

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
L. B.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

ESTUDOS SOBRE XIFIDIOCERCÁRIAS (TREMATODA) E SEU
PARASITISMO EM LARVAS DE MOSQUITOS (DIPTERA: CULICIDAE)

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a)
<i>Gilcia Aparecida de Carvalho Silva</i>
e aprovada pela Comissão Julgadora.
<i>08/02/00 Carlos F. Andrade</i>

GÍLCIA APARECIDA DE CARVALHO SILVA

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de
Mestre em Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. CARLOS FERNANDO SALGUEIROSA DE ANDRADE

Co-orientadora: Profa. Dra. MARLENÉ TIDUKO UETA

Campinas, SP
2000

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

20005835

IDADE	30
CHAMADA:	11/11/2000
Ex.	278100
CO	40920
CO	811,00
CPD	13104100

CM-00138971-6

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Carvalho Silva, Gílcia Aparecida de

C253e

Estudos sobre xifidiocercárias (Trematoda) e seu parasitismo em larvas de mosquitos (Diptera: culicidae)/Gílcia Aparecida de Carvalho Silva. -- Campinas, SP: [s.n.], 2000.

107f. ilus.

Orientador: Carlos Fernando Salgueirosa de Andrade

Co-Orientadora: Marlene Tiduko Ueta

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

1. Parasitismo. 2. Prevalência. 3. Cercária. 4. Mortalidade. I. Andrade, Carlos Fernando Salgueirosa. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 08 de fevereiro de 2000.

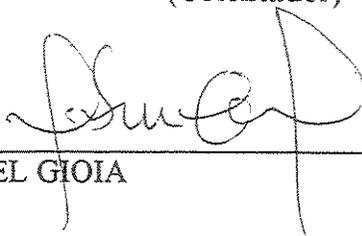
UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

BANCA EXAMINADORA:

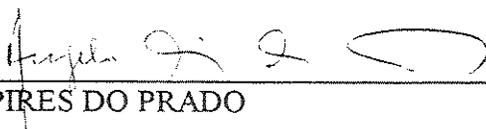
TITULARES:



Prof. Dr. CARLOS FERNANDO SALGUEIROSA DE ANDRADE
(Orientador)



Prof. Dr. ISMAEL GIOIA



Prof. Dr. ANGELO PIRES DO PRADO

SUPLENTE:

Prof. Dr. ODAIR BENEDITO RIBEIRO

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Francisco e Genny por todo o amor, carinho e compreensão com que sempre me presentearam

Ao meu esposo Edson pelo apoio de fundamental importância e carinho em todos os momentos

À minha filha Gabrielinha que faz com que tudo valha a pena

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Fernando S. de Andrade pela dedicação, amizade, paciência e pela incansável disposição para ensinar, com que me orientou.

À Profa. Dra. Marlene T. Ueta pelas sugestões e ensinamentos de grande valia com que co-orientou este projeto e por todo o apoio, companheirismo e amizade.

Aos Profs. Drs. Nelson da Silva Cordeiro, Angelo Pires do Prado, Odair Benedito Ribeiro e Ismael Gioia pelas valiosas críticas e sugestões durante os Exames de Qualificação e Prévio.

À Pesquisadora Takako Ueki Fujii e aos técnicos Alberto José dos Santos e Antônio Lino de Mendonça, do Instituto Biológico de Registro, SP, pela fundamental colaboração.

Ao Dr. Paulo de Castro, proprietário da Fazenda Bananal em Miracatu, SP, onde a maior parte deste projeto foi desenvolvida.

Aos Técnicos de Laboratório Ivo Gonçalves Pereira e João Batista Alves de Oliveira por toda a disposição, amizade e apoio constantes durante as coletas de campo e trabalhos de laboratório.

Ao Biólogo Paulo Roberto Manzani pela identificação dos anfíbios e pelas informações sobre comportamento destes animais.

Aos amigos René J. Franjola e Déborah R. Serrano pela ajuda na elaboração das figuras no computador.

Aos docentes e funcionários dos Departamentos de Zoologia e Parasitologia.

À Cleusa e aos motoristas Joaquim e Élcio do Setor de Transportes do Instituto de Biologia, UNICAMP.

Aos amigos e colegas Luciana, Jairo, Ana Tereza, Carmen, Giovanna, Fernanda, Virgínia, Lucho, Heitor, Horácio, Rubens, Nilson, Fabíola, Rejane, Maria Angélica, Maria Antonia, e María Argenis por todo o incentivo e auxílio sempre presentes.

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a ocorrência de xifidiocercárias na região de Campinas e em duas localidades no Vale do Ribeira, Estado de São Paulo e estudar o parasitismo das mesmas sobre larvas de mosquitos da família Culicidae em condições experimentais.

Realizaram-se coletas de moluscos em corpos de água doce na região de Campinas e nos municípios de Registro e Miracatu no Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, no período de setembro de 1996 a fevereiro de 1999. Foram coletadas as espécies *Lymnaea columella*, *Physa marmorata*, *Biomphalaria tenagophila*, *Drepanotrema cimex* e *D. lucidum*. Também foram coletados exemplares de *Biomphalaria* e *Drepanotrema* os quais não foram dissecados para a confirmação da espécie, podendo pertencer à uma das espécies acima identificadas.

Após a exposição dos moluscos à luz incandescente de 60 W encontrou-se exemplares de limnédeos provenientes de Miracatu, SP, apresentando uma variação de 0,2 a 1,0% de parasitismo por cercárias de *Fasciola hepatica*, 0,4 a 8,3% de parasitismo por xifidiocercárias (Haematoloechidae) e 3,3% de parasitismo por cercárias de equinostomatídeo, além de moluscos planorbídeos parasitados por furcocercárias (prevalência de 1,5%), cercárias de equinostomatídeo com 14,1% de prevalência e 1,5 a 15,6% de parasitismo por xifidiocercárias. As xifidiocercárias encontradas em planorbídeos eram diferentes das obtidas de limnédeos. Em Louveira, SP, foi encontrado um exemplar de *Biomphalaria* sp. parasitado por furcocercárias (1,9%). Na localidade ROSA em Campinas, SP encontrou-se um exemplar de *Biomphalaria* sp. e um de *L. columella* parasitados por furcocercárias (7,6%) e cercárias de equinostomatídeo (1,5%), respectivamente. Na lagoa da UNICAMP, atrás da Faculdade de Educação Física (UNI-I), também em Campinas, encontrou-se um exemplar de *L. columella* parasitado por furcocercárias (2,3%).

Três exemplares de *B. tenagophila* provenientes de Miracatu, estavam duplamente infectados por furcocercárias, tanto com ocelo como sem esta estrutura totalizando 3,8% de parasitismo por estas cercárias, além de seis moluscos da mesma espécie (4,3%) com infecção dupla por xifidiocercárias e cercárias de equinostomatídeo. Dois exemplares de *L. columella* da mesma localidade, também apresentaram infecção dupla por xifidiocercárias e cercárias de *F.*

hepatica (4,4%) e um exemplar com xifidiocercárias e equinostomatídeo (1,7%). Houve também infecção dupla por xifidiocercárias e rédias em quatro moluscos, que apresentou parasitismo variando de 1,2 a 3,2%.

Estudou-se a morfologia das xifidiocercárias eliminadas por *L. columella* e comparou-se com descrições de outros autores. Com estes estudos, concluiu-se que as mesmas pertenciam a subordem Plagiorchiata, família Haematoloechidae, mais provavelmente gênero *Haematoloechus*. Tais cercárias, quando colocadas em contato com larvas de mosquitos das espécies *Culex quinquefasciatus*, *Aedes albopictus* ou *Ae. aegypti*, penetraram e encistaram nas larvas, formando as metacercárias. Observou-se em geral atraso no desenvolvimento das larvas de culicídeos parasitadas, que na maioria das vezes evoluíram até a morte. A infecção nas larvas foi sempre de 100% e a mortalidade máxima nos experimentos foi de 72,2% para larvas de *Cx. quinquefasciatus*, 100% para *Ae. albopictus* e 95% para *Ae. aegypti*. Verificou-se ainda, que quando não ocorreu a morte das larvas infectadas pelas xifidiocercárias, destas emergiam adultos infectados com metacercárias vivas e bem ativas.

Também foi feita uma simples infecção experimental em rãs da espécie *Rana catesbeiana*, considerando-se anfíbios como possíveis hospedeiros definitivos. Larvas de mosquito parasitadas por xifidiocercárias foram oralmente administradas às rãs, mas não foi possível recuperar nenhum trematódeo nos órgãos dos anfíbios.

ABSTRACT

The present work aimed to evaluate the xiphidiocercariae occurrence in Campinas region and two places in Vale do Ribeira, São Paulo State, and to study the xiphidiocercariae parasitism in mosquitoes larvae (Culicidae) under experimental conditions.

Snails were collected from fresh water collections in the region of Campinas, Registro and Miracatu in the Vale do Ribeira, São Paulo State, in the period from September-1996 to February-1999. The species collected were *Lymnaea columella*, *Physa marmorata*, *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria* sp., *Drepanotrema cimex*, *D. lucidum* and *Drepanotrema* sp. After exposing the snails to incandescent light (60 W), lymnaeid snails from Miracatu, SP, infected by *Fasciola hepatica* were found presenting of 0,2 to 1,0% of parasitism, besides 0,4 to 8,3% of parasitism with xiphidiocercariae (Haematoloecidae) and 3,3% of parasitism with echinostomatid cercariae. For the same locality planorbid snails were found parasited with furcocercariae (1,5% of prevalence), with echinostomatid cercariae (14,1% of prevalence) and xiphidiocercariae from 1,5 to 15,6% of parasitism. The xiphidiocercariae found in planorbid were different from that obtained from lymnaeid. In Louveira, SP it was found one *Biomphalaria* sp. snail infected with furcocercariae (1,9%). In the ROSA place (Campinas), SP it was found an individual of *Biomphalaria* sp. and one of *L. columella* infected by furcocercariae (7,6%) and echinostomatid cercariae (1,5%), respectively. In the place UNI-I, also in Campinas, one *L. columella* was infected by furcocercariae (2,3%).

Three individuals of *B. tenagophila* from Miracatu were double infected by two types of furcocercariae, (with or without ocellus), totaling 3,8% of parasitism for these cercariae, besides six snails of the same species (4,3%) with double infection for xiphidiocercariae and echinostomatid cercariae. Two *L. columella* from the same place, also presented double infection for xiphidiocercariae and *F. hepatica* (4,4%) and an exemplary with xiphidiocercariae and echinostomatid cercariae (1,7%). There was also double infection for xiphidiocercariae and rediae in four snails that presented a parasitism varying of 1,2 to 3,2%.

The morphology of the xiphidiocercariae eliminated by *L. columella* was studied and compared with other authors' descriptions. From these studies, it was possible to conclude the cercariae belonging to the suborder Plagiorchiata, family Haematoloechidae, and probably genus *Haematoloechus*. When in contact with mosquito larvae of the species *Culex quinquefasciatus*, *Aedes albopictus* or *Ae. aegypti*, such cercariae penetrated and encysted in the larvae forming metacercariae. It was observed in general a developmental delay of the culicid larvae caused by the parasitism that most of the time developed to the death. The infection in the larvae was always accomplished (100%) and the maximum mortality in the experiments was of 72,2% to *Cx. quinquefasciatus* larvae, 100% for *Ae. albopictus* and 95% for *Ae. aegypti*. It was still verified that when the death did not occur to the xiphidiocercariae-infected larvae, the resulting adults were infected with alive and very active metacercariae.

It was also made a simple experimental infection in frogs of the species *Rana catesbeiana*, considering amphibians as possible definitive host. Mosquito larvae parasitized by xiphidiocercariae were orally administered to the frogs but it was not possible to recover any trematode in the amphibians' organs.

ÍNDICE GERAL

	Página
1 – INTRODUÇÃO GERAL.....	01
1.1– OBJETIVOS.....	10
2 – AVALIAÇÃO DO PARASITISMO POR XIFIDIOCERCÁRIAS (TREMATODA) EM MOLUSCOS DE ÁGUA DOCE DE ALGUMAS LOCALIDADES DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL.....	11
2.1 – INTRODUÇÃO.....	11
2.2 – MATERIAL E MÉTODOS.....	12
2.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
3 – ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE XIFIDIOCERCÁRIAS PROVENIENTES DE INFECÇÃO NATURAL DE <i>Lymnaea columella</i> SAY, 1817 (BASOMMATOPHORA, LYMNAEIDAE) E DE <i>Biomphalaria</i> <i>tenagophila</i> ORBIGNY, 1835 (BASOMMATOPHORA, PLANORBIDAE) COLETADAS EM MIRACATU, SP.....	27
3.1 – INTRODUÇÃO.....	27
3.2 – MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4 – EXPOSIÇÃO EXPERIMENTAL DE LARVAS DE MOSQUITOS (DIPTERA: CULICIDAE) A XIFIDIOCERCÁRIAS (TREMATODA).....	44
4.1 – INTRODUÇÃO.....	44
4.2 – MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5 – CONCLUSÕES.....	82
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
1 – INTRODUÇÃO GERAL.....	01
Tabela 1 – Relação de algumas espécies de trematódeos que podem utilizar larvas de mosquitos como hospedeiros e autores da descrição de seus ciclos biológicos.....	06
2 – AVALIAÇÃO DO PARASITISMO POR XIFIDIOCERCÁRIAS (TREMATODA) EM MOLUSCOS DE ÁGUA DOCE DE ALGUMAS LOCALIDADES DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL.....	11
Tabela 1 – Relação e identificação dos locais de coleta de moluscos.....	13
Tabela 2 – Número de moluscos coletados no período de abril de 1996 a fevereiro de 1999, nas quinze localidades do Estado de São Paulo.....	15
Tabela 3 – Relação dos valores mínimos e máximos das características físico-químicas da água dos criadouros (temperaturas do ar e da água, pH, Ferro, Sulfito, Alcalinidade, Cloreto e Dureza), referentes às coletas realizadas no período de abril de 1996 a fevereiro de 1999, nas diversas localidades do Estado de São Paulo.....	17
Tabela 4 – Dados referentes ao número de moluscos coletados nas diversas localidades do Estado de São Paulo, no período de setembro de 1996 a fevereiro de 1999, e à eliminação de cercárias quando expostos à luz incandescente de 60W, por um período médio de 1 hora.....	20
Tabela 5 – Incidência mensal do parasitismo no município de Miracatu, SP (MIR), no período de setembro de 1996 a fevereiro de 1999.....	21
3 – ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE XIFIDIOCERCÁRIAS PROVENIENTES DE INFECÇÃO NATURAL DE <i>Lymnaea columella</i> SAY, 1817 (BASOMMATOPHORA, LYMNÆIDAE) E DE <i>Biomphalaria tenagophila</i> ORBIGNY, 1835 (BASOMMATOPHORA, PLANORBIDAE) COLETADAS EM MIRACATU, SP.....	27
Tabela 1 – Valores médios, mínimos e máximos (μm) referentes a morfologia de X-LC obtidas de infecção natural de <i>L. columella</i>	31
Tabela 2 - Valores médios, mínimos e máximos (μm) de metacercárias encistadas e excistadas, obtidas de infecção experimental através de exposição de larvas de <i>Ae. aegypti</i> à X-LC.....	35

