. Laboratory evaluation of *Vairimorpha necatrix* (Microspora: Microsporidia) as a control agent for the Black Cutworm (Lepidoptera: Noctuidae). Environ. Entomol., 16: 1228-1230.
- Guimarães, E.L.G. 1988. Biologia do *Simulium pertinax* Kollar, no Estado do Paraná. II Sem. Nac. Vet. Urb. e Anim. Sinantr. / III Reunião Bras. Simulídeos (Porto Alegre/RS), Resumos: 82-83.
- Gurley, R.R. 1893. Classification of the Myxosporidia, a group of protozoan parasites infesting fishes. Bull. U. S. Fish. Com. 1891, 11: 407-420.

- Habib, M.E.M. & C.F.S. Andrade 1986. Bactérias entomopatogênicas. Em: Controle Microbiano de Insetos. Alves, S.B. ed. Manole Ltda., 407 pp.
- Hall, I.M. 1954. Studies of microorganisms pathogenic to sod webworm. Hilgardia, 22: 535-565.
- Harding, J. & M.H. Colbo 1981. Competition for attachment sites between larvae of Simuliidae (Diptera). Can. Entomol., 113: 761-776.
- Hazard, E.I. & C.S. Lofgren 1971. Tissue specificity and systematics of a *Nosema* in some species of *Aedes*, *Anopheles* and *Culex*. J. Inv. Pathol., 18: 16-24
- Hazard, E.I. & J.W. Brookbank 1984. Karyogamy and meiosis in an *Amblyospora* sp. (Microspora) in the mosquito *Culex salinarius*. J. Inv. Pathol., 44: 3-11.
- Hazard, E.I.; Andreadis, T.G.; Joslyn, D.J. & E.A. Ellis 1979. Meiosis and its implications in the life cycles of *Amblyospora* and *Paratetelohania* (Microspora). J. Parasitol., 65: 117-122.
- Hazard, E.I.; Ellis, E.A. & D.J. Joslyn 1981. Identification of Microsporidia. Em: Microbial Control of Pests and Plant Diseases - 1970-1980. Burges, H.D. ed. Academic Press, 949 pp.
- Hazard, E.I.; Fukuda, T. & J.J. Becnel 1985. Gametogenesis and plasmogamy in certain species of Microspora. J. Inv. Pathol., 46: 63-69.
- Heimpel, A.M. 1969. Microbial control of insects. Em: Insect Pest Management and Control. Nat. Acad. Sci. Res. Council Washington D.C./EUA.
- Henry, J.E. & E.A. Oma 1981. Pest control by *Nosema locustae*, a pathogen of grasshoppers and crickets. Em: Microbial Control of Pests and Plant Diseases - 1970 - 1980. Burges, H.D. ed. Academic Press, 949 pp.
- Hunter, D.M. 1978. The sequence of events in outbreaks of *Austrosimulium pestilens* Mackerras & Mackerras (Diptera: Simuliidae) Bull. Ent. Res., 68: 307-312.
- Jenkins, D.W. 1964. Pathogens, parasites and predators of medically important arthropods. (Annotated list and bibliography). Bull. Wld Hlth. Org., 30(supl.): 1-150.
- Kellen, W.R.; Chapman, H.C.; Clark, T.B. & J.E. Lindegren 1965. Host-parasite relationship of some *Tetelohania* (Nosematidae: Microsporidia) from mosquitoes. J. Inv. Pathol., 2: 161-166.
- Kettle, D.S. 1985. Medical and Veterinary Entomology. John Wiley & Sons, 658 pp.

- Kramer, J.P. 1970. Longevity of microsporidian spores with special reference to *Octospora muscaedomesticae* Flu. Acta Protozool., 8: 217-224.
- Kudo, R. 1924. A biologic and taxonomic study of the Microsporidia. Ill. Biol. Monogr., 2: 1-268.
- Laigo, F.M. & M. Tamashiro 1967. Interactions between a microsporidian pathogen of the lawn armyworm and the hymenopterous parasite *Apanteles marginiventris*. J. Invert. Pathol., 2: 546-554.
- Laird, M.; Colbo, M.; Finney, J.; Mokry, J. & A. Undeen 1980. Pathogens of Simuliidae (blackflies). Bibliography on pathogens of medically important arthropods. Bull. Wld. Hlth. Org., 58(supl.): 105-124.
- Léger, L. & E. Hesse 1922. Microsporidies bactériiformes et essai de systématique du groupe. C. R. Acad. Sci., 124: 327-330.
