

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



PATOLOGIA E EPIZOOTIOLOGIA DE *Simulium pertinax* (DIPTERA;
SIMULIIDAE) INFECTADO POR *Polydispyrenia simulii* (MICROSPORA;
DUBOSCQIIDAE) E *Gastromermis viridis* cf. (NEMATODA; MERMITHIDAE).

Armando Castello Branco Júnior

Tese apresentada à Universidade Estadual
de Campinas (UNICAMP) como requisito
parcial para obtenção do grau de Doutor em
Ciências Biológicas (Parasitologia).

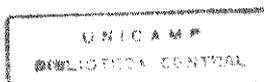
Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Armando Castello Branco
Júnior 21
e aprovada pela Comissão Julgadora. 10/94

Orientador:

Prof. Dr. Mohamed E. M. Habib

Campinas

1994



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. Mohamed E. M. Habib, pela orientação, amizade e apoio durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Fernando S. de Andrade, pela amizade e estímulo.

Em especial, gostaria de prestar uma homenagem aos profs. e amigos Mohamed e Fernando pela conduta profissional que sempre norteou seus caminhos, servindo hoje como modelo para eu seguir.

Ao Prof. Dr. Sixto Coscarón, do Museu da Faculdade de Ciências Naturais de La Plata/ Argentina, pela identificação da espécie de simulideo.

Ao Prof. Dr. Juan J. Garcia, do Centro de Estudos de Patologia de Insetos e Vetores (CEPAVE) da Universidade Nacional de La Plata/ Argentina, pela identificação do microsporídeo.

À FAPESP, pelo apoio financeiro durante a maior parte do desenvolvimento deste trabalho e, pelo respeito e seriedade com que esta instituição tem pela pesquisa no Brasil.

Ao Prof. Nery Aguiar Porchia, pró-reitor acadêmico da Universidade de Marília (UNIMAR), pela confiança e apoio para a elaboração final desta tese.

À Profª. Jusiara de Araújo H. Gurgel, diretora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/ UNIMAR, pela compreensão e apoio.

Ao Prof. Vitalino Pires, coordenador do Laboratório de Informática/ UNIMAR, e à Sra. Guiomar, Vera, Fabiano e Lauro, pelo apoio para a impressão final deste trabalho.

Aos amigos e colegas da UNIMAR pelo carinho desde o início.

Aos amigos, professores e funcionários do Depto. de Parasitologia, IB/ UNICAMP e, em especial, à Sra. Cleusa pela amizade e apoio técnico nas preparações histológicas.

Aos amigos, professores e funcionários do Depto. de Zoologia, IB/ UNICAMP e, em especial ao Sr. Mário, Sr. Otávio e Sr. João (*in memoriam*) pela amizade e assistência sempre prestada.

Aos profs. Drs. Amaral, Eloisa, Cecília e Cláudia, do Depto. de Zoologia - IB/ UNICAMP, pela amizade e apoio especialmente nos momentos de mudança de vida.

Aos grandes AMIGOS, Luciana, Miriam, Heitor, Rodolfo e Roseli, pela amizade, companheirismo e constante apoio em todas as fases deste trabalho, mesmo à distância.

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

Aos meus pais e irmãos, sempre presentes, pela atenção, carinho e incentivo durante toda a minha vida.

À minha esposa Cláudia, amiga e companheira, que participou ativamente de todos os momentos deste trabalho e me apoiou especialmente nas situações mais difíceis. Obrigado pelo carinho, amor e sobretudo, paciência.

Ao Lucas, meu querido filho, sem o qual este trabalho nada significaria.

À vocês dois, Cláudia e Lucas, dedico este trabalho.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO HISTÓRICA	
2.1. OS BORRACHUDOS E SEUS EFEITOS DANOSOS	03
2.2. MÉTODOS DE CONTROLE DE BORRACHUDOS	12
2.3. BIOLOGIA E ASPECTOS EPIZOOTIOLÓGICOS DE MICROSPORÍDEOS E MERMITÍDEOS	20
3. MATERIAL & MÉTODOS	
3.1. IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES ESTUDADAS	33
3.2. COLETA E MANUTENÇÃO DE <i>Simulium pertinax</i> EM LABORATÓRIO	33
3.3. PATOLOGIA DE <i>Simulium pertinax</i> INFECTADO POR <i>Polydispyrenia simulii</i>	37
3.3.1. HISTOPATOLOGIA	37
3.3.2. PREVALÊNCIA DE <i>P. simulii</i> EM OVÁRIOS DE <i>S. pertinax</i>	37
3.3.3. INFLUÊNCIA DO PARASITISMO POR <i>P. simulii</i> NO DESENVOLVIMENTO DAS GÓNADAS DE <i>S. pertinax</i>	38
3.4. PATOLOGIA DE <i>Simulium pertinax</i> PARASITADO POR <i>Gastromermis viridis</i> cf.	39
3.4.1. PREVALÊNCIA DE <i>G. viridis</i> cf. EM POPULAÇÕES LARVAIS DE <i>S. pertinax</i>	39
3.4.2. SINTOMATOLOGIA EXTERNA E MORFOMETRIA	41
3.4.3. HISTOPATOLOGIA	41
4. RESULTADOS & DISCUSSÃO	
4.1. PATOLOGIA DE <i>Simulium pertinax</i> INFECTADO POR <i>Polydispyrenia simulii</i>	42
4.1.1. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM LARVAS DE <i>S. pertinax</i>	42
4.1.1.1. EPITÉLIO INTESTINAL	42
4.1.1.2. TECIDO ADIPOSEO	45
4.1.1.3. TECIDO MUSCULAR	48
4.1.1.4. DEMAIS TECIDOS E SISTEMAS	49
4.1.2. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM PUPAS DE <i>S. pertinax</i>	50
4.1.3. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM ADULTOS DE <i>S. pertinax</i>	53
4.1.4. ESTUDOS SOBRE A PREVALÊNCIA DE <i>P. simulii</i> EM OVÁRIOS DE <i>S. pertinax</i>	54

4.1.5. INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO POR <i>P. simulii</i> NAS GÔNADAS	
DE <i>S. pertinax</i>	56
4.1.5.1. DESCRIÇÃO DA OOGÊNESE DE FÊMEAS SADIAS	
DE <i>S. pertinax</i>	56
4.1.5.2. ESTUDOS MORFOMÉTRICOS	62
4.1.5.3. OBSERVAÇÕES EM MACHOS DE <i>S. pertinax</i>	67
4.2. PATOLOGIA DE <i>Simulium pertinax</i> PARASITADO POR <i>Gastromermis viridis</i> cf.	69
4.2.1. CARACTERIZAÇÃO DO RIACHO CRIADOURO	69
4.2.2. PREVALÊNCIA DE <i>G. viridis</i> cf. EM POPULAÇÕES	
DE LARVAS DE <i>S. pertinax</i>	72
4.2.3. SINTOMATOLOGIA EXTERNA E MORFOMETRIA	77
4.2.4. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM LARVAS DE <i>S. pertinax</i>	81
4.2.4.1. EPITÉLIO INTESTINAL	81
4.2.4.2. TECIDO MUSCULAR	82
4.2.4.3. GLÂNDULAS SALIVARES	84
4.2.4.4. TECIDO ADIPOSEO	84
4.2.4.5. DEMAIS TECIDOS E SISTEMAS	87
5. CONCLUSÕES	88
6. RESUMO	90
7. SUMMARY	92
8. LITERATURA CITADA	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 ... ESQUEMA DO SISTEMA DE CRIAÇÃO DE BORRACHUDOS EM LABORATÓRIO	35
Fig. 2 ... CÂMARA DE CONTENÇÃO DE ADULTOS DE BORRACHUDO	36
Fig. 3 ... LARVAS DE <i>S. pertinax</i> DE DIFERENTES CLASSES ETÁRIAS	40
Figs. 4-6 ... CORTE TRANSVERSAL DE LARVA DE <i>S. pertinax</i> INFECTADA POR <i>P. simulii</i>	44
Fig. 7 ... CORTE TRANSVERSAL DE LARVA SADIADA DE <i>S. pertinax</i>	47
Fig. 8 ... CORTE TRANSVERSAL DE LARVA DE <i>S. pertinax</i> INFECTADA POR <i>P. simulii</i>	47
Fig. 9 ... LARVA DE <i>S. pertinax</i> INFECTADA POR <i>P. simulii</i>	47
Fig. 10 ... CORTE TRANSVERSAL DE LARVA DE <i>S. pertinax</i> INFECTADA POR <i>P. simulii</i>	47
Figs. 11-13 ... CORTE TRANSVERSAL DE PUPA DE <i>S. pertinax</i> (COM 24 h DE DESENVOLVIMENTO) INFECTADA POR <i>P. simulii</i>	57
Figs. 18-21 ... SEQUÊNCIA DA OOGÊNESE EM <i>S. pertinax</i>	60
Fig. 22 ... DISTRIBUIÇÃO DOS PONTOS DE AMOSTRAGEM E RESPECTIVAS ALTITUDES AO LONGO DO RIACHO ESTUDADO	71
Fig. 23 ... PREVALÊNCIA ANUAL DE <i>G. viridis</i> cf. EM POPULAÇÕES LARVAIS DE <i>S. pertinax</i> NA REGIÃO DE MORUNGABA/ SP	73
Fig. 24 ... LARVA DE <i>S. pertinax</i> PARASITADA POR <i>G. viridis</i> cf.	78
Figs. 25-26 ... CORTE TRANSVERSAL DE LARVA DE <i>S. pertinax</i> PARASITADA POR <i>G. viridis</i> cf.	78
Figs. 27-28 ... CORTE TRANSVERSAL DE LARVA DE <i>S. pertinax</i> PARASITADA POR <i>G. viridis</i> cf.	83
Fig. 29 ... CORTE TRANSVERSAL DE LARVA SADIADA DE <i>S. pertinax</i>	83
Fig. 30 ... CORTE TRANSVERSAL DE LARVA DE <i>S. pertinax</i> PARASITADA POR <i>G. viridis</i> cf.	83

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	MORFOMETRIA DAS FASES DE DESENVOLVIMENTO FOLICULAR DE FÊMEAS SADIAS DE <i>S. pertinax</i>	63
Tabela 2	DIMENSÕES DOS FOLÍCULOS OVARIANOS (FASE I) DE ADULTOS DE <i>S. pertinax</i> SADIOS E DE FÊMEAS ORIGINADAS DE LARVAS INFECTADAS POR <i>P. simulii</i>	66
Tabela 3	NÚMERO DE FOLÍCULOS EM DESENVOLVIMENTO POR OVÁRIO DE FÊMEAS DE <i>S. pertinax</i> SADIAS E DE FÊMEAS ORIGINADAS DE LARVAS INFECTADAS POR <i>P. simulii</i>	66
Tabela 4	COMPRIMENTO MÉDIO DO CORPO DE LARVAS DE <i>S. pertinax</i> DE DIFERENTES CLASSES ETÁRIAS, SADIAS E PARASITADAS POR <i>G. viridis</i> cf.	80

1. INTRODUÇÃO

Do ponto de vista da Saúde Pública, certos insetos têm um papel importante pois, além de poderem causar danos diretos devido ao seu hábito alimentar; são, na maioria dos casos, vetores biológicos ou mecânicos de agentes causadores de doenças. Neste caso encontram-se os mosquitos anofelinos em primeiro lugar na disseminação da maior endemia mundial, a malária (Najera, 1989).

Os danos causados pelos insetos de importância médica são normalmente de difícil mensuração. Além do impacto econômico, ou seja, a redução da produtividade humana e até o possível comprometimento da economia de determinada região, também existe o aspecto social como a qualidade de vida do ser humano. Neste ponto são enquadrados, por exemplo, desde o problema de áreas com habitações humanas onde a presença de elevada densidade de mosca doméstica acarreta em um comprometimento da qualidade de vida, até extremos como a disseminação de doenças como é atualmente a dengue e o *Aedes aegypti* (Dip.; Culicidae) ou a doença de Chagas e seus redúvidos vetores no território brasileiro.

Infelizmente, nos países do terceiro mundo os investimentos financeiros na luta contra os insetos vetores e de importância médica são pequenos quando comparados aos investimentos para o controle de insetos praga agrícolas e de importância veterinária. As razões desta desigualdade são, sem dúvida, a relação custo benefício em seu sentido mais amplo e, a pequena preocupação com a saúde da população.

De qualquer modo, o controle dos insetos daninhos é um objetivo comum desde a Antiguidade e, para tal fim, o caminho é longo e lento.

Estima-se que a entrada de qualquer inseticida químico ou biológico no mercado, requer entre 7 a 12 anos de pesquisas (Herrett, 1989). Dentro deste intervalo de tempo, são desenvolvidos vários estudos envolvendo a eficiência do produto contra o inseto alvo, além dos estudos de impacto em espécies não alvo. Obviamente os estudos de Patologia de Insetos ocupam um lugar de destaque como pré-requisitos para os estudos de eficiência.

Existe a necessidade de se identificar, no inseto prejudicial, qual o sítio alvo de determinado agente biológico ou princípio ativo químico. Seu modo de ação, a nível celular e tecidual, e sua dinâmica no inseto alvo são fundamentais para a escolha de um agente microbiano ou princípio ativo químico.

Inseticidas químicos e biológicos, hoje amplamente empregados contra um grande espectro de insetos daninhos, tiveram como ponto de partida tais estudos de Patologia de Insetos (Habib, 1989).

Dentro deste contexto e dando continuidade às investigações desenvolvidas pelo presente autor em sua dissertação de Mestrado (Castello Branco Jr., 1991), o presente trabalho tem como objetivos abordar aspectos patológicos e epizootiológicos de dois agentes biológicos, *Polydispyrenia simulii* (Microspora; Duboscqiidae) e *Gastromermis viridis* cf. (Nematoda; Mermithidae), em *Simulium (Chirostilbia) pertinax* (Diptera; Simuliidae), uma espécie de borrachudo altamente antropofílica com ocorrência em várias regiões do território brasileiro, inclusive no Estado de São Paulo e que, devido à sua importância, é alvo de controle por programas de instituições governamentais e particulares.

2. REVISÃO HISTÓRICA

2.1. OS BORRACHUDOS E SEUS EFEITOS DANOSOS

Os borrachudos ou piúns como são conhecidos respectivamente no centro-sul e norte do Brasil, são dípteros pequenos pertencentes à família Simuliidae e geralmente de cor escura e aspecto corcunda.

Ocorrem em qualquer região do mundo desde que exista água corrente suficiente para atender às necessidades fisiológicas de suas fases imaturas. A hematofagia da grande maioria desses nematóceros os colocam na categoria de insetos daninhos em muitas regiões do mundo, inclusive no Brasil. Cerca de 10% das 1.554 espécies de borrachudos descritas no mundo (aprox. 150 espécies) apresentam afinidade por sangue humano ou de animais domesticados. Destas espécies, aproximadamente 43 se destacam por realmente causarem danos (Crossskey, 1981, 1990). Essas espécies podem ser agrupadas em duas categorias; as espécies vetoras de doenças e as espécies incômodas devido à perturbação e irritação que suas picadas causam.

Algumas vezes o incômodo ocorre mesmo sem haver picadas. Peterson (1977) relata uma situação impressionante ao atravessar uma nuvem de *Simulium vittatum* no Canadá. Segundo ele, a quantidade de adultos voando era tamanha que a própria respiração tornava-se difícil, além do fato de haver insetos entrando pelos ouvidos, nariz e roupas. Apesar desta situação, Peterson relata que nem ele nem qualquer integrante de sua equipe sofreram picada alguma.

É importante salientar que apenas as fêmeas têm o hábito hematofágico e que seu período de atividade é diurno restringindo-se, via de regra, a alguns períodos do dia especialmente no crepúsculo. No entanto, existem várias exceções quando a densidade populacional de borrachudo é elevada.

O hábito hematofágico 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), *S. orbitale* no Rio Grande do Sul (Souza, M.A.T., 1988, comun. pessoal, SEMA/RS) e em *S. pertinax* no Estado de São Paulo (Andrade & Castello Branco Jr., 1990; Castello Branco Jr., *no prelo*).

A localização do hospedeiro se faz por vários mecanismos como olfato, visão e tato. A emanção de gás carbônico e o odor característico do hospedeiro vertebrado servem de guias à longa distância para as fêmeas. À certa distância a localização passa a ser orientada pela visão e finalmente ao localizar o hospedeiro, pelo tato há a seleção do sítio para a picada (Bradbury & Bennett, 1974a, 1974b; Davies, 1978).

Os borrachudos são insetos telmófagos, ou seja, o aparelho bucal das fêmeas perfura a pele até cortar algum capilar e, da bolsa de sangue formada ela se alimenta. A saliva injetada no ato da picada contém substâncias anticoagulantes e anestésicas. Devido a esta última substância é que a picada é percebida apenas instantes após a fêmea já estar engurgitada.

A sensibilidade às substâncias da saliva do borrachudo é que causa os diferentes graus de irritação da pele à picada. Existem casos de indivíduos que chegam a ficar prostrados durante alguns dias sendo até hospitalizados apresentando sintomas como cefaléia, febre, náuseas e vômitos além de hipertrofia de gânglios linfáticos (Stokes, 1914; Gudgel & Grauer, 1954; Szabó, 1971; Brown & Berton, 1970; Zivkovic & Burany, 1972; Souza, 1984; Crosskey, 1990). O risco de infecções secundárias devido à coceira provocada pela picada também é uma realidade frequente, especialmente em crianças. De Villiers (1987) descreveu uma severa dermatite causada pela picada de borrachudo em áreas da África do Sul onde curiosamente as espécies que ocorrem têm pouca antropofilia. Casos de morte devido à reação alérgica desenvolvida pelas picadas são extremamente raros, tendo sido relatados no século passado por Noble (1861 *apud* Crosskey, 1990) e Riley (1887 *apud* Crooskey, 1990).

O espectro de dispersão dos borrachudos é grande, sendo relatadas capacidades de vôo superiores a 500 km (Garms & Walsh, 1987). No entanto, na maioria dos casos o deslocamento não ocorre por mais de alguns quilômetros (Andrade & Castello Branco Jr., 1990; Castello Branco Jr., *no prelo*).

O fator dispersão é muito importante não só para os estudos de epidemiologia das espécies vetoras mas também para a determinação dos danos causados e para o controle das espécies alvo. A dispersão de adultos de *S. pertinax* no litoral norte do Estado de São Paulo, em área sujeita ao controle químico, é apontada como responsável pelo avanço da resistência ao ingrediente ativo (temefós) usado em seu controle em áreas nunca tratadas no litoral sul do Estado do Rio de Janeiro (Andrade & Castello Branco Jr., 1990). O fator dispersão dos simulídeos é também o responsável pela extensão da área sob tratamento do Programa de Controle da Oncocercose (PCO) na África (Walsh *et al.*, 1979).

Quanto às espécies de borrachudo não vetoras, temos que sua classificação como pragas devido à densidade dos adultos e conseqüente número de picadas é ainda muito relativo. Em várias áreas no Brasil, como por exemplo no Estado do Rio de Janeiro, quando da construção da Usina Nuclear Angra I os níveis de ataque de *S. pertinax* eram da ordem de 400 borrachudos/ hora/ homem (bhh). Mais recentemente foram detectados níveis de 1.500 bhh no município de Ilhabela, no litoral norte do Estado de São Paulo (Andrade, C.F.S., 1994, comun. pessoal, Depto. Zoologia, IB, UNICAMP). Estes são sem dúvida situações insuportáveis, tal qual a relatada por Shelley e colaboradores (1987) onde detectaram-se níveis de ataque de *S. oyapockense* de 6.780 bhh na Amazônia. Por outro lado, na pequena área de "East Dorset" no sul da Inglaterra, apesar do reduzido número de pessoas picadas por *S. posticum* durante apenas algumas semanas do ano, a espécie é considerada praga sendo até exigido o seu controle pelos parlamentares britânicos (Hansford & Ladle, 1979).

São inúmeros os registros dos danos causados pelas espécies praga (não vetoras) em quase todas as partes do mundo.

Em 1962, os ataques de *S. articum*, *S. venustum* e *S. vittatum* em áreas ao longo do rio Athabasca, no Canadá, reduziu a produtividade geral da região a

níveis extremos não só pelo seu efeito no homem mas também nos seus animais de criação. No início da década de 70, ainda no Canadá, ataques maciços destas mesmas espécies causaram danos na pecuária das regiões norte e noroeste daquele país superiores a US\$ 600.000,00 (Charnetsi & Haufe, 1981; Shemanchuck, 1987). Fredeen (1977) relata que devido às perdas causadas no gado devido à *S. articum*, vários pecuaristas abandonaram essa atividade passando a cultivar cereais.

Ainda no Canadá e também nos EUA, notadamente no Estado de Nova York, *S. venustum* e *Prosimulium mixtum* causaram sérios danos (Peterson & West, 1960; West *et al.*, 1960; Crosskey, 1981, 1990). Na região das montanhas Apalaches (EUA) as espécies do complexo *S. jenningsi* também têm se tornado um problema (Crosskey, 1990).

Na América Central, mais especificamente no Panamá, *S. quadrivittatum* é um sério problema especialmente quando da construção da Usina Hidroelétrica de Chiriqui (Petersen *et al.*, 1983).

No Brasil, uma das espécies mais antropofílicas é *S. pertinax*. Seus danos às populações humanas são sérios nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, sendo comum o seu controle não só por parte de programas governamentais mas também por entidades particulares (Ruas Neto, 1984a, 1984b; Souza, 1984; Ruas Neto *et al.*, 1985; Andrade, 1986; AraújoCoutinho, 1988; Guimarães, 1986; Andrade *et al.*, 1987a; Castello Branco Jr. & Andrade, 1992).

Além de *S. pertinax*, também causam danos na região Sul do Brasil, *S. orbitale* e *S. nogueirai*. Espécies zoofílicas como *S. rubrithorax* podem se tornar sérios problemas devido à adequação ao sangue humano. Na região de Itatiba, no interior do Estado de São Paulo, nuvens de *S. rubrithorax* atacam frequentemente seres humanos, necessitando-se de medidas de controle (Andrade & Castello Branco Jr., dados não publicados, Depto. Zoologia, IB, UNICAMP).

Na Austrália e Nova Zelândia, *Austrosimulium pestilens*, *A. australense* e *A. unguatum* tornam-se problemas graves não apenas para o homem como também para os animais de criação (Dumbleton, 1973). Em 1973, o ataque de *A. pestilens*

reduziu em 15% a produção de leite em regiões de "Queensland" (Nova Zelândia) devido às perturbações que causou no gado leiteiro (Hunter, 1978).

No arquipélago das Ilhas Marquesas, *S. jolyi*, *S. laciniatum* e *S. buissoni* causam grandes prejuízos à indústria do turismo daquela região (Crosskey, 1990).

Na Escandinávia e Sibéria os ataques de *S. truncatum*, *S. cholodkovskii*, *S. pusillum*, *S. decimatum*, *S. transiens*, *S. maculatum* e *S. erythrocephalum* são comuns ao longo das bacias dos rios Dnieper, Don e Volga (Crooskey, 1981, 1990). Um dos efeitos mais drásticos em termos de danos ao homem e à indústria de laticínios foi na década de 50, ao longo da bacia do rio Angara (ex-URSS), onde os ataques de *S. cholodkovskii* reduziram em 45% a produção de leite e entre 20 e 30% a produção de ovos e de carne. Nessa região chegou-se a coletar 1.046 adultos/ min./ homem (Dubitskii, 1981).

Ao longo da bacia do rio Danúbio, na Europa, a espécie *S. colombaschense* tipicamente ornitofílica adaptou-se ao sangue humano provocando sérios danos juntamente com *S. erythrocephalum*. Em 1970, na Hungria e ex-Iogoslávia, cerca de 4.600 pessoas precisaram de tratamento médico ou hospitalização (Zivkovic & Burany, 1972).

S. colombaschense foi a espécie responsável pela morte de milhares de animais ao longo dos séculos XVIII, XIX e XX. Em 1923 foi observado o recorde de 22.000 animais mortos (Ciurea & Dinulescu, 1924). Felizmente esta espécie não é mais problema nos dias de hoje. Seu controle, ou melhor, sua quase erradicação, foi realizada de maneira curiosa sem a adoção de quaisquer medidas químicas ou biológicas. A construção de usinas hidroelétricas e usinas de elevação para o aproveitamento do potencial de navegação do rio Danúbio durante a década de 70, provocaram a criação de imensos reservatórios destruindo o habitat de *S. colombaschense* (Zivkovic, 1975).

Em 1897, ao longo da bacia do rio Mississipi (EUA), os ataques por *Cnephia pecuarum* causaram a morte de centenas de aves em granjas (Bradley, 1935). Fato idêntico ocorreu na ex-Iogoslávia e na Romênia na década de 30 devido ao intenso ataque de *S. colombaschense* (Kettle, 1985). Ainda nos EUA, *C. pecuarum* foi o responsável pela morte de centenas de mulas ao longo do século XIX e ainda no século XX, no início da

década de 30 (Osborn, 1896 *apud* Crosskey, 1990; Bradley, 1935). Medidas de controle tornaram pequena a expressão de *C. pecuarum* sendo considerada hoje como um problema do passado (Crosskey, 1990).

As mortes de animais de criação causadas pelos ataques de simuliídeos sempre receberam grande atenção. A detecção de substâncias tóxicas na saliva de borrachudos sugere que toxemia possa ser a *causa mortis*. A natureza bioquímica ainda é incerta; no entanto, sabe-se que proteases presentes na saliva de *S. colombaschense* mediam reações que levam a uremia e edemas causando asfixia (Lazarevitch & Zivkovitch, 1960 *apud* Crosskey, 1990; Wilhelm *et al.*, 1982 *apud* Crosskey, 1990). Por outro lado a presença de histaminas em alguns borrachudos sustenta a suposição mais comum de que a morte se deva ao choque anafilático (Hutcheon & ChiversWilson, 1953).

Considerando-se a densidade de adultos que podem ocorrer em um único hospedeiro, ambas as hipóteses são possíveis. Zivkovic (1975) relatou a ocorrência de cerca de 6.000 fêmeas de *S. colombaschense* em uma única vaca.

Pode-se ainda considerar que acidentes sejam a causa das mortes dos animais de criação. Há relatos de que a densidade de adultos é tamanha que as narinas ficam obliteradas pelos insetos, sendo comum sua inalação até os pulmões. Na tentativa de livrarem-se dos adultos, os animais ficam nervosos e agressivos advindo acidentes mortais em consequência do choque de sua cabeça com cercas e árvores (Roberts, 1940; Mackerras & Mackerras, 1948).

Outras espécies como *S. triviattum*, *S. equinum*, *S. reptans* e o complexo de *S. ornatum* também têm elevada afinidade por sangue de gado, também causando sérias perdas em várias partes do mundo (Rivosecchi & Zanin, 1983; Rivosecchi, 1986; Crosskey, 1990).

Quanto às doenças transmitidas pelos borrachudos, a oncocercose humana é a mais importante, sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como a principal endemia da África Tropical e, em menor extensão, da América Latina.

A oncocercose humana é causada pela filária *Onchocerca volvulus* (Nematoda; Filariidae) sendo os borrachudos seus únicos vetores. A doença não chega a

matar o homem mas um de seus efeitos, a cegueira total e irreversível, torna-a muito temida. Devido a esse fato, a doença também é conhecida como "cegueira-dos-rios".

O oeste africano é a área de maior prevalência sendo esta sujeita a um intenso programa de controle orientado pela OMS, o Programa de Controle da Oncocercose (PCO). O PCO será abordado em detalhes adiante.

Cerca de 86 milhões de pessoas estão expostas à oncocercose, sendo que aproximadamente 18 milhões estão infectadas e 2% destes, totalmente cegos (WHO, 1987). Mais de 99% destas pessoas vivem em 27 países da África e o restante na América Latina (Duke, 1990). No início da década de 70, nas regiões de plantação de café na Guatemala, havia áreas onde toda a população 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 e Makiritare já há algumas décadas. Em 1985 acreditava-se que cerca de 5.500 pessoas, entre índios e garimpeiros, estivessem com a doença naquela região (Rey, 1991). 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 e frentes de trabalho, 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* tida como possível vetora da oncocercose (Coscarón, 1986).

A oncocercose tem origem africana, tendo sido introduzida nas Américas entre os séculos XVI e XVIII com o tráfico de escravos da África para o continente americano, especialmente para a América Latina.

Durante a picada, o lábio do borrachudo se rompe e larvas de *O. volvulus* escapam, penetrando ativamente pelo orifício da punção. Estas migram

rapidamente para o tecido subcutâneo onde se desenvolvem em adultos após cerca de 12 meses. Nódulos na pele são causados como reação do organismo ao parasita, no entanto estes nódulos acabaram se tornando em sítios de acasalamento e reprodução, ocorrendo frequentemente mais de 10 adultos por nódulo. A longevidade dos adultos é elevada, aproximadamente 12 anos ou mais. Este fator é muito importante em termos epidemiológicos sendo levado em consideração para a determinação do tempo de realização de um programa como por exemplo o PCO.

Os sintomas clássicos da oncocercose são despigmentação e alteração da textura da pele tornando-a "grossa". Este aspecto é conhecido como "pele de lagarto". Outro sintoma é a formação dos nódulos na pele causando séria irritação e intensa coceira. Febre, cefaléia e dor muscular também são reações comuns. No entanto o maior problema torna-se quando as microfilárias atingem os olhos. Podem ocorrer na córnea, retina, nervo óptico ou no fluido ocular. Uma gradual perda de visão até a cegueira total pode ocorrer à medida que as microfilárias vão morrendo em algum dos habitats citados acima. Por razões ainda desconhecidas podem ocorrer sérias lesões coroidoretinais ou mesmo total opacidade da córnea (Nelson, 1974; Crosskey, 1990).

A ação dos borrachudos como vetores da oncocercose foi sugerida pela primeira vez por Robles (1917) na Guatemala, sendo confirmada sua relação com *O. volvulus* em 1926 por Blacklock. Atualmente cerca de 13 espécies são reconhecidas como vetores, sendo que várias são complexos de espécies. O complexo de *S. damnosum* talvez seja o melhor conhecido, sendo formado por 9 espécies com distribuição distinta na África. Ainda neste continente ocorrem *S. albivirgulatum* e *S. neavei* (WHO, 1987). Na América Latina temos cerca de 10 espécies, entre as quais *S. oyapockense*, *S. pintoi* e os complexos de *S. metallicum*, *S. amazonicum* e *S. exiguum* (Yodeowei & Service, 1983; Shelley *et al.*, 1987; Shelley, 1988).

Outras filarioses também são veiculadas por borrachudos no Novo Mundo, como por exemplo *Mansonella ozzardi*. Sua patogenicidade no entanto, sempre foi questionada (Batista *et al.*, 1960; Rey, 1991).

Além da oncocercose e da mansonelose, os borrachudos têm sido associados à várias doenças. No entanto, na maioria dos casos seu papel na transmissão destas doenças não foi demonstrado cientificamente. Tem-se como exemplos a encefalite equina (Homan *et al.*, 1985), o sarcoma de Kaposi (McCrae *et al.*, 1968 *apud* Crosskey, 1990) e o pênfigo foliáceo brasileiro ou fogo selvagem (Pettit, 1987; Patrus, 1989). No entanto, sabe-se que os borrachudos atuam como vetores mecânicos da mixomatose em coelhos (Joubert & Monnett, 1975).

Quanto à síndrome hemorrágica de Altamira, descrita por Pinheiro e colaboradores (1974), acredita-se que seja uma reação acumulativa do organismo às substâncias da saliva do borrachudo inoculadas no ato da picada.