Tabela 3 – Valores médios, mínimos e máximos (μm) referentes a morfologia de X-BT obtidas de infecção natural de <i>B. tenagophila</i>	41
4 – EXPOSIÇÃO EXPERIMENTAL DE LARVAS DE MOSQUITOS (DIPTERA: CULICIDAE) A XIFIDIOCERCÁRIAS (TREMATODA).....	44
Tabela 1 – Relação dos experimentos com larvas de culicídeos em diferentes estádios (L_1 a L_4) expostas às xifidiocercárias (X-LC = xifidiocercárias eliminadas por <i>L. columella</i> , X-DL = eliminadas por <i>D. lucidum</i> e X-BT = eliminadas por <i>B. tenagophila</i>).....	48
Tabela 2 – Variação no tempo de desenvolvimento (A = avanço; T = atraso) de larvas de <i>Ae. albopictus</i> de diferentes estádios expostas a diferentes concentrações de X-LC, probabilidade para o Teste “t” quando comparadas à testemunha não exposta e porcentagem final de mortalidade.....	53
Tabela 3 – Variação no tempo de desenvolvimento (A = avanço; T = atraso) de larvas de <i>Ae. albopictus</i> de diferentes estádios expostas a diferentes concentrações de X-LC, probabilidade para o Teste “t” quando comparadas à testemunha não exposta e porcentagem final de mortalidade.....	59
Tabela 4 – Variação no tempo de desenvolvimento (A = avanço; T = atraso) de larvas de <i>Ae. aegypti</i> de diferentes estádios expostas a diferentes concentrações de X-LC, probabilidade para o Teste “t” quando comparadas à testemunha não exposta e porcentagem final de mortalidade.....	63
Tabela 5 – Variação no tempo de desenvolvimento (A = avanço; T = atraso) de larvas de <i>Cx. quinquefasciatus</i> de 1° e 4° estádios expostas a duas concentrações de X-LC, probabilidade para o Teste “t” quando comparadas à testemunha não exposta e porcentagem final de mortalidade.....	67
Tabela 6 – Porcentagem média e desvio padrão (DP) do parasitismo resultante da exposição individual de larvas de <i>Ae. albopictus</i> de 4° estágio à X-LC na concentração de dez cerc./larva (= 1,66 cerc./ml) para 3 repetições.....	70
Tabela 7 – Variação no tempo de desenvolvimento (A = avanço; T = atraso) de larvas de <i>Ae. albopictus</i> de 4° estágio expostas à X-LC na concentração de dez cerc./larva (= 1,66 cerc./ml) e probabilidade para o Teste “t”	71
Tabela 8 – Porcentagem do parasitismo resultante da exposição individual de larvas de <i>Ae. albopictus</i> de 4° estágio à X-LC na concentração de cinco cerc./larva (= 0,83 cerc./ml).....	72

Tabela 9 – Variação no tempo de desenvolvimento (A = avanço; T = atraso) de larvas de <i>Ae. albopictus</i> de 4º estágio expostas à X-LC na concentração de cinco cerc./larva (= 0,83 cerc./ml) e probabilidade para o Teste “t”	73
Tabela 10 – Comparação dos resultados das exposições de larvas de <i>Ae. albopictus</i> à duas concentrações de X-LC.....	73
Tabela 11 – Porcentagem média e desvio padrão (DP) do parasitismo resultante da exposição agrupada de larvas de <i>Ae. albopictus</i> de 4º estágio à X-LC na concentração de dez cerc./larva (= 10 cerc./ml) e individualizadas 24h após, para 2 repetições.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
2 – AVALIAÇÃO DO PARASITISMO POR XIFIDIOCERCÁRIAS (TREMATODA) EM MOLUSCOS DE ÁGUA DOCE DE ALGUMAS LOCALIDADES DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL.....	11
Figura 1 – Prevalência (%) de trematódeos parasitando <i>Lymnaea columella</i> em pasto de criação de bovinos em Miracatu, SP, entre setembro de 1996 a fevereiro de 1999.....	24
Figura 2 – Prevalência (%) de trematódeos parasitando <i>Biomphalaria tenagophila</i> em pasto de criação de bovinos em Miracatu, SP, entre dezembro de 1997 a fevereiro de 1999.....	25
3 – ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE XIFIDIOCERCÁRIAS PROVENIENTES DE INFECÇÃO NATURAL DE <i>Lymnaea columella</i> SAY, 1817 (BASOMMATOPHORA, LYMNAEIDAE) E DE <i>Biomphalaria tenagophila</i> ORBIGNY, 1835 (BASOMMATOPHORA, PLANORBIDAE) COLETADAS EM MIRACATU, SP.....	27
Figura 1 – Esporocisto que originou as X-LC, obtido de infecção natural de <i>L. columella</i> proveniente de Miracatu, SP.	32
Figura 2 – X-LC originada de esporocisto obtido de infecção natural de <i>L. columella</i> proveniente de Miracatu, SP.	33
Figura 3 - Metacercária encistada com idade de 24 h, obtida de infecção experimental através de exposição de larvas de <i>Ae. aegypti</i> a X-LC.....	36
Figura 4 - Metacercária excistada com idade de 24 h, obtida de infecção experimental através de exposição de larvas de <i>Ae. aegypti</i> a X-LC.	37
Figura 5 – X-BT originada por esporocistos obtidos de infecção natural de <i>B. tenagophila</i> proveniente de Miracatu, SP, corada com vermelho neutro.....	42

4 - EXPOSIÇÃO EXPERIMENTAL DE LARVAS DE MOSQUITOS (DIPTERA: CULICIDAE) A XIFIDIOCERCÁRIAS (TREMATODA).....	44
Figura 1 - Número de indivíduos vivos nas fases de desenvolvimento alcançado (colunas) e porcentagem de mortalidade acumulada (linhas) para larvas de <i>Ae. albopictus</i> de 1° a 4° estádios, expostas agrupadas às concentrações de 8,75, 4,11, 5,0 e 8,75 cerc./larva (= 1,75 cerc./ml).....	51
Figura 2 - Número de indivíduos vivos nas fases de desenvolvimento alcançado (colunas) e porcentagem de mortalidade acumulada (linha) para larvas de <i>Ae. albopictus</i> de 1° estágio, expostas agrupadas à concentração de 3,65 cerc./larva (=1,82 cerc./ml), ou não expostas (Testemunha).....	55
Figura 3 - Número de indivíduos vivos nas fases de desenvolvimento alcançado (colunas) e porcentagem de mortalidade acumulada (linha) para larvas de <i>Ae. albopictus</i> de 2° estágio, expostas agrupadas à concentração de 3,5 cerc./larva (=1,75 cerc./ml), ou não expostas (Testemunha).....	56
Figura 4 - Número de indivíduos vivos nas fases de desenvolvimento alcançado (colunas) e porcentagem de mortalidade acumulada (linha) para larvas de <i>Ae. albopictus</i> de 3° estágio, expostas agrupadas à concentração de 5,2 cerc./larva (=2,6 cerc./ml), ou não expostas (Testemunha).....	57
Figura 5 - Número de indivíduos vivos nas fases de desenvolvimento alcançado (colunas) e porcentagem de mortalidade acumulada (linha) para larvas de <i>Ae. albopictus</i> de 4° estágio, expostas agrupadas à concentração de 5,2 cerc./larva (=2,6 cerc./ml), ou não expostas (Testemunha).....	58
Figura 6 - Número de indivíduos vivos nas fases de desenvolvimento alcançado (colunas) e porcentagem de mortalidade acumulada (linha) para larvas de <i>Ae. aegypti</i> de 3° estágio, expostas agrupadas à concentração de 5,2 cerc./larva (=2,6 cerc./ml), ou não expostas (Testemunha).....	61
Figura 7 - Número de indivíduos vivos nas fases de desenvolvimento alcançado (colunas) e porcentagem de mortalidade acumulada (linha) para larvas de <i>Ae. aegypti</i> de 4° estágio, expostas agrupadas à concentração de 5,2 cerc./larva (=2,6 cerc./ml), ou não expostas (Testemunha).....	62
Figura 8 - Número de indivíduos vivos nas fases de desenvolvimento alcançado (colunas) e porcentagem de mortalidade acumulada (linha) para larvas de <i>Cx. quinquefasciatus</i> de 1° estágio, expostas agrupadas à concentração de 4,0 cerc./larva (=2,0 cerc./ml), ou não expostas (Testemunha).....	65

Figura 9 - Número de indivíduos vivos nas fases de desenvolvimento alcançado (colunas) e porcentagem de mortalidade acumulada (linha) para larvas de *Cx. quinquefasciatus* de 4º estágio, expostas agrupadas à concentração de 5,4 cerc./larva (=2,7 cerc./ml), ou não expostas (Testemunha)..... 66

Figura 10 - Larva de *Ae. albopictus* parasitada por X-LC, mostrando metacercárias encistadas. A - metacercárias encistadas nos segmentos abdominais e tórax. B - metacercária encistada no tórax..... 77

1. INTRODUÇÃO GERAL

Inúmeros parasitas causam doenças ao homem e aos animais de seu interesse. O planeta Terra abriga hoje 6 bilhões de seres humanos, que graças ao seu conhecimento e desenvolvimento já não sofrem mais controle populacional pelos seus predadores como nos tempos pré-históricos, mas sim por dois outros grandes fatores bióticos: a escassez de alimentos e as doenças. O recente livro de Laurie Garret, “A Próxima Peste” (1994 – Editora Nova Fronteira, Rio de Janeiro) trata em suas mais de 700 páginas das doenças humanas e as prováveis pandemias que sofreremos daqui em diante. E claro, entre as mais importantes, estão várias que são transmitidas por insetos que fazem o papel de vetores biológicos.

Entre os insetos de maior importância médica estão os mosquitos pertencentes à ordem Diptera (subordem Nematocera, família Culicidae). A família Culicidae tem aproximadamente 3000 espécies que possuem as seguintes designações populares no Brasil: carapanã na região Norte, muriçoca no Nordeste e pernilongo no Centro-Sul. Encontram-se entre outros na família Culicidae os gêneros: *Aedes* Meigen, 1818; *Anopheles* Meigen, 1818 e *Culex* Linnaeus, 1758 que são vetores de conhecidas doenças como febre amarela, dengue, malária, encefalites e filarioses. Estas doenças têm grande importância em praticamente todo o mundo, por causarem epidemias e elevado número de óbitos desde tempos muito antigos. Além desses insetos terem papel importante como vetores na transmissão de agentes infecciosos como vírus (nos casos de febre amarela, dengue e encefalites); protozoários (no caso de malária); e helmintos (causadores de filarioses); também podem causar enorme desconforto em de suas picadas, podendo ocorrer desde reações alérgicas devido à hipersensibilidade e até quadros mais graves inclusive com óbitos (PINHEIRO *et al.*, 1982).

A febre amarela é causada por um vírus da família Flaviviridae e transmitida por mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Haemagogus* Williston, 1876 e *Sabethes* Robineau-Desvoidy, 1827. No Brasil, o vetor da febre amarela urbana é o *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762, sendo o *Ae. albopictus* Skuse, 1894¹ um vetor em potencial (RAI, 1991). A forma silvestre da doença no Brasil, que tem como principal vetor o mosquito *Haemagogus janthinomys* (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; VASCONCELOS *et al.*, 1997), ainda está presente entre nós. Em fevereiro de 1999 ocorreu um caso de febre amarela silvestre em uma vila indígena no Estado do Mato

¹ gêneros abreviados de acordo com REINERT (1975) e FORATTINI (1996)

Grosso, sendo que não havia registro desta virose no Brasil desde novembro de 1998 (Internet: www.who.int/emc/outbreak-news/index.html, 17/03/99). Mais recentemente, no início do mês de janeiro de 2000, foram registrados pelo Centro Nacional de Epidemiologia três casos da doença da forma silvestre onde a contaminação se deu no Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, Alta Paraíso, no Estado de Goiás. Dois destes casos, ocorreram em pessoas residentes em Brasília (um caso fatal) e um caso em pessoa residente no Rio de Janeiro. (Internet: www.who.int/emc/outbreak-news/index.html, 14/01/00).

O agente etiológico da dengue é um *Flavivirus* que compreende quatro sorotipos imunologicamente distintos DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4, e a doença se manifesta sob as formas clássica e hemorrágica. Assim, as epidemias de dengue ocorridas em diferentes localidades do Brasil foram desencadeadas por diferentes sorotipos. Em Roraima foi o DEN-1 e DEN-4, no Rio de Janeiro e Alagoas o DEN-1 e DEN-2, no Ceará, Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, São Paulo e Mato Grosso do Sul o DEN-1 e em Tocantins o DEN-2 (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). No Brasil, *Ae. aegypti* é o vetor principal da dengue e o *Ae. albopictus* apesar de já ter sido incriminado como causador de uma epidemia em Campos Altos, MG (SERUFO *et al.*, 1993), pela falta de comprovação, é hoje considerado apenas como vetor em potencial (RAI, 1991). Os mosquitos das espécies *Ae. scutellaris hebrideus* e *Ae. scutellaris polynesiensis* também podem transmitir a dengue em outras regiões do mundo e devido principalmente ao fato de não haver uma vacina e serem os vetores de difícil controle, o número de casos desta doença vem crescendo a cada ano.

A malária é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* Marchiafava & Celli, 1885 e é transmitida por mosquitos do gênero *Anopheles*. No Brasil, destacam-se várias espécies como vetores da malária, sendo a principal *An. darlingi* Root, 1926. Como vetores em potencial encontram-se *An. aquasalis* Curry, 1932; *An. albitarsis* Lynch-Arribáizaga, 1878; *An. nuneztovari* Galbadon, 1940; *An. oswaldoi* Peryassú, 1922; *An. triannulatus* Neiva & Pinto, 1922; *An. strodei*; *An. evansai*; *An. cruzii* Dyar & Knab, 1908; *An. bellator* Dyar & Knab, 1906 e *An. homunculus* Komp, 1937. Outras várias espécies têm sido ainda incriminadas como vetores de menor importância (DEANE, 1986; ARRUDA *et al.*, 1986). Os registros desta doença no Brasil são muito antigos e vêm aumentando principalmente na região amazônica. Embora os números não sejam precisos devido à subnotificação, estão seguramente acima dos 500.000 casos anuais no Brasil e 300 milhões no mundo todo.