- Leitritz, E. 1959. Trout and salmon culture. California Dep. Fish & Game. Fish. Bull., nº 102, 169 pp.
- Levine, N.D.; Corliss, J.O.; Cox, E.E.G.; Deroux, G.; Grain, J.; Honigberg, B.M.; Leedale, G.F.; Loeblich, A.R.; Lom, J.; Lynn, D.; Merinfeld, E.G.; Page, F.C.; Poljansky, G.; Sprague, V.; Vavra, J. & F.G. Wallace 1980. A newly revised classification of the protozoa. J. Protozool., 27: 37-58.
- Liu, T.F. 1972. Ultrastructural changes in the nuclear envelope of larval fat body cells of *Simulium vittatum* (Dipt.) induced by microsporidian infection of *T. bracteata*. Tissue & Cell, 4: 493-502.
- Lord, J.C.; Hall, D.C. & E.A. Ellis 1981. Life cycle of a new species of *Amblyospora* (Microspora: Amblyosporidae) in the mosquito *Aedes taeniorhynchus*. J. Inv. Pathol., 32: 66-72.
- Loubés, C. 1979. Recherches sur la méiose chez les microsporidies: conséquences sur le cycles biologiques. J. Protozool., 26: 200-208
- Lozovei, A.L. 1988. Diatomaceae (Bacillariophyceae) componentes da alimentação das larvas de *Simulium* spp. (Diptera, Simuliidae), no rio Passaúna, Curitiba, Paraná, Brasil. II Sem. Nac. Vet. Urb. e Anim. Sinantr. / III Reunião Bras. Simulídeos (Porto Alegre/RS), Resumos: 80-81.
- Lozovei, A.L.; Da Cunha, M.C.I. & R.A. Bassi 1989. Estudos das espécies de simulídeos (Diptera: Simuliidae) que se procriam em "vertedouros" de açudes de piscicultura, região metropolitana de Curitiba, Paraná, Brasil. Anais XI Congr. Bras. Entomol. (Campinas/SP) 3: 103-111.
- Lutz, A. 1910. Segunda contribuição para o conhecimento das espécies brasileiras do gênero "*Simulium*". Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2: 213-267.

- Lutz, A. & A. Splendore 1904. Ueber Febrine und Verwandte Mikrosporidien. Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Originale. Bd. XXXVI n°5.
- Lutz, A. & A. Splendore 1908. Ueber Febrine und Verwandte Mikrosporidien. Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Originale. Bd. XLVI n°4.
- Maddox, J.V. 1973. The persistence of the microsporidia in the environment. Ent. Soc. Am. Misc. Publ., 2: 99-104.
- Maddox, J.V. 1987. Protozoan diseases. Em: Epizootiology of Insect Diseases. Fuxa, J.R. & Y. Tanada eds. John Wiley & Sons, 555 pp.
- Maddox, J.V.; Brooks, W.M. & J.R. Fuxa 1981. *Vairimorpha necatrix*, a pathogen of agricultural pests: potential for pest control. Em: Microbial Control of Pests and Plant Diseases - 1970 - 1980. Burges, H.D. ed. Academic Press, 949 pp.
- Maia-herzog, M. & M.L. Felipe-Bauer 1986. Contribuição ao estudo dos culicídeos e *Simulium* do Rio de Janeiro: frequência horária e mensal. XIV Congr. Bras. Zool. (Juiz de Fora/MG), Resumos: 60.
- Marino, G.; Coscarón, S.; Maurand, J.; Loubes, C. & F. Cabeza Meckert 1979. Sobre la presencia de *Pleistophora simulii* (Lutz & Splendore) en la región Austral de America. Neotropica, 25: 127-132.
- Maurand, J. 1975. Les Microsporidies des larves de Simulies. Ann. Parasitologie, 50: 371-396.
- McLaughlin, R.E. 1971. Use of protozoans for microbial control of insects. Em: Microbial Control of Insects and Mites. Burges, H.D. & N.W. Hussey eds. Academic Press, 861 pp.
- Mollenhauer, H.H. 1964. Plastic embedding mixtures for use in electron microscopy. Stain. technol., 32: 111-114.
- Moreira, G.R.P. & G. Sato 1988. Aspectos da ecologia de populações de *Simulium* (*Inaequalium*) *nogueirai* D'Andretta & González, 1964 (Diptera: Culicomorpha). II Sem. Nac. Vet. Urb. e Anim. Sinantr. / III Reunião Bras. Simulídeos (Porto Alegre/RS), Resumos: 80-81.