A descoberta de *Trypanosoma cruzi* em adultos de simúlideos (Magni, 1988) e de *Bacillus leprae* no intestino de *Simulium pertinax* (Souza-Araújo, 1943) levantam novas suspeitas sobre a relação destes insetos e a transmissão da doença de Chagas e da lepra.

Além da oncocercose humana, algumas espécies de simúlideos são vetoras de várias oncocercoses em gado. Aproximadamente 16 espécies de *Onchocerca* ocorrem em animais domesticados, no entanto na maioria dos casos o envolvimento de borrachudos como vetores não foi confirmado. Sabe-se seguramente que na ex-URSS os borrachudos desempenham papel importante na sua transmissão assim como os complexos *S. jenningsi* na América do Norte e *S. ornatum* na Inglaterra (Eichler, 1971a, 1971b; Nelson, 1974; Scholtens *et al.*, 1977; Crosskey, 1990).

Apesar da elevada prevalência no gado, a infecção causada por *Onchocerca* spp. não produz sintomas clínicos tornando-se, na maioria das vezes, uma pequena patologia críptica com pequena importância econômica.

2.2. MÉTODOS DE CONTROLE DE BORRACHUDOS

As primeiras referências quanto ao emprego de produtos químicos para o controle de insetos daninhos datam de quase 3.000 anos nas escrituras de gregos, romanos e chineses. A natureza tóxica do arsênico, por exemplo, já era conhecida pelos gregos e chineses desde o primeiro século d.C. (NAS, 1978). Apesar destas citações, o emprego de substâncias químicas para o controle de insetos é um fato do século XIX. O uso do verde de Paris e o desenvolvimento da calda Bordalesa, no final do século XIX, contra *Leptinotarsa decemlineata* (Col.; Chrysomelidae) e insetos picadores, respectivamente, marcaram o início do moderno emprego de inseticidas.

No entanto foi na primeira metade do século XX que se desenvolveram os compostos de flúor e os primeiros inseticidas de origem vegetal. Já em 1939, a descoberta do poder inseticida do DDT foi um evento revolucionário no desenvolvimento dos inseticidas. Coincidindo com a 2ª Guerra Mundial, o DDT demonstrou seu valor de forma dramática nos tempos de guerra.

O controle químico de borrachudos inicia-se no princípio da década de 40 justamente com o emprego do DDT (Fairchild & Barreda, 1946). Antes disso as técnicas e produtos empregados eram muito caros (como por exemplo, a escovação das larvas dos criadouros), ineficientes em sua maioria ou extremamente danosos para a fauna não alvo, uma vez serem aplicados emulsões de óleo, xilol, querosene e arseniatos (Jamnback, 1981).

O controle de borrachudos tem sido feito visando-se atacar o estágio larval devido ao fato deste estar confinado a um único habitat facilmente tratado, os sistemas lóticos. O controle do estágio adulto é efetivo em algumas situações muito limitadas, sendo inclusive muito caro e danoso para a fauna não alvo.

O DDT também foi eficiente contra o vetor da oncocercose, *S. ochraceum*, na Guatemala (Walsh, 1983) e também o responsável pela erradicação de *S. neavei* do Kenia (Garnham & McMahon, 1947; McMahon *et al.*, 1958) e eliminação de *S. damnosum* do Zaire (Wanson *et al.*, 1949).

Estas demonstrações da grande eficiência do DDT contra simúlideos levou a um grande número de trabalhos de campo em todo o mundo, especialmente no Alasca, Canadá, Uganda, Ghana e Nigéria (Jamnback, 1981). Nesta época não se imaginava que em menos de 20 anos o DDT seria quase que completamente banido do controle de borrachudos na maior parte do mundo, especialmente devido à resistência desenvolvida pelas espécies alvo e aos efeitos adversos à fauna não alvo.

A partir do final da década de 50 as pesquisas foram concentradas na busca por substitutos do DDT. Em termos de larvicidas químicos, as opções mais efetivas contra borrachudos e com menor efeito sobre a fauna não alvo foram o temefós e o methoxychlor (Burdick *et al.*, 1968; Wallace *et al.*, 1973, 1976; Wallace & Hynes, 1975; Dejoux, 1977a, 1977b *apud* Jamnback, 1981; Dejoux & Elouart, 1977; Walsh, 1983).

Em termos de programas de controle de borrachudos, o maior proposto e ainda em andamento é o Programa de Controle da Oncocercose (PCO) no oeste africano. Este programa foi iniciado em 1974, sob orientação da Organização Mundial de Saúde (OMS), abrangendo inicialmente uma área de 654.000 Km² ao longo da bacia do rio Volta, envolvendo 7 países; Gana, Mali, Nigéria, Volta Superior, Costa do Marfim, Togo e Benin. Posteriormente foi estendido ocupando uma área de 764.000 Km² e hoje ocupa aproximadamente 1,3 milhão de Km² cobrindo 11 países (Walsh *et al.*, 1979; Duke, 1990).

O PCO visava inicialmente a erradicação dos vetores da oncocercose, o complexo de espécies de *S. damnosum*. No entanto, logo percebeu-se que sua eliminação não seria possível (Walsh *et al.*, 1979). Foram previstas atividades de controle por um período de 15 a 20 anos visando-se a interrupção da transmissão da doença.

Avaliando-se os resultados obtidos após 16 anos do andamento do PCO, acredita-se que a erradicação da oncocercose na maioria dos cenários endêmicos seja impossível. No entanto, uma significativa redução da prevalência e incidência da doença foram alcançadas (Duke, 1990).

O larvicida selecionado foi o ABATE[®], à base de temefós, por ter sido o mais eficiente contra borrachudos e o menos tóxico para mamíferos e fauna não alvo,

além de ter sido demonstrada sua segurança na água servida (Laws *et al.*, 1968; Walsh *et al.*, 1979).

Após alguns anos de uso rotineiro do ABATE[®], Guillet e colaboradores (1980) detectaram a resistência das populações de *S. damnosum* ao temefós. Brown (1986) e Taylor (1986) avaliando a dinâmica da resistência dos insetos aos inseticidas químicos apontaram as principais causas possíveis. Quanto aos borrachudos, podem ser enumeradas; a grande extensão da área tratada impedindo, inclusive a entrada de genes de outras populações de borrachudos de áreas não tratadas; a periodicidade da aplicação e, erros de dosagem.

A resistência detectada encorajou as pesquisas no sentido de, novamente, buscarem-se alternativas de controle, que incluíam desde formulações de temefós "aditivadas" até o uso de Reguladores de Crescimento de Insetos e, especialmente, agentes para o controle biológico (Lacey & Mulla, 1977, 1978; Thompson & Adams, 1979; Undeen & Berl, 1979; Walsh, 1983; Andrade, 1987).

Dentre os agentes biológicos, a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (H:14) (BTI) é a principal arma e a mais amplamente utilizada nos dias de hoje (Habib & Andrade, 1986; Dulmage, 1989; Habib, 1989). A partir de 1976, com sua descoberta a partir de amostras de solo de Israel (Goldberg & Margalit, 1977) e sua industrialização no final da década de 70, o controle de dípteros aquáticos conseguiu um grande aliado. A especificidade, alta virulência e facilidade de produção massal à baixos custos são características que colocaram os produtos comerciais à base de BTI em igualdade comercial com os larvicidas químicos rotineiramente empregados (Habib & Andrade, 1986; Cibulski, 1987).

Somando-se à grande dificuldade de indução de resistência natural nas populações alvo, BTI é um dos principais meios disponíveis atualmente para o controle biológico de populações larvais de borrachudos.

A ação de BTI ocorre a nível intestinal provocando paralisia e toxemia levando as larvas hospedeiras à morte devido à ação de determinadas proteínas, especialmente a delta-endotoxina (Dulmage *et al.*, 1981; Fast, 1981).

Os estudos genéticos de *B. thuringiensis* têm avançado muito, tanto das variedades patogênicas aos lepidópteros desfolhadores, como das variedades patogênicas à coleópteros e dípteros. O nível do atual conhecimento permite que, pela engenharia genética, sejam criados organismos híbridos ou mesmo a implantação de plasmídeos com a codificação para as frações tóxicas de *B. thuringiensis* em plantas hospedeiras e algas (Martin & Dean, 1981; Jahn *et al.*, 1987; Donovan *et al.*, 1988).

No Brasil o nível de susceptibilidade de várias espécies-alvo de borrachudo vem sendo avaliado há vários anos. Entre estas incluem-se *S. pertinax*, *S. orbitale*, *S. rubrithorax* e *S. inaequale* (Habib, 1983; Ruas Neto, 1984b; Ruas Neto *et al.*, 1985; Andrade *et al.*, 1987b; Habib *et al.*, 1987; Andrade & Castello Branco Jr., 1988, 1991; Souza, 1988; Castello Branco Jr. & Andrade, 1992).

O início do controle de borrachudos no Brasil data de 1951 em áreas do litoral norte do Estado de São Paulo. Durante 19 anos o controle foi feito por meio de aplicações quinzenais de BHC e DDT. A partir de 1971 passou-se a utilizar o ABATE® em praticamente todo o litoral norte de São Paulo cobrindo-se uma área de aproximadamente 893 Km² (Araújo-Coutinho, 1988).

Em 1987 ainda no Estado de São Paulo, Andrade e colaboradores detectaram a resistência de populações de 3 espécies de borrachudo ao temefós, inclusive *S. pertinax*, a espécie-alvo de controle em todo o litoral norte de São Paulo (Andrade *et al.*, 1987a).

No Rio Grande do Sul, Ruas Neto (1984a) também já havia detectado a resistência de várias espécies ao temefós e, desde então o controle de borrachudos naquele Estado passou a ser realizado com BTI (Ruas Neto, 1984b). A resistência dos borrachudos ao temefós também se tornou uma realidade nos Estados do Paraná e Santa Catarina (Paz, C.M., 1986, comun. pessoal, SURHEMA/ PR; Guimarães, 1986).

Apesar da resistência ter sido detectada em 1987 no Estado de São Paulo, o uso de temefós durou até meados de 1990. A partir de então iniciaram-se projetos

pilotos com o uso de BTI para o controle de *S. pertinax* (Araújo-Coutinho, C.J.P.C., 1990, comun. pessoal, SUCEN-Litoral Norte).

Apesar de serem listados ou recomendados para o controle de borrachudos produtos à base de vários princípios ativos, entre eles o temefós, clorfoxin, methoxycloer e o próprio DDT (WHO, 1984; Busvine, 1985; Andrade, 1987), o Ministério da Saúde brasileiro (1982) regulamenta apenas o temefós e o clorfoxin para o controle larval de borrachudos.

Em termos de controle, os larvicidas químicos vêm sendo empregados em situações muito particulares e em áreas restritas. Seu uso em larga escala só é possível no contexto do Manejo Integrado de Pragas (MIP), sob um monitoramento constante e, em rodízio com outros produtos, especialmente os à base de BTI. Tem-se verificado que sob certas condições a resistência ao temefós é reversível, especialmente quando detectada no início de sua expressão na população alvo (Ruas Neto, A.L., 1988, comun. pessoal, SCV-SEMA/ RS; Paz, C.M., 1986, comun. pessoal, SURHEMA/ PR). Este monitoramento já é possível por métodos mais práticos e menos custosos possibilitando assim, a avaliação de grandes áreas em curto espaço de tempo (Andrade & Castello Branco Jr., 1990).

Quanto ao MIP, tem-se que suas bases foram lançadas inicialmente entre 1950 e 1960, quando se falava de controle integrado, objetivando-se o controle de pragas agrícolas. Posteriormente seus princípios foram sendo aplicados à Saúde Pública (Axtell, 1979; Olson, 1979; Steelman, 1979; Womeldorf, 1979; Metcalf, 1982; Andrade, 1987).

O MIP enquadra-se no contexto da ecologia aplicada sendo embasado na ecologia de populações (Levins & Wilson, 1980). Constitui-se em um conjunto de medidas, tanto a nível de controle químico e biológico como medidas legislativas e educacionais que, quando integradas levariam a uma manutenção das populações alvo a níveis suportáveis.

Um sério problema tem sido justamente a detecção destes níveis suportáveis. Em termos agrícolas são facilmente definidos os chamados Nível Econômico

de Dano (NED) e o Limiar Econômico de Dano (LED). Tais valores derivam simplesmente da relação custo econômico - benefício. O NED é a densidade populacional da espécie-alvo que não deve ser alcançada, pois a partir de tal densidade a espécie-praga passa a causar prejuízos econômicos à lavoura. O LED é a densidade a partir da qual sabe-se que, no período seguinte, a espécie praga alcançará o NED. Quando a população da espécie-alvo atinge o LED é o momento de serem efetuadas medidas de controle químico ou biológico.

Em termos de Saúde Pública ocorrem complicações desde a definição de termos e valores similares ao NED e LED até a própria concepção do controle. Esse último aspecto é facilmente percebido quando a espécie-alvo trata-se de vetor de alguma doença, como por exemplo o *Aedes aegypti* e a dengue e a febre amarela ou os triatomíneos e a doença de Chagas ou mesmo os complexos de *S. damnosum* e *S. guanense* e a oncocercose. Nesses casos o desejável passa a ser a erradicação da população do inseto-alvo e não a sua manutenção a níveis aceitáveis.

Por outro lado, nos casos onde a espécie alvo não transmite doença alguma na região e vem a ser um incômodo, torna-se possível o MIP. Deve-se levar em consideração que mesmo sem causar doença, os danos sócio-econômicos podem ser elevados comprometendo o bem estar das populações humanas e até a economia de determinada região. Nesse caso o LED poderia ser estabelecido. Esse aspecto foi abordado no item 2.1..

A situação dos borrachudos no Brasil enquadra-se nessa última categoria, excetuando-se *S. pintoi*, *S. guanense* e *S. oyapockense* que são tidos como vetores da oncocercose na Amazônia. Entre as mais de 100 espécies que ocorrem no Brasil, *S. pertinax* é sem dúvida uma das que apresentam maior antropofilia. Seu ataque pode provocar graves problemas de Saúde Pública conforme exposto anteriormente (item 2.1.).

Nesses casos a determinação dos níveis aceitáveis (de controle) das populações-alvo de borrachudos deve levar em consideração alguns fatores, entre os quais, a própria população humana que habita a região e a população flutuante ao longo do ano. Além disso, o esclarecimento da população afetada é fundamental (Castello Branco Jr. & Andrade, 1993a).

Uma medida usada rotineiramente para a avaliação da densidade das populações da espécie-alvo é o índice "borrachudo/ hora/ homem" (bhh), ou seja, é a quantidade de fêmeas coletadas pelo técnico ao redor de si mesmo com o auxílio de um puçá entomológico em determinado período de tempo, conforme já mencionado. Valores da ordem de 400 a 600 bhh foram comuns e ainda o são em algumas épocas do ano em várias áreas do Brasil, como o interior e litoral norte do Estado de São Paulo, litoral sul do Rio de Janeiro e interior do sul do Brasil (Araújo-Coutinho *et al.*, 1988; Souza, 1984; Andrade, 1987; Castello Branco Jr., *no prelo*, Andrade, C.F.S., 1994, comun. pessoal, UNICAMP).

O MIP pressupõe o monitoramento das populações-alvo, sendo assim o índice borrachudo/ hora/ homem é fundamental. Castello Brando Jr & Andrade (1993a) verificaram que após o esclarecimento um pouco mais técnico da população humana afetada sobre o problema que a aflige, a obtenção de um nível aceitável torná-se possível. É claro que devem ser avaliadas todas as classes sociais, categorias de trabalho e faixas etárias para se obter um valor que reflita a realidade da região durante todo o ano.

É extenso o conhecimento necessário para que um programa de Manejo Integrado de Borrachudos tenha sucesso. Informações básicas sobre a biologia e ecologia da espécie-alvo são fundamentais, assim como de sua fauna de inimigos naturais. A seleção das opções químicas, quando possíveis, e biológicas é um processo trabalhoso. A determinação de dosagens e pontos de aplicação ao longo dos cursos d'água e a detecção dos riachos criadouros também são fundamentais para o sucesso do programa. Ainda existem outros componentes a serem mencionados como os estudos de produtos repelentes ou atraentes e estudos genéticos além de medidas legislativas (Tonn, 1982; Andrade, 1987). Habib (1987) aborda justamente este aspecto levando em consideração que existem vários órgãos estaduais e federais cuja função é exatamente o controle de vetores, zoonoses e insetos daninhos. A ação conjunta desses órgãos com as administrações municipais e centros de pesquisa como as universidades além de instituições particulares é fundamental para a elaboração e realização de um projeto do porte necessário para o controle de borrachudos.

O PCO no oeste africano é um bom exemplo de como a união de medidas de controle do vetor, seu monitoramento e tratamento de doentes podem resultar em melhores condições de vida para o homem.

Existem alguns exemplos de trabalhos unificados sendo realizados nos Estados do sul do Brasil (Andrade, 1987), mas o que se verifica na maioria das vezes é uma falta de vontade política e desrespeito com o povo.

Percebe-se assim, que o controle de borrachudos dispõe, na realidade, de poucas opções concretas, tanto em termos de controle químico como biológico.

Felizmente, a busca por novas opções de controle, especialmente quanto aos agentes biológicos, vem revelando uma série de agentes que merecem maiores investigações. Entre estes encontram-se os nematóides mermitídeos e os protozoários microsporídeos. Estes dois grupos serão abordados com maiores detalhes adiante.

É relativamente extensa a lista dos inimigos naturais dos borrachudos, ou seja, predadores, parasitas e parasitos além de entomopatógenos que exercem alguma influência no controle natural das populações de borrachudo hospedeiras.

É conveniente diferenciarem-se os termos Controle Natural e Controle Biológico. O primeiro refere-se a interação natural que ocorre entre determinada espécie, praga ou não, e seus inimigos naturais no meio ambiente. O Controle Biológico, por outro lado, implica em uma ação do homem quanto à manipulação dos inimigos naturais de espécies-pragas e seu uso racional, objetivando-se o controle de determinada espécie daninha (Coppel & Mertins, 1977).

Tem-se assim que sob determinadas condições, vários outros organismos têm apresentado um grande papel no controle natural de borrachudos. Estes organismos são predadores vertebrados (Speir, 1976 *apud* Davies, 1981; Goncharova, 1983 *apud* Crosskey, 1990; Souza & Magni, 1988; Mardini, 1988; Shelley & Luna Dias, 1989) e predadores invertebrados (Peterson & Davies, 1960; Pavlichenko, 1977; Saito *et al.*, 1978; Davies, 1981; Gorayeb & Pinger, 1978; Gorayeb & Mok, 1982; Wotton & Merrit, 1988; Magni & Py-Daniel, 1989), parasitas como os ácaros hydracaríneos (Prasad & Cook, 1972;

Bottger, 1976), ou mesmo diversos entomopatógenos entre bactérias, vírus, fungos e protozoários (Rubtsov, 1967; Beaudoin & Willis, 1968; Al-Aidroos & Roberts, 1978; Nolan, 1981; Weiser & Undeen, 1981; Weiser, 1968, 1984; Batson, 1983; Avery & Bauer, 1984; Vorobetz, 1984; Kettle, 1985; Crosskey, 1990).

2.3. BIOLOGIA E ASPECTOS EPIZOOTIOLÓGICOS DE MICROSPORÍDEOS E MERMITÍDEOS

Epizootiologia é a ciência que estuda a dinâmica das doenças, suas causas e manifestações em todos os níveis de intensidade em uma população hospedeira. 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, 1957; Weiser, 1963; Tanada, 1959, 1976; 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 epidemiologia 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.

Anderson & May (1979) sugerem ainda que doenças enzoóticas 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, estando hoje incorporadas pela filosofia do Manejo Integrado de Pragas.

Antes de se entrar no mérito das pesquisas sobre epizootiologia dos mermitídeos e microsporídeos, serão abordados alguns aspectos de sua biologia.

Embora existam cerca de 40 famílias de nematóides reunindo cerca de 3.000 espécies que apresentam associação com insetos, poucas realmente causam a morte do hospedeiro e, destas, apenas 3 famílias são consideradas com potencial para o controle biológico: Steinernematidae, Heterorhabditidae e Mermithidae. As duas primeiras têm sido amplamente utilizadas contra insetos pragas agrícolas (Gaugler & Kaya, 1990; Hominick, 1990); assim sendo, não são alvo de nosso estudo. Já a família Mermithidae tem despertado a atenção quanto ao seu potencial no controle biológico de pernilongos e borrachudos desde a década de 70.

Mais de 30 gêneros de mermitídeos foram descritos parasitando insetos e outros invertebrados como crustáceos e aranhas (Poinar Jr., 1983).

Todos os nematóides parasitas naturais de borrachudos pertencem à família Mermithidae, tendo sido descritas até 1981 mais de 60 espécies ocorrendo em mais de 70 espécies de borrachudos e quase todos os continentes (Poinar Jr., 1981).

A maioria dos mermitídeos, inclusive os patogênicos aos borrachudos, têm um ciclo de vida direto onde no interior do ovo já ocorre uma muda, eclodindo assim, uma larva L₂ infectante. Ao encontrar o hospedeiro, esta perfura seu tegumento com o estilete e passa a ocupar a hemocele, desenvolvendo-se e nutrindo-se das reservas energéticas do hospedeiro. O desenvolvimento pode durar alguns dias até vários meses dependendo da espécie, ocorrendo ainda nova muda no interior do hospedeiro. Após o desenvolvimento parasitário ter sido completado, a larva L₃ sai do hospedeiro, sofre duas mudas tornando-se L₄ e adulto, respectivamente. Os adultos, dióicos, acasalam-se e depositam seus ovos.

Algumas espécies de mermitídeos apresentam um ciclo de vida indireto, utilizando-se de hospedeiros paratênicos para alcançar o hospedeiro natural. O

mermitídeo *Pheromermis pachysoma*, por exemplo, se vale de adultos de tricópteros para parasitar vespas predadoras (Poinar Jr., 1983).

A invasão da hemocele do inseto hospedeiro pela forma infectante dos mermitídeos geralmente ocorre pela penetração ativa do tegumento do hospedeiro, enquanto que a ingestão de ovos ou larvas infectantes é um mecanismo especialmente comum em hospedeiros terrestres (Poinar Jr., 1976; Platzer, 1982; Petersen, 1985).

A forma parasítica do mermitídeo é a única que se alimenta. Este passa a nutrir-se dos tecidos e da hemolinfa do hospedeiro armazenando reservas energéticas em seu trofosoma. Estas reservas serão posteriormente consumidas durante as fases pós-parasítica e adulta, especialmente para os processo de maturação de gônadas e gametogênese (Nickle, 1972; Petersen, 1985).

Apesar de muitos trabalhos terem focado o uso de mermitídeos, especialmente *Mesomermis fluminalis*, para o controle de borrachudos durante a década de 70 (Ebsary & Bennett, 1973, 1975; Bailey *et al.*, 1974; Ezenwa, 1974a, 1974b; Ezenwa & Carter, 1975; Bailey & Gordon, 1977; Mokry & Finney, 1977; Molloy & Jamnback, 1977), o grande problema, ainda hoje, continua sendo a criação massal da espécie de borrachudo hospedeiro em condições de laboratório (Petersen, 1985).

Uma das espécies de mermitídeos mais estudadas e conhecidas é *Romanomermis culicivorax*. Apesar de não ocorrer naturalmente em simulídeos, sua infectividade foi demonstrada nestes hospedeiros em 1976 (Hansen & Hansen, 1976). A criação massal de *R. culicivorax* usando-se larvas do pernilongo doméstico *Culex quinquefasciatus* como hospedeiro contribuiu muito para o avanço do controle biológico de mosquitos (Petersen & Willis, 1972; Petersen, 1985). A produção massal a baixos custos (ca. US\$ 0,10/ 10⁶ pré-parasitas), o espectro de hospedeiros, a não ação sobre a fauna não-alvo, além dos efeitos sinérgicos com os produtos químicos normalmente empregados para o controle de dípteros são alguns dos fatores que favorecem o seu uso no controle biológico de dípteros aquáticos, especialmente contra pernilongos (Petersen *et al.*, 1969; Petersen, 1973; NAS, 1973; Finney *et al.*, 1977; Petersen, 1985).

A viabilidade do uso de *R. culicivora* é tamanha que duas grandes empresas norte-americanas, a Nutrilite Products Inc. e a Fairfax Biological Products Inc., investiram em pesquisas e industrializaram *R. culicivora*. O produto Skeeter Doom^R foi o primeiro no mercado a ter nematóides como ingrediente ativo. Entretanto, a concorrência com a indústria química de pesticidas, inclusive com a comercialização do BTI, acarretou em uma desvantagem em termos de custo do produto comercial e, infelizmente, as empresas abandonaram os produtos à base de nematóides (Finney, 1981; Rubtsov, 1981).

Finney & Mokry (1980) avaliaram economicamente a possibilidade do uso de *R. culicivora* para o controle de borrachudos concluindo que um controle efetivo não seria uma possibilidade realista diante do conhecimento e das técnicas de criação massal disponíveis na época.

Tem-se avaliado inclusive nematóides não mermitídeos como por exemplo *Steinernema feltiae* (Steinernematidae) (antiga *Neoplectana carpocapsae*) para o controle de borrachudos, no entanto os resultados obtidos não são satisfatórios (Gaugler & Molloy, 1981; Gordon, 1984).

No Brasil os estudos sobre mermitídeos em borrachudos são realmente poucos, havendo muitas incógnitas inclusive sobre aspectos básicos de sua biologia, ecologia e epizootiologia. No Estado de São Paulo tem sido registrada a ocorrência de mermitídeos em populações de várias espécies de borrachudo, inclusive *S. pertinax* (Castello Branco Jr. & Andrade, 1988; Castello Branco Jr. *et al.*, 1987, 1993b).

Quanto aos protozoários do filo Microspora, estes estão entre os entomopatógenos mais comuns ocorrendo em borrachudos. Atualmente são descritas cerca de 30 espécies, pertencendo a 7 famílias, ocorrendo em mais de 60 espécies de borrachudos em todo o mundo, inclusive no Brasil (Castello Branco Jr. *et al.*, 1987, 1991; Castello Branco Jr. & Andrade, 1988; Cordeiro & Castello Branco Jr., 1988; Crosskey, 1990; Castello Branco Jr., 1991).

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, 1991; Castello Branco Jr. & Andrade,

1988; Cordeiro & Castello Branco Jr., 1988; Garcia, 1989; Garcia *et al.*, 1989; Crosskey, 1990; Castello Branco Jr., 1991) e, com menor frequência em adultos (Undeen, 1981).

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

Os microsporídeos são parasitas unicelulares obrigatórios. Em 1980, foi proposta uma nova classificação onde os protozoários foram agrupados em sete filos, sendo os microsporídeos agrupados no filo Microspora (Levine *et al.*, 1980). Recentemente, Sprague e colaboradores (1992) reordenaram a sistemática dos microsporídeos na tentativa de serem normatizados vários aspectos de sua biologia e sistemática.

Quanto à biologia e aos mecanismos de transmissão dos microsporídeos temos que na infecção horizontal, de maneira geral, os esporos de microsporídeos, quando na luz do intestino do inseto hospedeiro, sofrem ação do pH e de enzimas digestivas intestinais de maneira a aumentar a permeabilidade do esporo à água. Com o conseqüente aumento da pressão interna do esporo ocorre a extrusão de um filamento polar. Este filamento é oco e por ele passa o conteúdo do esporo, especialmente o núcleo e parte do esporoplasma (célula infectante ou germe). A pressão de extrusão é tamanha que permite a um filamento perfurar a parede de outro esporo e, em especial, atravessar a membrana plasmática das células do epitélio intestinal de modo a injetar a célula infectante no interior da célula hospedeira (Weiser, 1976).

A partir deste ponto podem ser distinguidas duas fases: a merogonia e a esporogonia. A primeira é uma fase de proliferação. Os merontes formados na merogonia podem ter um único núcleo individualizado ou uma estrutura conhecida como diplocário (dois núcleos). Dividem-se repetidamente por divisão binária ou por esquizogonia. A segunda fase (esporogonia) consiste no desenvolvimento de esporontes em esporoblastos e, estes em esporos. Os esporontes também podem ter um núcleo ou o diplocário. Podem dividir-se binariamente em esporoblastos ou alternativamente, tornarem-se estágios multinucleados (plasmódio esporogonial) (Weiser, 1976).

Alguns gêneros têm como característica o desenvolvimento dos esporoblastos em vesículas conhecidas como vesículas do esporóforo. Cada vesícula contém um número de esporos característico para cada gênero. Por exemplo, *Thelohania* apresenta oito esporos enquanto *Polydispyrenia* e *Pleistophora*, quantidade igual ou superior a 32 esporos (Sprague *et al.*, 1992).

Considerando-se a infecção vertical, ocorrem as mesmas fases (merogonia e esporogonia) só que obrigatoriamente nos oócitos de fêmeas infectadas (transmissão transovariana) ou nas glândulas anexas de maneira a contaminar o córion do ovo (transmissão transovigênica).

Nos hospedeiros artrópodos e, em especial nos insetos, em qualquer um dos casos (infecção vertical ou horizontal), as células infectantes alcançam a hemolinfa, são distribuídas por todo o corpo e infectam os tecidos susceptíveis (Weiser, 1976). Uma vez no hospedeiro, diferentes espécies de microsporídeos podem ter um ou mais tecidos alvo onde se multiplicam e se desenvolvem. O mecanismo desta seleção ainda não é bem conhecido.

Em populações de simúlideos, 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; Maddox, 1987; Castello Branco Jr., 1991).

Sweeney & Becnel (1991) sustentam que é grande o potencial dos microsporídeos para o controle de dípteros aquáticos, especialmente a médio e longo prazo. A dificuldade reside na criação massal à custos competitivos no mercado mundial de defensivos. O microsporídeo *Nosema locustae* chegou a ser industrializado e comercializado para o controle de grilos e gafanhotos (Henry & Oma, 1981). A especificidade e patogenicidade garantiram bons resultados, no entanto, em termos de custos comerciais o produto tornou-se pouco competitivo frente às outras opções (químicas) e, tal qual aconteceu com o nematóide *R. culicivora*, os produtos à base de *N. locustae* deixaram de ser fabricados.

Ocorre uma situação muito peculiar no Brasil. No curso de seus estudos com borrachudos, os pesquisadores relatam ter sempre encontrado indivíduos infectados, especialmente por mermitídeos e microsporídeos, no entanto não registraram tais ocorrências permanecendo a maioria como comunicações pessoais.

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; Onstad & Maddox, 1989; Habbema *et al.*, 1992).

As propriedades mais significativas quanto ao patógeno, em termos epizootiológicos, são: sua patogenicidade ou virulência, sua capacidade de sobrevivência ou de persistência no ambiente 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 à 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).

Quanto aos mermitídeos também existem poucos estudos sobre a infectividade ou virulência. Sabe-se que em *R. culicivora*, a infectividade para as larvas de mosquitos diminui 24 h após a eclosão das formas pré-parasíticas, sendo que após 72 h não conseguem mais penetrar no hospedeiro (Petersen, 1975).

As formas infectantes de *Mesomermis fluminalis*, atacam a região torácica das larvas de borrachudo, furam e penetram no hospedeiro em alguns minutos. Durante esse período, e mesmo algum tempo após, a larva do borrachudo fica paralisada. Gradualmente o hospedeiro volta ao movimento normal (Molloy & Jamnback, 1975). Shamseldean & Platzer (1989) verificaram fenômeno semelhante em larvas de diversas espécies de culicídeos ao serem infectadas por *R. culicivora*.