Entre as encefalites, algumas das mais importantes são as Equina do Oeste e do Leste, Saint Louis, Equina Venezuelana e Oropouche. Entre as espécies de culicídeos vetoras dos vírus das encefalites, estão *Ae. aegypti*; *Ae. albopictus*; *Ae. dorsalis*; *Ae. taeniorhynchus* Wiedemann, 1821; *Cx. pipiens* var. *pallens* Coquillett, 1898; *Cx. fatigans* Wiedemann, 1828; *An. neomaculipalpus* e *Mansonia titilans* Walker, 1848 (HARWOOD & JAMES, 1979; ESTRADA-FRANCO & CRAIG, 1995). Essas viroses podem ocorrer no ambiente silvestre tanto quanto nos grandes centros urbanos. Recentemente por exemplo ocorreu o registro da encefalite de Saint Louis pela primeira vez na cidade de Nova York, nos EUA com 48 casos confirmados em laboratório, destes três foram a óbito (Internet: www.who.int/emc/outbreak-news/index.html, 10/09/99).

Quanto às filariose, são estimados aproximadamente 9 milhões de pessoas parasitadas por *Wuchereria bancrofti* (Cobbold, 1877) nas Américas e 1 milhão por *Onchocerca volvulus* (Leuckart, 1893). Entre os mosquitos envolvidos como vetores de filariose por exemplo, *Cx. quinquefasciatus* se destaca na transmissão de *W. bancrofti*, tendo ainda como vetores secundários *An. darlingi*, *An. aquasalis*, *Ae. scapularis*, *Ma. titilans* e ocasionalmente outras espécies (CUPP *et al.*, 1994).

Para controlar essa enorme gama de mosquitos vetores em todo o mundo, a principal estratégia após a II Grande Guerra Mundial tem sido o emprego dos inseticidas químicos sintéticos. Esses inseticidas têm como princípios ativos organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides. Possuem algumas desvantagens como o fato de atingirem os insetos benéficos o que pode causar desequilíbrio biológico. Podem ainda causar toxicidade aos operadores e também ao longo do tempo podem induzir resistência nas espécies de mosquito. Estes fatores têm levado à procura de alternativas para o controle dos mosquitos vetores, tendo sido desenvolvidos inúmeros trabalhos envolvendo moléculas mais eficientes e seguras bem como o controle biológico, na forma de um manejo integrado com parasitas, predadores e patógenos de mosquitos (BROOKE & KING, 1977; AXTELL, 1979; TIETZE *et al.*, 1994 e ANDRADE, 1995).

De 1960 até meados da década de 70 houve um maior empenho das instituições de pesquisa em estudar agentes naturais biológicos de mortalidade de mosquitos, como consta na revisão de ROBERTS & STRAND (1977). Em 1980 novas relações de publicações sobre viroses, bacterioses, micoses, protozooses e helmintoses foram compilados pela Organização

Mundial da Saúde, para artrópodos de importância médica (ROBERTS & CASTILLO, 1980). Dentre todos os organismos estudados os agentes microbianos demonstraram grande potencial para o controle biológico, destacando-se as bactérias e os fungos. Os produtos à base das bactérias *Bacillus sphaericus* (B.s.) e *B. thuringiensis* var. *israelensis* (H-14) (B.t.i.) têm se constituído os patógenos mais utilizados para o controle destes dípteros aquáticos. Além de mosquitos, o uso contra simuliídeos é rotineiro nos Estados do Rio Grande do Sul e São Paulo em áreas onde estes já desenvolveram resistência ao organofosforado temephos (RUAS NETO *et al.*, 1984 e ANDRADE, 1989). Na cidade de Porto Velho, RO já vem sendo empregado um inseticida biológico à base de B.t.i. para o controle dos mosquitos vetores da malária (VILARINHOS *et al.*, 1998), levando atualmente a Fundação Nacional de Saúde (FNS) a considerar seu emprego de forma mais ampla no Brasil.

Diante da grande diversidade de ambientes aquáticos e mosquitos alvo no Brasil, é de grande importância a realização de estudos com outros agentes de controle biológico, que poderão ser mais viáveis que os inseticidas químicos, ou mesmo os inseticidas biológicos B.t.i. e B.sp. em determinadas situações. Segundo ANDRADE (1995) existem vários agentes biológicos que podem ser melhor explorados como os predadores copépodos, planárias, hidras, sangue-sugas, peixes, insetos aquáticos; os patógenos como vírus e fungos; ou parasitas como protozoários e fases evolutivas de trematódeos entre outros. Mais do que possíveis, alguns desses agentes são realmente promissores para o controle biológico de mosquitos vetores de importância à Saúde Pública, pois reproduzem-se nos mesmos habitats que os mosquitos e não causam impacto à fauna local, entre outras vantagens. Além dos mosquitos hospedeiros não desenvolverem resistência, o custo de produção e dispersão no ambiente pode ser baixo e a produção e aplicação poderia ter a participação das comunidades envolvidas.

Entre os predadores destacam-se como mais viáveis os copépodos, que são muito eficientes no controle de larvas de mosquito nos primeiros estádios. Segundo VASCONCELOS *et al.* (1992) *Mesocyclops longisetus* (Thiebaud) Dussart proporcionou controle de 80% de larvas de *Ae. aegypti* em recipientes usados para armazenamento de água na cidade de Fortaleza/CE. Enquanto que SANTOS (1997) obteve 97,3% de controle sobre larvas de *Ae. albopictus* em pneus-armadilha no campus da UNICAMP. MELO *et al.*, (1996) demonstraram que planárias da espécie *Dugesia tigrina*, quando introduzidas em pneus-

armadilha no campus da UNICAMP proporcionaram controle de 91,9% das larvas de *Ae. albopictus* que colonizaram naturalmente as armadilhas. Os peixes das espécies *Gambusia affinis* e *Poecilia reticulata* (Peters, 1895) também são eficientes predadores de larvas de mosquitos, porém seu uso para o controle de *Aedes* por exemplo, é limitado devido a seu tamanho em relação à maioria dos criadouros. Seriam no entanto adequados contra outras espécies de mosquitos em outros criadouros. Nos Estados Unidos por exemplo, LACEY & ORR (1994) utilizaram peixes em programas de controle integrado e comprovaram a eficiência de predação de *Gambusia affinis* contra larvas de culicídeos em campos de arroz irrigado.

Entre os patógenos eficientes para o controle de mosquitos estão os fungos como *Metarhizium anisopliae*, *Coelomomyces* spp., *Lagenidium giganteum* e *Culicinomyces clavisporus*. Quanto aos parasitas temos os protozoários como os microsporídeos e os nematódeos mermitídeos como *Romanomermis culicivorax* Ross & Smith, 1976 e *R. yengari* que são muito eficientes no controle de *Culex quinquefasciatus*. Esses últimos vem sendo produzidos e comercializados pelo IPK - Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri em Cuba (MIJARES & BROCHE, 1987).

O parasitismo por cercárias entomofílicas de trematódeos digenéticos é o enfoque principal do presente trabalho. Espécies dos gêneros *Prosthogonimus* Lühe, 1809 (Prosthogonimidae) ou *Plagiorchis* Lühe, 1809 (Plagiorchiidae), sempre utilizam mosquitos como 2º hospedeiro intermediário e por isso podem ser eficientes no controle de espécies de mosquitos de importância à Saúde Pública ou pecuária. Algumas espécies de *Haematoloechus* Loss, 1899 (Haematoloechidae) também podem utilizar larvas de mosquitos como 2º hospedeiro intermediário. O ciclo biológico de algumas espécies desses trematódeos foi estudado por diversos pesquisadores e uma sinopse pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1 - Relação de algumas espécies de trematódeos que podem utilizar larvas de mosquitos como hospedeiros e autores da descrição de seus ciclos biológicos.

Família	Espécie	Lugar	Referência
Prosthogonimidae	<i>Prosthogonimus ovatus</i> (Rud., 1803) Lühe, 1899	China	QIU & LIU (1984)
	<i>P. pellucidus</i> (Linstown, 1873)	China	QIU & LIU (1984)
Plagiorchiidae	<i>Plagiorchis vespertilionis parorchis</i> (Mueller, 1784)	Europa, Canadá	MACY (1960)
	<i>P. noblei</i> Park, 1936	Canadá	WILLIAMS (1964) DANIELL & ULMER (1964) BLANKESPOOR (1977)
	<i>P. elegans</i> (Rudolphi, 1802)	Rússia	BOCK (1984) BUSTA (1985)
	<i>P. maculosus</i> Schulz, 1932	Rússia	BOCK & JANSSEN (1987)
Haematoloechidae	<i>Haematoloechus medioplexus</i> Stafford, 1902	Canadá, EUA	KRULL (1930, 1931)
	<i>H. parviplexus</i> (Irwin, 1929)	EUA	KRULL (1930, 1931)
	<i>H. longiplexus</i> Stafford, 1902	EUA	KRULL (1932)
	<i>H. complexus</i> (Seely, 1906)	Canadá, EUA	KRULL (1933a)
	<i>H. similis</i> (Looss, 1899)	África	GRABDA (1960)
	<i>H. breviplexus</i> Stafford, 1902	Canadá	SCHELL (1965)
	<i>H. coloradensis</i> (Cort, 1915)	EUA	DRONEN (1975)
	<i>H. johnsoni</i> Bourgat, 1977	África	BOURGAT & KULO (1979)
<i>H. variegatus</i> (Rud., 1819)	Europa	VAN THEIL (1930) DOLLFUS <i>et al.</i> (1960)	

As espécies dos gêneros *Plagiorchis* e *Haematoloechus* foram revisadas por RICCI (1995) e KENNEDY (1981), respectivamente.

A fase adulta das espécies do gênero *Prosthogonimus* ocorre com grande frequência em aves. VATTANODORN *et al.* (1984) detectaram *Prosthogonimus* sp. em galinhas (*Gallus domesticus*), enquanto que FARIAS & CANARIS (1986) e ISLAM *et al.* (1988) estudaram *P. cuneatus* (Rudolphi, 1809) Braun, 1901 no trato gastrointestinal de patos das subespécies *Anas platyrhynchos diazi* e *A. platyrhynchos domesticus*, respectivamente.

O gênero *Plagiorchis* é mais diversificado quanto às classes de seus hospedeiros vertebrados, incluindo desde anfíbios e répteis, até pássaros e mamíferos (BAYSSADE-DUFOUR & GRABDA-KAZUBSKA, 1993). As espécies predominantemente ocorrem em mamíferos e algumas espécies em aves, pois são parasitas principalmente de animais homeotérmicos. LOWENBERGER & RAU (1993) utilizando meio artificial para excistamento MBEM à base de NaHCO₃, NaCl e sais biliares, demonstraram que metacercárias infectantes de *P. elegans* foram dependentes da temperatura, havendo um maior excistamento a 37°C.

MHAISEN *et al.* (1990) detectaram *P. elegans* em pássaros. BOCK & JANSSEN (1987) estudaram o ciclo de *P. maculosus* usando canário como hospedeiro definitivo em laboratório, no entanto a infecção em galinhas foi negativa.

Os trematódeos do gênero *Haematoloechus* são parasitas de anfíbios. Assim, SHIELDS (1987) detectou a presença de *H. longiplexus* em *Rana catesbeiana*, coincidindo com os estudos de KENNEDY (1981) que encontrou este parasita no mesmo anfíbio e em *R. clamitans*. DRONEN (1977) encontrou *H. breviplexus* e *H. coloradensis* parasitando os anfíbios *R. catesbeiana* e *R. pipiens*, respectivamente.

Os prostogonimídeos, plagiorquídeos e os hematolequídeos utilizam moluscos como primeiro hospedeiro intermediário, que se contaminam através da ingestão de seus ovos liberados juntamente com as fezes do hospedeiro definitivo. O primeiro hospedeiro intermediário, pode pertencer aos moluscos dos gêneros *Lymnaea*, *Stagnicola*, *Bithynia* e *Radix* (Lymnaeidae) (BLANKESPOOR, 1977; EKLUNATEY *et al.*, 1985; RAO *et al.*, 1985; MANGA-GONZALEZ *et al.*, 1994; TANG *et al.*, 1986; DEMPSTER *et al.*, 1986; WEBBER *et al.*, 1986 e JACOBS *et al.*, 1993).

Os moluscos infectados com *Plagiorchis elegans* apresentam o seu comportamento alterado. Em exposição à luz, quando a intensidade luminosa é reduzida, deslocam-se para cima da coluna d'água onde permanecem por 2 a 3 horas e nesse período se dá a emergência das cercárias (LOWENBERGER & RAU, 1994). Segundo WEBBER *et al.* (1986) a emergência de cercárias de *P. noblei* se dá em regime de escuro. O segundo hospedeiro intermediário é um inseto aquático que se infecta quando entra em contato com as xifidiocercárias. BUSTA & NASINCOVA (1986) demonstraram experimentalmente que o 2º hospedeiro intermediário de *P. neomidis* pode ser larvas de mosquitos como *Culex* sp.

(Culicidae) e *Dixa* sp. (Dixidae) ou ainda de borrachudos (Simuliidae). YODER & COGGINS (1998) observaram em laboratório que as cercárias de um plagiórquideo, provavelmente do gênero *Plagiorchis*, penetraram e encistaram em larvas de quironomídeo. VAN THEIL (1930) observou que xifidiocercárias de *H. variegatus* encistam em larvas de *An. maculipennis* (Culicidae) e DOLLFUS *et al.* (1960) registraram o parasitismo por cercárias dessa mesma espécie de trematódeo em *An. maculipennis* e *Culex* sp.

WEBBER *et al.* (1987a) observaram que o comportamento das espécies de mosquitos determinam sua susceptibilidade à infecção com cercárias de *P. noblei*. Os autores verificaram que em experimentos de laboratório, *Ae. aegypti* (Culicidae) foi significativamente mais susceptível à infecção com cercárias que larvas de *An. quadrimaculatus*, devido a grande atividade das larvas do primeiro na coluna d'água.

De acordo com DEMPSTER & RAU (1987), o tamanho do hospedeiro também influencia na infecção por cercárias, sendo que larvas de 4º estágio, por serem maiores adquirem mais cercárias. Estes mesmos autores indicaram adicionalmente que o comportamento alimentar também interfere no sucesso da penetração de cercárias e a distribuição de metacercárias no corpo do inseto hospedeiro.