- Nelson, J.B. 1962. An intracellular parasite resembling a microsporidian associated with ascites in Swiss mice. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 102: 714-717.
- Ogata, K. 1981. Preliminary report of Japan-Guatemala Onchocerciasis control pilot project. Em: Blackflies - The future for biological methods in integrated control. Laird, M. ed. Academic Press, 398 pp.
- Onstad, D.W. & J.V. Maddox 1989. Modeling the effects of the microsporidium, *Nosema pyrausta*, on the population dynamics of the insect, *Ostrinia nubilalis*. J. Inv. Pathol., 53: 410-421.
- Patrus, O.A. 1989. Fogo selvagem, endemia brasileira. Ciência Hoje, 10: 8-9.

- Payne, N.M. 1933. A parasitic hymenopteron as a vector of an insect disease. Entomol. News, 44: 22.
- Pegoraro, R.A. & G.R.P. Moreira 1986. Bioecologia dos simulídeos do Vale do Itajaí, SC. I. Sem. Nac. Vet. Urb. e Anim. Sinantr. (São Paulo/SP), Resumos: 21.
- Pessôa, S.B. & A.V. Martins 1982. Parasitologia Médica. 11ª edição Edit. Guanabara-Koogan, 872 pp.
- Petersen, J.J. 1985. Nematodes as biological control agents: part I. Mermithidae. Adv. Parasitol., 24: 307-344.
- Reisen, W.K. 1977. The ecology of Honey Creek, Oklahoma: population dynamics and drifting behavior of three species of *Simulium* (Diptera: Simuliidae). Can. J. Zool., 55: 325-337.
- Reynolds, E.S. 1963. The use of lead citrate in electron microscopy. J. Cell. Biol., 12: 208-212.
- Roberts, D.W. & M.A. Strand 1977. Pathogens of Meddically Important Arthropods. Bull. Wld. Hlth. Org., 55(supl.1): 1-419.
- Ruas Neto, A.L. & R.S. Matias 1985. Controle Integrado do *Simulium* (*Chirostilbia*) *perfinax* Kollar, 1832. 2. A competição interespecífica como possível método de controle natural. R. Saúde (Porto Alegre), 12: 21-24.
- Shadduck, J.A. & S.F. Pakes 1971. Encephalitozoonosis (Nosematosis) and toxoplasmosis. Am. J. Pathol., 64: 657-671.
- Shelley, A.J. 1988. Vector aspects of the epidemiology of Onchocerciasis in Latin America. Ann. Rev. Entomol., 30: 337-366.
- Sinnecker, H. 1976. General Epidemiology. John Wiley & Sons, pp.
- Smirnoff, W.A. 1968. Adaptation of the microsporidian *Thelohanbia pristiphorae* to the tent caterpillars *Malacosoma disstria* and *Malacosoma americanum*. J. Inv. Pathol., 11: 321-325.
- Souza, M.A.T. 1984. Atendimento médico por picada de simulídeos. R. Saúde (Porto Alegre/RS), 11: 8-11.
- Sprague, V. 1976. Classification and phylogeny of the Microsporidia. Em: Comparative Pathobiology vol. 2 - Systematics of the Microsporidia. Bulla Jr., L.A. & T.C. Cheng eds. Plenum Press, 510 pp.
- Steinhaus, E.A. 1949. Principles of Insect Pathology. McGraw Hill, NY, 757 pp.
- Steinhaus, E.A. 1954. The effects of disease on insect populations. Hilgardia, 23: 197-261.

- Steinhaus, E.A. 1957. Microbial diseases of insects. Ann. Rev. Microbiol., 11: 165-182.
- Strickland, E.H. 1911. Some parasites of *Simulium* larvae and their effects on the development of the host. Biol. Bull., 21: 302-338.
- Strickland, E.H. 1913. Further observations on the parasites of *Simulium* larvae. J. Morphol., 24: 43-105.
- Strieder, M.N. & E. Corseull 1988. Avaliação preliminar de atividade hematofágica de Simuliidae (Diptera: Nematocera) em Picada Verão Sapiiranga - RS. II Sem. Nac. Vet. Urb. e Anim. Sinantr. / III Reunião Bras. Simulídeos (Porto Alegre/RS), Resumos: 88-89.
- SUCAM 1987. Informações Epidemiológicas. Publicação interna do DECEM/SUCAM - MS nº 55, 2 pp.