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* após passagem por 20 gerações do pernilongo *Anopheles quadrimaculatus* (Dip.; Culicidae). Tentou-se ainda a adequação de microsporídeos a hospedeiros alternativos. Smirnoff (1968) adaptou com sucesso *Thelohania pristiphora*, um microsporídeo parasita da vespa *Pristiphora erichsonii* (Hym.; Tenthredinidae), à lagartas de *Malacossoma distria* e *M. americanum* (Lep.; Lasiocampidae). A virulência permaneceu a mesma após 6 passagens pelos hospedeiros alternativos. Sabe-se, entretanto, que 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; Habib & Andrade, 1986).

Entre os mermitídeos não se conhecem estudos neste nível. No entanto, o neotilenquídeo *Delademus siricidula* tem sido mantido no estágio de vida livre por mais de 10 anos, havendo já mais de 200 gerações, sem perder a patogenicidade (Kaya, 1987).

A virulência ou patogenicidade de um microsporídeo depende 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 aos mermitídeos sabe-se que sua patogenicidade também depende do estágio e estágio de desenvolvimento do hospedeiro. Larvas jovens de culicídeos (1° e 2° estádios) são mais susceptíveis a *R. culicivorax* do que as larvas de 3° e 4° estádios (Petersen & Willis, 1970). Por outro lado, indivíduos mais velhos de borrachudos e pernilongos são mais susceptíveis ao steinernematídeo *S. feltiae* (Dadd, 1971; Gaugler & Molloy, 1981). Essas diferenças devem-se ao modo invasivo de cada nematóide. *R. culicivorax* penetra ativamente pelo tegumento das larvas hospedeiras, portanto o tegumento de indivíduos mais velhos funciona como uma barreira, enquanto que *S. feltiae* precisa ser ingerido e, as peças bucais dos hospedeiros jovens danificam suas larvas. O comportamento do hospedeiro também está relacionado à sua susceptibilidade ao nematóide. Larvas muito ativas como as de pernilongos e borrachudos são menos susceptíveis à *R. culicivorax* do que insetos mais lentos. Isto se deve ao fato do nematóide ter maior dificuldade em se ancorar ao hospedeiro (Woodward & Fukuda, 1977; Petersen, 1978).

Quanto à persistência no ambiente temos que, para 95% das espécies de microsporídeos descritas, essa era uma questão desconhecida até o início da década de 70 (Kramer, 1970; Maddox, 1973). Os estudos que existem são em sua maioria de laboratório. 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 após 5 minutos de dessecação (Alger & Undeen, 1970), enquanto esporos de outras espécies de *Nosema* sobrevivem no solo por pelo menos 12 anos (Weiser, 1956 *apud* Tanada, 1976).

Fatores abióticos como umidade relativa, temperatura, concentração de sais, tensão de oxigênio e radiação solar também interferem na persistência e virulência dos mermitídeos (Kaya, 1987). Quanto aos mermitídeos aquáticos, por exemplo, é notável a sua capacidade de sobrevivência em situações onde a água é escassa. *R. culicivorax* consegue atravessar todo o inverno nos campos drenados de arroz da Califórnia (EUA) e

permanecer viável, assim como os ovos de *Octomyomermis muspratti* permanecem viáveis na areia úmida por vários anos (Petersen, 1981; Westerdahl *et al.*, 1982).

Na realidade, em alguns casos a persistência em ambientes bióticos pode ser mais importante que a persistência no ambiente abiótico. É o caso de algumas espécies do gênero *Thelohania* que "hibernam" dentro de mosquitos univoltinos (Kellen *et al.*, 1965) ou do alantonematídeo *Heterotylenchus autumnalis* que apresenta diapausa em seu hospedeiro *Musca autumnalis* (Stoffolano Jr., 1967).

A persistência de mermitídeos no ambiente pode ocorrer basicamente de 3 modos: em algum hospedeiro paratênico como é o caso de *P. pachysoma*; na forma de adultos de vida livre ou no estágio de ovo. Como exemplo temos *Mermis nigrescens* cujos adultos têm uma grande longevidade e seus ovos permanecem viáveis por mais de 15 meses à 5°C (Craig & Webster, 1978).

A relativa escassez de estudos sobre a persistência de esporos de microsporídeos e mermitídeos no ambiente implica também em pouco conhecimento sobre sua dispersão. Sabe-se que o vento, a chuva, os rios e tantos outros fatores podem dispersar seus esporos, ovos e larvas, existindo no entanto, poucos trabalhos direcionados para esse aspecto (Tanada, 1976; Poinar Jr., 1983; Kaya, 1987).

Uma vez que o hospedeiro parasitado tanto por microsporídeos como por mermitídeos 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; Kaya, 1987; Maddox, 1987).

Ainda, como muitas vezes as microsporidioses são crônicas, os próprios hospedeiros atuam como dispersores. Um exemplo clássico são as larvas de *Choristoneura fumiferana* (Lep.; Tortricidae) infectadas com o microsporídeo *N. fumiferanae*. 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 (Hostounsky, 1970 *apud* Tanada, 1976; Brooks & Cranford, 1972 *apud* Tanada, 1976).

Da mesma forma, os próprios indivíduos parasitados por mermitídeos funcionam como dispersores dos nematóides em áreas onde indivíduos sadios ocorram ou possam ocorrer.

Quanto à Epizootiologia tanto de microsporídeos como de mermitídeos, um dos fatores de grande importância para a compreensão da dinâmica da doença é seu modo de transmissão.

A principal rota de transmissão dos nematóides entomopatogênicos é a penetração direta do tegumento do hospedeiro, inclusive entre os mermitídeos.

A revisão de Canning (1971) aborda a transmissão de microsporídeos em insetos e em vertebrados. A transmissão oral é tida como a principal rota para os insetos, podendo entretanto 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 oral além da transovigênica (Maddox, 1987).

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

Apesar das tentativas de transmissão oral terem tido sucesso em poucas espécies de insetos aquáticos (Kellen *et al.*, 1966 *apud* Tanada, 1976; Chapman, 1974; Avery, 1989; 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 dos 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 kuehniella* (Lep.; Pyralidae) (Payne, 1933); ou mesmo *Perezia mesnili* transmitida por *A. glomeratus* para as larvas de *P. rapae* (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 do desenvolvimento de patologias 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; Poinar Jr., 1983; Habib & Andrade, 1986; Kaya, 1987). 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).

Da mesma forma acredita-se que exista uma especificidade muito grande dos mermitídeos com relação aos seus hospedeiros. Hoje aceita-se que tal especificidade dependa muito mais de fatores ecológicos do hospedeiro do que do mermitídeo (Stoffolano Jr., 1973).

Maddox (1987) ressalta que do ponto de vista epizootiológico 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 sistemática do grupo.

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

Rubtsov (1981) considera que a despeito de todas as vantagens apresentadas pelos mermitídeos como agentes no controle biológico de dípteros aquáticos, a única maneira de torná-los competitivos com os inseticidas químicos e biológicos industrializados é a hibridação de populações de mermitídeos de áreas distintas de forma a aumentar seu potencial reprodutivo e assim, otimizar a criação massal e sua ação inoculativa no meio ambiente.

O impacto das microsporidioses e das helmintoses de insetos, tanto ao nível dos indivíduos como das populações, deve ser bem conhecido a fim de se compreender melhor sua dinâmica objetivando-se a obtenção de subsídios para a avaliação de 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; Kaya, 1987)

3. MATERIAL & MÉTODOS

3.1. IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES ESTUDADAS

A identificação da espécie de borrachudo *Simulium pertinax* foi confirmada pelo prof. Dr. Sixto Coscarón do Museu Nacional da Faculdade de Ciências Naturais de La Plata, La Plata, Argentina.

A identificação do microsporídeo *Polydispyrenia simulii* (Duboscqiidae) foi realizada, ao nível de gênero, pelo presente autor; sendo confirmada a espécie pelo Dr. Juan J. Garcia do Centro de Estudos de Patologia de Insetos e Vetores (CEPAVE) da Universidade Nacional de La Plata (La Plata/ Argentina). A identificação do mermitídeo como *Gastromermis viridis* foi realizada pelo presente autor, sendo necessária ainda a sua confirmação.

3.2. COLETA E MANUTENÇÃO DE *Simulium pertinax* EM LABORATÓRIO

A coleta periódica de borrachudos (tanto larvas sadias e doentes como adultos) procedeu-se em um riacho, pertencente à bacia do rio Jaguari, na Fazenda Cachoeirinha, município de Morungaba, região sudeste do Estado de São Paulo.

Este riacho percorre cerca de 3 Km ao longo das encostas da Serra das Cabras, atravessando propriedades rurais onde são desenvolvidas atividades agrícolas, além de criações de animais como gado, cavalo, porcos e aves.

A caracterização do riacho foi feita avaliando-se periodicamente parâmetros como temperatura, pH, velocidade e vazão d'água além do tipo de fundo do

riacho. A vazão foi calculada pela fórmula de Leitritz (1959)¹. Além desses parâmetros a região também foi caracterizada quanto à altitude.

Larvas de *S. pertinax* foram coletadas no seu criadouro natural e trazidas para o laboratório, sob aeração artificial, e mantidas em um sistema de calhas de criação adaptado do sistema de Raybould & Grunewald (1975 *apud* Edman & Simons, 1985).

O sistema consta de 2 reservatórios d'água (superior: 250 l ; inferior: 130 l) alimentando continuamente um conjunto de calhas de madeira (0,10 x 1,0 x 0,04 m). Um sistema de torneiras torna possível a alimentação das calhas com uma vazão d'água conhecida (6 l/min) e contínua. Um sistema de bombeamento elétrico d'água permite o funcionamento contínuo de todo o sistema (Fig. 1).

O sistema era alimentado por água de torneira (pH = 6,0 e O.D. = 4 ml/l) e mantido sob temperatura ambiente e sem controle de fotoperíodo.

De acordo com a fase da pesquisa em desenvolvimento, as calhas eram colonizadas diferencialmente com larvas sadias ou larvas com sintomas de microsporidiose ou de parasitismo por mermitídeos.

O sistema era monitorado diariamente e, a partir do momento em que as larvas empupavam, as calhas de madeira eram cobertas com uma armação de tecido de filó para a obtenção de adultos. Dessa forma o sistema permitia a obtenção de larvas, pupas e adultos de *S. pertinax*, tanto sadios como doentes.

Para a realização dos estudos de oogênese (item 4.1.5.), os adultos (machos e/ou fêmeas) recém-emergidos do sistema de calhas de criação eram coletados com o auxílio de frasco aspirador e mantidos em uma câmara de contenção de 0,29 m³ (Fig. 2) à temperatura ambiente e sem controle de fotoperíodo, para cópula e repasto sanguíneo.

Para o repasto sanguíneo era oferecida isca humana diariamente durante 40 min., duas vezes ao dia (pela manhã e no crepúsculo). Além disso também foram oferecidas fitas de papel de filtro previamente embebidas em solução de sacarose a 20%.

¹ Fórmula de Leitritz: $V = (L \times C \times P \times c) / T$, onde: V=vazão; L=largura; C=comprimento; P=profundidade; T= tempo; c=constante (0,8 p/ riacho c/ fundo de pedra; 0,9 p/ riacho c/ fundo de areia)

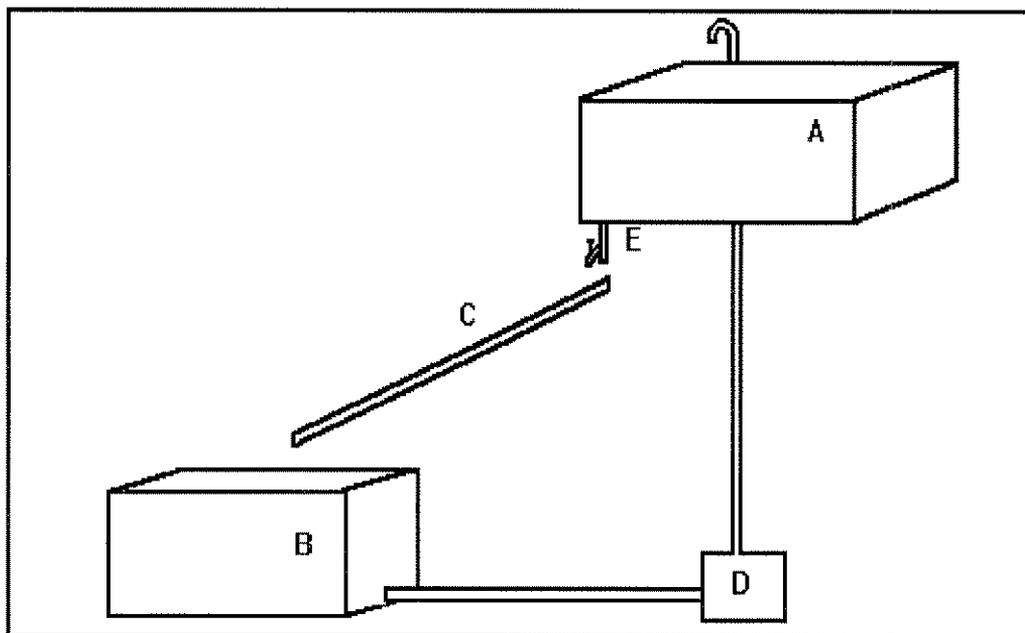


Fig. 01. ESQUEMA DO SISTEMA DE CRIAÇÃO DE BORRACHUDOS EM LABORATÓRIO. RESERVATÓRIO D'ÁGUA SUPERIOR (A); RESERVATÓRIO D'ÁGUA INFERIOR (B); RAMPAS DE MADEIRA (C); BOMBA D'ÁGUA ELÉTRICA (D); SISTEMA DE ALIMENTAÇÃO D'ÁGUA (E).

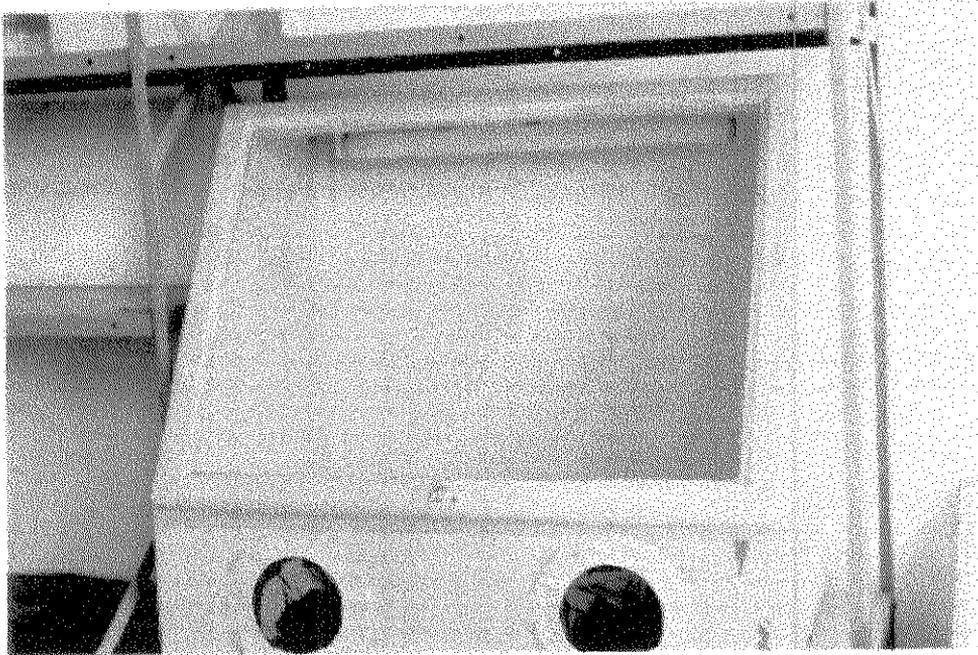


Fig. 2. CÂMARA DE CONTENÇÃO DE ADULTOS DE BORRACHUDO

Após a realização do repasto sanguíneo, as fêmeas de *S. pertinax* eram individualizadas em frascos de vidro de 40 ml (2,5 cm de diâmetro x 8,5 cm de altura) providas de fitas de papel de filtro com solução açucarada.

3.3. PATOLOGIA DE *Simulium pertinax* INFECTADO POR *Polydispyrenia simulii*

3.3.1. HISTOPATOLOGIA

Foram feitas investigações em indivíduos sadios e infectados por *P. simulii* em diferentes estágios de desenvolvimento; larva, pupa (com 24 h, 48 h e 72 h de desenvolvimento) e adultos recém-emergidos (machos e fêmeas).

Os indivíduos foram fixados em líquido de Bouin acético por 24 h sendo então processada a desidratação do material em gradiente de etanol (60% a 100%) para posterior inclusão em parafina.

Os cortes seriados foram obtidos com 6 a 8 μ m de espessura e corados com hematoxilina de Herlich e contrastados com eosina através de técnicas clássicas de histopatologia de insetos (Habib, 1982, 1983).

3.3.2. PREVALÊNCIA DE *P. simulii* EM OVÁRIOS DE *S. pertinax*

Para esta fase da pesquisa foram coletadas do campo fêmeas adultas do borrachudo por meio de aspiração diurna em isca humana. As coletas foram realizadas na Fazenda Cachoeirinha (Morungaba/ SP) em região onde sabidamente as populações de *S. pertinax* sofrem frequentes epizootias por *P. simulii* (Castello Branco Jr., 1991).

As fêmeas recém-coletadas foram mantidas em recipientes plásticos com gelo seco para imediata fixação dos ovários e posterior triagem em laboratório.

3.3.3. INFLUÊNCIA DO PARASITISMO POR *P. simulii* NO DESENVOLVIMENTO DAS GÔNADAS DE *S. pertinax*

Para a realização desta fase, procedeu-se à coleta de larvas sadias e doentes de *S. pertinax* de seu criadouro natural e sua manutenção, sob condições de laboratório, até a obtenção de adultos, conforme o exposto no item 3.2., observando-se que adultos originados de larvas sadias e de larvas doentes eram acondicionados em câmaras de contenção distintas.

As fêmeas de *S. pertinax*, obtidas pelo sistema de criação, foram dissecadas em solução salina 0,85% em intervalos regulares e, analisadas ao microscópio óptico.

Os ovários eram retirados e colocados em lâminas de microscopia para observação. Medidas de largura e comprimento dos folículos foram feitas com o auxílio de ocular de micrometria. A estimativa do volume folicular foi obtida pela fórmula de prolado esferóide (King & Vanoucek, 1960)². Tanto o número de ovos formados como o número de folículos em desenvolvimento das fêmeas eram contados.

Também foram dissecados em solução salina 0,85%, machos de *S. pertinax* tanto sadios como originados de larvas doentes, para análise das gônadas. Neste caso o único parâmetro avaliado foi a motilidade dos espermatozóides.

A análise estatística dos resultados referentes à morfometria e de todos os resultados deste trabalho foram feitos pelo teste "t", ao nível de 5% de significância (Beiguelman, 1988).

²Fórmula do Prolado Esferóide: $V=0,5236 \times L^2 \times C$, onde: V=volume; L=largura; C=comprimento

3.4. PATOLOGIA DE *Simulium pertinax* PARASITADO POR *Gastromermis viridis* c.f.

3.4.1. PREVALÊNCIA DE *G. viridis* cf. EM POPULAÇÕES LARVAIS DE *S. pertinax*

Esta etapa da pesquisa foi desenvolvida no período de maio de 1990 à abril de 1991. As larvas de *S. pertinax* foram coletadas em riacho afluente do rio Jaguari, no município de Morungaba/ SP.

A ocorrência natural de *G. viridis* cf. em larvas de *S. pertinax* foi avaliada através de amostragens mensais em 16 pontos ao longo do riacho. Esses pontos foram previamente demarcados após triagem em toda a sua extensão à procura de criadouros de *S. pertinax*. Em cada um destes pontos, as larvas eram observadas e uma determinada quantidade (ca. 100 indivíduos) era coletada de seu criadouro natural e fixadas imediatamente em álcool 70% para posterior triagem.

Em laboratório, as larvas eram agrupadas, por critérios anatomo-fisiológicos, em 3 classes; pequenas, médias e grandes. Para tal categorização utilizou-se como critério a presença e o desenvolvimento dos histoblastos respiratórios (Mulla & Lacey, 1976 ; Shelley, A., 1991, comunic. pessoal, Museu Britânico, Inglaterra). Desse modo, larvas pequenas não apresentavam histoblastos respiratórios enquanto larvas médias possuíam-nos aparentes mas não desenvolvidos. Já as larvas grandes possuíam os histoblastos respiratórios visíveis e bem desenvolvidos (Fig. 3). Dentro de cada classe, indivíduos parasitados eram distinguidos de larvas sadias devido ao fato dos nematóides serem visíveis através do tegumento translúcido da larva.

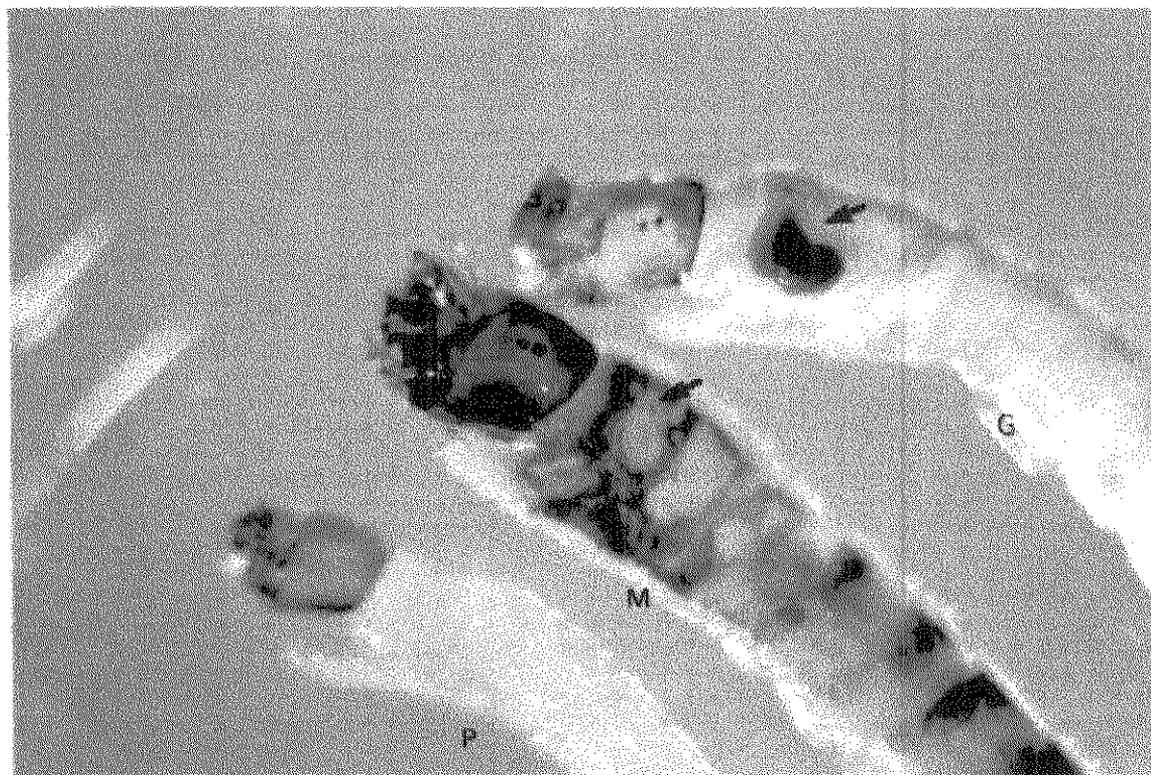


Fig. 3. LARVAS DE *S. pertinax*. PEQUENA (P), MÉDIA (M) E GRANDE (G). HISTOBLASTO RESPIRATÓRIO (SETA). (11,5x)

3.4.2. SINTOMATOLOGIA EXTERNA E MORFOMETRIA

As investigações nesta fase foram feitas a partir de observações de larvas de *S. pertinax* sadias e parasitadas no campo e também no sistema de criação em calhas (item 3.2.).

O estudo morfométrico baseou-se na medida do comprimento do corpo de larvas de *S. pertinax* sadias e parasitadas das 3 classes fisiológicas (pequena, média e grande). Com o auxílio de ocular de micrometria foi medido o comprimento da base da cabeça até a extremidade posterior do corpo da larva.

3.4.3. HISTOPATOLOGIA

As investigações histopatológicas foram feitas em larvas de *S. pertinax* sadias e parasitadas por *G. viridis* cf.. Os indivíduos foram fixados em líquido de Bouin acético por 24 h e processados conforme as técnicas clássicas de histopatologia de insetos expostas no item 3.3.1..

4. RESULTADOS & DISCUSSÃO

4.1. PATOLOGIA DE *Simulium pertinax* INFECTADO POR *Polydispyrenia simulii*

A sintomatologia externa de larvas de *S. pertinax* infectadas pelo microsporídeo *P. simulii* foi estudada e relatada por Castello Branco Jr. (1991) em sua dissertação de mestrado. Torna-se conveniente ressaltar que as larvas infectadas, conforme relatado pelo autor, apresentam uma redução da resposta comportamental face a quaisquer estímulos mecânicos ou físicos; além de um retardo em seu desenvolvimento revelando um processo conhecido como metatetelia.

4.1.1. ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS EM LARVAS DE *S. pertinax*

As investigações em cortes seriados de larvas de *S. pertinax* infectadas por *P. simulii* revelaram aspectos importantes da dinâmica da microsporidiose no hospedeiro borrachudo.

Foram constatadas alterações histológicas significativas no epitélio intestinal, tecido adiposo e tecido muscular de larvas infectadas. Tais alterações devem-se não apenas a ação direta do protozoário mas também a efeitos indiretos. Os resultados obtidos serão apresentados e discutidos a seguir.

4.1.1.1. EPITÉLIO INTESTINAL

Foram encontrados diversos esporos e esporóforos junto ao bolo alimentar na luz do intestino de larvas infectadas (Fig. 4). Ainda em larvas doentes foram encontrados frequentemente esporos no citoplasma de células epiteliais do intestino médio

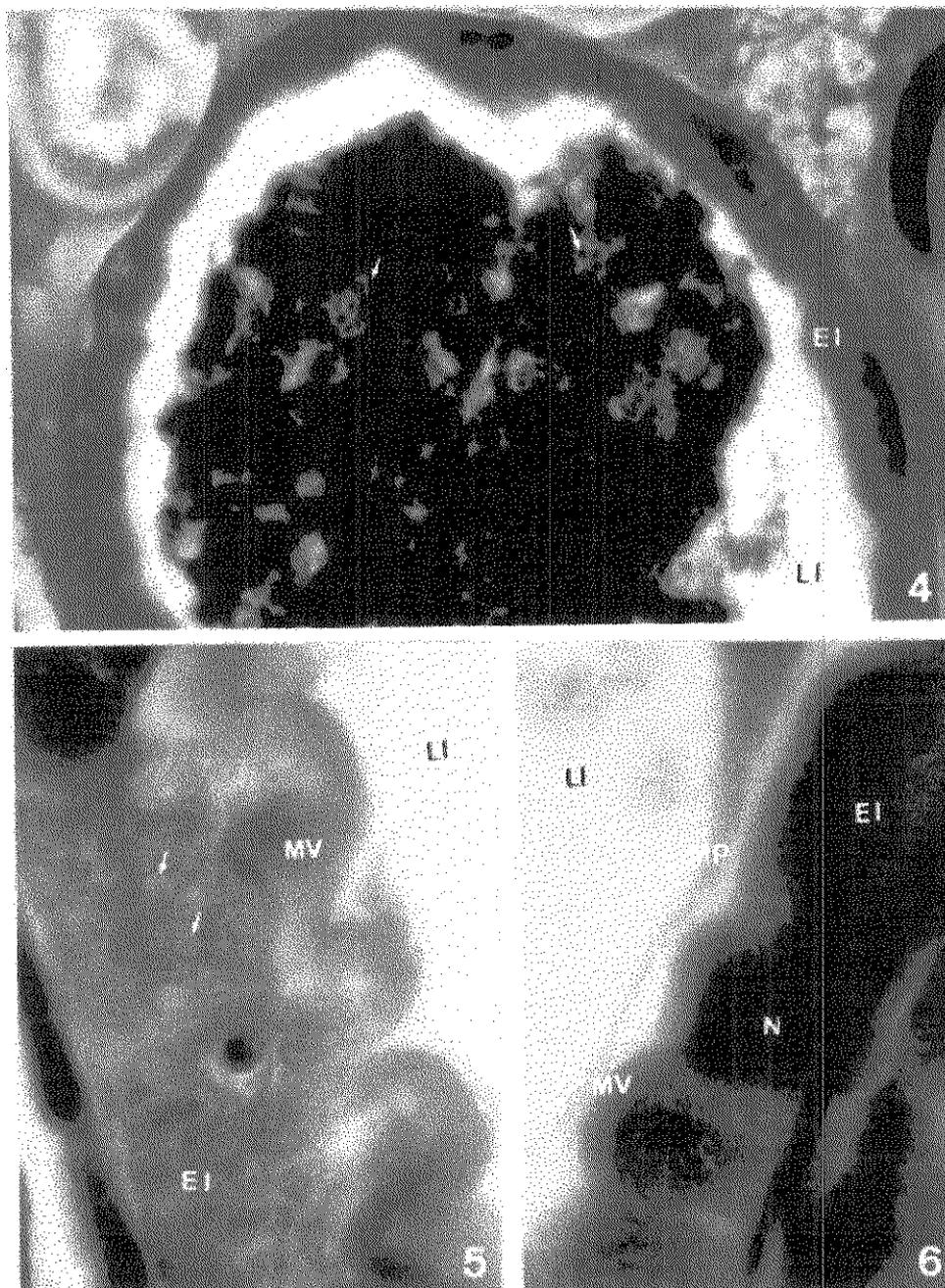
(Fig. 5). Tal fato evidencia a via horizontal como meio de infecção de microsporídeos em larvas de borrachudos. A extrusão do filamento polar na luz do intestino e a proximidade do esporo ao epitélio levam ao sucesso da invasão da célula hospedeira pelo agente biológico.

No interior da célula epitelial hospedeira ocorre o desenvolvimento e a multiplicação dos esporos. Sabe-se que dependendo da densidade de esporos com sucesso na invasão do epitélio intestinal, pode haver a morte do hospedeiro em alguns dias, tempo inferior ao necessário para a expressão da microsporidiose. Tal situação deve-se ao fato de que bactérias potencialmente patogênicas da flora intestinal do inseto acabam se beneficiando dos orifícios de entrada feitos pelo filamento polar do microsporídeo, invadindo também o epitélio intestinal e desencadeando uma septicemia. A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é um típico exemplo deste fenômeno em insetos terrestres (Habib, 1978; Habib & Andrade, 1986).

Acredita-se que a manutenção da doença na população hospedeira deva-se ao fato de que o sucesso do microsporídeo na invasão das células epiteliais do intestino médio seja relativamente pequeno de modo que a ação da flora bacteriana, presente no intestino do inseto, não seja relevante. Assim, os esporos que penetrem no epitélio intestinal se multiplicam no interior da célula epitelial e a rompem de modo a alcançarem a hemolinfa.

Avaliações de campo quanto à prevalência da microsporidiose causada por *P. simulii* em populações de simulídeos também evidenciam a existência de mecanismos de infecção horizontal na manutenção da doença em populações hospedeiras de simulídeos (Castello Branco Jr., 1991).

Segundo Weiser (1976), o núcleo de células parasitadas pelos microsporídeos *Thelohania bracteata*, *Stempellia simulii* ou *Pleistophora longifilis* torna-se hipertrofiado havendo posteriormente a quebra dos cromossomos e consequente deposição excessiva de cromatina.