JACOBS *et al.* (1993) estudaram em laboratório a prevalência e intensidade de infecção de cercárias de *P. noblei* em 4 espécies de borrachudo (Simuliidae), e concluíram que em todas as espécies ocorre variação da prevalência diretamente relacionada com o tempo de exposição das larvas às cercárias, aumentando a infecção em larvas expostas por maior período de tempo. A prevalência diminui com o aumento da velocidade da água e ao contrário do que ocorre nos mosquitos, aumenta em larvas pequenas. A prevalência e a intensidade de infecções experimentais em *Ae. aegypti* com *P. noblei* aumentam significativamente com o seu movimento na água onde as larvas estão expostas às cercárias (DEMPSTER & RAU, 1991). WEBBER *et al.* (1989) verificaram que larvas de *Ae. aegypti* deixadas dispersas são mais susceptíveis a infecção que larvas confinadas. Larvas de *Ae. aegypti* quando infectadas com metacercárias de *P. noblei* ficam menos ativas e permanecem mais tempo suspensas na superfície da água que larvas não infectadas. Esta característica comportamental faz com que fiquem mais susceptíveis à predadores e pode facilitar a transmissão de *P. noblei*, de acordo com WEBBER *et al.* (1987b). Segundo WEBBER *et al.* (1987c) as larvas infectadas com mais de três metacercárias ficam mais susceptíveis ao roedor *Microtus pennsylvanicus*, que ingere

as larvas acidentalmente na superfície da água juntamente com a vegetação. Este roedor atua como hospedeiro definitivo de *P. muris*. Segundo os autores ainda, a susceptibilidade não aumenta em relação a predação por peixes *P. reticulata* que se alimentam em toda a coluna d'água.

No decorrer do desenvolvimento, as metacercárias incorporam nutrientes diferencialmente, absorvidos do inseto hospedeiro (LOWENBERGER *et al.*, 1994). Assim, segundo DEMPSTER & RAU (1990) a mortalidade de imaturos de *Ae. aegypti* infectados experimentalmente com metacercárias de *P. noblei* é determinada pelo estágio de desenvolvimento do hospedeiro, pelo tempo e pela localização do parasita no corpo do inseto. DEMPSTER *et al.* (1986) verificaram que as metacercárias de *P. noblei* reduzem a pupação e conseqüentemente a emergência de adultos de *Ae. aegypti*. Nesse sentido, RAU *et al.* (1991) observaram sob condições de campo, que *Ae. provocans* quando exposto à cercárias de *P. noblei*, apresenta redução do número de pupas formadas devido ao controle sobre as larvas de 1° a 3° estádios. Larvas parasitadas com mais de duas metacercárias raramente sobrevivem. Morte de larvas de mosquitos devido ao número elevado de metacercárias de *Prosthogonimus* sp. foi também observado por RAO *et al.* (1985).

Alguns desses estudos, e principalmente aqueles desenvolvidos no Canadá pela equipe do Dr. RAU indicam fortes possibilidades de se utilizar xifidiocercárias como agente de controle biológico de mosquitos (e.g. RAO *et al.*, 1985; DEMPSTER *et al.*, 1986; WEBBER *et al.*, 1987a,b; RAU *et al.*, 1991; RAU, 1992 e ZAKIKHANI & RAU, 1999). Para se conhecer melhor estas cercárias é necessário primeiramente tentar infectar larvas de mosquitos criadas em laboratório com as xifidiocercárias desconhecidas, depois alimentar hospedeiros definitivos experimentais com estas larvas de mosquito infectadas com as metacercárias (Dr. MANFRED RAU, McGill University, Canadá, COMUNICAÇÃO PESSOAL). No Brasil, pouco se conhece sequer sobre a ocorrência dessas cercárias, e a possibilidade de sua utilização poderia ser de grande valia para programas locais de controle.

1.1. OBJETIVOS

- Levantamento de cercárias em corpos de água doce na região da cidade de Campinas e nos municípios de Miracatu e Registro, situados no Vale do Ribeira, Estado de São Paulo.
- Identificação e caracterização morfológica das cercárias em estudos de microscopia óptica.
- Determinação da susceptibilidade de larvas de *Aedes albopictus*, *Ae. aegypti* e *Culex quinquefasciatus* a xifidiocercárias pertencentes às famílias Plagiorchiidae, Prosthogonimidae ou Haematoloechidae através de exposições experimentais em laboratório.
- Infecções experimentais em supostos hospedeiros definitivos do trematódeo em estudo.

2. AVALIAÇÃO DO PARASITISMO POR XIFIDIOCERCÁRIAS (TREMATODA) EM MOLUSCOS DE ÁGUA DOCE DE ALGUMAS LOCALIDADES DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL.

2.1. INTRODUÇÃO

Algumas espécies de moluscos da ordem Basommatophora exercem o papel de hospedeiros intermediários de fases imaturas de trematódeos digenéticos de importância médico-veterinária e portanto sócio-econômica. As famílias dessa ordem que ocorrem no Brasil são: Planorbidae, Lymnaeidae, Physidae, Ancyliidae e Chilinidae, sendo que as duas primeiras são as mais importantes do ponto de vista epidemiológico, pois nelas encontram-se gêneros hospedeiros intermediários de helmintos parasitas do homem e de animais domésticos (LEME, 1995).

Na família Planorbidae encontra-se o gênero *Biomphalaria* que possui espécies como *B. glabrata* (Say, 1818), *B. tenagophila* (Orbigny, 1835) e *B. straminea* (Dunker, 1848) que são hospedeiras de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 (Trematoda, Schistosomatidae), parasita do sistema sanguíneo humano e de outros animais e causador da esquistossomose. Outras espécies ainda, como *B. peregrina* (Orbigny, 1835) e *B. amazonica* Paraense, 1966 são também importantes por serem consideradas hospedeiras em potencial deste trematódeo no Brasil (PARAENSE, 1973; CORRÊA & PARAENSE, 1971; PARAENSE & CORRÊA, 1985). A esquistossomose é a segunda doença tropical humana mais importante, sendo a primeira a malária. Estima-se que existem aproximadamente 200 milhões de pessoas infectadas em várias regiões do mundo. Espécies do gênero *Biomphalaria* albergam também outros trematódeos, entre eles *Echinostoma* spp. Rud., 1809 (Echinostomatidae), e os pertencentes à família Plagiorchiidae, além de cercárias do tipo furcocercárias *caratinguensis*.

Espécies do gênero *Lymnaea* (Lymnaeidae) são hospedeiras intermediárias de vários trematódeos. Um deles, a *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Fasciolidae) é o mais importante por ser parasita do fígado e ductos biliares de ovinos, bovinos, equinos, caprinos, suínos, cães e acidentalmente humanos nas áreas endêmicas. A fasciolose tem importância veterinária e econômica por causar morte de animais jovens e diminuição da produção de leite, além de

tornar os produtos contaminados inadequados para o consumo humano (MUIRSON, 1997). Além de *F. hepatica*, os limneídeos podem albergar helmintos parasitas de mamíferos silvestres, aves, répteis e anfíbios como, por exemplo *Echinostoma* spp. (Echinostomatidae), *Paramphistomum* spp. Fischöeder, 1901 (Paramphistomidae), *Haplometra* spp. Loss, 1899 (Plagiorchiidae), *Prosthogonimus* spp. Lühe, 1899 (Prosthogonimidae), *Plagiorchis* spp. Lühe, 1899 (Plagiorchiidae) e *Haematoloechus* spp. Loss, 1899 (Haematoloechidae).

As espécies da família Physidae não têm importância como hospedeiras intermediárias de helmintos parasitas humanos no Brasil. Nos EUA no entanto, SNYDER & ESCH (1993) detectaram indivíduos da espécie *Physa girina* parasitados pelos trematódeos *Halipegus eccentricus*, *Haematoloechus complexus* (Seely, 1906), *Glythelmins quieta* (Stafford, 1900), *Echinostoma trivolvis*, *Megalodiscus temperatus* (Stafford, 1905) e por exemplares da família Strigeidae na Carolina do Norte.

Os moluscos pertencentes à família Chilinae que no Brasil ocorrem somente no Sul do país (PARAENSE, 1981) são importantes em outros países, como Chile, Argentina, Uruguai e Peru. Na Argentina, foram encontradas espécies do gênero *Chilina* parasitadas por trematódeos das famílias Notocotyliidae, Echinostomidae, Hemiuroidea, Schistosomatidae, Diplostomidae, Strigeidae e Plagiorchiidae, na Patagônia (QUAGGIOTTO & VALVERDE, 1995). Segundo esses autores, alguns desses trematódeos (Echinostomidae, Diplostomidae) podem utilizar peixes como segundo hospedeiro intermediário ou ainda como hospedeiro definitivo (Hemiuroidea).

O presente estudo teve por objetivo avaliar moluscos da ordem Basommatophora, principalmente os pertencentes ao gênero *Lymnaea*, quanto ao parasitismo por trematódeos, com ênfase especial às cercárias pertencentes às famílias Prosthogonimidae, Plagiorchiidae e Haematoloechidae, por utilizarem insetos aquáticos como segundo hospedeiro intermediário. Este estudo, compõe um projeto maior que visa avaliar o parasitismo destas cercárias sobre larvas de culicídeos.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento deste estudo iniciou-se com a realização de coletas de moluscos em corpos de água doce em cidades da região de Campinas e nos municípios de Registro e

Miracatu, no Vale do Ribeira, Estado de São Paulo. As coletas foram mensais no período abril de 1996 a fevereiro de 1999. A Tabela 1 apresenta a localização dos criadouros onde os moluscos foram coletados.

Tabela 1 - Relação e identificação dos locais de coleta de moluscos.

Municípios do Estado de São Paulo	Local	Tipo de criadouro	Sigla da Localidade
Americana	Fazenda Saltinho (braço da represa de Americana)	Represa	SALT
Campinas	UNICAMP (atrás da Fac. Ed. Física)	Lagoa	UNI-I
Campinas	UNICAMP (Editora)	Lagoa	UNI-II
Campinas	Parque Portugal (Recinto das Emas)	Lagoa	TAQU
Campinas	Faz. Sta. Elisa/IAC (Monjolinho)	Lagoa	ELISA
Campinas	Jd. Satélite Íris	Tanques artificiais de criação de peixes	ÍRIS
Campinas	Jd. Santa Rosa	Lagoa	ROSA
Jaguariúna	Hotel Fazenda Duas Marias	Lagoa	JAG
Louveira	Chácara Bandeirantes	Tanques artificiais de criação de peixes	LOUV
Miracatu	Fazenda Bananal	Pasto que normalmente alaga com valas laterais	MIR
Paulínia	Parque Ecológico "Zeca Malavazzi"	Lagoa	PAUL
Piracicaba	ESALQ/USP (Depto. de Genética)	Valas de drenagem em campos de arroz	ESALQ
Pirassununga	CEPTA/IBAMA	Tanques artificiais de criação de peixes	CEPTA
Registro	Fazenda Dr. Valter Ramos	Lagoa	REG
Registro	Fazenda Barra do Capinzal	Tanque artificial de criação de peixes	CAP

UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas, IAC - Instituto Agronômico de Campinas, USP - Universidade de São Paulo, ESALQ - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", CEPTA - Centro de Pesquisa de Peixes Tropicais, IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente

Durante as coletas foram registradas as condições físico-químicas dos criadouros, tais como temperatura do ar e da água, pH e condições químicas da água. As temperaturas do ar e da água foram tomadas com termômetro de mercúrio e o pH foi medido com fita Merck código 9535. As condições químicas da água em relação ao teor de Ferro, Sulfito, Alcalinidade, Cloreto e Dureza (CaCO_3) foram medidos utilizando-se o Kit modelo Q 403B, marca Quimis. Durante as coletas foram feitas observações também em relação a presença de insetos aquáticos, aves, anfíbios, peixes, répteis e de vegetações aquática e marginal nos criadouros, pois alguns destes animais podem servir de hospedeiros intermediários ou definitivos de trematódeos. Já a vegetação, oferece proteção aos moluscos contra radiação solar, altas temperaturas e correntezas, além de servir de alimento e como substrato para locomoção e oviposição.

As coletas foram realizadas manualmente utilizando-se conchas e pinças de bambú, sendo posteriormente os moluscos levados ao laboratório, quantificados e separados de acordo com o gênero. Em seguida, os mesmos foram expostos à luz para serem avaliados quanto a infecção através de eliminação de cercárias ou quanto a presença de formas imaturas por compressão entre duas placas de vidro. A exposição à luz foi realizada usando-se lâmpada incandescente de 60W, por um período médio de uma hora. Os moluscos foram colocados em frascos e expostos à luz primeiramente em pequenos grupos e depois os indivíduos pertencentes aos frascos positivos para cercárias, foram expostos individualizados, semanalmente, por um período de 30 dias. Os que persistiram sem eliminar cercárias foram esmagados entre duas placas de vidro, para serem examinados quanto a infecção. Os exemplares que eliminaram xifidiocercárias, foram esmagados para observação de esporocistos e/ou rédias, após um mês da exposição ou após a morte (quando esta ocorreu antes do trigésimo dia). Neste período, os moluscos foram mantidos em recipientes de vidro medindo 19 cm de diâmetro por 12 cm de altura, com 2 litros de água de torneira decolorada, sendo alimentados com alface fresca oferecida diariamente.

As cercárias eliminadas foram observadas a fresco (vivas), entre lâmina e lamínula, após coloração com vermelho neutro a 5%. Foram também observadas utilizando-se coloração com lugol fraco. Após a observação, as xifidiocercárias foram fotografadas e desenhadas em câmara

clara para posterior medição. As xifidiocercárias foram mortas em água a 85°C e fixadas em Bles para posterior coloração e observação mais detalhada da morfologia.

No presente trabalho, foram utilizadas as terminologias X-LC para as xifidiocercárias eliminadas por *Lymnaea columella* e ainda X-DL e X-BT para as eliminadas respectivamente por *Drepanotrema lucidum* e *Biomphalaria tenagophila*.

As espécies de moluscos coletadas foram identificadas por Maria Angélica C. R. Guitti, do Departamento de Parasitologia, Instituto de Biologia, UNICAMP. Já as larvas de culicídeos provenientes de Miracatu, foram identificadas por Aristides Fernandes do Laboratório de Culicidologia, Faculdade de Saúde Pública, USP.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de abril de 1996 a fevereiro de 1999 foram coletados 9290 moluscos de sete espécies, sendo cinco pertencentes à família Planorbidae, uma espécie pertencente à família Lymnaeidae e uma à família Physidae (Tabela 2).