- Sweeney, A.W.; Dogget, S.L. & R.G. Piper 1990. Life cycle of *Amblyospora indicola* (Microspora : Amblyosporidae) a parasite of the mosquito *Culex sitiens* and of *Apocyclops* sp. copepods. J. Inv. Pathol., 55: 428-434.
- Tanada, Y. 1959. Microbial control of insect pests. Ann. Rev. Entomol., 4: 277-302.
- Tanada, Y. 1976. Epizootiology and microbial control. Em: Comparative Pathobiology - vol. 1. Biology of the Microsporidia. Bulla Jr L.A. & T.C. Cheng eds. Plenum Press, 371 pp.
- Thélohan, P. 1892. Observations sur les Myxosporidies et essai de classification de ces organismes. Bull. Soc. Philom. Paris, 4: 173-174.
- Thomson, H.M. 1958. Some aspects of the epidemiology of a microsporidian parasite of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.). Can. J. Zool., 36: 309-316.
- Tuzet, O.; Maurand, J.; Fize, A.; Michel, R. & B. Fenwick 1971. Proposition d'un nouveau cadre systématique pour les genres de Microsporidies. C. R. Acad. Sci., 272: 1268-1271.
- Undeen, A.H. 1981. Microsporidia infections in adult *Simulium vittatum*. J. Inv. Pathol., 38: 426-427.
- Undeen, A.H.; Vavra, J. & K.H. Rothfels 1984. The sex of larval simuliids infected with Microsporidia. J. Inv. Pathol., 43: 126-127.
- Vavra, J. & J.V. Maddox 1976. Methods in microsporidiology. Em Comparative Pathobiology vol. 1 - Biology of the Microsporidia. Bulla Jr., L.A. & T.C. Cheng eds. Plenum Press, 371 pp.
- Wallace, J.B. & R.W. Meritt 1980. Filter-feeding ecology of aquatic insects. Ann. Rev. Entomol., 25: 103-132.

- Waters, T.F. 1972. The drift of stream insects. Ann. Rev. Entomol., 17: 253-272.
- Weissemberg, R. 1976. Microsporidian interactions with host cells. Em: Comparative Pathobiology vol. 1 - Biology of the Microsporidia. Bulla Jr., L.A. & T.C. Cheng eds. Plenum Press, 371 pp.
- Weiser, J. 1963. Sporozoa infections. Em: Insect Pathology, an Advanced Treatise. Steinhaus, E.A. ed. Academic Press, 661 pp.
- Weiser, J. 1964. On the taxonomic position of the genus *Encephalitozoon* Levaditi, Nicolau & Schoen, 1923 (Protozoa: Microsporidia). Parasitology, 54: 749-751.
- Weiser, J. 1969. Immunity of insects to protozoa. Em: Immunity to Parasitic Animals. Jackson, G.L.; Herman, R. & I. Singer eds. Appleton-Century-Crofts, 345 pp.
- Weiser, J. 1976a. Staining of the nuclei of microsporidian spores. J. Inv. Pathol., 28: 147-149.
- Weiser, J. 1976b. Microsporidia in invertebrates: host-parasite relations at the organismal level. Em: Comparative Pathobiology vol. 1 - Biology of the Microsporidia. Bulla Jr., L.A. & T.C. Cheng eds. Plenum Press, 371 pp.
- Weiser, J. 1977. An Atlas of Insect Diseases. Czechoslovak Acad. Sci., 240 pp.
- Weiser, J. 1982. Guide for field determination of major groups of pathogens affecting arthropod vectors of human diseases. Wld. Hlth. Org./WRC/82.840, 43 pp.
- Weiser, J. & A.H. Undeen 1981. Diseases of blackflies. Em: Blackflies-The future for biological methods in integrated control. Laird, M. ed. Academic Press, 398 pp.
- Weiser, J. & S. Prasertphon 1982. Microsporidia infecting *Simulium damnosum* in Nigeria. Z. fur Angew. Entomol., 93: 93-101.
- Wenk, F. 1981. Bionomics of adult blackflies. Em: Blackflies - The future for biological methods in integrated control. Laird, M. ed. Academic Press, 398 pp.
- Wigglesworth, V.B. 1972. The Principles of Insect Physiology. John Wiley & Sons Inc., 827 pp.
- Wilson, G.G. 1983. Protozoans for insect control. Em: Microbial Viral Pesticides. Kurtak, E. ed. Maral dekker Inc., pp.
- Youdeowei, A. & M.W. Service 1983. Pest and Vector Management in the Tropics. Longman Group Ltd., Londres, 199 pp.