Figs. 4-6. CORTE TRANSVERSAL DE LARVA DE *S. pertinax* INFECTADA POR *P. simulii*. EPITÉLIO INTESTINAL (EI); ESPOROS (*setas*); MEMBRANA PERITRÓFICA (MP); LUZ INTESTINAL (LI); MICROVILOSIDADES (MV); NÚCLEO DA CÉLULA HOSPEDEIRA COM DEPOSIÇÃO DE CROMATINA (N). 4. 1.817x. 5. 4.543x. 6. 4.543x.

No presente trabalho, foi observado um aumento da deposição de cromatina no núcleo de algumas células infectadas. No entanto, não se verificou hipertrofia (Fig. 6).

De qualquer maneira, evidencia-se assim a ação do microsporídeo nas atividades metabólicas da célula hospedeira, especialmente quanto à síntese de proteínas.

Apesar das células epiteliais estarem infectadas, não foi observada inicialmente, ação alguma sobre a bordadura do epitélio (microvilosidades) nem sobre a membrana peritrófica (Fig. 6). No entanto, em larvas em adiantado estado de infecção foram observadas alterações significantes. Ocorre uma degeneração da bordadura do epitélio, inclusive com a redução da intimidade entre o epitélio e a membrana peritrófica. As Figuras 4 e 5 revelam esse aspecto. O tecido degenerado responde inclusive de forma diferente ao processo de coloração quando comparado ao tecido de larvas sadias, evidenciando alteração química na composição do tecido afetado. Tal situação sugere que as atividades enzimáticas e os processos metabólicos de digestão e absorção de nutrientes pelo epitélio intestinal do inseto fiquem comprometidos.

4.1.1.2. TECIDO ADIPOSEO

As reservas energéticas e todas as reações do metabolismo intermediário dos insetos são mediadas no tecido adiposo, portanto sua importância é fundamental para a sobrevivência do indivíduo. O tecido adiposo sadio se apresenta sob duas formas, subepidérmico e visceral. Este último é mostrado na Fig. 7.

Em todas as larvas doentes observadas, o tecido adiposo subepidérmico mostrou-se íntegro. Já o tecido adiposo visceral revelou ser o sítio alvo de *P. simulii*. Observou-se em indivíduos infectados tanto a ocorrência de tecido adiposo sadio como infectado (Fig. 8), diferenciando do observado por Weiser (1976) e Patel & Habib

(1988) em larvas de lepidópteros infectadas por microsporídeos, onde todo o tecido alvo é infectado ao mesmo tempo.

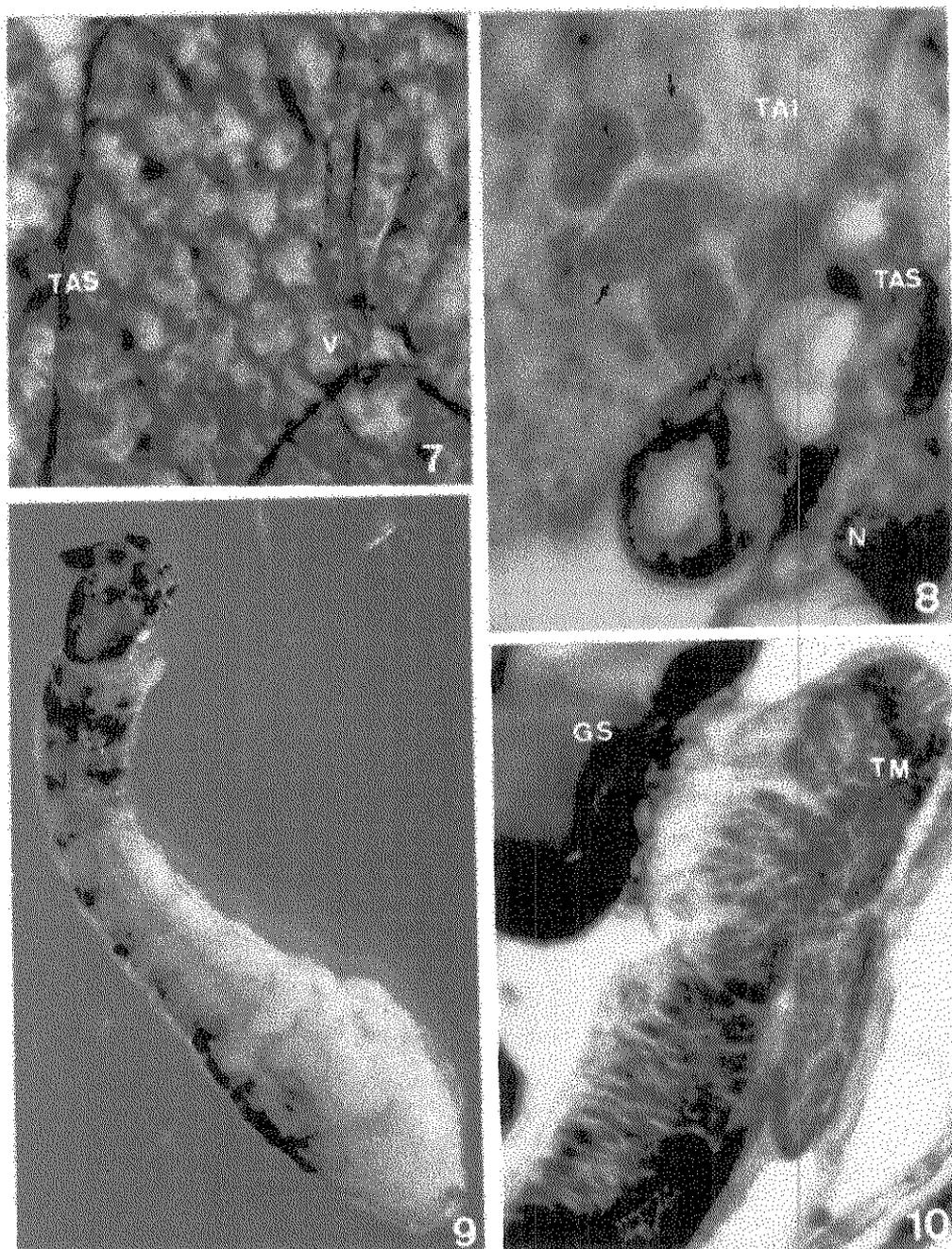
O tecido infectado apresentou diferenças morfo-histológicas em relação ao tecido sadio. A ausência de vacúolos de lipídeos e de lipoproteínas, além da resposta diferente à coloração, evidenciam tais alterações. O tecido adiposo infectado mostrou-se totalmente ocupado por esporos e formas vegetativas de *P. simulii* (Fig. 8).

As alterações na composição do tecido adiposo infectado por microsporídeos foram evidenciadas primeiramente por Smirnoff (1973). Foi demonstrado que em *Archips cerasivoranus* (Lep.; Tortricidae) infectado com *Nosema cerasivoranae* e em *Neodiprion swaini* (Hym.; Diprionidae) infectado com *Thelohania pristiphorae*, a quantidade de lipídeos insaturados foi reduzida drasticamente. Alterações semelhantes foram observadas por Patel & Habib (1988) em larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lep.; Noctuidae) infectadas por *Vairimorpha necatrix*.

Ainda temos que, larvas de *Bombyx mori* (Lep.; Bombycidae) infectadas experimentalmente por *Thelohania ephestiae*, *Nosema plodiae* e *N. heterosporum* apresentavam o tecido adiposo sem conter reserva lipídica alguma inviabilizando os processos de empupação e metamorfose levando o inseto à morte (Weiser, 1976).

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que boa parte do tecido adiposo infectado perca suas funções e acabe atuando apenas como sítio de multiplicação e desenvolvimento do patógeno. A existência de tecido adiposo não infectado em larvas doentes sugere, no entanto, a manutenção de níveis mínimos do metabolismo intermediário além de reservas energéticas suficientes para os processos de empupação e emergência de adultos.

Não foi possível a observação de vacúolos parasitoróforos como o exposto por Weiser & Ziska (1975 *apud* Weiser, 1976). Esses vacúolos seriam o resultado de atividade proteolítica ao redor de esporos maduros durante o processo de esporogonia.



Figs. 7-10. 7. CORTE TRANSVERSAL DE LARVA SADIO DE *S. pertinax* 4.543x. 8-10. LARVA DE *S. pertinax* INFECTADA POR *P. simulii*. 8. CORTE TRANSVERSAL 4.543x. 9. LARVA 6,0x. 10. CORTE TRANSVERSAL 1.817x. TECIDO ADIPOSEO SADIO (TAS); TECIDO ADIPOSEO INFECTADO (TAI); VACÚOLOS DE GORDURA (V); NÚCLEO DA CÉLULA HOSPEDEIRA (N); ESPOROS (SETAS); TECIDO MUSCULAR (TM); GLÂNDULA SALIVAR (GS).

A ação de *P. simulii* no citoplasma de células hospedeiras parece-nos evidente. Observa-se ainda a presença de núcleos da célula hospedeira ainda em atividade devido a presença de cromatina.

O presente autor observou a ocorrência do processo de metatetelia em larvas de *S. pertinax* e *S. subpallidum* infectadas por *P. simulii* (Castello Branco Jr., 1991). Tal processo, detectado inicialmente por Strickland (1913) em borrachudos infectados por microsporídeos, consiste no retardo do desenvolvimento larval, evidenciado pelo crescimento larval e pelo desenvolvimento dos histoblastos respiratórios. A liberação de substâncias de caráter proteico semelhante ao do hormônio juvenil durante o desenvolvimento do microsporídeo, revelado por Maurand & Bouix (1969), associada à estrutura do tecido adiposo infectado, observada no presente trabalho, sugerem serem estes os fatores responsáveis pelo processo de metatetelia também observado por Castello Branco Jr. (1991). Os grumos esbranquiçados visíveis em larvas de simúlideos infectadas por microsporídeos são facilmente explicados pelas alterações histológicas apresentadas neste trabalho. Esses grumos são visíveis devido à transparência do tegumento da larva (Fig. 9).

4.1.1.3. TECIDO MUSCULAR

Foi observada uma ação indireta da microsporidiose sobre o tecido muscular. Em larvas infectadas não se encontrou qualquer esporo ou forma vegetativa de *P. simulii* nesse tecido. Entretanto, frequentemente observou-se uma dissociação das fibras musculares e dos seus respectivos feixes de fibrilas (Fig. 10). Tal aspecto não foi detectado em larvas sadias.

Este fenômeno revela que apesar do microsporídeo não se instalar no tecido muscular, a ação direta do patógeno sobre o tecido adiposo deve implicar em alterações no metabolismo larval e das características físico-químicas da hemolinfa de modo a afetar indiretamente outros tecidos como o muscular.

Weidner (1970) foi um dos primeiros a revelar o estado de dissociação das fibras musculares em insetos infectados por microsporídeos.

Sabe-se que larvas de simúlídeos infectadas por microsporídeos apresentam uma resposta comportamental lenta a estímulos mecânicos e físicos, mostrando-se frequentemente letárgicas quando comparadas a larvas sadias (Waters, 1972; Reisen, 1977; Cupp, 1981; Castello Branco Jr., 1991).

Os resultados obtidos neste trabalho, quanto a ação da microsporidiose sobre o tecido muscular, sugerem que não apenas a redução de reservas energéticas e do metabolismo intermediário do hospedeiro levem ao comportamento letárgico das larvas mas também a ação no tecido muscular colabore para tal comportamento.

Larvas que apresentem tal comportamento podem se tornar presas mais fáceis para predadores e parasitas além de competirem de maneira desigual por sítios de fixação no substrato do curso d'água.

4.1.1.4. DEMAIS TECIDOS E SISTEMAS

Não foi detectada a presença de esporos ou formas vegetativas de *P. simulii* ou quaisquer efeitos diretos ou indiretos em outros tecidos como por exemplo, túbulos de Malpighi, glândulas salivares, epiderme e sistema nervoso.

Tem-se que realmente o tecido adiposo visceral seja o sítio alvo da infecção causada por *P. simulii*.

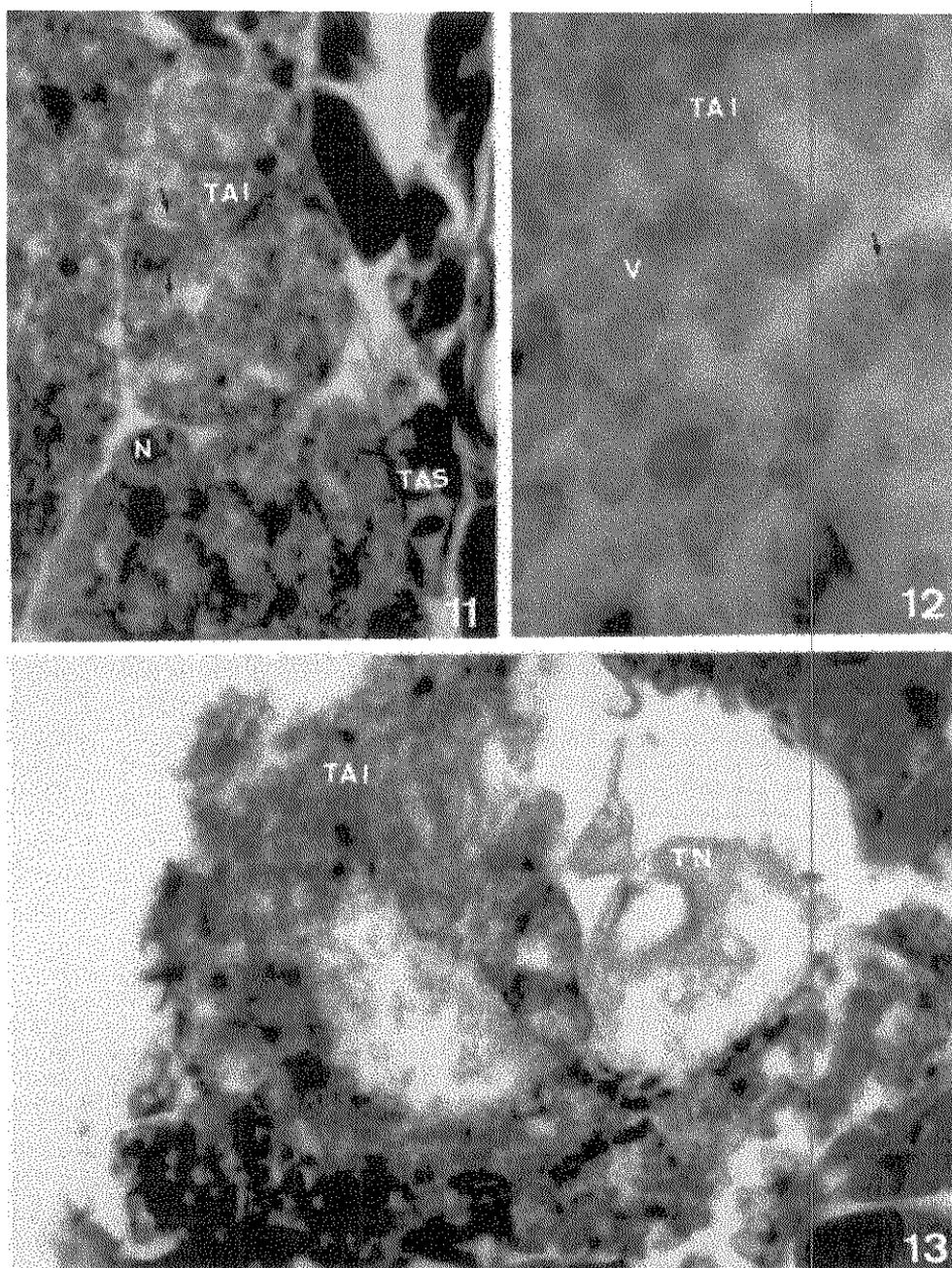
4.1.2. ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS EM PUPAS DE *S.pertinax*

Os resultados obtidos no presente trabalho revelam que larvas de *S. pertinax* infectadas por *P. simulii* apesar de apresentarem quase todo o tecido adiposo comprometido, além de desarranjo do epitélio intestinal médio e do tecido muscular conseguem passar ao estágio de pupa.

A histologia do estágio de desenvolvimento de pupa é, sem dúvida, algo de difícil execução devido a todo um complicado processo de histólise tecidual e rearranjo de tecidos e sistemas. Apesar disto, foi possível a observação de alguns processos.

Pupas doentes de *S. pertinax* com 24 h de desenvolvimento já apresentavam vários tecidos e sistemas desenvolvidos e, entre estes, encontramos massas de tecido adiposo visceral infectado e sadio. De qualquer maneira notou-se que o tecido adiposo da pupa, tanto o sadio como o infectado, reage de maneira diferente à coloração por Hematoxilina e Eosina quando comparado ao tecido adiposo larval, sugerindo assim, alteração em sua composição química. Tal fato é esperado visto a dimensão das mudanças envolvidas neste estágio de desenvolvimento do inseto e as necessidades energéticas do futuro adulto.

Verificou-se, no presente trabalho, uma maior individualização das gotículas de gordura em ambos os tecidos (sadio e infectado). Nos cortes histológicos pôde-se observar centenas de esporos e esporóforos de *P. simulii* no tecido adiposo infectado de pupas com 24 h de desenvolvimento. Além disso verifica-se a destruição da membrana plasmática das células hospedeiras conforme evidenciam as Figuras 11 e 12. Ainda notou-se a mesma proximidade observada em larvas infectadas entre o tecido infectado e o sadio (Figuras 8 e 11). Observou-se ainda nestas pupas a formação de uma matriz geralmente inserida no tecido adiposo infectado (Fig. 13). Esta matriz apresenta todos os aspectos de um tecido necrosado. Acredita-se que o tecido adiposo infectado, já exaurido, não apresentando mais condições de suportar o patógeno, passa a sofrer um



Figs. 11-13. CORTE TRANSVERSAL DE PUPA DE *S. pertinax* (COM 24 h DE DESENVOLVIMENTO) INFECTADA POR *P. simulii*. TECIDO ADIPOSEO SADIO (TAS); TECIDO ADIPOSEO INFECTADO (TAI); ESPOROS (SETAS); NÚCLEO DA CÉLULA HOSPEDEIRA (N); VACÚOLO DE GORDURA (V); TECIDO NECROSADO (TN). 11. 1.817x. 12. 4.543x. 13. 1.817x.

processo de necrose. Os demais tecidos já diferenciados não apresentaram sintoma algum da microsporidiose.

Pupas infectadas por *P. simulii* e com 48 h de desenvolvimento ainda apresentavam a mesma conformação que as pupas com 24 h de desenvolvimento, sendo que as massas de tecido necrosado no tecido adiposo infectado eram em maior quantidade. Já as pupas infectadas com 72 h de desenvolvimento apresentaram um panorama diferente. O tecido adiposo apresentava-se praticamente sem esporos e a quantidade de tecido necrosado era muito grande, evidenciando assim, a destruição de tecido e dos esporos de *P. simulii* ao longo do desenvolvimento pupal do hospedeiro.

Constatou-se a ausência de esporos ou, pelo menos, nenhuma evidência da ação da microsporidiose nos outros tecidos e sistemas já diferenciados tais como, sistema nervoso, epitélio intestinal, músculos e túbulos de Malpighi. Infelizmente as gônadas não foram reconhecidas no material, tanto em pupas sadias como em infectadas.

Exemplos de infecções por patógenos sendo debeladas no estágio de pupa do hospedeiro devido ao processo histolítico dessa fase são conhecidos em dípteros muscóides (Balzan, 1937 *apud* Wigglesworth, 1972). Além disso, microrganismos não patogênicos, como algumas bactérias, também são destruídas no processo de histólise na pupa de vários lepidópteros e ortopteróides (Wigglesworth, 1972).

A partir da situação encontrada no presente trabalho, dois processos seriam possíveis para a manutenção da microsporidiose na população hospedeira. No primeiro caso, haveria a morte do hospedeiro e conseqüente liberação de esporos no meio aquático, promovendo assim, a infecção via oral de novos indivíduos. No segundo processo, a pupa infectada conseguiria gerar um adulto e, no caso de fêmea, uma pequena porcentagem de esporos migraria do tecido adiposo necrosante para os oenócitos nos ovários, ainda no estágio de pupa. Esta situação caracterizaria a manutenção da microsporidiose na população hospedeira via infecção vertical transovariana. Este último processo tem sido descrito em algumas espécies de microsporídeos ocorrendo em pernilongos (Andreadis & Hall, 1979a; Lord *et al.*, 1981; Becnel *et al.*, 1986; Andreadis, 1983, 1988, 1989, 1990).

Os mecanismos de manutenção da microsporidiose nas populações hospedeiras de borrachudos serão discutidos novamente adiante.

4.1.3. ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS EM ADULTOS DE *S. pertinax*

Não se verificou a presença de esporos ou formas vegetativas de *P. simulii* ou qualquer evidência da ação da microsporidiose em quaisquer tecidos, inclusive nas gônadas.

Dessa maneira, a infecção vertical de *P. simulii* em *S. pertinax* não se verificou. Existem duas possibilidades; a primeira é de que a infecção vertical de fato não ocorra e, a segunda é que sua frequência seja muito baixa, pois seria necessário que o patógeno enfrentasse primeiramente as defesas da larva, passasse pelo processo de histólise na pupa e ainda conseguisse infectar as gônadas do hospedeiro, no estágio de larva ou de pupa, e sobreviver até a fase adulta do hospedeiro para então se expressar na progênie do inseto.

O único registro existente quanto à transmissão vertical em simuliídeos é a nota reportada por Undeen (1981), onde esporoblastos foram encontrados em esfregaços de fêmeas adultas de *S. vittatum* originadas de larvas submetidas a doses diárias de esporos de *Tuzetia debaisieux*. Entretanto, o próprio Undeen (1981) relata que as formas encontradas nos adultos eram muito diferentes das de *T. dabaisieux* usadas nos inóculos, levantando dúvidas quanto à real possibilidade da infecção vertical ter ocorrido.

Apesar da transmissão vertical de microsporídeos ser considerada comum nos dípteros culicídeos, vários 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 algumas situações, esta última não seria capaz de manter uma microsporidiose por muito tempo nas

populações hospedeiras (Fine, 1975; Andreadis & Hall, 1979b; Anderson & May, 1981; Brown, 1987).

Infelizmente, os trabalhos versando sobre a dinâmica da relação patógeno-hospedeiro de microsporidioses são escassos. Hoje as pesquisas em Microsporidiologia tratam de aspectos específicos da biologia do patógeno, novos caracteres taxonômicos ou sua simples ocorrência. Conforme atesta Madox (1987), em sua revisão sobre protozoários em insetos, são poucos os trabalhos com real valor para o estudo da epizootiologia de microsporidioses.

O estudo de microsporídeos em insetos aquáticos tem sido quase que restrito aos dípteros culicídeos, especialmente devido à sua relativa facilidade de manutenção em laboratório. Mesmo assim, trabalhos versando sobre a histopatologia de microsporidioses nestes insetos são poucos.

As microsporidioses ocorrendo em simulídeos são pouco estudadas, havendo na maioria dos casos, apenas o relato de sua ocorrência em determinada espécie hospedeira. Os resultados apresentados no presente trabalho auxiliam a compreensão da dinâmica da doença no hospedeiro e a correta avaliação do potencial deste grupo de patógenos para o controle microbiano de borrachudos.

4.1.4. ESTUDOS SOBRE A PREVALÊNCIA DE *P. simulii* EM OVÁRIOS DE *S. pertinax*

Foram coletadas 522 fêmeas de *S. pertinax* do campo em área onde epizootias por *P. simulii* são frequentes nas populações larvais do borrachudo. No entanto não se detectou presença alguma de esporos do microsporídeo nos ovários das fêmeas analisadas.

Tal resultado deve ser analisado cuidadosamente. Em epizootiologia, e no caso de microsporídeos em especial, é comum a afirmação geral de que taxas de infecção muito baixas encontradas em hospedeiros insetos seriam consonantes com o

mecanismo de transmissão horizontal, enquanto que prevalências elevadas indicariam um mecanismo de transmissão vertical atuando na dinâmica da manutenção da doença no campo.

Segundo Fine (1984), esta e outras afirmações tidas como verdadeiramente imutáveis representam, na realidade, a opinião de alguns autores pois cada afirmação deste tipo é de validade questionável, especialmente quanto à relação entre a prevalência encontrada e o tipo de mecanismo de transmissão envolvido.

Na área de estudo, em Morungaba/ SP, Castello Branco Jr. (1991) relatou haver constantes epizootias nas populações larvais de *S. pertinax* e *S. subpallidum*, atingindo níveis superiores a 50%. Tal situação tradicionalmente seria justificada devido a um mecanismo de transmissão vertical bem estabelecido nas populações hospedeiras.

No entanto, em termos histológicos conforme exposto anteriormente, verificou-se que ocorre uma eliminação dos esporos de *P. simulii* durante a fase de pupa do hospedeiro. Considerando-se que a amostragem de fêmeas adultas realizada no presente trabalho foi satisfatória e que, na época de coleta desses adultos, as populações larvais de *S. pertinax* da região sofriam da microsporidiose (Castello Branco Jr., 1991), acredita-se que de fato não ocorra a transmissão vertical de *P. simulii* em *S. pertinax*. Desta forma, a manutenção da doença no campo seria semelhante a *Amblyospora* sp. em *Culex salinarius* (Andreadis & Hall, 1979b) onde a transmissão horizontal tem o principal papel na manutenção da microsporidiose no campo.

Segundo Maddox (1987) e Crosskey (1990) este fenômeno ainda não é completamente compreendido, havendo inúmeras incógnitas. Conforme exposto anteriormente, o único relato existente até o momento quanto à transmissão vertical em simúlideos é a nota de Undeen (1981) onde o próprio autor coloca em dúvida os resultados obtidos quanto a eventual transmissão de *Tuzetia debaisieux* em *S. vittatum*.

Assim sendo, os resultados expostos no presente relato colaboram para uma melhor compreensão dos mecanismos de manutenção das microsporidioses em populações hospedeiras de simúlideos.

4.1.5. INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO POR *P. simulii* NAS GÔNADAS DE *S. pertinax*

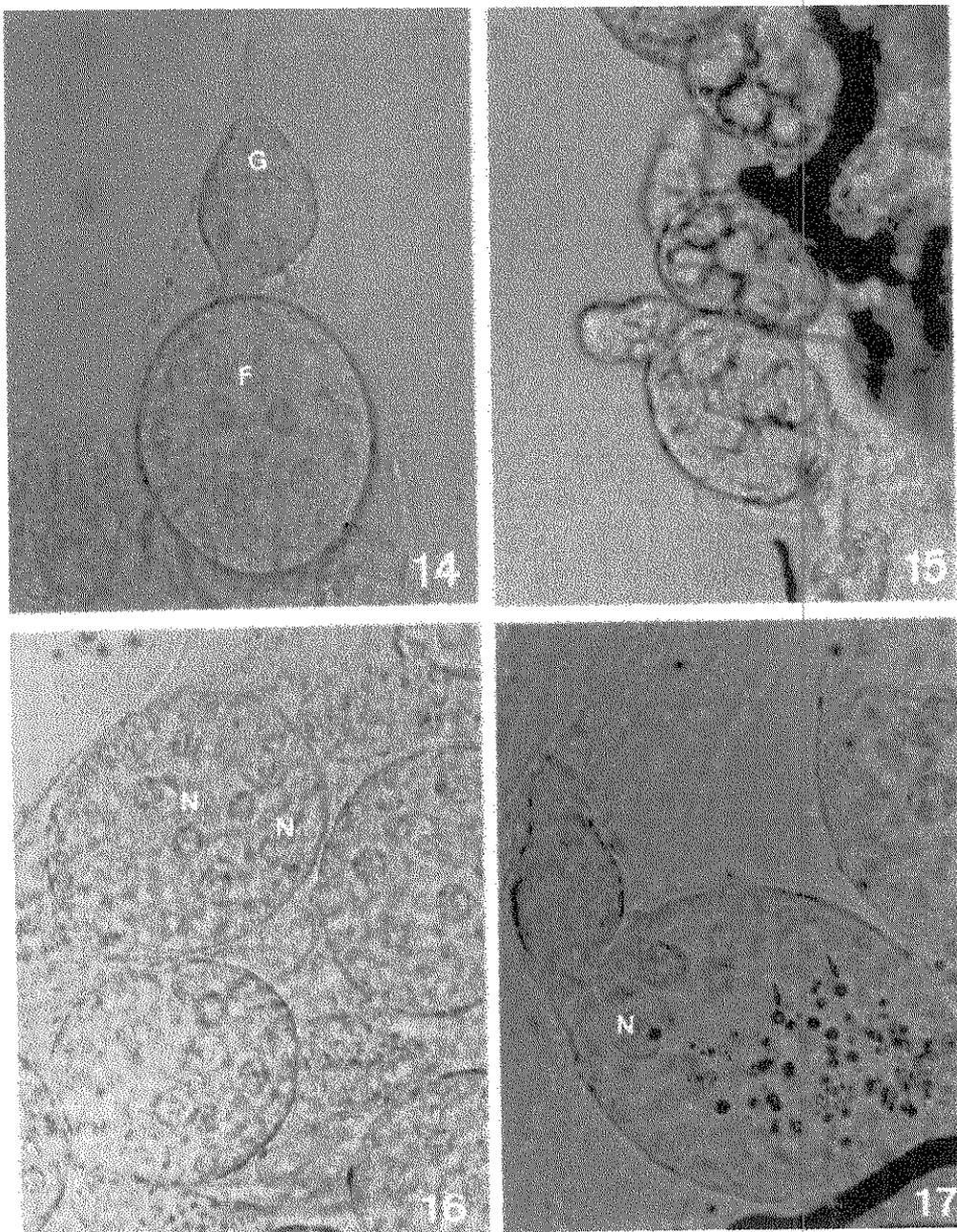
Uma vez verificada a não ocorrência de *P. simulii* em fêmeas de *S. pertinax* coletadas no campo e que, histologicamente a microsporidiose em larvas de borrachudo era debelada na fase de pupa do hospedeiro, restava ainda uma dúvida quanto à possibilidade do comprometimento indireto da oogênese de adultos cujas larvas haviam apresentado uma severa infecção.

Investigações foram feitas neste sentido, sendo necessários inicialmente, estudos sobre o processo de oogênese em indivíduos originados de larvas sadias. Os resultados destes estudos são apresentados e discutidos a seguir.

4.1.5.1. DESCRIÇÃO DA OOGÊNESE DE FÊMEAS SADIAS DE *S. pertinax*

A estrutura do sistema reprodutor de *S. pertinax* é a clássica em insetos; 2 ovários e ovidutos que desembocam em uma vagina, um par de glândulas acessórias além da própria spermateca. Os ovários localizam-se adjacentes ao intestino sendo geralmente ovalados e de aspecto translúcido. Cada ovário é formado por vários ovariolos. Estes são mantidos bem unidos por uma fina membrana que forma a parede do ovário.

Os ovários dos simúlideos são do tipo meroístico politrófico, ou seja, os trofócitos localizam-se dentro do folículo e suprem o oócito de vitelo durante o seu desenvolvimento. Cada ovariolo consiste de um germário do qual diferenciam-se sucessivos folículos. Em fêmeas gonoativas, 2 folículos são normalmente visíveis. Um deles é bem aderido ao germário, enquanto o outro, é mais distal (Fig. 14). Este último desenvolve-se após o repasto sanguíneo.



Figs. 14-17. SEQUÊNCIA DA OOGÊNESE EM *S. pertinax*. 14. FOLÍCULO TÍPICO DE FÊMEAS GONOATIVAS. GERMÁRIO COM FOLÍCULO INDIFERENCIADO (G); FOLÍCULO DIFERENCIADO NA FASE I (F) 1.794x. 15. FOLÍCULO FASE I DIFERENCIADO EM 8 CÉLULAS 449x. 16. FOLÍCULO FASE I COM NÚCLEOS POLIPLÓIDES (N) 1.794x. 17. FOLÍCULO EM INÍCIO DE VITELOGÊNESE (FASE II). GRÂNULO DE VITELÓ (SETAS); NÚCLEO POLIPLÓIDE DE UM TROFÓCITO (N) 1.794x.