Tabela 2 – Número de moluscos coletados no período de abril de 1996 a fevereiro de 1999, nas quinze localidades do Estado de São Paulo.

Espécies	n° de moluscos
<i>Lymnaea columella</i> Say, 1817 (Basom., Lymnaeidae)	5137
<i>Physa marmorata</i> Guilding, 1828 (Basom., Physidae)	1735
<i>Biomphalaria</i> sp. (Basom., Planorbidae)	1647
<i>Biomphalaria tenagophila</i> (Orbigny, 1835) (Basom., Planorbidae)	442
<i>Drepanotrema</i> sp. (Basom., Planorbidae)	257
<i>Drepanotrema cimex</i> (Moricand, 1839) (Basom., Planorbidae)	31
<i>Drepanotrema lucidum</i> (Pfeiffer, 1839) (Basom., Planorbidae)	41
Total	9290

O maior número de moluscos coletados foi de *L. columella* porque as coletas foram direcionadas a esta espécie, pelo motivo da mesma ser indicada como hospedeira frequente de trematódeos das famílias Plagiorchiidae, Prosthogonimidae e Haematoloechidae. Assim, todos os exemplares de *L. columella* encontrados nos criadouros foram coletados, enquanto das outras espécies foram tomadas apenas amostras.

Em todos os criadouros havia vegetações aquática e marginal, além da presença de aves silvestres. Em Miracatu, SP também foi observado a presença de bovinos, anfíbios, peixes e larvas de mosquito pertencentes a família Culicidae [*Culex* (Cx.) *coronator* Dyar e Knab, 1906, Cx. (Cx.) *declarator* Dyar e Knab, 1906, Cx. (Cx.) *lygrus* Root, 1927 e *Aedes* (Och.) *scapularis* (Rondani, 1848)]. Estas espécies de mosquito foram encontradas na mesma coleção de água onde estavam presentes exemplares de *L. columella* em pegadas de bovinos, no pasto onde foram realizadas as coletas. As larvas de mosquito coletadas foram avaliadas em relação ao parasitismo natural por trematódeos, nematódeos e microsporídeos, porém mostraram-se não infectadas.

A Tabela 3 apresenta o resultado da análise físico-química da água dos criadouros que mostraram as seguintes variações: pH (5 a 8,2), teor de ferro (0,5 a 3 mg/l), sulfito (6,4 a 100 mg/l), alcalinidade (19 a 82 mg/l), cloreto (8 a 94 mg/l) e dureza (18 a 225 mg/l).

Na localidade MIR a variação de Fe foi a maior encontrada (0,5 a 3 mg/l), enquanto que nas outras localidades esta variação foi menor (0,5 a 1 mg/l) e na localidade PAUL foi encontrado 2 mg/l de Fe. Também na localidade MIR encontrou-se o maior teor de dureza (225 mg/l). O valor máximo encontrado para sulfito foi de 100 mg/l e foi obtido nas localidades ELISA, ESALQ, JAG e LOUV. A maior alcalinidade (82 mg/l) foi obtida na localidade ESALQ e cloreto de 94 mg/l na localidade ÍRIS.

Tabela 3 – Relação dos valores mínimos e máximos das características físico-químicas da água dos criadouros (temperaturas do ar e da água, pH, Ferro, Sulfito, Alcalinidade, Cloreto e Dureza), referentes às coletas realizadas no período de abril de 1996 a fevereiro de 1999, nas diversas localidades do Estado de São Paulo.

Localidade (Sigla)	Temperatura (°C)		pH	Propriedades químicas (mg/l)				
	ar	água		Fe	Sulf.	Alcal.	Clor.	Dur.
CAP	26 - 29	24 - 30	5,5 - 6,0	1	30 - 33	30 - 80	15 - 25	51 - 90
CEPTA	23	26	6,0	1	6	20	8	30
ELISA	26	25	6,0	1	100	67	81	42
ESALQ	25 - 28	24 - 26	5,5	1	92 - 100	63 - 82	76 - 85	33 - 45
ÍRIS	29 - 30	26 - 28	5,5 - 6,0	0,5 - 1	10 - 40	22 - 59	80 - 94	22 - 30
JAG	29 - 31	26 - 30	5,5 - 6,0	1	98 - 100	59 - 68	79 - 80	39 - 43
LOUV	21,5 - 28	17 - 27	5,5 - 8,2	0,5 - 1	44 - 100	22 - 74	55 - 90	33 - 46
MIR	20 - 36	18 - 30	5,0 - 6,0	0,5 - 3	12 - 33	29 - 79	11 - 34	51 - 225
PAUL	26	23	5,0	2	95	60	82	39
REG	26 - 30	25 - 31	5,5 - 6,0	1	60 - 80	23 - 51	53 - 73	18 - 30
ROSA	24	16	7,0	1	98	60	90	38
SALT	25	26	6,0	1	29	40	12	55
TAQU	24 - 28	22 - 25	6,0 - 6,5	1	86 - 97	39 - 65	62 - 78	29 - 36
UNI-I	27 - 29	24 - 26	5,5 - 6,0	1	97 - 98	40 - 74	87 - 88	37 - 42
UNI-II	17	16	6,0	1	99	60	90	39

CAP - Registro; CEPTA - Pirassununga; ELISA - Campinas; ESALQ - Piracicaba; ÍRIS - Campinas; JAG - Jaguariúna; LOUV - Louveira; MIR - Miracatu; PAUL - Paulínia; REG - Registro; ROSA - Campinas; SALT - Americana; TAQU - Campinas; UNI-I - Campinas; UNI-II - Campinas.

As espécies coletadas demonstraram ter capacidade para colonizar coleções de água com grandes diferenças em suas características físico-químicas.

Segundo HYMAN (1967) moluscos pulmonados aquáticos em águas com pH igual ou menor que 6,0 são raros ou ausentes. Porém, neste estudo as espécies foram bem tolerantes as variações de pH, ocorrendo de 5,0 (muito ácido) até 8,2 (alcalino).

Em três coletas na localidade MIR encontrou-se um pH muito ácido (5,0). *L. columella* demonstrou ser mais tolerante ao pH ácido que as outras espécies, sendo que em uma destas coletas apenas um pequeno número de limnéias foi encontrado.

Na localidade SALT registrou-se um pH ácido de 6,0 e na localidade TAQU o pH máximo foi de 6,5, enquanto que UETA (1976) registrou nas mesmas localidades pH de 6,5 e 7,3, respectivamente.

O maior pH registrado foi de 8,2 na localidade LOUV onde nesta oportunidade foram encontradas mais *Physa*, seguidas por *Lymnaea* e poucas *Biomphalaria*. KRULL (1933b) verificou a tolerância de *L. columella* à variação do pH e em laboratório comprovou a capacidade destas sobreviverem em águas ácidas. Segundo MALEK (1958) o pH raramente é um fator limitante na distribuição de moluscos mas pode no entanto ter esse efeito quando associado a outros fatores.

WILLIAMS (1970) estudou a distribuição e densidade de moluscos aquáticos na Rodésia em relação ao teor de bicarbonato de cálcio na água. De acordo com a concentração de cálcio e bicarbonato ele classificou os pontos de estudo da seguinte forma:

água mole – menos de 5 mg/l de Ca e menos que 20 mg/l de bicarbonato em CaCO_3 .

água média – 5 a 40 mg/l Ca e 20 a 200 mg/l de bicarbonato em CaCO_3 .

Água dura – acima de 40 mg/l de Ca e acima de 200 mg/l de bicarbonato em CaCO_3 .

De acordo com a classificação de WILLIAMS (1970) a água de todos os criadouros observados neste estudo foram do tipo água média com valores variando de 19 a 82 mg/l de CaCO_3 . *L. columella* ocorreu em todas as faixas de água média e em maior quantidade em águas com alcalinidade entre 20 a 42 mg/l. WILLIAMS (1970) encontrou *B. pfeifferi* em águas médias e duras e esta espécie foi menos tolerante a água mole. UETA (1976) registrou a presença de *L. columella* em criadouros do tipo água mole e água média, havendo predominância para o tipo água média.

Segundo MALEK (1958) o conteúdo de cálcio na água poderia ser tomado como medida de dureza, para fins práticos, uma vez que os sais de cálcio juntamente com os de magnésio são os principais responsáveis pela dureza da água.

Em relação à dureza encontrou-se neste estudo valores muito variáveis e as espécies toleraram bem estas variações. Segundo UETA (1976) a dureza da água parece estar relacionada com a resistência das conchas dos moluscos.

De acordo com WILLIAMS (1970) os fosfatos influenciam no crescimento de algas que constituem parte da dieta alimentar dos moluscos. Para este mesmo autor sulfitos e cloretos em baixas concentrações tem efeito limitante à ocorrência dos moluscos. No presente estudo no entanto, moluscos ocorreram nas faixas de 6,4 a 100 e 8 a 94 mg/l de sulfito e cloreto, respectivamente.

Quanto a quantidade de íons ferro, na localidade MIR ocorreu a maior concentração apresentando um valor de 3,0 mg/l e nesta ocasião observou-se que *L. columella* foi mais tolerante que as outras espécies.

HARRY *et al.* (1957); POINTIER *et al.* (1977) e REY & PESSOA (1953) encontraram valores também de certa forma discrepantes em relação a alguns fatores químicos da água como alcalinidade de 415 mg/l, ou 5,4 mg/l de ferro e 3500 mg/l de cloreto em habitats colonizados por *Biomphalaria glabrata*. Apesar da composição química da água dos criadouros em estudo apresentarem valores variáveis nas mesmas localidades em coletas distintas, acredita-se que a intolerância a variações físico-químicas da água não deva ter sido motivo para algumas espécies de molusco não estarem presentes ou abundantes nos criadouros em determinadas épocas. Mais provavelmente, o padrão encontrado poderia estar sendo definido por fatores bióticos, tais como a competição entre as espécies por recursos ou ainda pela própria capacidade de dispersão. As alterações das características físico-químicas observadas em Miracatu, como por exemplo as variações de ferro de 0,5 a 3 mg/l e dureza de 51 a 225 mg/l podem ser atribuídas à influência humana e interferências pluviométricas que ocasionam a mistura de fezes do gado na água dos criadouros.

Os resultados da exposição dos moluscos à luz para pesquisa de cercárias estão expressos na Tabela 4 e na Tabela 5 pode ser observada a prevalência mensal (incidência) do parasitismo na localidade MIR.

Tabela 4 – Dados referentes ao número de moluscos coletados nas diversas localidades do Estado de São Paulo, no período de setembro de 1996 a fevereiro de 1999 e à eliminação de cercárias quando expostos à luz incandescente de 60W, por um período médio de 1 hora.

Moluscos positivos à cercárias e total coletado	Sigla das Localidades													
	CAP	CEPTA	ELISA	ESALQ	ÍRIS	JAG	LOUV	PAUL	REG	ROSA	SALT	TAQU	UNI-I	UNI-II
n° de coletas	2	1	1	3	2	2	9	1	2	1	1	2	2	1
<i>Biomphalaria</i> spp.														
Furco.							1			1				
Total coletado	12	122	2	59	481	0	681	0	4	13	2	43	0	5
<i>P. marmorata</i>														
Cerc.														
Total coletado	11	1	49	95	61	0	779	3	69	115	3	32	43	0
<i>L. columella</i>														
Furco.														
Echin.										1			1	
Total coletado	712	563	0	137	48	96	898	0	214	66	0	79	66	5
<i>Drepanotrema</i> spp.														
Cerc.														
Total coletado	0	0	0	0	0	17	0	0	0	0	0	1	0	0

CAP - Registro; CEPTA - Pirassununga; ELISA - Campinas; ESALQ - Piracicaba; ÍRIS - Campinas; JAG - Jaguariúna; LOUV - Louveira; PAUL - Paulínia; REG - Registro; ROSA - Campinas; SALT - Americana; TAQU - Campinas; UNI-I - Campinas; UNI-II - Campinas, Furco. - furcocercárias; Cerc. - cercárias; Echin. - cercárias de equinostomatídeos.

Tabela 5 – Incidência mensal do parasitismo no município de Miracatu, SP (MIR), no período de setembro de 1996 a fevereiro de 1999.

Meses de coleta	Espécies	Total coletado	% de positividade para o parasitismo									
			Fur	Fur c/ + s/ oculo	X-LC	X-DL / X-BT	Fh	Ech	X-BT + Ech	X-LC + Fh	X-LC + rédias	X-LC + Ech
Set/96	<i>Biomphalaria</i> spp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>P. marmorata</i>	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>L. columella</i>	45	0	0	4,4	0	0	0	0	0	4,4	0
	<i>Drepanotrema</i> spp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Out/96	<i>Biomphalaria</i> spp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>P. marmorata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>L. columella</i>	24	0	0	8,3	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Drepanotrema</i> spp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ago/97	<i>Biomphalaria</i> spp.	86	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>P. marmorata</i>	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>L. columella</i>	62	0	0	0	0	0	0	0	0	3,2	0
	<i>Drepanotrema</i> spp.	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Out/97	<i>Biomphalaria</i> spp.	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>P. marmorata</i>	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>L. columella</i>	330	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Drepanotrema</i> spp.	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dez/97	<i>Biomphalaria</i> spp.	80	0	3,8	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>P. marmorata</i>	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>L. columella</i>	101	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Drepanotrema</i> spp.	71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Jan/98	<i>Biomphalaria</i> spp.	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>P. marmorata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>L. columella</i>	27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Drepanotrema</i> spp.	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ago/98	<i>Biomphalaria</i> spp.	62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>P. marmorata</i>	166	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>L. columella</i>	164	0	0	0	0	0	0	0	0	1,2	0
	<i>Drepanotrema</i> spp.	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Set/98	<i>Biomphalaria</i> spp.	208	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>P. marmorata</i>	175	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>L. columella</i>	252	0	0	0,4	0	0,8	0	0	0	0	0
	<i>Drepanotrema</i> spp.	108	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Out/98	<i>Biomphalaria</i> spp.	47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>P. marmorata</i>	64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>L. columella</i>	413	0	0	0	0	1,0	0	0	0	0	0
	<i>Drepanotrema</i> spp.	33	0	0	0	3,0*	0	0	0	0	0	0