Os simulídeos apresentam concordância gonotrófica, sendo assim o desenvolvimento folicular é sincrônico e modulado pela necessidade de sangue para que a oogênese se complete. Dessa forma, a cada repasto sanguíneo, um lote de ovos se desenvolve.

A oogênese nos simulídeos não difere significativamente da encontrada em outros dípteros. No entanto o desenvolvimento folicular tem sido classificado diversamente por vários autores.

Adams (1974) propôs uma classificação baseada no desenvolvimento ovariano de muscídeos, onde são reconhecidas 10 fases no processo de oogênese. Esta classificação tem sido muito usada em estudos em dípteros ciclorrafos (Spradbery & Sands, 1976; Avancini & Prado, 1986; Linhares, 1988).

Christophers (1911), trabalhando com mosquitos, apresentou uma classificação onde são reconhecidas 5 fases de desenvolvimento. Segundo Charlwood *et al.* (1980) e Crosskey (1990) esta classificação mesmo tendo sofrido algumas modificações por Mer (1936) e Macan (1950) ainda é comumente usada.

Segundo Crosskey (1990) as classificações que apresentam mais de 5 fases são, na realidade, subfases de difícil reconhecimento e comparação.

No presente trabalho será adotada a classificação modificada de Christophers (1911) devido especialmente ao fato de que originalmente foi proposta para dípteros nematóceros. Esta classificação é apresentada a seguir. As figuras apresentadas são de foliculos de fêmeas sadias de *S. pertinax*.

FASE I : O folículo tem inicialmente forma arredondada e não há deposição de vitelo. O folículo, quando diferenciado, apresenta 2 a 8 células (Fig. 15), havendo posteriormente a distinção entre trofócitos e oócito (Fig. 16).

FASE II: O folículo apresenta-se ovalado e a deposição de vitelo inicia-se, ocupando posteriormente entre um terço do folículo até cerca de 50 % deste (Figuras 17 e 18).

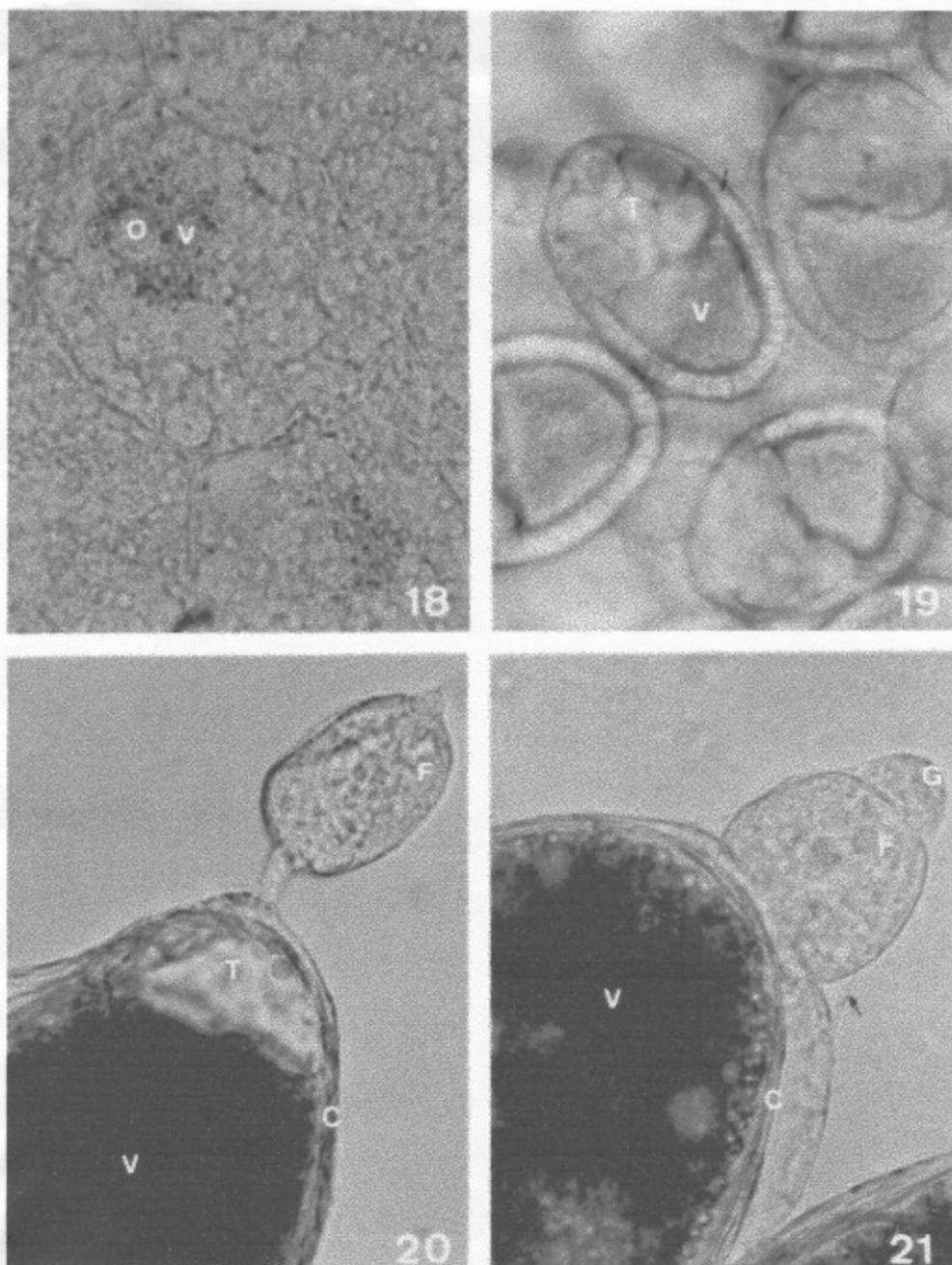
FASE III: A deposição de vitelo continua e este ocupa entre 50% e 60% do folículo (Fig. 19).

FASE IV: A deposição de vitelo continua e este ocupa entre 70% e 90% do folículo. Nesta fase o folículo está maior e os trofócitos ocupam uma porção terminal distal do folículo (Fig. 20).

FASE V: A deposição de vitelo está completada. O "ovo" está maduro no folículo e as membranas do córion cobrem o óvulo (Fig. 21). Os restos dos trofócitos podem ser encontrados na extremidade distal do folículo, entre o epitélio folicular e o córion. Nesta fase o óvulo está pronto para ser fecundado e oviposto. Quando atingida esta fase, o próximo folículo encontra-se no meio da fase I, ocorrendo até a diferenciação do folículo em 8 células (Fig. 15).

As equivalências entre a classificação adotada neste trabalho e a de Adams (1974) são apresentadas a seguir. A Fase I abrange os estágios 1, 2 e 3; a Fase II compreende os estágios 4 e 5; a Fase III, os estágios 6 e 7; a Fase IV engloba os estágios 8 e 9, e a Fase V equivale ao estágio 10.

Vale salientar que realmente existe uma grande dificuldade para diferenciar-se as fases propostas por Adams (1974), especialmente do estágio 5 ao 8. No entanto os estágios 1 ao 4 são facilmente detectáveis. O estágio 1 consiste do folículo ainda não diferenciado no germário (Fig. 14). No estágio 2, o folículo já diferenciado é esferoide e apresenta até 8 células (Fig. 15). No estágio 3, o folículo tende a assumir uma forma ovalada com trofócitos e oócito já diferenciados. Neste passo, ocorre uma poliploidização dos núcleos dos trofócitos (Fig. 16). Estes 3 estágios compreendem a Fase I proposta por Christophers (1911). O estágio 4, que compreende o início da Fase II de Christophers (1911), apresenta o início do processo de vitelogênese (Fig. 17). Quanto à Fase II, tem-se que o epitélio folicular inicialmente cúbico torna-se colunar na área ao redor do vitelo, permanecendo cúbico na região dos trofócitos. Na Fase III o epitélio ao redor da área com vitelo permanece colunar, no entanto o resto do epitélio folicular adquire o aspecto de afrouxado (Fig. 19). Na Fase IV, todo o epitélio folicular tende a adquirir tal aspecto.



Figs. 18-21. SEQUÊNCIA DA OOGÊNESE EM *S. pertinax*. 18. FOLÍCULO FASE II. DEPOSIÇÃO DE VITELO (V) AO REDOR DO NÚCLEO DO OÓCITO (O) 4.485x. 19. FOLÍCULO FASE III. REGIÃO DIFERENCIADA COM OÓCITO E VITELO (V); TROFÓCITOS (T); EPITÉLIO FOLICULAR (SETAS) 1.794x. 20. FOLÍCULO FASE IV. VITELO (V), REGIÃO DOS TROFÓCITOS (T) 1.794x. 21. FOLÍCULO FASE V. VITELO (V); MEMBRANA OVARIÓLO (SETA); CÓRION (C); SEGUNDO FOLÍCULO (F); GERMÁRIO (G) 1.794x.

Quanto a deposição de vitelo, esta ocorre de modo diferente do observado em dípteros ciclorrafos. Em califorídeos, por exemplo, a deposição ocorre inicialmente ao redor do núcleo do oócito e de forma uniforme vai ocupando o folículo da região proximal do folículo para a distal (Avancini & Prado, 1986; Linhares, 1988).

A deposição de vitelo, observada no presente trabalho, inicia-se não necessariamente ao redor do núcleo do oócito, aparecendo, nesses casos, inicialmente na região central do folículo (Fig. 17), espalhando-se e ocupando irregularmente o folículo, até que 50% deste esteja preenchido (Fase II - Fase III). Além deste padrão também verificou-se a vitelogênese clássica, onde o vitelo vai sendo depositado ao redor do oócito (Fig. 18).

Os resultados obtidos, no presente trabalho, revelam que 21 h a 26 h após o repasto sanguíneo, os folículos ovarianos de *S. pertinax* estão na Fase II de desenvolvimento.

Estes resultados diferem do verificado por Ramirez-Perez *et al.* (1976) e Lacey & Charlwood (1980) em fêmeas de *S. metallicum* na Venezuela e em *S. simplicicolor* na Amazônia brasileira, respectivamente.

No estudo de Ramirez-Perez *et al.* (1976) o desenvolvimento folicular de *S. metallicum* apresentava-se na Fase II logo após 6 hs do repasto sanguíneo; passando à Fase III em aproximadamente 12 h após o repasto. Lacey & Charlwood (1980) revelaram que a Fase II persistia até 12 a 15 h pós-repasto, entrando na Fase III após 15 h da refeição sanguínea. Seus estudos revelaram que ambas as espécies possuem um ciclo gonotrófico de 48 h.

Os resultados obtidos, no presente estudo, quando comparados aos obtidos para *S. metallicum* e *S. simplicicolor*, sugerem que *S. pertinax* tenha um ciclo gonotrófico superior a 48 h. A manutenção de fêmeas por um tempo superior ao já obtido seria necessária para a verificação final do período do ciclo gonotrófico em *S. pertinax*.

Ciclos gonotróficos superiores a 48 h foram descritos em espécies dos complexos *S. damnosum* na África (Wanson & Lebiec, 1948 *apud* Crosskey, 1990; Lewis, 1953; Le Berre, 1966 *apud* Crosskey, 1990) e *S. ochraceum* na América Central (Garms & Ochoa, 1979; Cupp & Collins, 1979) onde verificou-se sua duração entre 3 e 5

dias. Curiosamente, existem ciclos gonotróficos bem menores como o relatado em *Austrosimulium pestilens*, sendo de 24 hs (Hunter & Moorhouse, 1976).

Segundo Crosskey (1990), a duração do ciclo gonotrófico de simulídeos em geral tem sido relatada entre 2 e 8 dias.

4.1.5.2. ESTUDOS MORFOMÉTRICOS

As dimensões dos folículos de fêmeas sadias nas diferentes fases de desenvolvimento são apresentadas na TABELA 1.

As dimensões dos ovos de *S. pertinax* (Fase V), verificadas no presente trabalho, estão dentro das medidas geralmente encontradas para as espécies do gênero *Simulium*, ou seja, com o comprimento variando de 150 a 300 μm (Crosskey, 1990) e consonantes aos valores encontrados por Pegoraro (1993) também em *S. pertinax*.

Infelizmente os poucos trabalhos que existem abordando a morfometria das fases da oogênese de simulídeos não permitem uma comparação precisa de dados. Isto devido ao não esclarecimento das dimensões no texto, como por exemplo, no trabalho de Ramirez-Perez *et al.* (1976).

Observando-se os resultados obtidos (TABELA 1), percebe-se um nítido aumento em todas as fases, especialmente durante as 4 primeiras.

Conforme exposto anteriormente, embora haja dificuldade para o reconhecimento das fases da classificação de Adams (1974), os 4 primeiros estágios são de diagnóstico relativamente fácil. O desmembramento da Fase I em 3 estágios pode ser facilmente realizada, no entanto a análise estatística dos dados morfométricos não revelou diferença significativa entre essas sub-categorias. No entanto, deve-se levar em consideração que as diferenças visíveis têm sua importância biológica.

O mesmo não ocorreu para a Fase II, onde podem ser reconhecidos 2 estágios conforme exposto anteriormente. O primeiro estágio (nº 4, segundo Adams (1974)) apresentou as seguintes dimensões médias: 62,2 μm x 75,2 μm ; enquanto o

TABELA 1: MORFOMETRIA DAS FASES DE DESENVOLVIMENTO FOLICULAR DE FÊMEAS SADIAS DE *S. pertinax*.

FASE	n	LARGURA (μm)		COMPRIMENTO (μm)		VOLUME (μm^3)	
		X	S	X	S	X	S
I	35	46,6	0,004	56,8	0,003	$6,5 \times 10^5$	0,003
II	23	70,7	0,010	85,3	0,013	$22,3 \times 10^4$	0,010
III	20	79,3	0,010	105,0	0,012	$35,6 \times 10^4$	0,011
IV	33	168,0	0,016	263,9	0,017	$39,0 \times 10^5$	0,016
V	10	174,1	0,017	276,2	0,020	$43,8 \times 10^5$	0,019

(n= número de medições; x= média; s= desvio padrão)

segundo estágio (nº 5) revelou ter dimensões médias de 81,7 µm x 98,4 µm. Estes valores mostraram-se diferentes ao nível de 5% de significância.

Em vista dos resultados obtidos quanto à morfometria, pode-se concluir que há possibilidade do uso das subdivisões da Fase II para os estudos comparativos da oogênese de *S. pertinax*, assim como das demais fases sem, no entanto, a necessidade de subdividi-las.

O número de ovos encontrados, em média, em fêmeas sadias de *S. pertinax* foi de 423,5 ; variando de 345 a 502 ovos enquanto que o número de oócitos em desenvolvimento encontrados por ovário foi de 193,25 ; variando de 117 a 265 oócitos.

Os resultados obtidos no presente trabalho, não são consonantes aos observados por Pegoraro (1993) também em *S. pertinax*. Em seu trabalho foi encontrado um número bem menor de ovos por fêmea, 236,9 em média. Este valor deve refletir o fato de que Pegoraro (1993) trabalhou com fêmeas coletadas do campo enquanto que, no presente trabalho, as fêmeas foram obtidas em laboratório, tendo portanto, a mesma idade. Uma vez que a quantidade de ovos por fêmea decresce com sua idade (Ramirez-Perez *et al.*, 1976; Crosskey, 1990), acredita-se que os resultados obtidos por Pegoraro (1993) são subestimados devido a este detalhe fisiológico. Sendo assim, os resultados obtidos no presente trabalho refletiriam com maior segurança o real potencial reprodutivo de fêmeas nulíparas de *S. pertinax*.

Quanto às fêmeas de *S. pertinax* originadas de larvas infectadas por *P. simulii* (n=7), temos que não se detectou qualquer alteração na sequência do desenvolvimento ovariano quando comparadas com fêmeas originadas de larvas sadias (n=30).

Também não se verificou diferença significativa nas dimensões dos folículos ovarianos entre as duas categorias de fêmeas. A TABELA 2 apresenta os valores comparativos das dimensões dos folículos de fêmeas sadias e originadas de larvas doentes. Salienta-se que tal comparação só foi possível entre folículos na Fase I de desenvolvimento (pré-vitelogênese) devido ao número de adultos obtido. De qualquer modo, pode-se verificar um maior desvio padrão da média das dimensões dos folículos de fêmeas

originadas de larvas doentes, indicando assim uma maior heterogeneidade fenotípica para esta característica. Uma das explicações para este fator é que durante o estágio de pupa, apesar da doença ser debelada, ocorra um comprometimento de recursos energéticos a serem alocados para determinadas funções do adulto.

Consonante à hipótese acima é a diferença significativa ($P < 0,05$) verificada no número de folículos por ovário entre fêmeas sadias e originadas de larvas doentes, revelando uma redução de 31,2 % na fecundidade das fêmeas cujas larvas estavam infectadas por *P. simulii*. A TABELA 3 apresenta os valores obtidos quanto ao número de folículos em desenvolvimento por ovário das fêmeas estudadas.

A redução da fecundidade de insetos hospedeiros devido a microsporidioses tem sido frequentemente relatada (Gaugler & Brooks, 1975; Mercer & Wigley, 1987; Lockwood & Debrey, 1990), inclusive em dípteros (Alger & Undeen, 1970). Malone (1987) relata uma redução de 25% na fecundidade de *Listronotus bonariensis* (Col.; Curculionidae) devido a infecções por *Microsporidium ititi*; enquanto reduções mais drásticas da ordem de 77% foram verificadas em infecções por *Nosema whitei* em *Tribolium castaneum* (Col.; Tenebrionidae) (Armstrong & Bass, 1986).

A redução da fecundidade tem sido verificada inclusive em parasitos de lepidópteros quando estes encontram-se infectados por microsporídeos, como por exemplo, *Trichogramma nubilale* ao parasitar ovos de *Ostrinia nubilalis* (Lep.; Pyralidae) infectados por *Nosema pyrausta*. Nesse caso houve uma redução de 41% na fecundidade do parasito (Sajap & Lewis, 1988).

Os resultados obtidos no presente trabalho sustentam a hipótese de haver uma redução de, no mínimo, 31,2% na fecundidade de fêmeas de *S. pertinax* originadas de larvas doentes devido ao fato de que tais valores referem-se ao desenvolvimento folicular ainda na FASE I. Além disso ainda existe a chance de que a fêmea não consiga copular ou não consiga obter o repasto sanguíneo necessário para o desenvolvimento ovariano; ou ainda, que os espermatozoides obtidos pela cópula não sejam

TABELA 2: DIMENSÕES DOS FOLÍCULOS OVARIANOS (FASE I) DE ADULTOS DE *S. pertinax* SADIOS E DE FÊMEAS ORIGINADAS DE LARVAS INFECTADAS POR *P. simulii*.

FÊMEAS	n	LARGURA (μm)		COMPRIMENTO (μm)	
		x	s	x	s
SADIAS	35	46,6 ^a	0,004	56,8 ^b	0,003
INFECTADAS	56	38,8 ^a	4,120	50,4 ^b	4,150

(n = número de indivíduos, x = média, s = desvio padrão)

(valores seguidos de mesma letra não são significativamente diferentes ao nível de significância de 5%)

TABELA 3: NÚMERO DE FOLÍCULOS EM DESENVOLVIMENTO POR OVÁRIO DE FÊMEAS DE *S. pertinax* SADIAS E DE FÊMEAS ORIGINADAS DE LARVAS INFECTADAS POR *P. simulii*.

	FÊMEAS	
	SADIAS	INFECTADAS
n	30	07
x	262,3 ^a	180,4 ^b
s	40,9	80,1

(n = número de indivíduos; x = média; s = desvio padrão)

(valores seguidos de mesma letra não são significativamente diferentes ao nível de significância de 5 %)

viáveis. Dessa forma, a redução da fecundidade de fêmeas de *S. pertinax* originadas de larvas doentes poderia ser ainda mais acentuada.

4.1.5.3. OBSERVAÇÕES EM MACHOS DE *S. pertinax*

O sistema reprodutor masculino dos borrachudos é formado por 2 testículos, ductos deferentes e ducto ejaculador.

De um modo geral, os estudos sobre espermatogênese em insetos são poucos se comparados ao volume de trabalhos sobre oogênese. Tal situação é explicada por Dumser (1980) devido, especialmente, à importância da fêmea quanto às estratégias reprodutivas. Além disso, as fêmeas sempre foram alvo de pesquisas de controle químico e biológico. Uma das poucas situações onde foi dada maior ênfase aos machos é o caso do controle genético or esterilização de machos de *Cochliomyia hominivorax* (Dip.; Calliphoridae) na América do Norte (N.A.S., 1978).

No presente trabalho, observando-se os testículos de machos originados de larvas doentes (n=10) não se observou qualquer evidência da protozoose nem alterações morfológicas visíveis. No entanto, ao romperem-se os testículos e compararem-se, ao microscópio óptico, os movimentos dos espermatozóides de machos sadios (n=20) e de indivíduos originados de larvas doentes (n=10) tem-se que, os gametas dos primeiros apresentavam movimentos contínuos e rápidos por pelo menos 10 minutos enquanto que, os espermatozóides de machos "doentes" apresentavam movimentos menos vigorosos e durante não mais que 2 ou 3 minutos, cessando todo e qualquer movimento após esse período de tempo.

A movimentação dos espermatozóides é devido especialmente à ação do axonema e dos derivativos mitocondriais (Henning & Kremer, 1990). O axonema é formado por feixes de microfibrilas e microtúbulos na estrutura 9x2 igual a estrutura básica dos flagelos (Phillips, 1970), ocupando a região central da cauda do espermatozóide. Os derivativos mitocondriais, intimamente localizados junto ao axonema, têm sua função ainda

incerta. Acredita-se que estejam relacionados à produção de energia para a movimentação da cauda. Além disso a grande deposição de material paracristalino, semelhante à miosina, depositado em seu interior também sugere íntima relação com a movimentação da cauda (Henning & Kremer, 1990).

Pode-se supor que a redução da movimentação dos espermatozóides, observada no presente trabalho, em machos originados de larvas doentes possa ser consequência de anomalias nestas duas organelas, especialmente a nível dos derivativos mitocondriais uma vez que a situação observada no presente trabalho foi de redução do período de motilidade e não total imobilidade dos espermatozóides.

Uma vez que o desenvolvimento da cauda do espermatozóide se inicia a partir do estágio PmII da espermátide (Henning & Kremer, 1990), supõe-se que a infecção por *P. simulii* a nível do estágio larval comprometa a espermatogênese de *S. pertinax* a partir desse ponto. Considerando-se que o desenvolvimento e a estruturação do sistema reprodutor masculino dos insetos inicia-se geralmente nos últimos estágios larvais ou mesmo no estágio de pupa (Dumser, 1980), é plausível a interferência indireta da microsporidiose também na alocação de reservas para a formação das gônadas e gametogênese.

Tal qual a oogênese, a espermatogênese também é um processo regulado hormonalmente. Uma vez que as microsporidioses de modo geral, e inclusive a causada por *P. simulii*, afetam a constituição da hemolinfa, conforme exposto anteriormente, é de se esperar alterações a nível hormonal, especialmente no estágio larval quando o processo de espermatogênese tem início.

De qualquer modo, se esta redução da motilidade dos espermatozóides também ocorrer *in vivo* no sistema reprodutor de fêmeas copuladas, provavelmente a fertilização dos óvulos seja comprometida contribuindo ainda mais para a redução da fecundidade da fêmea.

Os efeitos subletais de microsporidioses não se restringem apenas à redução da fecundidade do hospedeiro, mas também à redução da longevidade do adulto e

do sucesso da cópula, variando este último entre 6% e 33% (Gaulgler & Brooks, 1975; Armstrong & Bass, 1986; Mercer & Wigley, 1987).

Infelizmente não foi possível a investigação destes fatores no presente trabalho. Entretanto, tal averiguação seria muito interessante, acrescentando importante informação para a correta avaliação do potencial deste protozoário no controle de borrachudos.

Os efeitos acumulativos da redução da fecundidade, verificada no presente trabalho, da longevidade e acasalamento, comuns em microsporidioses, no potencial reprodutivo do inseto hospedeiro servem para limitar o aumento natural da população hospedeira. A supressão da população também é auxiliada indiretamente pela exposição do estágio larval a fatores de mortalidade sob condições de campo.

Assim, os efeitos subletais da microsporidiose são intensificados em populações naturais onde as condições ambientais são mais estressantes, aumentando ainda mais o potencial de *P. simulii* como um importante fator regulador da dinâmica populacional de *S. pertinax*.

4.2. PATOLOGIA DE *Simulium pertinax* INFECTADO POR *Gastromermis viridis* cf.

4.2.1. CARACTERIZAÇÃO DO RIACHO CRIADOURO

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 início de 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. pertinax*, a espécie alvo de controle em diversas regiões do Sul e Sudeste do Brasil.

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 600 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. No entanto, a ação das chuvas e do próprio homem eliminaram estes pontos logo nos primeiros meses de amostragem.

A Fig. 22 apresenta a localização e a altitude dos pontos de amostragem ao longo do riacho.

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.

As larvas de *S. pertinax* apresentaram uma distribuição relativamente uniforme ao longo do curso d'água.

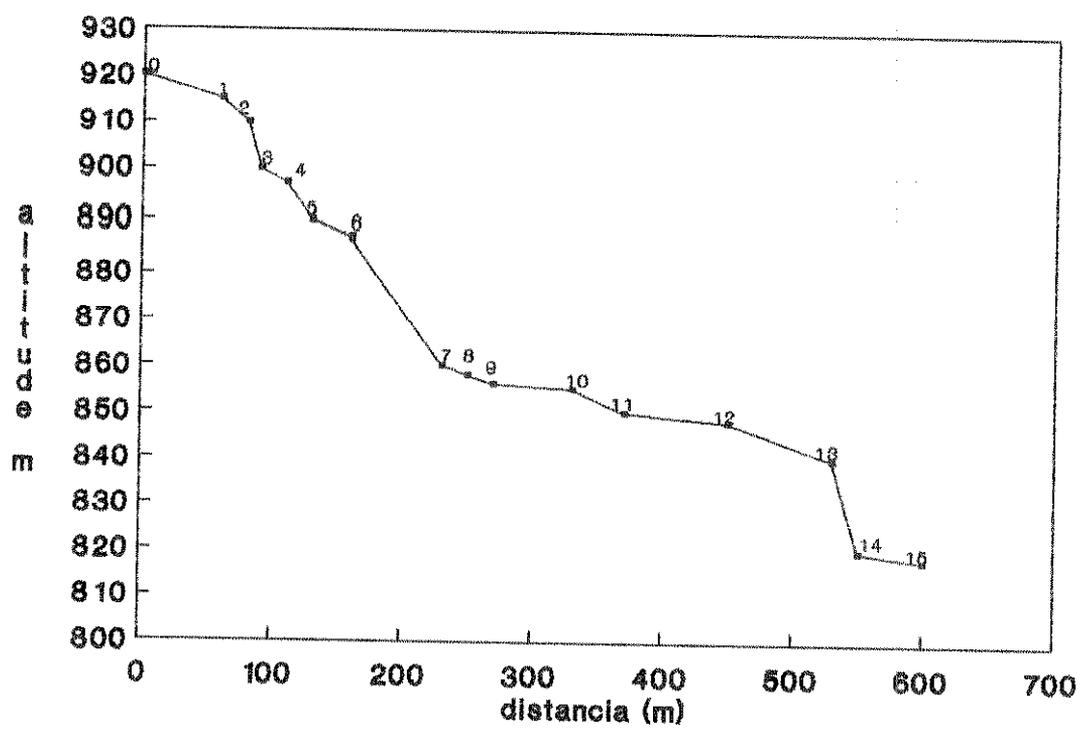


Fig. 22. ESQUEMA REPRESENTANDO A DISTRIBUIÇÃO DOS PONTOS DE AMOSTRAGEM E SUAS ALTITUDES AO LONGO DO RIACHO ESTUDADO.

São muitos os fatores que influenciam na biodinâmica dos sistemas aquáticos, especialmente nos ambientes lóticos. A biota destes sistemas está sempre sujeita a variações sazonais que muitas vezes podem alterar toda a sua dinâmica populacional (Waters, 1972).

Salienta-se aqui a influência do regime de chuvas não só na distribuição dos adultos de borrachudos, mas especialmente na distribuição de suas populações de imaturos. Variações no fluxo d'água do riacho ou alterações quanto à qualidade e quantidade do plâncton são alguns dos fatores relacionados à migração das populações larvais dos simuliídeos 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 a migração das larvas, mas também fatores bióticos como a competição pelo substrato de fixação, a defesa do território e a fuga de predadores provocam este tipo de comportamento.

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

4.2.2. PREVALÊNCIA DE *G. viridis* cf. EM POPULAÇÕES DE LARVAS DE *S. pertinax*

A ocorrência natural de mermitídeos em populações de larvas de *S. pertinax* foi detectada após a triagem de mais de 8.000 larvas. A Fig. 23 mostra a taxa de prevalência para todo o período de estudo, ponto a ponto. Em todos os casos, quando detectada a infecção, o nível de ocorrência era sempre baixo variando de 0,8% (ponto 0 - Agosto) ao máximo de 14,3% (ponto 4 - Setembro).

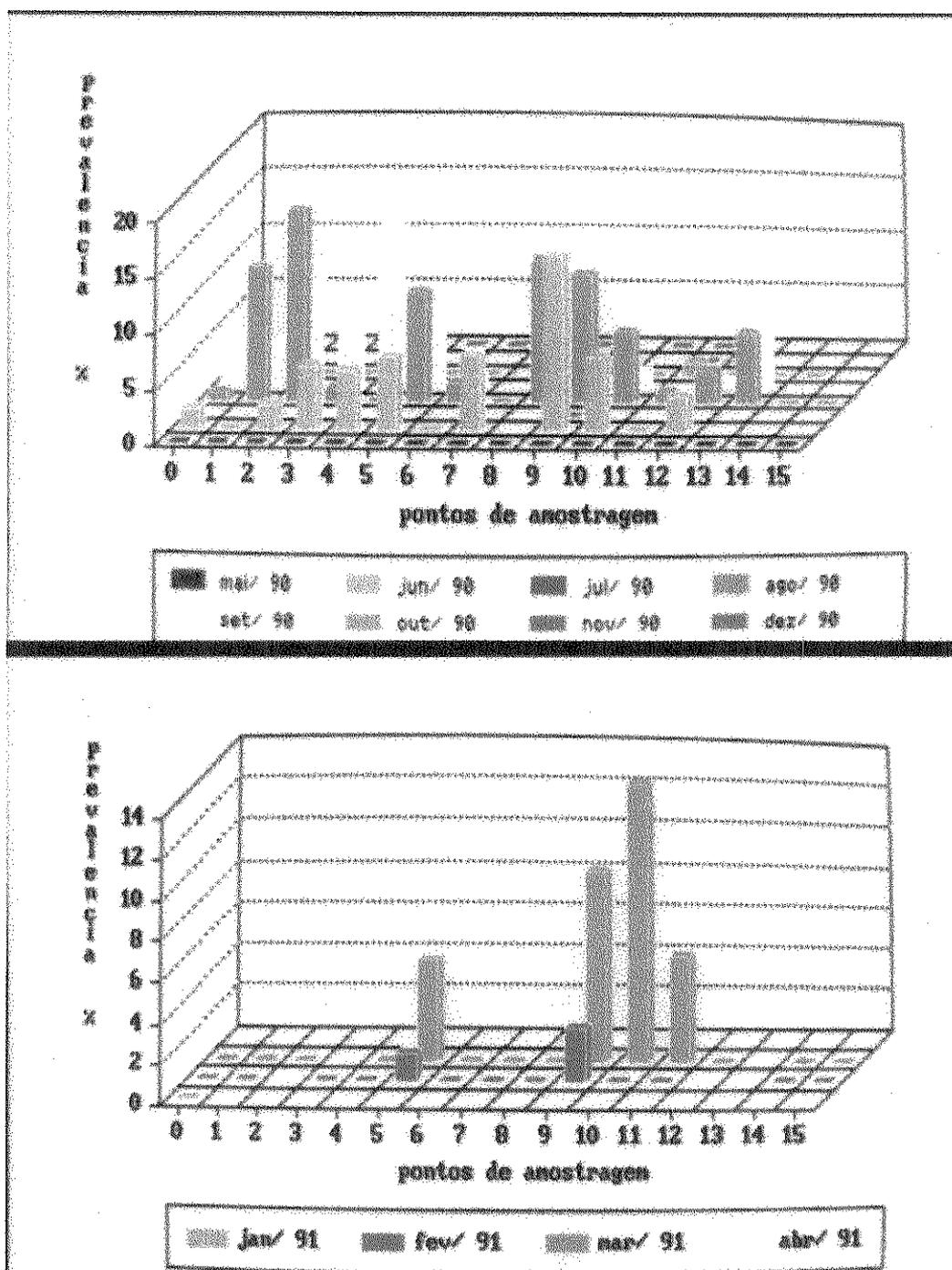


Fig. 23. PREVALÊNCIA ANUAL DE *G. viridis* cf. EM POPULAÇÕES LARVAIS DE *S. pertinax* NA REGIÃO DE MORUNGABA/SP.

Das 8.194 larvas de *S.pertinax* coletadas, cerca de 4% (328 indivíduos) estavam parasitadas. Deste total, 38,1% eram larvas pequenas (125 indivíduos), 42,7% eram larvas médias (140 indivíduos) e as demais 63 larvas eram grandes (19,3%).

A taxa de prevalência de qualquer doença é o resultado da interação entre vários fatores. Supõe-se que a temperatura seja um deles. Em regiões temperadas e mesmo em montanhas onde ocorrem temperaturas relativamente baixas, as espécies de borrachudos que ali ocorrem têm um ciclo de vida de longa duração e, em alguns casos, chegam a apresentar diapausa. Sob condições de baixa temperatura ou diapausa, as larvas de simulídeos reduzem drasticamente sua movimentação e, em geral, suas respostas comportamentais ao ambiente. Nessas áreas a ocorrência de mermitídeos é geralmente elevada. Anderson & Dicke (1960) e Rubtsov (1963) relataram níveis superiores a 90% em várias espécies de simulídeos do Wisconsin (EUA) e da Rússia, respectivamente.

No entanto há vários relatos de prevalências muito baixas, variando entre 0,03% e 5% em borrachudos na América do Norte como por exemplo em populações de *S. vittatum* e *P. mixtum/fuscum* (Ezenwa, 1974a, 1974b; Bailey & Gordon, 1975; Ebsary & Bennett, 1975; Bruder & Crans, 1979).

Em regiões onde as temperaturas não são tão rigorosas nem ocorre o fenômeno da diapausa, os níveis de infecção em simulídeos são relativamente muito baixos. O fato das larvas estarem em atividade normal, implica em respostas comportamentais ótimas. Assim quando uma larva infectante (L₂) de mermitídeo tenta perfurar ativamente a cutícula do hospedeiro borrachudo, há um comportamento de evasão deste. Isto provavelmente dificulta a entrada do nematódeo no hospedeiro. Vários estudos parecem confirmar, ao menos parcialmente, esta hipótese em culicídeos (Petersen & Willis, 1970; Petersen, 1978).

A prevalência de *G. viridis* cf., relatada no presente trabalho, é consonante com a maioria dos relatos em borrachudos de áreas tropicais (Takaoka, 1980; Poinar Jr., 1981; Camino, 1985; Fernandez *et al.*, 1991). Avaliações realizadas em outras espécies de borrachudo no Brasil também revelaram uma baixa taxa de prevalência (Castello Branco Jr. *et al.*, 1987; Castello Branco Jr. & Andrade, 1988; Castello Branco Jr. *et al.*,

1993a, 1993b). No entanto, o registro de que em *S. damnosum*, na África, a taxa de prevalência em adultos chega a 98,9% (Crosskey, 1990) contraria a expectativa em ambientes tropicais.

A ocorrência de mermitídeos nas suas populações hospedeiras pode depender de vários outros fatores. Ainda quanto à temperatura da água, tem-se que estudos com *R. culicivora* revelaram atividade do nematódeo mesmo próximo a 10°C (Galloway & Brust, 1977). Na realidade, Petersen (1985) ressalta que a tolerância dos mermitídeos à baixas temperaturas varia muito de espécie para espécie. Acredita-se assim que a faixa de temperatura d'água na qual os estudos foram realizados (médias de 12°C a 19,5°C) não seria um fator determinante para a ocorrência de *G. viridis* cf. nas populações hospedeiras.

A faixa de pH na qual os mermitídeos são infectivos também é relativamente ampla, variando de 3,6 a 8,6 (Brown & Platzer, 1978). Assim sendo, o valor médio de pH igual a 5,7 das águas do riacho estudado, no presente trabalho, está dentro da faixa de tolerância não sendo um fator determinante na ocorrência do nematódeo nas populações de borrachudo hospedeiras.

Petersen (1985) sugere que um dos fatores que pode ser limitante para mermitídeos aquáticos, mesmo em sistemas lóticos, é a corrente d'água, ou seja, a velocidade da água do riacho.

Comparando-se a taxa de prevalência de *G. viridis* cf. ao longo do período estudado (Fig. 23) com as vazões do riacho, obtidas nas diferentes estações do ano, pode-se perceber que nos meses de junho a setembro de 1990 (inverno e início da primavera), onde a vazão média foi a menor do período de estudo (51 l/s), a prevalência de *G. viridis* cf. foi mais constante ao longo do riacho, apesar de variar entre 0,7% e 14,3%. Pelo mesmo raciocínio, verifica-se a não ocorrência de *G. viridis* cf. nos meses de dezembro de 1990 a fevereiro de 1991, quando a vazão média do riacho foi a maior do período de estudo (190 l/s). Nos meses de dezembro de 1990 a fevereiro de 1991 verificam-se apenas alguns picos variando de 1,5% a 14,0%.

Uma maior vazão é consequência de uma maior precipitação pluviométrica no período, implicando em uma maior velocidade de corrente d'água.

Acredita-se que esta maior velocidade levaria as formas de vida livre do mermitídeo riacho abaixo, reduzindo assim a ocorrência do nematódeo durante certos períodos do ano (outubro de 1990 a fevereiro de 1991). Esta hipótese já havia sido sugerida por Weiser (1964) sem que, no entanto, houvesse sido confirmada.

Caso o processo de carreamento de mermitídeos riacho abaixo fosse contínuo e único, a população do parasita seria eliminada do curso d'água em poucas gerações. No entanto, este fenômeno não se verifica na prática, mesmo no presente trabalho.

Acredita-se que uns poucos adultos de borrachudo que tenham se originado de larvas parasitadas por mermitídeos e que ainda os alberguem neste estágio, sejam os responsáveis pela reintrodução do nematódeo no mesmo riacho ou ainda pela colonização de novos cursos d'água (Gordon *et al.*, 1973; Poinar Jr., 1981; Petersen, 1985).

Deve-se salientar que nas 522 fêmeas de *S. pertinax* analisadas para a averiguação da prevalência de microsporidiose, detectou-se a ocorrência de *G. viridis* cf. em apenas 2 indivíduos (0,38% do total coletado). Esta proporção de adultos parasitados, apesar de pequena, pode ser a responsável pela manutenção do nematódeo na população de *S. pertinax* no riacho.

Por outro lado, deve-se também levar em consideração a população hospedeira. Sabe-se que a velocidade da água é um fator limitante para a fixação de larvas de borrachudo no substrato (Waters, 1972). No entanto, *S. pertinax* é uma espécie adaptada a cursos d'água com alta velocidade de corrente. Em períodos de chuva ocorre um maior carreamento de material particulado e conseqüentemente há uma maior turbidez da água. Essas alterações favorecem o carreamento de larvas de borrachudo riacho abaixo, mesmo sendo *S. pertinax* (Andrade & Castello Branco Jr., dados não publicados, IB, UNICAMP). Ressalta-se que esta situação foi pouco frequente durante o período de estudo, verificando-se na Fig. 23 que são poucas as situações onde a população hospedeira de *S. pertinax* não existia, como por exemplo em julho de 1990 ou em janeiro de 1991.

Um último fator que poderia ser considerado associando-se à vazão do riacho é que, uma maior pluviosidade implica também em um maior carreamento de

resíduos de defensivos agrícolas para os cursos d'água. Vale lembrar que o riacho estudado percorre áreas de lavoura e criação de animais. A idéia de que tais resíduos tivessem alguma ação sobre as populações de *G. viridis* cf. é descartada devido ao fato de que os mermitídeos, em geral, apresentam uma elevada tolerância aos defensivos químicos comumente utilizados na lavoura, saúde pública e animal (Mitchell *et al.*, 1974; Levy & Miller, 1977; Petersen, 1985).

Finalmente tem-se que a baixa prevalência, verificada no presente trabalho, sugere que o controle natural das populações de *S. pertinax* exercido por *G. viridis* cf. seja pouco significativo no riacho estudado.

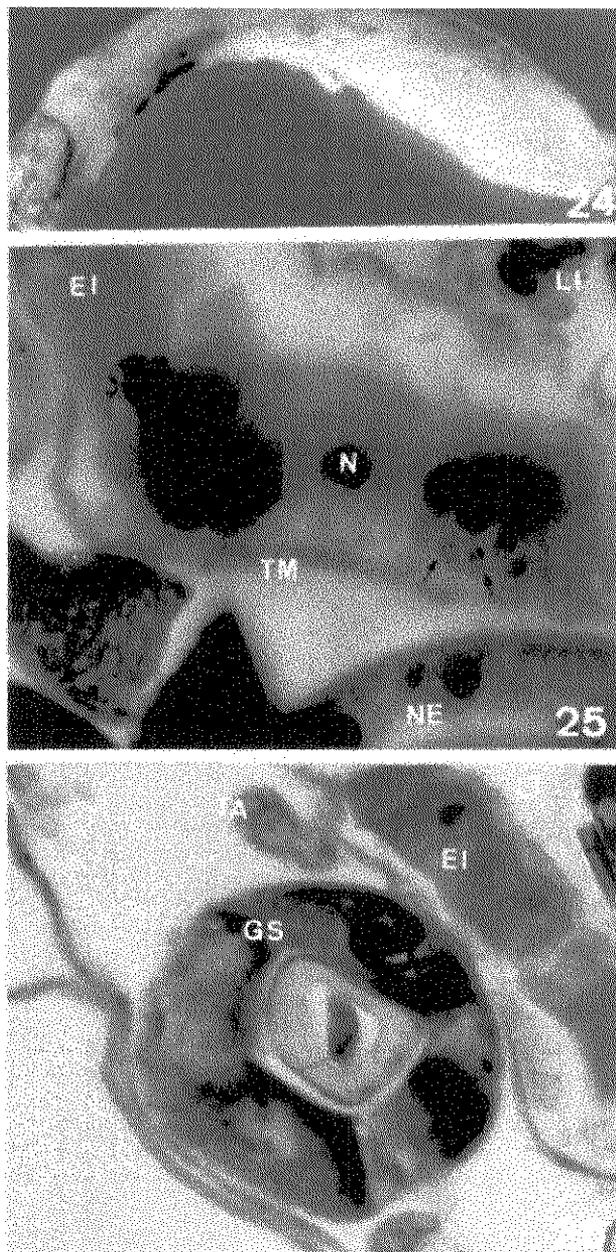
4.2.3. SINTOMATOLOGIA EXTERNA E MORFOMETRIA

A Patologia de Insetos envolve, entre outros estudos, a análise dos sintomas manifestados no hospedeiro, incluindo os externos.

Infecções por mermitídeos não são facilmente detectáveis no criadouro do hospedeiro, sendo necessária a observação cuidadosa sob lupa e frequentemente a dissecação das larvas. É característica a visualização do nematódeo enrolado dentro da larva de borrachudo, geralmente na região abdominal (Fig. 24).

Normalmente, nas larvas sadias, 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. Aumentando-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; Reisen, 1977; Cupp, 1981).

Indivíduos parasitados por *G. viridis* cf. demonstraram pequena retração do corpo apenas após vários toques. Alterações no fluxo da lâmina d'água também resultaram em raras respostas. Uma das conseqüências imediatas deste comportamento é



Figs. 24-26. 24. LARVA DE *S. pertinax* PARASITADA POR *G. viridis* cf. 4,6x. 25 e 26. CORTE TRANSVERSAL DE LARVA DE *S. pertinax* PARASITADA POR *G. viridis* cf. LUZ INTESTINAL (LI); EPITÉLIO INTESTINAL (EI); NÚCLEO (N); CÉLULAS DE REPOSIÇÃO (SETAS); TECIDO MUSCULAR (TM); NEMATÓDEO (NE); GLÂNDULA SALIVAR (GS); TECIDO ADIPOSEO (TA). 25. 4.485x. 26. 1.794x.

que larvas parasitadas por mermitídeos possivelmente tornam-se mais susceptíveis ao ataque de predadores e outros parasitas.

Um dos sintomas mais evidentes foi quanto ao desenvolvimento larval. Indivíduos parasitados apresentaram um retardo no seu desenvolvimento do ponto de vista fisiológico. O critério utilizado, conforme exposto anteriormente (item 3.4.2.), foi a presença e desenvolvimento dos histoblastos respiratórios em relação ao comprimento do corpo das larvas de *S. pertinax*.

A TABELA 4 apresenta os resultados obtidos quanto ao comprimento do corpo de larvas de *S. pertinax*. Verificou-se que indivíduos infectados pelo mermitídeo apresentam o corpo intumescido provocando inclusive um aumento de seu comprimento. A diferença entre larvas sadias e parasitadas foi significativa ($P < 0,05$), tanto para larvas pequenas e médias como grandes.

A diferença de tamanho entre larvas de *S. pertinax* pequenas, sadias e parasitadas, foi de 118,6%, enquanto que para larvas médias foi de 35,3%. Larvas grandes parasitadas apresentaram 24,7% de aumento no comprimento do corpo quando comparadas com indivíduos sadios.

Os resultados obtidos aqui coincidem com os de Strickland (1911), que foi o primeiro a registrar alterações morfométricas em simulídeos infectados tanto por mermitídeos como por microsporídeos. Strickland relata o mesmo fenômeno observado no presente trabalho, isto é, larvas parasitadas tornam-se maiores que indivíduos sadios além de outras alterações morfológicas. Embora Strickland (1911) não deixe claro se houve comparação entre larvas sadias e doentes de mesma idade fisiológica, o termo proposto por aquele autor para este fenômeno foi de metatetelia.

O retardo no desenvolvimento das larvas de borrachudos (metatetelia) também foi diagnosticado em simulídeos infectados por microsporídeos (Castello Branco Jr., 1991).

O processo de metatetelia pode ser explicado levando-se em consideração que a ação do patógeno sobre o tecido de reserva provavelmente o comprometa de modo que este não exerça plenamente as suas funções metabólicas,

TABELA 4: COMPRIMENTO MÉDIO (mm) DO CORPO DE LARVAS DE *S. pertinax* DE DIFERENTES CLASSES ETÁRIAS, SÁDIAS E PARASITADAS POR *G. viridis* cf..

	PEQUENAS		MÉDIAS		GRANDES	
	SÁDIA	PARASITADA	SÁDIA	PARASITADA	SÁDIA	PARASITADA
n	42	45	26	46	30	08
x	2,47 ^a	5,40 ^b	3,94 ^c	5,33 ^d	4,66 ^e	5,81 ^f
s ²	0,30	0,24	0,34	0,56	0,11	0,09

(n = n° de indivíduos; x = média; s²= variância)

(valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente ao nível de significância de 5%)

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, tendo por consequência o crescimento do indivíduo embora apresentando ainda caracteres de fases anteriores. Esta hipótese vem sendo estudada a algum tempo sendo especialmente formulada para mermitídeos em simulídeos (Gordon et al., 1973; Cupp, 1981; Weiser & Undeen, 1981; Petersen, 1985).

4.2.4 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM LARVAS DE *S. pertinax*

As investigações em cortes seriados de larvas de *S. pertinax* revelaram aspectos importantes da parasitemia causada por *G. viridis* cf.

Em todos os casos, os tecidos de indivíduos parasitados apresentaram uma resposta diferente à coloração quando comparados aos de larvas sadias. Este fato já indica profundas alterações histoquímicas e anomalias no metabolismo do hospedeiro (Habib, M.E.M., 1992, comun. pessoal, IB, UNICAMP).

Os tecidos que apresentaram alterações histológicas foram o epitélio intestinal, tecido muscular, adiposo e glândulas salivares.

4.2.4.1. EPITÉLIO INTESTINAL

A descamação e reposição de células epiteliais encontradas em vários pontos (Fig. 25) parece-nos normais apesar da resposta diferencial à coloração quando comparado ao epitélio intestinal de larvas sadias (Fig. 26).

O epitélio intestinal de larvas parasitadas apresentou-se parcialmente fragmentado em vários pontos. Este fato pode dever-se ao comprometimento da camada

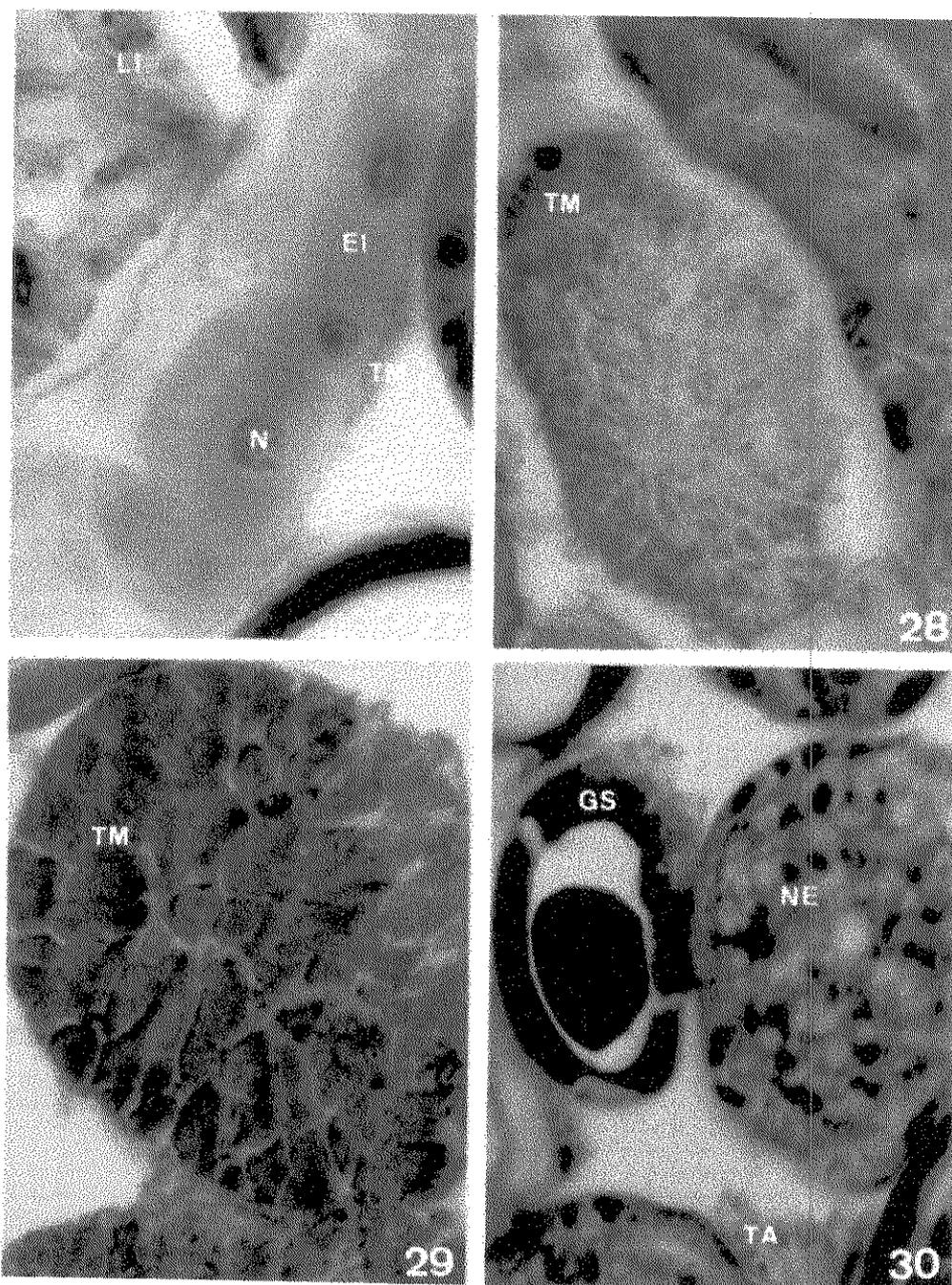
muscular do epitélio intestinal, observado em indivíduos parasitados. As figuras 25 e 27 revelam claramente a descontinuidade da camada muscular em vários pontos.

Uma vez que a entrada do nematódeo se faz via tegumento e não via oral, poucas alterações são esperadas no epitélio intestinal. Maiores detalhes quanto à fisiopatologia da relação mermitídeo-hospedeiro serão abordados posteriormente.

4.2.4.2. TECIDO MUSCULAR

O tecido muscular foi um dos mais afetados histologicamente pela infecção por *G. viridis* cf.. Além das alterações já descritas na musculatura do epitélio intestinal e da diferença de resposta à coloração entre o tecido muscular de indivíduos parasitados (Fig. 28) e sadios (Fig. 29), nota-se claramente a dissociação das fibras musculares e de seus respectivos feixes de fibrilas nos indivíduos parasitados (Fig. 28), enquanto nas larvas sadias a compactação dos feixes é grande (Fig. 29). Esse mesmo aspecto foi verificado por Schmidt & Platzer (1980) em larvas de *Culex pipiens* parasitadas por *Romanomermis culicivorax*.

O comprometimento do tecido muscular e o relaxamento das suas fibras estão intimamente relacionados à sintomatologia apresentada pelos indivíduos parasitados. Conforme já exposto no item 4.2.3. , larvas de *S. pertinax* parasitadas por mermitídeos mostram-se praticamente apáticas, com uma resposta comportamental extremamente lenta a estímulos físicos e mecânicos. Uma vez que o arranjo muscular fica comprometido, conforme o observado no presente trabalho, seria esperado tal quadro sintomatológico. Confirma-se assim, pelo menos uma das causas do comportamento modificado de larvas de borrachudo parasitadas por mermitídeos.



Figs. 27-30. CORTE TRANSVERSAL DE LARVA DE *S. pertinax*. 27, 28 E 30. LARVA PARASITADA POR *G. viridis* cf. 29. LARVA SADIA. 27. 4.543x. 28. 4.543x. 29. 4.543x. 30. 4.543x. EPITÉLIO INTESTINAL (EI); NÚCLEO (N); TECIDO MUSCULAR (TM); LUZ INTESTINAL (LI); NEMATÓDEO (NE); TECIDO ADIPOSO (TA); GLÂNDULA SALIVAR (GS).

4.2.4.3. GLÂNDULAS SALIVARES

As glândulas salivares de indivíduos parasitados apresentaram além da diferença de coloração, alterações histológicas quando comparadas às de larvas sadias.

As células secretoras das glândulas salivares de indivíduos parasitados apresentaram sempre um volume celular menor (FIG. 30) quando comparados às células de indivíduos sadios (FIG. 26).

Acredita-se que eventualmente até possam ocorrer alterações na quantidade e qualidade do produto secretado por estas glândulas de modo a influenciar a movimentação e dispersão dos indivíduos parasitados, uma vez que as larvas de borrachudos fixam-se e movimentam-se pelo substrato do curso d'agua não apenas com a ajuda do sistema de ganchos abdominais e do pé truncado mas também com o auxílio dos fios secretados pelas glândulas salivares.

Outro aspecto é quanto ao processo de empupação. Uma vez que para a confecção do pupário é fundamental a elaboração dos fios de seda da larva, qualquer alteração que possa comprometer a quantidade ou qualidade dos fios secretados pode inviabilizar esse estágio do hospedeiro, contribuindo para a sua morte.

4.2.4.4. TECIDO ADIPOSEO

Conforme exposto no item 4.1.1.2., as reações energéticas e todas as reações do metabolismo intermediário dos insetos são mediadas no tecido adiposo, portanto sua presença é fundamental para a sobrevivência do indivíduo. O tecido adiposo apresenta-se sob 2 formas, subepidérmico e visceral.

Em todos os indivíduos parasitados verificou-se tanto a presença de tecido adiposo visceral sadio como tecido adiposo degenerado. Verificou-se ainda, uma significativa redução na quantidade de tecido adiposo em larvas parasitadas por *G. viridis* cf.

De um modo geral, a forma parasítica se utiliza dos constituintes da hemolinfa e do tecido adiposo do hospedeiro, levando à redução no volume desse tecido ocasionando no hospedeiro o que Rutherford & Webster (1974) denominaram como um estado de "fome fisiológica".

Os resultados obtidos, no presente trabalho, quanto à redução da quantidade de tecido adiposo no hospedeiro parasitado confirmam os estudos de diversos autores que, trabalhando com culicídeos e simulídeos parasitados por mermitídeos, revelaram reduções bruscas de mais de 60% nos metabólitos de reserva (Bailey & Gordon, 1973; Condon & Gordon, 1977; Gordon *et al.*, 1978, 1979; Schmidt & Platzer, 1980).

Uma das funções do metabolismo intermediário, que se processa no tecido adiposo dos insetos, é o controle de carboidratos disponíveis na hemolinfa, especialmente trealose e glucose, e estocados no tecido adiposo, especialmente glicogênio (Bailey, 1975).

Rutherford & Webster (1974) relatam que *Mermis nigrescens* infectando o gafanhoto *Schistocerca gregaria* (Ort.; Acrididae) ocasiona um aumento da glicogenólise no tecido adiposo, além da redução dos níveis de trehalose da hemolinfa mantendo assim, constante o nível de glucose na hemolinfa do hospedeiro durante todo o período da infecção. Tem-se que glucose é um dos compostos mais facilmente absorvidos transcuticularmente pelos mermitídeos (Poinar Jr. & Hess, 1977; Batson, 1979a; 1979b).

Segundo Gordon (1981), os mermitídeos que parasitam larvas de dípteros assemelham-se à espécie *Mermis nigrescens*, inclusive ao obter uma dieta de aminoácidos estimulando o catabolismo de lipoproteínas no tecido adiposo do hospedeiro.

A manutenção dos níveis de carboidratos na hemolinfa está sob controle hormonal (Chippendale, 1978) e especula-se que este poderia até ser manipulado pelo mermitídeo. No entanto, uma vez que os efeitos do parasitismo são variados, não se espera que o controle hormonal seja diferente de gênero para gênero do parasita. Acredita-se assim, que uma explicação mais simples seria realmente o estresse nutricional do hospedeiro (fome fisiológica).

O nematódeo necessita de carboidratos do hospedeiro e os absorve na forma de glucose presente na hemolinfa. O hospedeiro, por sua vez, aumenta tanto a glicogénólise como a mobilização de trehalose a fim de repor a trehalose convertida em glucose. Uma vez que as reservas de carboidratos vão sendo esgotadas, a capacidade do hospedeiro em repor açucars é afetada e então, flutuações passam a ocorrer (Schmidt & Platzer, 1980).

Uma vez que aminoácidos são absorvidos seletivamente pela cutícula do mermitídeo (Rutherford *et al.*, 1977), outro aspecto da patogenia causada por mermitídeos é a alteração dos níveis de aminoácidos na hemolinfa (Gordon *et al.*, 1978; Rutherford & Webster, 1978). Sabe-se que os aminoácidos têm importante papel na manutenção do balanço osmótico na hemolinfa dos artrópodos em geral (Sutcliffe, 1963). A redução dos níveis de aminoácidos na hemolinfa é contrabalançada pelo aumento da proteólise de tecidos do hospedeiro ou pela redução da síntese de proteínas.

Dessa forma tem-se que, não apenas a redução do tecido adiposo mas também o comprometimento do tecido muscular em larvas de *S. pertinax* parasitadas por *G. viridis* cf. são de fato resultado do mermitídeo exaurindo as reservas do hospedeiro.

Os estudos com culicídeos e simulídeos parasitados por mermitídeos revelam que o parasitismo causa quase que completa degeneração do tecido adiposo do hospedeiro além de redução de todos os seus metabólitos de estocagem, inclusive glicogênio, podendo ser direta ou indiretamente utilizados para o desenvolvimento do nematódeo (Bailey & Gordon, 1973; Condon & Gordon, 1977; Gordon *et al.*, 1978, 1979; Finney & Mokry, 1980; Schmidt & Platzer, 1980).

Tem-se ainda que maiores modificações no metabolismo do hospedeiro são manifestadas não só pelo retardo no desenvolvimento, pela intumescência e aumento do comprimento do corpo (item 4.2.3.) mas também pela reabsorção ou supressão do desenvolvimento de oócitos. Como resultado, os hospedeiros ficam impedidos de promover o processo de maturação ou quando o fazem, geralmente são incapazes de se reproduzir (Poinar Jr., 1983; Petersen, 1985). Este aspecto pode sugerir que o mermitídeo atinja diretamente o sistema endócrino do hospedeiro, no entanto tem-se que, distúrbios

nutricionais como os causados pela infecção por mermitídeos resultem em disfunção endócrina (Condon & Gordon, 1977; Petersen, 1985).

4.2.4.5. DEMAIS TECIDOS E SISTEMAS

Todos os demais tecidos e sistemas como por exemplo, túbulos de Malpighi, sistema nervoso e vaso sanguíneo não apresentaram alterações histológicas visíveis.

Desta maneira, vários aspectos fisio-patológicos da patogenia causada por mermitídeos em geral puderam ser relacionados às alterações histológicas observadas, no presente trabalho, em larvas de *S. pertinax* parasitadas por *G. viridis* cf.

Abordagens histopatológicas, como a apresentada no presente estudo, são fundamentais, juntamente com outros estudos básicos, para a correta avaliação do potencial deste grupo de nematódeos como agentes para o controle de dípteros aquáticos.

Acreditamos que os resultados inéditos quanto à histopatologia e prevalência, obtidos neste trabalho, possam esclarecer um pouco mais a ação dos mermitídeos em seus hospedeiros, especialmente nos simulídeos.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem elaborar conclusões de ordem geral e aplicativas referentes à patologia e epizootiologia do microsporídeo *P. simulii* e do mermitídeo *G. viridis* cf. que ocorrem naturalmente nas populações hospedeiras do borrachudo *S. pertinax* na região estudada.