Fur – furcocercárias; Fur c/ + s/ oculo – infecção dupla por furcocercárias com oculo e furcocercárias sem oculo; X-LC – xifidocercárias eliminadas por *L. columella*; X-DL e X-BT – xifidocercárias eliminadas por *D. lucidum* e *B. tenagophila*; Fh – cercária de *F. hepatica*; Ech – cercária de equinostomatídeo; X-BT + Ech – infecção dupla por xifidocercárias eliminadas por X-BT e cercárias de equinostomatídeo; X-LC + Fh – infecção dupla por xifidocercárias eliminadas por *L. columella* e cercárias de *F. hepatica*; X-LC + rédias - infecção dupla por xifidocercárias eliminadas por *L. columella* e rédias; X-LC + Ech - infecção dupla por xifidocercárias eliminadas por *L. columella* e cercárias de equinostomatídeo

Continuação da Tabela 05

Meses de coleta	Espécies	Total coletado	% de positividade para o parasitismo									
			Fur	Fur c/ + s/ ocelo	X-LC	X-DL / X-BT	Fh	Ech	X-BT + Ech	X-LC + Fh	X-LC + rédias	X-LC + Ech
Nov/98	<i>Biomphalaria</i> spp.	59	0	0	0	13,6	0	0	0	0	0	0
	<i>P. marmorata</i>	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>L. columella</i>	655	0	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0
	<i>Drepanotrema</i> spp.	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dez/98	<i>Biomphalaria</i> spp.	66	1,5	0	0	1,5	0	0	0	0	0	0
	<i>P. marmorata</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>L. columella</i>	180	0	0	2,2	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Drepanotrema</i> spp.	36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Jan/99	<i>Biomphalaria</i> spp.	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>P. marmorata</i>	44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>L. columella</i>	113	0	0	0	0	0,9	0	0	0	0	0
	<i>Drepanotrema</i> spp.	58	1,7*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fev/99	<i>Biomphalaria</i> spp.	141	0	0	0	15,6	0	14,1	4,3	0	0	0
	<i>P. marmorata</i>	45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>L. columella</i>	60	0	0	0	0	0	3,3	0	0	0	1,7
	<i>Drepanotrema</i> spp.	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fur – furcocercárias; Fur c/ + s/ ocelo – infecção dupla por furcocercárias com ocelo e furcocercárias sem ocelo; X-LC – xifidiocercárias eliminadas por *L. columella*; X-DL e X-BT – xifidiocercárias eliminadas por *D. lucidum* e *B. tenagophila*; Fh – cercária de *F. hepatica*; Ech – cercária de equinostomatídeo; X-BT + Ech – infecção dupla por xifidiocercárias eliminadas por X-BT e cercárias de equinostomatídeo; X-LC + Fh – infecção dupla por xifidiocercárias eliminadas por *L. columella* e cercárias de *F. hepatica*; X-LC + rédias - infecção dupla por xifidiocercárias eliminadas por *L. columella* e rédias; X-LC + Ech - infecção dupla por xifidiocercárias eliminadas por *L. columella* e cercárias de equinostomatídeo

Como pode ser observado na Tabela 4, foram encontrados moluscos parasitados por cercárias as quais foi possível identificar como sendo de *Fasciola hepatica* pela sua morfologia. Com relação as demais cercárias, foi possível identificar duas famílias: Echinostomatidae e Haematoloechidae (xifidiocercárias) e um tipo morfológico (furocercária).

Quanto a morfologia das xifidiocercárias, duas variações foram encontradas. A primeira (X-LC) eliminadas por *L. columella*, foram identificadas como xifidiocercárias com uma membrana terminal na cauda. A segunda variação encontrada parasitando *D. lucidum* e *B. tenagophila* (X-DL/X-BT) possuíam o corpo muito semelhante às eliminadas por *L. columella*, porém, a cauda não apresentava a membrana terminal. Tanto as xifidiocercárias eliminadas por limneídeos como as de planorbídeos, originaram-se de esporocistos. Baseando-se em estudos

* Duas espécies de *Drepanotrema* foram coletadas, *D. lucidum* e *D. cimex*, porém a eliminação de cercárias ocorreu apenas por *D. lucidum*.

morfológicos, as xifidiocercárias obtidas foram classificadas como pertencentes a subordem Plagiorchiata. Comparando-se as X-LC com as estudadas por KRULL (1930, 1931, 1932, 1933a e 1934), DOLLFUS *et al.* (1960), DRONEN (1975) e BOURGAT & KULO (1979), as semelhanças observadas, fornecem indícios de que as mesmas possam pertencer ao gênero *Haematoloechus*.

Em uma das coletas realizadas em Louveira, SP (LOUV – 27/05/96) foi encontrado um exemplar do gênero *Biomphalaria* eliminando furcocercárias do tipo “caratinguensis” representando 1,9% de parasitismo, sem ocelo e com faringe bem visível ao microscópio óptico, provavelmente originárias de esporocisto. Após a morte do exemplar positivo, o mesmo foi comprimido entre duas placas de vidro e detectou-se um esporocisto ramificado (filetes) e dentro do mesmo foi encontrada uma metacercária.

Nas coletas realizadas em Campinas, SP, na localidade UNI-I um exemplar de *L. columella* estava positivo à infecção eliminando furcocercárias (prevalência de 2,3%). Enquanto que na localidade ROSA, um molusco do gênero *Biomphalaria* e outro *L. columella* estavam positivos à infecção eliminando furcocercárias, representando 7,6% de moluscos parasitados por este tipo de cercária. Também houve 1,5% de parasitismo por cercária com duas ventosas e colar de espinhos pertencente à família Echinostomatidae.

Exemplares da espécie *L. columella* coletados em Miracatu, SP (MIR) apresentaram uma prevalência a X-LC que variou de 0,4 a 8,3%, já para *F. hepatica* esta variação foi de 0,2 a 1,0 e 3,3% a cercárias de equinostomatídeos (Fig. 1). O parasitismo por X-LC em *L. columella* foi observado principalmente nos meses de agosto e setembro, ocorrendo também em outubro, dezembro e fevereiro, sendo que a maior ocorrência de parasitismo por X-LC foi obtida no mês de setembro/96. Observou-se que a variação da prevalência esteve relacionada com as precipitações, pois nos meses de verão quando aumentava o índice pluviométrico ocorria inundação dos criadouros ocasionando o deslocamento de grande número de moluscos para outros locais. O ciclo de vida do molusco hospedeiro também pode ter influenciado o parasitismo, pois enquanto em uma coleta havia um grande número de adultos de *L. columella* por exemplo, já no mês seguinte somente jovens eram encontrados. Isso fez com que ocorresse provavelmente uma diluição na prevalência dos trematódeos. Fenômeno similar foi observado

por YODER & COGGINS (1998) onde a prevalência de plágiorquídeos diminuiu com a mortalidade de adultos de *L. stagnalis* e com aumento de moluscos jovens não infectados.

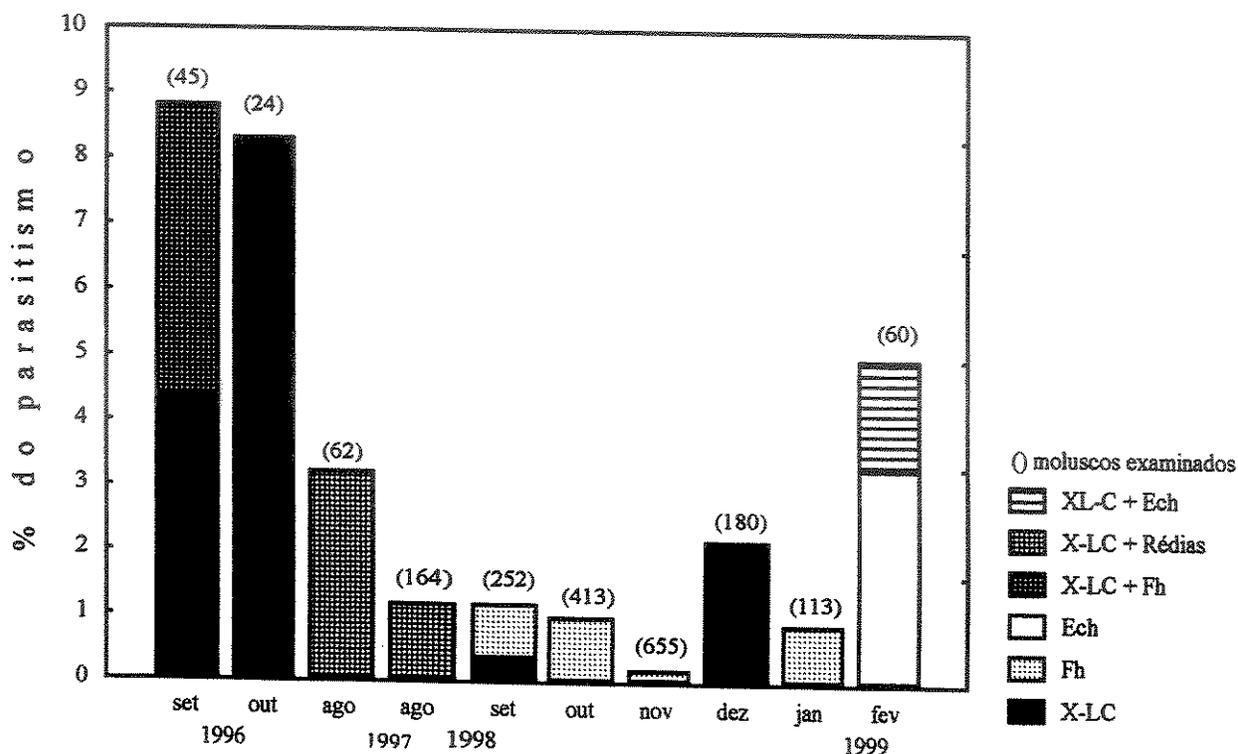


Figura 1 - Prevalência (%) de trematódeos parasitando *Lymnaea columella* em pasto de criação de bovinos em Miracatu, SP, entre setembro de 1996 a fevereiro de 1999.

Infecções duplas por X-LC e cercárias de equinostomatídeo ocorreram em um molusco representando 1,7% de parasitismo e de X-LC e rédias (não foi possível a confirmação do trematódeo) em quatro moluscos que variou entre 1,2 a 3,2% de parasitismo. Outros dois moluscos estavam duplamente infectados com cercárias de *F. hepatica* e X-LC em formação, o que representou 4,4%. Após dissecação de 15 exemplares de *L. columella* foi detectada a presença de vários *Chaetogaster* (Nematoda) além de outro nematódeo não identificado. *B. tenagophila* desta localidade apresentaram uma prevalência que variou de 1,5 a 15,6% à X-BT, 14,1% à cercárias de equinostomatídeo e 1,5% de parasitismo por furcocercárias (Fig.2). O parasitismo por X-BT em moluscos planorbídeos foi observada nos meses de novembro, dezembro e fevereiro.

Três moluscos (3,8%) apresentaram infecção dupla a dois tipos de furcocercárias, uma com ocelo e outra sem esta estrutura. Seis moluscos ainda (4,3%) apresentaram-se duplamente infectados com X-BT e cercária de equinostomatídeo. MANGA-GONZÁLEZ *et al.* (1994) também detectaram infecção dupla por *F. hepatica* e *Plagiorchis elegans* (xifidiocercárias) em moluscos da espécie *L. truncatula* coletados em diferentes épocas do ano em Redipollos, Espanha. De acordo com os autores, a presença de uma espécie de trematódeo no molusco dificulta o estabelecimento de outras, por este motivo encontra-se um número baixo de moluscos com parasitismo múltiplo por trematódeos. Quando ocorre infecção dupla no entanto, costuma haver predominância de uma espécie sobre a outra. FERNANDEZ & ESCH (1991) observaram que em moluscos duplamente infectados por cercárias de *Echinostoma trivolvis* e xifidiocercárias de *Haematoloechus longiplexus*, ocorreu uma dominância do primeiro trematódeo sobre o segundo, sendo encontradas muitas rédias do equinostomatídeo e apenas um pequeno número de esporocistos do hematolequídeo.

Em nenhuma das localidades foram coletadas *Physa marmorata* infectadas.

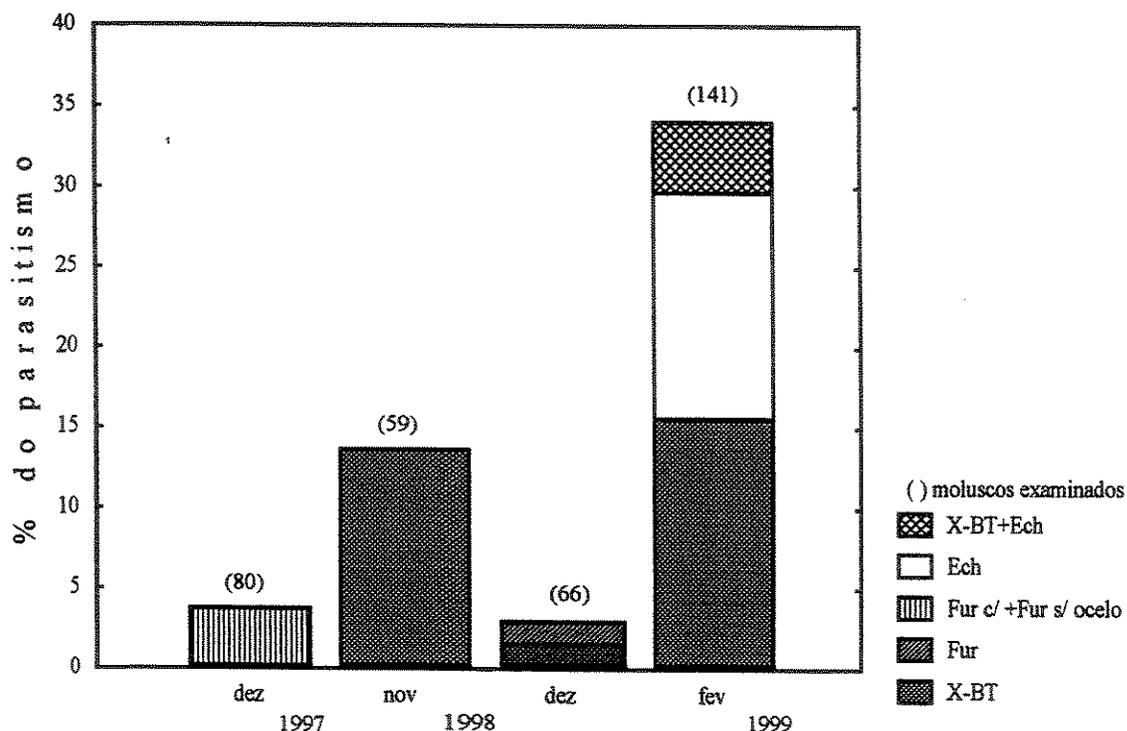


Figura 2 Prevalência (%) de trematódeos parasitando *Biomphalaria tenagophila* em pasto de criação de bovinos em Miracatu, SP, entre dezembro de 1997 a fevereiro de 1999.