1. O tecido adiposo visceral é o principal sítio de replicação e desenvolvimento de *P. simulii* no estágio larval de *S. pertinax*, havendo também o comprometimento do epitélio intestinal e tecido muscular. Como consequência, são esperados distúrbios na absorção de nutrientes e locomoção do hospedeiro, respectivamente.
2. A microsporidiose é debelada durante o estágio de pupa do hospedeiro devido a um processo histolítico e de necrose do tecido adiposo infectado. Este processo deve ser o responsável pela não expressão da microsporidiose em adultos de *S. pertinax*, verificada no presente trabalho. Consequentemente a transmissão vertical de *P. simulii* não deve ocorrer em *S. pertinax* sendo que a manutenção da doença no campo, muito provavelmente, deva-se a mecanismos de transmissão horizontal.
3. O microsporídeo *P. simulii* tem um significativo papel no controle natural de populações de *S. pertinax* visto que fêmeas originadas de larvas doentes, apesar de não sofrerem a doença, apresentam uma redução média de 31,2% no número de folículos ovarianos formados.
4. Apesar da redução do número de folículos ovarianos em desenvolvimento, não se verificou qualquer alteração no processo de oogênese das fêmeas originadas de larvas doentes quando comparada com adultos originados de larvas sadias.

5. Verificou-se uma redução de pelo menos 50% na motilidade dos espermatozoides de machos originados de larvas infectadas por *P. simulii*. Tal fato indica uma potencialização da redução da fecundação das fêmeas, devido à uma menor aptidão reprodutiva de machos parasitados.
6. Quanto à parasitemia causada por *G. viridis* cf. no borrachudo *S. pertinax* tem-se que, o tecido adiposo é o principal alvo do parasita no hospedeiro em seu estágio de desenvolvimento larval. O tecido muscular e as glândulas salivares sofrem alterações histológicas, sendo esperadas consequências fisiológicas.
7. A parasitemia por *G. viridis* cf. causa redução na resposta comportamental de larvas de *S. pertinax* parasitadas, assim como ocasiona o processo de metatetelia nesses indivíduos.
8. A taxa de prevalência de *G. viridis* cf. em populações de larvas de *S. pertinax* é consonante aos relatos obtidos em outras espécies tropicais de borrachudos.
9. A prevalência anual de *G. viridis* cf. nas populações de *S. pertinax* parece ser relacionada com a vazão do riacho ao longo do ano e, conseqüentemente, à velocidade da corrente d'água.
10. A baixa taxa de prevalência detectada nas populações larvais do hospedeiro sugere que o impacto de *G. viridis* cf. no controle natural de *S. pertinax* seja de pequena expressão.

6. RESUMO

No presente trabalho foram investigados vários aspectos da patologia e epizootiologia de dois agentes biológicos, o microsporídeo *Polydispyrenia simulii* (Microspora; Duboscquiidae) e o nematódeo *Gastromermis viridis* cf. (Nematoda; Mermithidae), que ocorrem naturalmente no borrachudo *Simulium pertinax* (Dip.; Simuliidae) na região estudada. Esta espécie de borrachudo apresenta elevada antropofilia, sendo alvo de práticas de controle no sul e sudeste do Brasil. O objetivo principal é a obtenção de dados para a correta avaliação do potencial destes organismos como agentes de controle biológico natural dessa espécie de borrachudo.

Quanto aos estudos sobre a microsporidiose em *S. pertinax* foram feitas investigações histológicas em hospedeiros sadios e doentes, nos diferentes estágios de seu desenvolvimento (larva, pupa e adulto). Verificou-se que em larvas e pupas de *S. pertinax* doentes, o tecido adiposo visceral é o sítio principal de replicação e desenvolvimento do protozoário, havendo também o comprometimento do tecido muscular e do epitélio intestinal no hospedeiro no estágio de larva. No estágio de pupa verificou-se que por processos histolíticos tem-se a debelagem da doença e conseqüente ausência de esporos na fase adulta de *S. pertinax*.

Apesar de não se detectar a presença de esporos nos ovários de fêmeas tanto coletadas no campo como obtidas no laboratório, verificou-se que como conseqüência da infecção larval, os indivíduos adultos, inclusive machos, apresentam algum comprometimento das gônadas. As fêmeas apresentam uma redução média de 31,2% na fecundidade enquanto que nos machos há uma sensível redução da motilidade dos espermatozóides.

Além disso, constatou-se que a manutenção da microsporidiose no campo deve-se muito provavelmente a mecanismos de transmissão horizontal visto que a transmissão vertical não foi confirmada pelas investigações.

Quanto aos estudos sobre *G. viridis* cf. em *S. pertinax*, temos que sua prevalência anual em populações larvais do hospedeiro é baixa, variando de 0,8% a

14,3%. Sua ocorrência parece estar relacionada à vazão do riacho e consequente velocidade de corrente d'água.

As investigações histopatológicas revelaram que o tecido adiposo visceral das larvas hospedeiras é o principal alvo da parasitemia, havendo também o comprometimento do tecido muscular e glândulas salivares.

Verificou-se ainda que a parasitemia por *G. viridis* cf. causa redução significativa da resposta comportamental das larvas parasitadas face a qualquer estímulo físico-químico ou mecânico. Além disso, o retardo no desenvolvimento do hospedeiro larval também foi verificado. Esse fenômeno é conhecido como metatetelia.

Os resultados obtidos indicam que o microsporídeo *P. simulii* tem um significativo papel no controle natural das populações de *S. pertinax*, uma vez que reduz em quase um terço a fecundidade das fêmeas e promove um menor período de motilidade dos espermatozóides dos machos. Por outro lado, *G. viridis* cf. apesar de exaurir as reservas da larva hospedeira não apresenta elevada prevalência indicando uma pequena influência na regulação das populações hospedeiras.

Acreditamos que alguns estudos ainda são necessários para a correta avaliação do potencial de *G. viridis* cf. como agente de controle biológico natural de borrachudos.

O uso de ambos os agentes, *P. simulii* e *G. viridis* cf., nos parece promissor como ferramentas auxiliares para o Manejo Integrado destes incômodos dípteros.

7. SUMMARY

The aim of the present work is to evaluate the potentiality of *Polydispyrenia simulii* (Microspora; Duboscquiidae) and *Gastromermis viridis* cf. (Nematoda; Mermithidae) as two agents for biological control of the blackfly *Simulium pertinax* (Diptera; Simuliidae). Pathological and epizootiological aspects of both agents were investigated.

Histopathological studies revealed that the visceral fat body of *S. pertinax* larvae and pupae showed to be the main site of infection for *P. simulii*. The microsporidiosis also affected the muscular tissue and midgut epithelium of larvae. It was detected that during host pupal development the spores of *P. simulii* were lysed, causing the adults to become free of infection. Although no infection was detected in adults originated from heavily infected larvae, the number of ovarian follicles of females, as well as the mobility of spermatozooids in males were reduced. It was also detected that vertical transmission does not work on the microsporidiosis maintenance in host populations of *S. pertinax*. The results also indicated that *P. simulii* has a high influence as a natural control agent of *S. pertinax* populations.

Epizootiological studies reveal that the annual prevalence of the nematode *G. viridis* cf. in *S. pertinax* larvae population is low, ranging from 0,8% to 14,3%.

Histopathological investigations in infected larvae showed that the visceral fat body was the principal target site of mermithid infection. The muscular tissue and the salivary glands were also affected. Infected larvae of *S. pertinax* showed a reduced behavioural response to physical stimuli. Parasitized individuals showed a slower development, known as metatetely.

The low prevalence rate of *G. viridis* cf. in *S. pertinax* larval populations indicates that its effects on the blackfly natural control are very small. More studies are necessary for the correct evaluation of *G. viridis* cf. as biological control agent of *S. pertinax*. However, both agents may be helpful weapons in Integrated Management Programmes of this medically important insect.

8. LITERATURA CITADA

- Adams, T.S. 1974. The role of juvenile hormone in housefly morphogenesis. J. Insect Physiol., 20: 263-276.
- Al-Aidroos, K. & D. W. Roberts 1978. Mutants of *Metarhizium anisopliae* with increased virulence toward mosquito larvae. Can. J. Genet. Cytol., 20: 211-219.
- Alger, N. E. & A. H. Undeen 1970. The control of a microsporidium, *Nosema* sp., in an anopheline colony by an egg-rinsing technique. J. Invertebr. Pathol., 15: 321-327.
- Anderson, J.R. & J. Dicke 1960. Ecology of the immature stages of some Wisconsin blackflies (Simuliidae: Diptera). Ann. Entomol. Soc. Am., 53: 386-404.
- Anderson, R.M. & R.M. May 1979. Population biology of infectious diseases: part I. Nature, 280: 361-367.
- Anderson, R.M. & R.M. May 1981. The population dynamics of microparasites and their invertebrate hosts. Philos. Trans. R. Soc. Lond., (B) 291: 451-524.
- Andrade, C.F.S. 1986. Perspectivas do uso do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* no controle de borrachudos no Brasil. I Semin. sobre Vet. Urb. e An. Sinantr. (São Paulo/SP), Resumos: 26.
- Andrade, C. F. S. 1987. Manejo Integrado de Borrachudos. Anais XI Congr. Bras. Entomol. (Campinas/SP), 3: 141-157.
- Andrade, C.F.S. & A. Castello Branco Jr. 1988. Influência do tipo de criadouro no controle de *Simulium pertinax* Kollar, 1832 (Diptera; Simuliidae). I Simp. 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 of the insecticide to adults. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 85: 291-297.

- Andrade, C. F. S. & A. Castello Branco Jr. 1991. Susceptibilidade de populações de *Simulium pertinax* Kollar, 1832 (Culicomorpha, Simuliidae) ao temefós e a um formulado à base de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Rev. Saúde Pública, 25: 367-370.
- Andrade, C.F.S.; Castello Branco Jr., A. & L.F.D.P. Moreira 1987a. Resistência de populações de 3 espécies de Simuliidae ao inseticida Temefós. XI Congr. Bras. Entomol (Campinas/ SP). Resumos, 2: 406.
- Andrade, C.F.S.; Moreira, L.F.D.P. & A.Castello Branco Jr.1987b. Eficiência de Vectobac 12AS, à base de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* contra simulídeos sob condições de campo. XI Congr. Bras. Entomol. (Campinas/ SP), Resumos, 2: 407.
- 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. Invertebr. 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 transmittion 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. (Microspora: Thelohanidae) in relation to parasite maintenance in the mosquito *Culex salinarius*. J. Invertebr. Pathol., 34: 152-157.
- Araújo-Coutinho, C.J.P.C. 1988. Controle de borrachudos no litoral paulista. II Semin. Nac.de Vet. Urb. e An.Sinantr. III Reunião Bras. sobre Smulídeos (Porto Alegre/ RS). Resumos: 65.

- Araújo-Coutinho, C.J.P.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.
- Armstrong, E. & L.K. Bass 1986. Effects of infection by *Nosema whitei* on the mating frequency and fecundity of *Tribolium castaneum*. J. Invertebr. Pathol., 47: 310-316.
- Avancini, R.M.P. & A.P. Prado 1986. Oogenesis in *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). Int. J. Morphol. & Embryol., 15: 375-384.
- Avery, S.W. 1989. Horizontal transmission of *Parathelohania obesa* (Protozoa: Microsporida) to *Anopheles quadrimaculatus* (Diptera: Culicidae). J. Invertebr. Pathol., 53: 424-426.
- Avery, S.W. & L. Bauer 1984. Iridescent virus from *Prosimulium* collected in Maine. J. Invertebr. Pathol., 43: 430-431.
- Avery, S.W. & A.H. Undeen 1990. Horizontal transmission of *Parathelohania anophelis* to the copepod, *Microcyclops varicans*, and the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. J. Invertebr. Pathol., 56: 98-105.
- Axtell, R. 1979. Principles of Integrated Pest Management (IPM) in relation to mosquito control. Paper n^o1, Mosq. News, 39: 709-736.
- Bailey, E. 1975. Biochemistry of Insect Flight. Em: Insect Biochemistry and Function. D.J.Candy & B.A. Kilby eds., Chapman & Hall Ltd., London, 89-176.
- Bailey, C.H. & R. Gordon 1973. Histopathology of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae parasitized by *Reesimermis nielsenii* (Nematoda: Mermithidae). J. Invertebr. Pathol., 22: 435-441.
- Bailey, C.H. & R. Gordon 1975. Observations on the occurrence and collections of mermithid nematodes from blackflies (Diptera: Simuliidae). Can. J. Zool., 55: 145-154.
- Bailey, C.H. & R. Gordon 1977. Field and laboratory observations on a cytoplasmic polyhedrosis virus of blackflies (Diptera: Simuliidae). J. Invertebr. Pathol., 29: 69-73.

- Bailey, C.H.; Gordon, R. & J. Mokry 1974. Procedure for mass collection of mermithid postparasites (Nematoda: Mermithidae) from larval blackflies (Diptera: Simuliidae). Can. J. Zool., 52: 660-661.
- Barr, A.R. 1979. Epidemiological concepts for entomologists. Bull. Entomol. Soc. Am., 25: 129-130.
- Batista, D.; Oliveira, W.R. & V.D. Rabello. 1960. Estudo da patogenicidade da *Mansonella ozzardi* e da sintomatologia da mansonelose. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 2: 281-289.
- Batson, B. S. 1979a. Body wall of juvenile and adult *Gastromermis boophthorae* (Nematoda: Mermithidae): Ultrastructure and nutritional role. Int. J. Parasitol., 9: 495-503.
- Batson, B.S. 1979b. Ultrastructure of the trophosome, a food-storage organ in *Gastromermis boophthorae* (Nematoda: Mermithidae). Int. J. Parasitol., 9: 505-514.
- Batson, B. S. 1983. *Tetrahymena dimorpha* sp. nov. (Hymenostomatida: Tetrahymenidae), a new ciliate parasite of Simuliidae (Diptera) with potential as a model for the study of ciliate morphogenesis. Phil. Trans. R. Soc. Lond., (B) 301: 345-363.
- Beaudoin, R.L. & W. Willis 1968. *Haplosporidium simulii* sp. n. (Haplosporida: Haplosporidiidae), parasitic in larvae of *Simulium venustum* Say. J. Invertebr. Pathol., 10: 374-378
- 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.
- Beiguelman, B. 1988. Curso Prático de Bioestatística. Rev. Bras. Genética, 231 pp.
- Blacklock, D.B. 1926. The development of *Onchocerca volvulus* in *Simulium damnosum*. Ann. Trop. Med. Parasitol., 20: 1-48.
- Bottger, K. 1976. Types of parasitism by larvae of water mites (Acari: Hydrachnellae). Freshwater Biol., 6: 497-500.

- Bradbury, W.C. & G.F. Bennett 1974a. Behavior of adult Simuliidae (Diptera). I. Response to color and shape. Can. J. Zool., 52: 251-259.
- Bradbury, W.C. & G.F. Bennett 1974b. Behaviour of adult Simuliidae (Diptera). II. Vision and olfaction in near-orientation and landing. Can. J. Zool., 52: 1355-1364.
- Bradley, G.H. 1935. Notes on the southern buffalo gnat *Eusimulium pecuarum* (Riley) (Diptera: Simuliidae). Proc. Entomol. Soc. Wash., 37: 60-64.
- Brown, A.W.A. 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: A pragmatic review. J. Am. Mosq. Control Assoc., 2: 123-140
- Brown, G.C. 1987. Modeline. Em: Epizootiology of Insect Diseases. Fuxa, J.R. & Y. Tanada eds. John Wiley & Sons, 43-68.
- Brown, H. & H.S. Berton 1970. A case of ashma caused by *Simulium jenningsi* (order Diptera) protected by hyposensitization. J. Allergy, 45: 103-104.
- Brown, B.J. & E.G. Platzer 1978. Salts and the infectivity of *Romanomermis culicivorax*. J. Nematol., 10: 53-64.
- Bruder, K.W. & W.J. Crans 1979. The blackflies (Diptera: Simuliidae) of the Stony Brook Watershed of New Jersey, with emphasis on parasitism by mermithid nematodes (Mermithidae: Nematoda). Bull. N. J. Agric. Expt. Stat. Univ. N.J. n^o851.
- Burdick, G.; Dean, H.; Harris, E.J.; Skea, J.; Frisca, C. & C. Sweeney 1968. Methoxychlor as a blackfly larvicide, persistence of its residues in fish and its effect on stream arthropods. N.Y. Fish Game J., 15: 120-142.
- Busvine, J.R. 1985. Insecticides or Use against Pests of Public Health Importance. Em: The Theory and Practice of Public Health., Hobson, W. ed., Oxford Univ. Press, 257-262.
- Camino, N.B. 1985. Estudio de cuatro especies del género *Mesomermis* Dady, 1911 (Nematoda: Mermithidae) parásitas de larvas de simúlidos (Diptera: Simuliidae). Rev. Museu La Plata (Zoología), 14: 1-19.
- Canning, E.U. 1971. Transmission of Microsporidia. Proc. 4th Int. Colloq. Insect Pathol., 415-424.

- Castello Branco Jr., A. 1991. Estudos Ecológicos e Patológicos da Infecção por *Polidispyrenia simulii* (Microspora; Pleistophoridae) em uma Comunidade de Simulídeos. Tese de Mestrado 83pp. - UNICAMP
- Castello Branco Jr., A. Influência do regime de ventos na dispersão de adultos de *Simulium pertinax* Kollar (Diptera; Simuliidae). An. Soc. Entomol. Bras., (no prelo)
- Castello Branco Jr., A. & C.F.S. Andrade 1988. Novo registro da ocorrência de microsporídeos e mermitídeos em populações de simulídeos. II Sem. Nac. Vet. Urb. e Anim. Sinantr./ III Reunião Bras. Simulídeos (Porto Alegre/RS), Resumos: 63-64.
- Castello Branco Jr., A. & C. F. S. Andrade 1992. Susceptibility of *Simulium (Chirostilbia) pertinax* Kollar 1832 (Diptera, Simuliidae) to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in an atypical breeding habitat. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 87: 317-318.
- Castello Branco Jr., A. & C. F. S. Andrade 1993a. O borrachudo vai à escola? Relato de uma experiência de ensino como suporte ao Manejo Integrado de Pragas. Rev. Ensino Ciências, 24: 27-30.
- Castello Branco Jr., A. & C.F.S. Andrade 1993b. Studies on *Polidispyrenia simulii* (Microspora; Pleistophoridae) in *Simulium pertinax* (Diptera; Simuliidae) in Brazil. Mem. Inst. Osw. Cruz, 88: 167.
- 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.
- Castello Branco Jr., A.; Waib, C. M. & C. F. S. Andrade. 1991. Prevalência de *Polydispyrenia simulii* (Microspora, Pleistophoridae) em uma comunidade de borachudos (Diptera, Simuliidae) com estudos de sintomatologia. II Congr. Argentino Entomol. (Córdoba, Argentina), Resumos: 67.
- Castello Branco Jr., A.; Waib, C.M. & M.E.M. Habib 1993a. Influência do parasitismo por mermitídeos (Nematoda) no desenvolvimento de hospedeiros borrachudos (Diptera; Simuliidae). XIV Congr. Bras. Entomol. (Piracicaba/ SP), Resumos: 748.
- Castello Branco Jr., A.; Waib, C.M. & M.E.M. Habib 1993b. Ocorrência natural de mermitídeos (Nematoda) em uma comunidade de borrachudos (Diptera; Simuliidae). XIV Congr. Bras. Entomol. (Piracicaba/ SP), Resumos: 749.

- Chapman, H.C. 1974. Biological control of mosquito larvae. Annu. Rev. Entomol., 19: 33-59.
- Charlwood, J.D.; Rafael, J.A. & T.J. Wilkes 1980. Métodos de determinação a idade fisiológica em Diptera de importância médica. Uma revisão com especial referência aos vetores de doenças na América do Sul. Acta Amazonica, 10: 311-333.
- Charnetski, W.A. & W.O. Haufe 1981. Control of *Simulium articum* Malloch in Northern Alberta, Canada. Em: Blackflies - The future for biological methods in integrated control. Laird, M. ed., Academic Press, 117-131.
- Chippendale, G.M. 1978. The Functions of Carbohydrates in Insect Life Process. Em: Biochemistry of Insects, M. Rockstein ed., Academic Press, NY, 2-55.
- Christophers, S.R. 1911. The development of the egg follicle in anophelines. Paludism, 2: 73-89.
- Cibulsky, R.J. 1987. Industrial Production of *Bacillus thuringiensis* H-14. Anais XI Congr. Bras. Entomol. (Campinas/SP), 3: 112-120.
- Ciurea, I. & G. Dinulescu 1924. Ravages causés par la mouche de Goloubatz en Roumanie; des attaques contre les animaux et contre l'homme. Ann. Trop. Med. Parasit., 18: 323-342.
- Condon, W.J. & R. Gordon 1977. Some effects of mermithid parasitism on the larval blackflies *Prosimulium mixtum/ fuscum* and *Simulium venustum*. J. Invertebr. Pathol., 29: 56-62.
- Coppel, H.C. & J.W. Mertins 1977. Biological Insect Pest Suppression. Springer-Verlag Edit., 314 pp.
- Cordeiro, N.S. & A. Castello Branco Jr. 1988. Developmental cycle and histopathological studies of *Thelohania* 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 taxonomicos de los simulidos en la Región Neotropical. I Sem. Vet. Urb. e Anim. Sinantr. (São Paulo/SP). Resumos: 19-20.

- Craig, S.M. & J.M. Webster, 1978. Viability and hatching of *Mermis nigrescens* eggs and subsequent larval penetration of the desert locust *Schistocerca gregaria*. Nematologica, 24: 472-478.
- Crosskey, R. W. 1981. Geographical Distribution of Simuliidae. Em: Blackflies - The future for biological methods in integrated control. Laird, M. ed., Acad. Press, 57-68.
- Crosskey, R.W. 1990. The Natural History of Blackflies. John Wiley & Sons, 711 pp.
- Cupp, E.W. 1981. Blackfly Physiology. Em: Blackflies - The future for biological methods in integrated control. Laird, M. ed., Academic Press, 199-206.
- Cupp, E.W. & R.C. Collins 1979. The gonotrophic cycle in *Simulium ochraceum*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 28: 422-426.
- Dadd, R.H. 1971. Size limitations on the infectibility of mosquito larvae by nematodes during filter-feeding. J. Invertebr. Pathol., 18: 246-251.
- Davies, D.M. 1978. Ecology and behaviour of adult blackflies (Simuliidae): a review. Quaest. entomol., 14: 3-12.
- Davies, D.M. 1981. Predators upon Blackflies. Em: Blackflies - The future for biological methods in integrated control. Laird, M. ed., Academic Press, 139-148
- Dejoux, C. & J.M. Elouard 1977. Action de l'abate sur les invertébrés aquatiques cinétique de décrochement à court et moyen terme. Cah. ORSTOM, Sér. Hydrobiol., 11: 217-230.
- De Villiers, P.C. 1987. *Simulium dermatitis* in man-clinical and biological features in South Africa. A case report. South African Med. J., 71: 523-525.
- Donovan, W.P.; Gonzalez Jr., J.M.; Pearce Gilbert, M. & C. Dankocsik 1988. Isolation and characterization of EG 2158, a new strain of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopteran larvae, and nucleotide sequence of the toxin gene. Mol. & Gen. Genet., 214: 365-372.
- 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, 75-84.

- Duke, B.O.L. 1990. Onchocerciasis (River Blindness) - Can it be eradicated? Parasitol. Today, 6: 82-84.
- Dulmage, H. T. 1989. Production and use of *Bacillus thuringiensis* - perspective from 1989. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 84 (supl. III): 113-122.
- Dulmage, H.T. and Cooperators, 1981. Insecticidal Activity of Isolates of *Bacillus thuringiensis* and Their Potential for Pest Control. Em: Microbial Control of Pests and Plant Diseases. Burges, H.D. ed., Academic Press, 193-222
- Dumbleton, L.J. 1973. The genus *Austrosimulium* Tonnior (Diptera: Simuliidae) with particular reference to the New Zealand fauna. New Zealand J. Sci., 15: 480-584.
- Dumser, J.B. 1980. The regulation of spermatogenesis in insects. Annu. Rev. Entomol., 25: 341-369.
- Ebsary, B.A. & G.F. Bennett 1973. Molting and oviposition of *Neomesomeris fluminalis* (Welch, 1962) Nickle, 1972, a mermithid parasite of blackflies. Can. J. Zool., 51: 637-639.
- Ebsary, B.A. & G.F. Bennett 1975. Studies on the bionimics of mermithid nematode parasites of blackflies in Newfoundland. Can. J. Zool., 53: 1324-1331.
- Edman, J.D. & K.R. Simmons 1985. Rearing and colonization of blackflies (Diptera: Simuliidae). J. Med. Entomol., 22: 1-17.
- Eichler, D.A. 1971a. Studies on *Onchocerca gutterosa* (Neumann, 1910) and its development in *Simulium ornatum* (Meigen, 1818). I. Observations on *O. gutterosa* in cattle in South East England. J. Helminthol., 45: 245-258.
- Eichler, D.A. 1971b. Studies on *Onchocerca gutterosa* (Neumann, 1910) and its development in *Simulium ornatum* (Meigen, 1818). II. Behaviour of *S. ornatum* in relation to the transmission of *O. gutterosa*. J. Helminthol., 45: 259-270.
- Ezenwa, A.O. 1974a. Studies on host-parasite relationships of Simuliidae with mermithids and microsporidians. J. Parasitol., 60: 809-813.
- Ezenwa, A.O. 1974b. Ecology of Simuliidae, Mermithidae and Microsporida in Newfoundland freshwaters. Can. J. Zool., 52: 557-565.

- Ezenwa, A.O. & N.E. Carter 1975. Influence of multiple infections on sex ratios of mermithid parasites of blackflies. Environ. Entomol., 4: 142-144.
- Fairchild, G.B. & E.A. Barreda 1946. DDT as a larvicide against *Simulium*. J. Econ. Entomol., 38: 694-699.
- Fast, P.G. 1981. The Crystal Toxin of *Bacillus thuringiensis* Em: Microbial Control of Pests and Plant Diseases. Burges, H.D. ed., Academic Press, 223-248.
- Fernandez, O. T.; Munhoz de Hoyos, P. & G. R. Pérez 1991. Parasitismo en larvas de simulidos (Diptera: Simuliidae) del Rio Teusaca: Microsporidios, mermitidos y hongos. Rev. Acad. Colomb. Cienc., 18: 253-264.
- Fine, P.E.M. 1975. Vectors and vertical transmission: an epidemic perspective. Ann. N.Y. Acad. Sci., 266: 173-194.
- Fine, P.E.M. 1984. Vertical Transmission of Pathogens of Invertebrates. Em: Comparative Pathobiology Vol.7, T.C. Cheng, ed. Plenum Press, NY, 205-241.
- Fine, P.E.M. & E.S. Sylvester 1977. Calculation of vertical transmission rates of infection, illustrated with data on an aphid-borne virus. Am. Nat., 112: 781-786.
- Finney, J.R. 1981. Potential of Nematodes for Pest Control. Em: Microbial Control of Pests and Plant Diseases. H.D. Burges ed., Academic Press, 603-620.
- Finney, J.R. & Mokry, J.E. 1980. *Romanomermis culicivorax* and simuliids. J. Invertebr. Pathol., 35: 211-213.
- Finney, J.R.; Gordon, R.; Condon, W.J. & T.N. Rudted 1977. Laboratory studies on the feasibility of integrated mosquito control using an insect growth regulator and a mermithid nematode. Mosq. News, 37: 6-11.
- Fredeen, F.J.H. 1977. A review of the economic importance of blackflies (Simuliidae) in Canada. Quaest. Entomol., 13: 219-229.
- Frost, S. 1970. Microsporidia (Protozoa : Microsporidia) in Newfoundland blackfly larvae (Dipt.: Simuliidae). 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, 3-22.
- Galloway, T.D. & R.A. Brust 1977. Effects of temperature and photoperiod on the infection of two mosquito species by the mermithid *Romanomermis culicivorax*. J. Nematol., 9: 218-221.
- 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. Amer. Mosq. Control Assoc., 5: 64-69.
- Garms, R. & J.O. Ochoa 1979. Further studies on the relative importance of guatemalan blackfly species as vectors of *Onchocerca volvulus*. Tropenmed Parasitol., 30: 120-128.
- Garms, R. & J.F. Walsh 1987. The Migration and Dispersal of Black flies: *Simulium damnosum* s.l., The Main Vector of Human Onchocerciasis. Em: Blackflies: ecology, population management, and annotated world list. Kim K.C. & R.W. Merritt ed., Pennsylvania State University, University Park & London, 201-214.
- Garnham, P.C.C. & J.P. McMahon 1947. The eradication of *Simulium neavei*, Roubaud, from an onchocerciasis area in Kenya Colony. Bull. Entomol. Res., 37: 619-627.
- Gassouma, M.S.S. 1972. Microsporidian parasites of *S. ornatum* 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. Invertebr. Pathol., 26: 57-63.
- Gaugler, R. & D. Molloy. 1981. Instar susceptibility of *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) to the entomogenous nematode, *Neoplectada carpocapsae*. J. Nematol., 13: 1-5.
- Gaugler, R. & H.K. Kaya 1990. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Boston, 365 pp.

- Goldberg, L.J. & J. Margalit 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univitattus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosq. News, 37: 355-358.
- Gorayeb, I.S. & R.R. Pinger 1978. Detecção de predadores naturais das larvas de *Simulium fulvinotum* Cerq. e Mello, 1968 (Diptera: Nematocera). Acta Amazonica, 8: 629-637.
- Gorayeb, I.S. & W.Y. Mok 1982. Comparision of capillary tube and immunodiffusion precipitin tests in the detection of *Simulium fulvinotum* larval predators. Ciênc. Cult. (São Paulo), 34: 1662-1668.
- Gordon, R. 1981. Mermithid nematodes: Physiological relationship with their insect hosts. J. Nematol., 13: 266-273.
- Gordon, R. 1984. Nematode Parasites of Blackflies. Em: Plant and Insect Nematodes, Nickle, W.R. ed., Marcel Dekker, Inc., 821-847.
- 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
- Gordon, R.; Condon, W.J.; Edgar, W.J. & S.J. Babie 1978. Effects of mermithid parasitism on the hemolymph composition of the larval blackflies *Prosimulium mixtum / fuscum* and *Simulium venustum*. Parasitology, 77: 367-374.
- Gordon, R.; Finney, J.R.; Condon, W.J. & T.N. Rusted 1979. Lipids in the storage organs of three mermithid nematodes and in the hemolymph of their hosts. Comp. Biochem. Physiol., 64B: 369-374.
- Gudgel, E.F. & F.H. Grauer 1954. Acute and chronic reactions to black fly bites (*Simulium* fly). Arch. Dermatol. Syphilol., 70: 609-615.
- Guillet, P.; Escafre, H.; Ouedraogo, M. & D. Quilévéré 1980. Mise en évidence d'une résistance au téméphos dans le complexe *Simulium damnosum* (*S. sanctipauli* et *S. soubrense*) en Côte d'Ivoire (Zone du Programme de lutte contre l'Onchocercose dans la région du Bassin de la Volta) Cah. ORSTOM ser. Entomol. med. Parasitol., 17: 291-299.

- Guimarães, E.L.G. 1986. Biologia e controle de simulídeos no Estado do Paraná. I. Sem. Vet. Urb. e An. Sinantr. (São Paulo), Resumos: 24.
- Habbema, J.D.F.; Alley, E.S.; Plaisier, A.P.; van Oortmarssen, G.J. & J.H.F. Remme 1992. Epidemiological modelling for Onchocerciasis control. Parasitol. Today, 8: 99-103.
- Habib, M.E.M. 1978. A bacterial disease of the American Cotton Leaf Worm, *Alabama argillacea* (Lepid., Noctuidae), with notes on its histopathological effects. Z. Angew. Entomol., H1, 5: 76-81.
- Habib, M.E.M. 1982. Patogenicidade de duas variedades de *Bacillus thuringiensis* Berliner para larvas de Lepidoptera e Diptera. Tese de Livre-Docência/ UNICAMP, 163 pp.
- Habib, M.E.M. 1983. Potency of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against some aquatic dipterous insects. Z. Angew. Entomol., 95: 368-376.
- Habib, M.E.M. 1987. Uma Política para o Controle de Borrachudos no Brasil. Anais XI Congr. Bras. Entomol. (Campinas/SP), 3: 99-102.
- Habib, M.E.M. 1989. Utilização de bactérias no controle de dípteros de importância médica. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 83 (supl. III): 31-34.
- Habib, M.E.M. & C.F.S. Andrade 1986. Bactérias Entomopatogênicas. Em: Controle Microbiano de Insetos. Alves, S.B. ed., Edit. Manole Ltda., 127-170.
- Habib, M.E.M.; Andrade, C. F. S.; Moreira, L.F.D.P. & A. Castello Branco Jr. 1987. Susceptibilidade de larvas de *Simulium (I.) inaequale* ao *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (H:14). XI Congr. Bras. Entomol. (Campinas/SP), 2: 410.
- Hall, I.M. 1954. Studies of microorganisms pathogenic to sod webworm. Hilgardia, 22: 535-565.
- Hansen, E.L. & J.W. Hansen 1976. Parasitismo of *Simulium damnosum* by *Romanomermis culicivorax*. I.R.C.S. Med.Sci., 4: 508.
- Hansford, R.G. & M. Ladle 1979. The medical importance and behaviour of *Simulium austeni* Edwards (Diptera: Simuliidae) in England. Bull. Entomol. Res., 69: 33-41.

- Hazard, E.I. & C.S. Lofgren 1971. Tissue specificity and systematics of a *Nosema* in some species of *Aedes*, *Anopheles* and *Culex*. J. Invertebr. Pathol., 18: 16-24.
- 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, 163-182.
- 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, 573-586.
- Henning, W. & H. Kremer, 1990. Spermatogenesis of *Drosophyla hydei*. Int. Rev. Citol., 123: 129-175.
- Herrett, R.A. 1989. An industrial perspective of the Green Revolution. Trop. Pest Manage., 35: 231-234.
- Homan, E.J.; Zuluaga, F.N.; Yuill, T.M. & R.H. Lorbacher 1985. Studies on the transmission of Venezuelan Equine Encephalitis virus by Colombian Simuliidae (Diptera). Amer. J. Trop. Med. Hyg., 34: 799-804.
- Hominick, W.M. 1990. Entomopathogenic rhabditid nematodes and pest control. Parasitol. Today, 6: 148-154.
- Hunter, D.M. 1978. The sequence of events in outbreaks of *Austrosimulium pestilens* Mackerras & Mackerras (Diptera: Simuliidae). Bull. Entomol. Res., 68: 307-312.
- Hunter, D.M. & D.E. Moorhouse 1976. Comparative bionimics of adult *Austrosimulium pestilens* Mackerras & Mackerras and *A. bancrofti* (Taylor) (Diptera, Simuliidae). Bull. Entomol. Res., 66: 453-467.
- Hutcheon, D.E. & V.S. Chivers-Wilson 1953. The histaminic and anticoagulant activity of extracts of the black fly (*Simulium vittatum* and *Simulium venustum*). Rev. Can. Biol., 12: 77-85.
- Jahn, N.; Schnetter, W. & K. Geider 1987. Cloning of an insecticidal toxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* and its expression in *Escherichia coli* cells. FEMS Microbiol. Lett., 48: 311-315.

- Jamnback, H. 1981. The Origins of Blackfly Control Programmes. Em: Blackflies - The future for biological methods in integrated control. Laird, M. ed., Acad. Press, 71-73.
- Joubert, L. & P. Monnet 1975. Verification expérimentale du rôle des Simulies (*Tetisimulium bezzii*, Corti, 1914 et *Odagmia* groupe *Ornatum*) dans la transmission du virus myxomateux en Haute-Provence. Rev. Med. Vet. (Toulode), 126: 617-634.
- Kaya, H.K. 1987. Diseases Caused by Nematodes. Em: Epizootiology of Insect Diseases. Fuxa, J.R. & Y. Tanada ed., John Wiley & Sons, 453-470.
- Kellen, W.R.; Chapman, H.C.; Clark, T.B. & J.E. Lindegren 1965. Host-parasite relationship of some *Thelohania* (Nosematidae: Microsporidia) from mosquitoes. J. Invertebr. Pathol., 7: 161-166.
- Kettle, D.S. 1985. Medical and Veterinary Entomology. John Wiley & Sons, 658 pp.
- King, R.C. & E.G. Vanoucek 1960. Oogenesis in adult *Drosophila melanogaster*. X. Studies on the behaviour of the follicle cells. Growth, 24: 333-338.
- Kramer, J.P. 1970. Longevity of microsporidian spores with special reference to *Octospora muscaedomesticae* Flu. Acta Protozool., 8: 217-224.
- Lacey, L.A. & M.S. Mulla 1977. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* as a biocide of blackfly larvae (Diptera: Simuliidae). J. Invertebr. Pathol., 30: 46-49.
- Lacey, L.A. & M.S. Mulla 1978. Factors affecting the activity of diflubenzuron against *Simulium* larvae (Diptera: Simuliidae). Mosq. News, 38: 264-268.
- Lacey, L.A. & J.D. Charlwood 1980. On the biting activities of some anthropophilic Amazonian Simuliidae (Diptera). Bull. Entomol. Res., 70: 495-509.
- Laigo, F.M. & M. Tamashiro 1967. Interactions between a microsporidian pathogen of the lawn armyworm and the hymenopterous parasite *Apanteles marginikentris*. J. Invertebr. Pathol., 9: 546-554.
- Laws, E. R.; Sedlak, V. A.; Miles, J. W.; Joseph, C. R.; Lacomba, J.R. & A. D. Rivera 1968. Field study of the safety of Abate for treating potable water and observations on the effectiveness of a control programme involving both Abate and Malathion. Bull. WHO, 38: 439-445.

- Leitritz, E. 1959. Trout and salmon culture. California Dep. Fish & Game. Fish. Bull., n^o 107, 169 pp.
- Levine, N.D.; Corliss, J.D.; 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.
- Levins, R. & M. Wilson 1980. Ecological theory and pest management. Annu. Rev. Entomol., 25: 287-308.
- Levy, R. & T.W. Miller 1977. Susceptibility of the mosquito nematode *Romanomermis culicivorax* (Mermithidae) to pesticides and growth regulators. Environ. Entomol., 6: 447-448.
- Lewis, D.J. 1953. *Simulium damnosum* and its relation to onchocerciasis in the Anglo-Egyptian Sudan. Bull. Entomol. Res., 43: 597-644.
- Linhares, A.X. 1988. The gonotrophic cycle of *Chrysomya megacephala* (Diptera, Calliphoridae) in the laboratory. Rev. Bras. Entomol., 32: 383-392.
- Lockwood, J.A. & L.D. Debrey 1990. Direct and indirect effects of a large-scale application of *Nosema locustae* (Microsporida: Nosematidae) on rangeland grasshoppers (Orthoptera: Acrididae). J. Econ. Entomol., 83: 377-383.
- 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. Invertebr. Pathol., 37: 66-72.
- Macan, T.T. 1950. The anopheline mosquitoes of Iraq and north Persia. Mem. Lond. Sch. Hyg. Trop. Med., 7: 109-132.
- Mackerras, M.J. & I.M. Mackerras 1948. Simuliidae (Diptera) from Queensland. Austr. J. Sci. Res., 1: 231-270.
- Maddox, J.V. 1973. The persistence of the microsporidia in the environment. Ent. Soc. Am. Misc. Publ., 9: 99-104.

- Maddox, J.V. 1987. Protozoan diseases. Em: Epizootiology of Insect Diseases. Fuxa, J.R. & Y. Tanada eds. John Wiley & Sons, 417-452.
- 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, 587-594.
- Magni, S.T. 1988. Métodos alternativos de controle de simulídeos no RS. II Semin. Nac. Vet. Urb. e An. Sinantr. III Reunião Bras. sobre Simulídeos. (Porto Alegre/RS). Resumos: 66-67.
- Magni, S.T. & V. Py-Daniel 1989. *Aegla platensis* Schmitt, 1942 (Decapoda: Anomura) um predador de imaturos de Simuliidae (Diptera: Culicomorpha). Rev. Saúde pública, 23: 258-259.
- Malone, L.A. 1987. Longevity and Fecundity of argentine stem weevils, *Listronotus bonariensis* (Coleoptera: Curculionidae), infected with *Microsporidium ititii* (Protozoa: Microspora). J. Invertebr. Pathol., 50: 113-117
- Mardini, L.B.L.F. 1988. Ocorrência de larvas de simulídeos e outros insetos no conteúdo estomacal das espécies de peixes capturados em uma área da região piloto do programa estadual de controle do simulídeo. II Semin. Nac. Vet. Urb. e An. Sinantr. III Reunião Bras. sobre Simulídeos. (Porto Alegre/RS). Resumos: 71-72.
- Martin, P.A.W. & D.H. Dean 1981. Genetics and Genetic Manipulation of *Bacillus thuringiensis*. Em: Microbial Control of Pests and Plant Diseases. Burges, H.D. ed., Academic Press, 299-311.
- Maurand, J. & G. Bouix 1969. Mise en evidence d'un phéromène secretore dans le cycle de *Thelohania fibrata* Strickland 1913, microsporidie parasite des larves de *Simulium*. C.R. Acad. Sci. Paris, 269: 2216-2218.
- 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 ed. Academic Press, 151-172.
- McMahon, J. P.; Highton, R. B. & H. Goiny 1958. The eradication of *Simulium neavei* from Kenya. Bull. WHO, 19: 75-107.

- Mer, G.G. 1936. Experimental study on the development of ovary in *Anopheles elutus* Edw. (Diptera: Culicidae). Bull. Entomol. Res., 27:351-359.
- Mercer, C. F. & P. J. Wigley 1987. A microsporidian pathogen of the Poroporo Stem Borer, *Sceliodes cordalis* (Dbl) (Lepidoptera: Pyralidae). J. Invertebr. Pathol., 49: 108-115.
- Metcalf, R.L. 1982. Pest Management Strategies for Insects Affecting Man and Domestic Animals. Em: Introduction to Insect Pest Management., Metcalf, R.L. & W.H. Luckmann ed John Wiley & Sons, 521- 556.
- Ministério da Saúde do Brasil 1982. Praguicidas em Saúde Pública. Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 160 pp.
- Mitchell, C.J.; Chen, P. & H.C. Chapman 1974. Exploratory trials utilizing a mermithid nematode as a control agent for *Culex* mosquitoes in Taiwan. J. Form. Med. Assoc., 73: 241-254.
- Mokry, J.E. & J.R. Finney 1977. Notes on mermithid parasitism of Newfoundland blackflies, with the first record of *Neomesomermis fluminalis* from adult hosts. Can. J. Zool., 55: 1370-1372.
- Molloy, D. & H. Jamnback 1975. Laboratory transmission of mermithids parasitic in blackflies. Mosq. News, 35: 339-342.
- Molloy, D. & H. Jamnback 1977. A larval black fly control field trial using mermithid parasites and its cost implications. Mosq. News, 37: 104-108.
- 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. Simuliídeos (PortoAlegre/ RS), Resumos: 80-81.
- Mulla, M.S. & L.A. Lacey 1976. Feeding rates of *Simulium* larvae on particulates in natural streams (Diptera: Simuliidae). Environ. Ent., 5: 283-287.
- Najera, J.A. 1989. Malaria and the work of WHO. Bull. WHO, 67: 229-243.
- N.A.S. 1973. Mosquito Control - Some Perspectives for Developing Countries. 64 pp.

- N.A.S., 1978. Manejo y Control de Plagas e Insectos. Vol. 3. Edit. Limusa, 522 pp.
- Nelson, G.S. 1974. Onchocerciasis. Adv. Parasitol., 8: 173-224.
- Nickle, W.R. 1972. A contribution to our knowledge of the mermithidae (Nematoda). J.Nematol., 4: 113-146.
- Nolan, R.A. 1981. Mass Production of Pathogens. Em: Blackflies - The future for biological methods in integrated control. Laird, M. ed., Academic Press, 319-324.
- 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, 105-115.
- Olson, J.K. 1979. Application of the concept of Integrated Pest Management (IPM) to mosquito control programs. Paper n^o2. Mosq. News, 39: 737-752.
- 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. Invertebr. Pathol., 53: 410-421.
- Patel, P.N. & M.E.M. Habib 1988. Protozoosis caused by *Vairimorpha necatrix* (Microsporida, Nosematidae) in larvae of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). Rev. Bras. Zool. (S. Paulo), 5: 593-598.
- Patrus, O. A. 1989. Fogo selvagem, endemia brasileira. Ciência Hoje, 10: 8-9.
- Pavlichenko, V.I. 1977. Role of larvae of *Hydropsyche angustipennis* Curt. (Trichoptera, Hydropsychidae) in the destruction of blackfly larvae in running water of Zaporozhe district. Sov. J. Ecol., 8: 84-85.
- Payne, N.M. 1933. A parasitic hymenopteron as a vector of an insect disease. Entomol. News, 44: 22.
- Pegoraro, R.A. 1993. Ciclo biológico de *Simulium (Chirostilbia) pertinax* Kollar, 1832 (Diptera: Simuliidae). An. Soc. ent. Brasil, 22: 29-38.
- Petersen, J.J. 1973. Role of mermithid nematodes in biological control of mosquitoes. Exp. Parasitol., 33: 239-247.

- Petersen, J.J. 1975. Development and fecundity of *Reesimermis nielseni*, a nematode parasite of mosquitoes. J. Nematol., 7: 211-221.
- Petersen, J.J. 1978. Development of resistance by the southern house mosquito to the parasitic nematode *Romanomermis culicivorax*. Econ. Entomol., 7: 518-520.
- Petersen, J.J. 1981. Observations on the biology of *Octomyomermis muspratti*, a nematode parasite of mosquitoes. J. Invertebr. Pathol., 37: 290-294.
- Petersen, J.J. 1985. Nematodes as biological control agents: part I. Mermithidae. Adv. Parasitol., 24: 307-344.
- Petersen, J.J. & O.R. Willis 1970. Some factors affecting parasitism by mermithid nematodes in southern house mosquito larvae. J. Econ. Entomol., 63: 175-178.
- Petersen, J.J. & O.R. Willis 1972. Procedures for the mass rearing of a mermithid parasite of mosquitoes. Mosq. News, 32: 226-230.
- Petersen, J. J.; Chapman, H. C. & O. R. Willis 1969. Fifteen species of mosquitoes as potential hosts of a mermithid nematode *Romanomermis* sp.. Mosq. News, 29: 192-201.
- Petersen, J.J.; Adames, A.J. & L. De León 1983. Bionomics and control of blackflies (Diptera: Simuliidae) at the Fortuna Hydroelectric Project, Panama. J. Med. Entomol., 20: 399-408.
- Peterson, B.V. 1977. The black flies of Iceland (Diptera: Simuliidae). Can. Entomol., 109: 449-472.
- Peterson, B.V. & D.M. Davies 1960. Observations on some insect predators of blackflies (Diptera: Simuliidae) of Algonquin Park, Ontario. Can. J. Zool., 38: 9-18.
- Peterson, B.V. & A.S. West 1960. Control of adult black flies (Diptera: Simuliidae) in the forests of eastern Canada by aircraft spraying. Can. Entomol., 92: 714-719.
- Pettit, J.H.S. 1987. Dermatological Problems. Em. Manson's Tropical Diseases. Manson-Bahr, P.E.C. & D.R. Bell ed., Baillière Tindall, 1054-1070.
- Phillips, D.M. 1970. Insect sperm: their structure and morphogenesis. J. Cell Biol., 44: 243-277.

- Pinheiro, F.P.; Bensabath, G.; Costa Jr., D.; Maroja, O.M.; Liins, Z.C. & A.H.P. Andrade 1974. Haemorrhagic Syndrome of Altamira. The Lancet, april 13: 639-642.
- Platzer, E.G. 1982. Hatching in the mermithid nematode *Octomyomermis musprati*. Proc. Calif. Mosq. and Vector Control Assoc., 49: 30-32.
- Poinar Jr., G.O. 1976. Presence of mermithidae (Nematoda) in invertebrated paratenic hosts. J. Parasitol., 62: 843-844.
- Poinar Jr., G.O. 1981. Mermithid Nematodes of Blackflies Em: Blackflies - The Future for Biological Methods in Integrated Control. M.Laird ed., Acad. Press N.Y., 159-170.
- Poinar Jr., G.O. 1983. The Natural History of Nematodes. Prentice-Hall, Inc., 323 pp.
- Poinar Jr., G.O. & R. Hess 1977. *Romanomermis culicivorax*: Morphological evidence of transcuticular uptake. Exp. Parasitol., 42: 27-33.
- Prasad, V. & D.R. Cook 1972. The taxonomy of water mite larvae. Mem. Am. Entomol. Inst., 18: 1-326.
- Ramirez-Perez, J.; Rassi, E.; Convit, J. & A. Ramirez 1976. Importancia epidemiologica de los grupos de edad en las poblaciones de *Simulium metallicum* (Diptera: Simuliidae) en Venezuela. Bol. Of. Sanit. Panam., 80: 105-122.
- 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.
- Rey, L. 1991. Parasitologia. Ed. Guanabara Koogan, 731 pp.
- Rivosecchi, L. 1986. Contributo alla conoscenza dei Simulidi italiani XXVII - le specie che attaccano in massa l'uomo i gli animali domestici nell'Italia nord-orientale. Riv. Parassitol., 47: 5-15.
- Rivosecchi, L. & E. Zanin 1983. Contributo alla conoscenza dei Simulidi italiani XXV - Focolai larvali di *Simulium reptans* (L.) e *Simulium voilense* Serban e attacco massivo al bestiame in Provincia di Trento. Riv. Parassitol., 44: 17-35.
- Roberts, F.H.S. 1940. The insect parasites of sheep. Queensl. J. Agric. Sci., 53: 530-546.

- Robles, R. 1917. Enfermedad nueva en Guatemala. La Juventud Médica, 17: 97-115.
- Ruas Neto, A.L. 1984a. Avaliação do uso de Temefôs para o controle de simulídeos no Rio Grande do Sul. B. Saúde (P.Alegre), 11: 27-31.
- Ruas Neto, A.L. 1984b. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* como alternativa no controle de simulídeos no Rio Grande do Sul. I. Susceptibilidade a campo. B. Saúde (P.Alegre), 11: 21-26.
- Ruas Neto, A.L.; Souza, M.A.T.; Severino, S.; Melo, J.L.B.; Silveira, S.M. & N.D.F. Fortes 1985. Controle Integrado do *Simulium (Chirostilbia) pertinax* Kollar, 1832. I. Utilização de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em três municípios do Rio Grande do Sul. B. Saúde (Porto Alegre), 12: 17-20.
- Rubtsov, I.A. 1963. On mermithids parasitic in blackflies. Zool. Zh., 42: 1768-1784.
- Rubtsov, I.A. 1967. On entomophthorous fungi parasiting bloodsucking blackflies. Parazitologiya (Leningrad), 1: 94-98.
- Rubtsov, I.A. 1981. Mermithidae: Taxonomix Criteria for their Juvenile Stages and Blackfly Biocontrol Prospects Em: Blackflies - The Future for Biological Methods in Integrated Control. M. Laird ed., Academic Press N.Y., 71-180.
- Rutherford, T.A. & J.M. Webster 1974. Transcuticular uptake of glucose by entomophilic nematode, *Mermis nigrescens*. J. Parasitol., 60: 804-808.
- Rutherford, T.A. & J.M. Webster 1978. Some effects of *Mermis nigrescens* in the hemolymph of *Schistocerca gregaria*. Can. J. Zool., 56: 339-347.
- Rutherford, T.A.; Webster, J.M. & J.S. Barlow 1977. Physiology of nutrient uptake by the entomophilic nematode *Mermis nigrescens* (Mermithidae). Can. J. Zool., 55: 1773-1783.
- Sajap, A.S. & L.C. Lewis 1988. Effects of the microsporidium *Nosema pyrausta* (Microsporida: Nosematidae) on the egg parasitoid, *Trichogramma nubilale* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). J. Invertebr. Pathol., 52: 294-300.
- Saito, K.; Takahashi, M.; Nakamura, Y. & T. Kurihara 1978. Spiders (Aranae) as natural enemies of blackfly adults (Simuliidae). JPN J. Appl. Entomol. Zool., 22: 119-121.

- Schmidt, S.P. & E.G. Platzer 1980. Changes in body tissues and hemolymph composition of *Culex pipiens* in response to infection by *Romanomermis culicivorax*. J. Invertebr. Pathol., 36: 240-254.
- Scholtens, R.G.; Adams, S.R. & J.R. Broderson 1977. Evidence of onchocerciasis in Georgia cattle: prevalence at slaughter. Am. J. Vet. Res., 38: 1093-1097.
- Shamseldean, M.M. & E.G. Platzer 1989. *Romanomermis culicivorax*: penetration of larval mosquitoes. J. Invertebr. Pathol., 54: 191-199.
- Shelley, A.J. 1988. Vector aspects of the epidemiology of Onchocerciasis in Latin America. Annu. Rev. Entomol., 30: 337-366.
- Shelley, A. J. & A.P.A. Luna Dias 1989. First report of man eating blackflies (Dipt., Simuliidae). Entomol. Mon. Mag., 125: 44.
- Shelley, A.J.; Luna Dias, A.P.A.; Moraes, M.A.P. & W.S.Procunier 1987. The status of *Simulium oyapockense* and *S. limbatum* as vectors of human onchocerciasis in Brazilian Amazonia. Med. Vet. Entomol., 1: 219-234.
- Shemanchuk, J.A. 1987. Host-seeking Behavior and Host Preference of *Simulium articum*. Em: Black flies: ecology population management, and annotated world list. Kim, K.C. & Merritt, R.W. ed., Pennsylvania State Univ., University Park & London, 250-260.
- Smirnoff, W.A. 1968. Adaptation of the microsporidian *Thelohania pristiphorae* to the tent caterpillars *Malacosoma disstria* and *Malacosoma americanum*. J. Invertebr. Pathol., 11: 321-325.
- Smirnoff, W.A. 1973. Biochemical exploration in insect pathology. Curr. Top. Compar. Pathobiol., 2: 89-106.
- Souza, M. A. T. 1984. Atendimento médico por picada de simulídeos. B. Saúde (Porto Alegre/RS), 11: 8-11.
- Souza, M.A.T. 1988. Controle de simulídeos no Rio Grande do Sul usando *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. II Semin. Nac. Vet. Urb. e An. Sinantr. III Reunião Bras. sobre Simulídeos (Porto Alegre/RS). Resumos: 68-69.

- Souza, M.A.T. & S.T. Magni 1988. Observações preliminares sobre predação de estágios imaturos de simulídeos por pássaros. II Semin. Nac. Vet. Urb. e An. Sinantr. III Reunião Bras. sobre Simulídeos. (Porto Alegre/ RS). Resumos: 70-71.
- Souza-Araújo, H.C. 1943. Verificação em condições naturais da infecção de mais três hematófagos (Anophelineos, Flebótomos e Simulídeos) em leprosos. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 39: 167-176.
- Spradbery, J.P. & D.P.A. Sands 1976. Reproductive system and terminalia of the old world screw-worm fly, *Chrysomya bezziana* Villeneuve (Diptera: Calliphoridae). Int. J. Morphol. & Embryol., 5: 409-421.
- Sprague, V.; Becnel, J.J. & E.I. Hazard 1992. Taxonomy of Phylum Microspora. Crit. Rev. Microbiol., 18: 285-395.
- Stelman, C.D. 1979. Economic threshold in Mosquito IPM Programs. Paper n^o3. Mosq. News, 39: 724-729.
- 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. Annu. Rev. Microbiol., 11: 165-182.
- Stoffolano Jr., J.G. 1967. The synchronization of the life cycle of diapausing face flies, *Musca autumnalis* and of the nematode *Heterotylenchus autumnalis*. J. Invertebr. Pathol., 9: 395-397.
- Stoffolano Jr., J.G. 1973. Host Specificity of Entomophilic Nematodes - A Review. Exp. Parasitol., 33: 263-284.
- Stokes, J. H. 1914. A clinical pathological and experimental study of the lesions produced by the bites of the "black fly" (*Simulium venustum*). J. Cutaneous Diseases, 32: 751-769.
- 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.

- SUCAM 1987. Informações Epidemiológicas. Publicação interna do DECEN/SUCAM - MS nº 55, 2 pp.
- Sutcliffe, D.W. 1963. The chemical composition of hemolymph in insects and some other arthropods in relation to their phylogeny. Comp. Biochem. Physiol., 9: 121-135.
- Sweeney, A.W. & J.J. Becnel 1991. Potencial of Microsporidia for the Biological Control of mosquitoes. Parasitology Today, 7: 217-220.
- 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. Invertebr. Pathol., 55: 428-434.
- Szabó, J.B. 1971. Black fly swarms and the possibilities of eradication at Tata, Hungary. Parasitol. Hung., 4: 169-180.
- Tanada, Y. 1959. Microbial control of insect pests. Annu. 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 247-279.
- Taylor, C.E. 1986. Genetics and evolution of resistance to insecticides. Biol. J. Linn. Soc., 27: 103-112.
- Thompson, B.H. & B.G. Adams 1979. Laboratory and field trials using Altosid^R insect growth regulator against blackflies (Diptera: Simuliidae) of Newfoundland Canada. J. med. Entomol., 16: 536-546.
- 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.
- Tonn, R.J. 1982. Medical entomology and vector control in Latin America. Mosq. News, 42: 506-510.
- Undeen, A.H. 1981. Microsporidia infections in adult *Simulium vittatum*. J. Invertebr. Pathol., 38: 426-427.

- Undeen, A.H. & D. Berl 1979. Laboratory studies on the effectiveness of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* de Barjac against *Simulium damnosum* (Diptera: Simuliidae) larvae. Mosq. News, 39: 742-745.
- Vorobetz, E.I. 1984. On the infection rate of blackflies (Diptera, Simuliidae) with the entomogenous fungus *Coelomycidium simulii* in Yakutia. Med. Parazitol. Parazit. Bolezni, 1984: 25-28.
- Wallace, R.R. & H.B.N. Hynes 1975. The catastrophic drift of stream insects after treatments with methoxychlor (1,1,1 - Trichloro - 2,2-Bis (p-methoxyphenyl) ethane). Environ. Pollut., 8: 255-268.
- Wallace, R.R.; West, A.S.; Downe, A.E.R. & H.B.N. Hynes 1973. The effects of experimental blackfly (Diptera: Simuliidae) larviciding with abate, dursban and methoxychlor on stream invertebrates. Can. Entomol., 105: 817-831.
- Wallace, R.R.; Hynes, H.B.N. & W. Merritt 1976. Laboratory and field experiments with methoxychlor as a larvicide for Simuliidae (Diptera). Environ. Pollut., 10: 251-269.
- Walsh, J.F. 1983. Control of Simuliid Blackflies. Em: Pest and Vector Management in the Tropics. Youdeowei, A. & M.W. Service eds., Longman Group Ltd., Londres, 280-290
- Walsh, J.F.; Davies, J.B. & R. Le Berre 1979. Entomological aspects of the first five years of the Onchocerciasis Control Programme in the Volta River basin. Tropenmed. Parasitol., 30: 328-344.
- Wanson, M.; Courtsois, L. & B. Lebiéd 1949. L'eradication du *Simulium damnosum* (Theobald) a Léopoldville. Ann. Soc. belge Med. Trop., 29: 373-403.
- Waters, T.F. 1972. The drift of stream insects. Annu. Rev. Entomol., 17: 253-272.
- Weidner, E. 1970. Ultrastructural study of microsporidian development. Z. Zellforsch., 105: 33-54.
- Weiser, J. 1963. Sporozoan Infections. Em: Insect Pathology, an Advanced Treatise. Steinhaus, E. A. ed., Academic Press, 291-334.
- Weiser, J. 1964. Parasitology of blackflies. Bull WHO, 31: 483-485.

- Weiser, J. 1968. Iridescent virus from the blackfly *Simulium ornatum* Meigen in Czechoslovakia. J. Invertebr. Pathol., 12: 36-39.
- Weiser, J. 1976. Microsporidia in Invertebrates: Host-Parasite Relations at the Organismal Level. Em: Comparative Pathobiology - Vol. 1 - Biology of the Microsporidia Bulla Jr., LA. & T.C. Cheng, eds. Plenum Press, 163-201.
- Weiser, J. 1977. An Atlas of Insect Diseases. Czechoslovak Acad. Sci., 240 pp.
- Weiser, J. 1984. A mosquito-virulent *Bacillus sphaericus* in adult *Simulium damnosum* from northern Nigeria. Zentralbl. fur Mikrobiol., 139: 57-60.
- Weiser, J. & A.H. Undeen 1981. Diseases of Blackflies. Em: Blackflies - The future for biological methods in integrated control. Laird, M. ed., Academic Press, 181-196
- Weiser, J. & S. Prasertphon 1982. Microsporidia infecting *Simulium damnosum* in Nigeria. Z. Angew. Entomol., 93: 93-101.
- Wenk, P. 1981. Bionomics of adult blackflies. Em: Blackflies - The future for biological methods in integrated control. Laird, M. ed., Academic Press, 259-279.
- West, A.S.; Brown, A.W.A. & D.G. Peterson 1960. Control of black fly larvae (Diptera: Simuliidae) in the forests of eastern Canada by aircraft spraying. Can. Entomol., 92: 745-754.
- Westerdahl, B.B.; Washino, R.K. & E.G. Platzer 1982. Successful establishment and subsequent recycling of *Romanomermis culicivorax* (Mermithidae: Nematoda) in a California rice field following postparasite application. J. Med. Entomol., 19: 34-41.
- WHO 1984. Chemical Methods for the Control of Arthropod Vectors and Pests of Public Health Importance. 108 pp.
- WHO 1987. WHO Expert Committee on Onchocerciasis. Third report. WHO Tech. Rep. Ser., 752: 1-167.
- Wigglesworth, V. B. 1972. The Principles of Insect Physiology. John Wiley & Sons Inc., 827 pp.

- Wilson, G.G. 1981. *Nosema fumiferanae*, a Natural Pathogen of a Forest Pest: Potential for Pest Management. Em: Microbial Control of Pests and Plant Diseases. Burges, H.D. ed., Academic Press, 595 - 601.
- Wilson, G.G. 1983. Protozoans for Insect Control. Em: Microbial Viral Pesticides. Kurtak, E. ed., Maral dekker Inc., 587-600.
- Womeldorf, D.J. 1979. Funding for Integrated Pest Management in Mosquito Control. Paper n^o4. Mosq. News, 39: 729-731.
- Woodward, D.B. & T. Fukuda 1977. Laboratory resistance of the mosquito *Anopheles quadrimaculatus* to the mermithid nematode *Diximermis peterseni*. Mosq. News, 37: 192-195.
- Wotton, R.S. & R.W. Merrit 1988. Experiments on predation and substratum choice by larvae of the muscid fly, *Limnophora riparia*. Holarct. Ecol., 11: 151-159.
- Youdeowei, A. & M.W. Service 1983. Pest and Vector Management in the Tropics. Longman Group Ltd., Londres, 199 pp.
- Zivkovic, V. 1975. Present state of black flies (Diptera, Simuliidae) in the Djerdap Gorge (Iron Gate) of the Danube in Yugoslavia. Acta Vet. Belgr., 25: 279-285.
- Zivkovic, V. & B. Burany 1972. An outbreak of *Boopthora erythrocephala* (Diptera: Simuliidae) in Yugoslavia in 1970. Acta Vet. Belgr., 22: 133-142.