Pôde-se observar na localidade MIR (Miracatu, SP), que mesmo em pequena porcentagem, a predominância do parasitismo tanto em limneídeos como em planorbídeos foi por xifidiocercárias.

3. ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE XIFIDIOCERCÁRIAS PROVENIENTES DE INFEÇÃO NATURAL DE *Lymnaea columella* SAY, 1817 (BASOMMATOPHORA, LYMNAEIDAE) E DE *Biomphalaria tenagophila* ORBIGNY, 1835 (BASOMMATOPHORA, PLANORBIDAE) COLETADAS EM MIRACATU, SP

3.1. INTRODUÇÃO

As cercárias correspondem a fase imatura de vida livre dos trematódeos digenéticos e são classificadas através de caracteres morfológicos peculiares. O número e arranjo das ventosas, presença ou ausência de colar de espinhos ou de estiletos na ventosa oral e a morfologia da cauda são as principais características utilizadas na classificação (OLSEN, 1974). Os tipos morfológicos mais comuns pelos quais as cercárias são caracterizadas são: furcocercária, xifidiocercária, oftalmocercária e microcercária. Porém, existem grandes variações morfológicas entre as cercárias de diferentes espécies.

As xifidiocercárias têm como características básicas a presença de um estilete na margem anterior da ventosa oral e cauda longa, que as distinguem das microcercárias. Caracterizam-se também, por desenvolver-se em esporocistos e encistar em invertebrados, raramente em peixes, podendo encistar em esporocistos de outros trematódeos (ROBERTS & JANOVY, 1996). As espécies de trematódeos digenéticos que possuem xifidiocercárias, pertencem a ordem Plagiorchiformes. BROOKS & McLENNAN (1993) classificam esta ordem em seis subordens, sendo que em Plagiorchiata, encontram-se as famílias Dicrocoeliidae, Prosthogonimidae, Plagiorchiidae e Haematolechidae. Os dicrocoelídeos são parasitas do fígado de vários vertebrados, porém raramente ocorrem em humanos. Os prostogonimídeos são parasitas de oviduto, bursa de Fabricius e intestino de aves. Já os plagiorquídeos parasitam o intestino de todas as classes de vertebrados, tendo poucos registros da ocorrência natural de *Plagiorchis muris* Tanabe, 1922 em humanos (ASADA *et al.*, 1962; RADOMYOS *et al.*, 1989 e HONG *et al.*, 1996), enquanto que os hematolequídeos parasitam somente pulmões de anfíbios, portanto, não tendo importância médica nem econômica.

No presente trabalho foram realizados estudos morfológicos comparativos de xifidiocercárias armadas de duas espécies e das metacercárias obtidas do encistamento de uma delas. Com a finalidade de estudar algumas fases do ciclo biológico desses trematódeos

avaliou-se experimentalmente a infectividade dessas cercárias em larvas de mosquito e posteriormente de suas metacercárias em anfíbios.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

As xifidiocercárias utilizadas neste estudo foram obtidas de infecção natural de exemplares de moluscos de água doce das espécies *Lymnaea columella* Say, 1817 e *Biomphalaria tenagophila* Orbigny, 1835 coletados na Fazenda Bananal, em Miracatu, SP. O local da coleta foi um pasto de criação de bovinos, com valas laterais e que normalmente alagam nos períodos de alto índice pluviométrico. As coletas mensais foram realizadas em setembro e outubro de 1996, agosto, outubro e dezembro de 1997, janeiro e de agosto a dezembro de 1998 e janeiro e fevereiro de 1999.

Para obtenção das cercárias os moluscos foram expostos à luz de lâmpada incandescente de 60 W por um período médio de uma hora. Os exemplares que não eliminaram cercárias foram comprimidos entre duas placas de vidro para detectar infecção imatura (esporocistos e/ou rédias). As xifidiocercárias eliminadas foram observadas quanto ao comportamento natatório na água onde emergiram.

No presente trabalho adotou-se a terminologia X-LC para as xifidiocercárias eliminadas por *L. columella* e X-BT para as eliminadas por *B. tenagophila*. Para o estudo microscópico, as xifidiocercárias X-LC e X-BT foram montadas entre lâmina e lamínula em uma gota de água e coradas com vermelho neutro a 5% para serem observadas e fotografadas a fresco (vivas) ou coradas com lugol fraco para a mesma finalidade, porém com as cercárias recém-mortas. Após a observação, as mesmas foram desenhadas em câmara clara no aumento de 200 vezes e posteriormente medidas por comparação com escala de lâmina de micrometria. Para medição e observação de detalhes da morfologia, 300 X-LC foram mortas em água aquecida a 85°C, fixadas em Bles e posteriormente coradas com Giemsa. Trinta X-LC e cinco X-BT a fresco (vivas) foram coradas com vermelho neutro a 5%, desenhadas e medidas por comparação com escala de lâmina de micrometria. Posteriormente, o material foi comparado com desenhos, medidas e as descrições de KRUL (1930, 1931, 1932, 1933a), DOLLFUS *et al.* (1960), DRONEN (1975) e BOURGAT & KULO (1979).

Para obtenção de metacercárias (cercárias encistadas), 20 larvas de último estágio (L₄) de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 foram expostas agrupadas à X-LC e 20 L₄ de *Aedes albopictus* Skuse, 1894, foram expostas agrupadas à X-BT. Utilizou-se 5,2 cerc./larva (2,6 cerc./ml) no primeiro caso e 6,0 cerc./larva (3,0 cerc./ml) no último caso. Posteriormente, as larvas dos mosquitos foram dissecadas para isolar as metacercárias e observadas a fresco (vivas) utilizando-se lupa e microscópio óptico no aumento de 200 vezes e desenhadas a seguir em câmara clara para posterior medição. Dez metacercárias encistadas sem lamínula, para evitar o excistamento, e sete excistadas artificialmente por compressão entre lâmina e lamínula foram desenhadas e medidas através de comparação com escala de lâmina de micrometria.

Com o objetivo de confirmar o gênero das xifidiocercárias em estudo, foram feitas infecções experimentais de metacercárias com idade de cinco dias em dois anfíbios visando obter o trematódeo adulto nestes possíveis hospedeiros definitivos. Foram utilizadas fêmeas adultas de *Rana catesbeiana* (Ranidae) oriundas de um ranário da região de Campinas, SP, que foram mantidas no laboratório e examinadas previamente quanto a eliminação de ovos de trematódeos pelo Método de Hoffman. Optou-se pela utilização de rãs oriundas de cativeiro devido a maior facilidade desses animais aceitarem dietas artificiais, manuseio, enfim adaptação mais fácil a essas condições. Posteriormente, cada rã recebeu oralmente três larvas de *Ae. albopictus* infectadas experimentalmente com um número de metacercárias que variou entre uma a quatro completando um total de sete e oito metacercárias, respectivamente. Aproximadamente dez dias após a infecção, essas duas rãs foram reinfetadas com 13 e 20 metacercárias respectivamente. Durante quatro meses, as fezes das rãs foram examinadas quinzenalmente para detecção de ovos de trematódeo. Posteriormente, as rãs foram necropsiadas para pesquisar os vermes jovens e adultos em seus órgãos.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As X-LC eliminadas de moluscos da família Lymnaeidae e as X-BT de Planorbidae desenvolveram-se em esporocistos.

3.3.1. Xifidiocercária X-LC

3.3.1.1. Morfologia dos esporocistos

Os esporocistos que originaram as X-LC foram encontrados dispostos lado a lado na glândula digestiva de *L. columella*. Apresentaram variações de tamanho, morfologia oval alongada e células germinativas em vários estágios de desenvolvimento de cercárias. Nos esporocistos maduros foram encontradas xifidiocercárias maduras, além de xifidiocercárias imaturas em várias fases de desenvolvimento (Fig. 1).

3.3.1.2. Morfologia da cercária

As cercárias obtidas (Fig. 2), foram classificadas como xifidiocercárias armadas, segundo OLSEN (1974). Apresentavam corpo oval com uma depressão na parte posterior (aonde insere-se a cauda) e eram incolores. A cauda quando estendida era longa e apresentava uma membrana terminal densamente pregueada. Tal membrana localizava-se dorso-ventralmente na extremidade da cauda, sendo que na parte dorsal tinha o dobro da extensão ventral. As cercárias mostraram possuir ventosa oral com um estilete longo, um pouco achatado com espessamento na base da lâmina e parte posterior um pouco dilatada. Dois grupos de glândulas de penetração situavam-se anterolateralmente à ventosa acetabular com cinco células quase sempre visíveis de cada lado, porém, esta contagem não foi precisa devido a opacidade da cercária em observação “in vivo”. Tais células apresentavam núcleos bem nítidos. Os ductos das glândulas de penetração seguiam lateralmente e abriam-se na região anterior da cercária ao lado da extremidade do estilete. A faringe apresentava-se bem visível em contraste de fase. O sistema excretor (canal e vesícula) em forma de Y. Células flama e glândulas cistógenas não ficaram visíveis à observação em microscopia óptica, nem em contraste de fase. Os valores das dimensões mínimas, máximas e médias das xifidiocercárias

estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores médios, mínimos e máximos (μm) referentes a morfologia de X-LC obtidas de infecção natural de *L. columella*.

Xifidiocercárias (n = 30)	Média (DP)	Mínimo	Máximo
Comprimento do corpo	236,8 (18,8)	208	276
Largura do corpo	120,4 (5,6)	112	132
Comprimento da cauda	193,6 (15,6)	160	220
Largura da cauda	37,46 (4,0)	32	44
Diâmetro v. o.	58,8 (4,8)	48	64
Diâm. v. a.	46,5 (5,6)	40	60
Diâmetro faringe	18,4 (3,6)	16	28
Distância v.o. - v.a.	74,53 (14,8)	48	108
Distância v.o. - far.	14,0 (4,4)	8	24
Distância v.a. - far.	42,0 (13,6)	20	80
Comprimento do estilete	23,73 (3,6)	20	32
Largura do estilete	4,0 (0)	4	4

v.o. - ventosa oral; v.a. - ventosa acetabular; far. - faringe



Fig. 1 – Esporocisto que originou as X-LC, obtido de infecção natural de *L. columella* proveniente de Miracatu, SP.

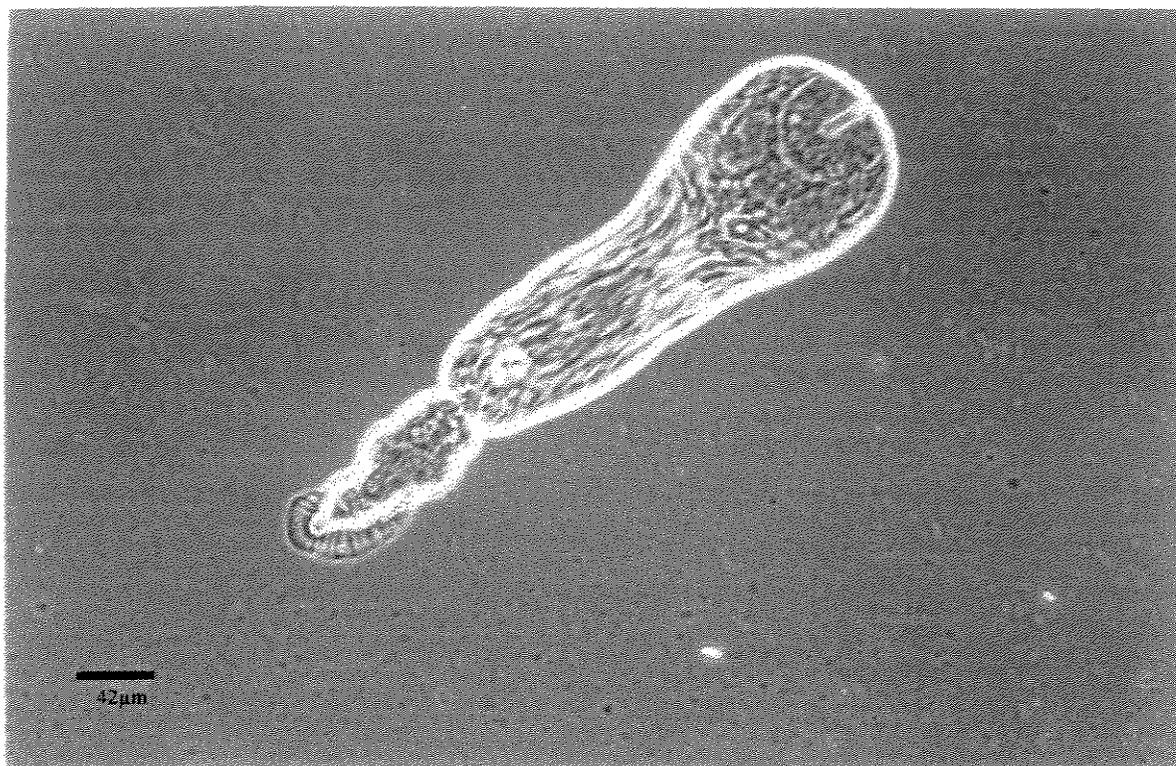


Fig. 2 – X-LC originada de esporocisto obtido de infecção natural de *L. columella* proveniente de Miracatu, SP.

3.3.1.3. Emergência e comportamento

As cercárias emergiram dos moluscos com o uso do estímulo luminoso. As mesmas permaneceram nadando por toda a coluna d'água utilizando a cauda e algumas vezes fixando-se com as ventosas no fundo do frasco para deslocar-se através de alongamento do corpo e contração da cauda. Segundo HAAS (1992), o comportamento das cercárias pode ter diferentes aspectos mas são compatíveis com as relações parasita-hospedeiro, e com a fisiologia, bioquímica, ecologia e evolução do hospedeiro.

O comportamento apresentado pelas xifidiocercárias obtidas neste estudo parecer ter relação com o comportamento de larvas de mosquito e outros insetos aquáticos, como odonatas, por exemplo, que constantemente nadam para o fundo do criadouro e para a superfície da água. O fato das xifidiocercárias nadarem por toda a coluna d'água facilita o contato com o hospedeiro intermediário.

3.3.1.4. Infectividade

As xifidiocercárias apresentaram-se altamente infectantes ao segundo hospedeiro experimental na primeira hora após a emergência. Depois deste período, houve diminuição de atividade, provavelmente devido a perda de reservas de energia. Após seis horas da emergência, a maioria das cercárias já estavam depositadas no fundo do frasco e estavam mortas após 24 h. DEMPSTER & RAU (1989) obtiveram infecções experimentais de *Ae. aegypti* pelo trematódeo *Plagiorchis noblei* Park, 1936, sendo que a infecção máxima ocorreu nos primeiros 30 minutos, após este tempo, a infectividade diminuiu chegando a ser quatro vezes menor em duas horas.

3.3.1.5. Metacercárias

Após 19 h de contato entre as xifidiocercárias e as larvas de *Ae. aegypti*, observou-se a ocorrência de infecção pela penetração das cercárias no interior das larvas. A penetração e o encistamento das xifidiocercárias nas larvas de mosquito variou quanto a localização. Foram encontrados cistos na cabeça, cérvix, tórax, segmentos abdominais, lobo anal e sifão respiratório (detalhes no item 4 - pág. 76). As metacercárias encistadas apresentaram-se como estruturas esféricas transparentes quando visualizadas em lupa. Quando examinadas em microscópio óptico, foi possível observar ainda o estilete da ventosa oral e uma movimentação

muito grande dentro do cisto. A parede deste ainda mostrava-se muito elástica e os órgãos internos das metacercárias ainda apresentavam-se semelhantes aos das cercárias. Após 24 h, os cistos escureceram tornando-se marrons, devido a formação da segunda camada da parede. Perderam o estilete e pôde-se observar as ventosas oral e acetabular, faringes, sistemas excretores (canal e vesícula) em forma de Y e uma grande movimentação destas dentro dos cistos (Fig. 3). FRIED (1994) menciona que para o encistamento a cercária demonstra aumentar a atividade, as ventosas se fixam no tecido do hospedeiro intermediário, a cauda se destaca do corpo e o material cistógeno é liberado das glândulas cistógenas para formar parte ou toda a parede do cisto e que secreções e/ou tecidos do hospedeiro podem contribuir para a formação da parede do cisto. Segundo TAFT (1990) a terceira camada da parede do cisto se forma em decorrência de reações de defesa do hospedeiro. Quando excistadas as metacercárias apresentaram morfologia oval (Fig. 4). Os valores referentes as dimensões mínimas, máximas e médias dos cistos e das metacercárias excistadas estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores médios, mínimos e máximos (μm) de metacercárias encistadas e excistadas, obtidas de infecção experimental através de exposição de larvas de *Ae. aegypti* à X-LC.

Metacercárias		Média (DP)	Mínimo	Máximo
Encistadas (n = 10)	Diâmetro do cisto	134,8 (15,5)	100	152
Excistadas (n = 7)	Comprimento	330,8 (21,6)	312	376
	Largura	137,1 (15,9)	112	156
	Diâmetro v.o.	58,3 (4,5)	52	64
	Diâmetro v.a.	41,1 (3,0)	36	44
	Diâmetro faringe	29,1 (1,9)	28	32
	Distância v.o. - v.a.	134,8 (11,9)	120	152
	Distância v.o. - far.	10,0 (5,1)	6	19
	Distância v.a. - far.	95,7 (13,5)	73	114

v.o. - ventosa oral; v.a. - ventosa acetabular; far. - faringe

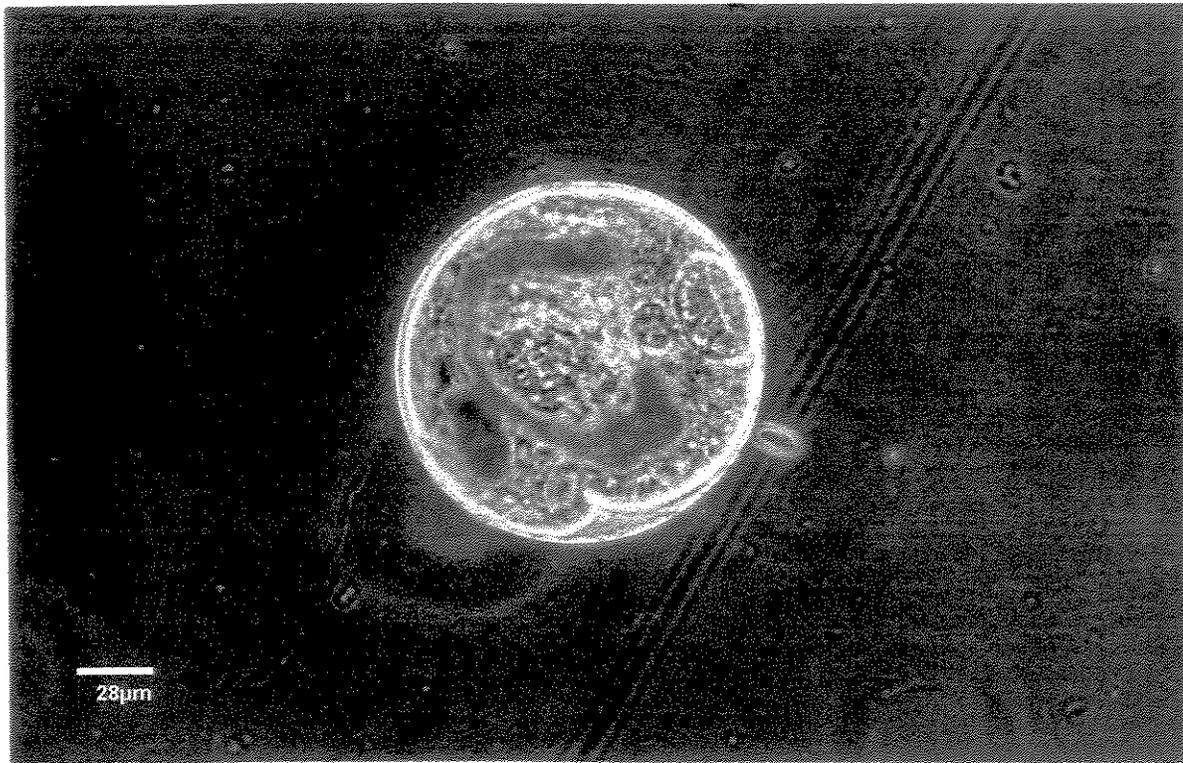


Fig. 3 - Metacercária encistada com idade de 24 h, obtida de infecção experimental através de exposição de larvas de *Ae. aegypti* a X-LC.



Fig. 4 - Metacercária excistada com idade de 24 h, obtida de infecção experimental através de exposição de larvas de *Ae. aegypti* a X-LC.

Os estudos morfológicos das xifidiocercárias e metacercárias do presente trabalho permitiram concluir que o trematoda pertence à subordem Plagiorchiata e mais provavelmente à família Haematoloechidae. As X-LC e suas metacercárias apresentaram características morfológicamente similares as descritas por KRULL (1930, 1931, 1932, 1933a), DOLLFUS *et al.* (1960), DRONEN (1975) e BOURGAT & KULO (1979), por este motivo acredita-se que as mesmas possam pertencer ao gênero *Haematoloechus*. Embora estes autores tenham descrito o ciclo destes trematódeos na América do Norte, Europa e África, há a ocorrência de espécies de *Haematoloechus* em países da América do Sul, como Uruguai, Venezuela, Colômbia e Brasil (YAMAGUTI, 1958). Em 1927, TRAVASSOS & ARTIGAS registraram nos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro, Brasil, a ocorrência de *H. neivai* nos anfíbios *Leptodactylus ocellatus* e *L. pentadactylus* e mais tarde em 1930, TRAVASSOS & DARRIBA, registraram o encontro de uma outra espécie no Estado de São Paulo, *H. fuelleborni* parasitando os pulmões de *Bufo marinus*.

A comparação dos valores morfométricos do presente estudo com outros da bibliografia, reforça a idéia de que as X-LC pertençam a uma espécie de *Haematoloechus*. Assim, as cercárias de *H. coloradensis* estudadas por DRONEN (1975) são xifidiocercárias e tem valores das medidas mínimas e máximas em micrômetros do comprimento do corpo que se enquadram na faixa de valores encontrados no presente estudo. O mesmo foi observado em relação às medidas do diâmetro das ventosas oral e acetabular e comprimento da cauda que apresentava também uma membrana terminal. O estilete das cercárias estudadas pelo referido autor apresentaram comprimento (32 a 35 μm) e largura (6 a 7 μm) maiores que os do presente estudo (comprimento de 20 a 32 μm e largura de 4 μm). As xifidiocercárias descritas por DRONEN (1975) possuíam dez a quinze glândulas cistógenas concentradas na metade posterior do corpo. Apresentavam da mesma forma que neste trabalho, cinco pares de glândulas de penetração localizadas lateralmente ao acetábulo com ductos passando anterodorsalmente a ventosa oral. O sistema excretor também era em forma de Y e 18 pares de células flama arranjadas em grupos de três. O autor obteve metacercárias do encistamento das xifidiocercárias em ninfas de Odonata e a metamorfose dos odonatas não afetaram a viabilidade das metacercárias. Os cistos metacercariais com idade de duas horas mediam 160 a 188 μm de diâmetro. Doze dias após, estas dimensões não apresentaram diferenças significativas. Três dias após o encistamento, as metacercárias perderam o estilete da ventosa

oral. A vesícula excretora apresentou-se escurecida e após doze dias todo o cisto estava escurecido. Metacercárias excistadas de *H. johnsoni* mensuradas por BOURGAT & KULO (1979) apresentaram valores em μm de comprimento e largura do corpo, ventosas e faringe também próximos aos encontrados neste estudo. A vesícula excretora se estendeu até a altura da faringe e esta apresentava grânulos refringentes. O tubo digestivo estava invisível.

3.3.1.6. Infecção experimental em anfíbios

A infecção experimental em *Rana catesbeiana* tendo como premissa que são anfíbios os possíveis hospedeiros definitivos, não teve resultado positivo. Uma das rãs infectada experimentalmente, morreu 15 dias após a ingestão de metacercárias e em sua dissecação observou-se hemorragia interna. O fígado, intestino e pulmões estavam necrosados. Nos pulmões, após fragmentação, não foram encontrados trematódeos e no sangue havia tripanossomatídeos. A outra rã que também foi exposta as metacercárias, foi mantida no laboratório por quatro meses, período em que suas fezes foram examinadas periodicamente, porém apresentaram-se negativas a presença de ovos de trematódeos.

Acredita-se que estas infecções experimentais em *R. catesbeiana* não tiveram êxito devido a fatores como: uma especificidade do parasita em relação a outro hospedeiro definitivo; que a idade do anfíbio utilizado poderia não estar compatível àquela necessária à aquisição dos parasitas; às metacercárias ainda não estarem infectantes; ao número de metacercárias ser insuficiente para a infecção ou ainda devido a respostas fisiológicas do hospedeiro (fêmea adulta), que pode ter impedido o desenvolvimento do parasita, eliminando-o. O trematódeo em estudo pode ser específico a uma das espécies de anfíbios encontradas no local de coleta, por isso não se desenvolveu em *R. catesbeiana* que é uma espécie que não ocorre naturalmente no Brasil. No ambiente de estudo foram coletados *Bufo paracnemis* e *Leptodactylus* sp., além de uma espécie observada, porém não coletada. Segundo DRONEN (1975) *Haematoloechus coloradensis* (Cort, 1915) tem especificidade para seu hospedeiro definitivo *R. pipiens*, demonstrando em infecções experimentais um desenvolvimento tardio em salamandras da espécie *Ambystoma tigrinum*, e não se desenvolve também em *R. catesbeiana*.

DRONEN (1977) utilizando *R. catesbeiana* de vários tamanhos em infecções experimentais com *H. brevipleurus* Stafford, 1902, observou também que rãs adultas com pesos maiores que 460g foram refratárias à infecção e que mecanismos fisiológicos podem causar diminuição da intensidade da infecção. SHIELDS (1987) observou que *H. longipleurus* Stafford, 1902 morreram em rãs infectadas quando estas atingiram a maturidade sexual e que a senescência do parasita e/ou características fisiológicas do hospedeiro podem ser responsáveis pela morte dos parasitas no início da maturidade sexual de *R. catesbeiana*.

A hipótese de que não ocorreu a infecção nos anfíbios devido as metacercárias não estarem infectantes após cinco dias do encistamento é discutível, pois enquanto OLSEN (1974) menciona que é necessária a ingestão de larvas após seis dias do encistamento das cercárias, para KRULL (1933a) bastaram dois dias para as metacercárias de *H. complexus* estarem infectantes.

3.3.2. Xifidiocercária X-BT

3.3.2.1. Morfologia dos esporocistos

Foram encontrados vários esporocistos dispostos lado a lado na glândula digestiva de *B. tenagophila*. Os mesmos apresentaram variações de tamanho, porém a morfologia e outras características foram semelhantes as observadas para as X-LC.

3.3.2.2. Morfologia da cercária

A morfologia interna e externa das X-DL/BT era bastante semelhante às X-LC. A única diferença observada foi a ausência da membrana terminal na cauda (Fig. 5). Os valores referentes as dimensões estão apresentados na Tabela 3. Quanto ao tamanho, as X-BT eram maiores que as X-LC, porém o tamanho das ventosas e faringe apresentaram pouca diferença.

Tabela 3 – Valores médios, mínimos e máximos (μm) referentes a morfologia de X-BT obtidas de infecção natural de *B. tenagophila*.

Xifidiocercárias (n = 5)	Média (DP)	Mínimo	Máximo
Comprimento do corpo	318,4 (14,0)	304	340
Largura do corpo	147,2 (7,2)	140	156
Comprimento da cauda	234,4 (11,6)	220	252
Largura da cauda	36,8 (1,6)	36	40
Diâmetro v. o.	52,0 (4,8)	48	60
Diâm. v. a.	60,8 (5,2)	56	68
Diâmetro faringe	20,8 (6,0)	12	28
Distância v.o - v.a.	92,8 (7,6)	84	104
Distância v.o. - far.	16,0 (2,8)	12	20
Distância v.a. - far.	54,4 (7,2)	48	64
Comprimento do estilete	18,4 (2,0)	16	20
Largura do estilete	4,4 (0,8)	4	6

v.o. - ventosa oral; v.a. - ventosa acetabular; far. - faringe



Fig. 5 – X-BT originada por esporocistos obtidos de infecção natural de *B. tenagophila* proveniente de Miracatu, SP, corada com vermelho neutro.

3.3.2.3. Emergência, comportamento e infectividade

A emergência e comportamento das cercárias na água foram parecidos com os apresentados pelas X-LC.

Embora com menor segurança do que para as X-LC sugere-se que as X-BT possam pertencer à família Haematoloechidae.

As X-BT não encistaram nas larvas de mosquito, pois não foram encontradas metacercárias no interior das mesmas. Provavelmente, isto ocorreu devido a especificidade destas cercárias ao segundo hospedeiro intermediário ou aos fatores discutidos anteriormente.

SNYDER & JANOBY (1996) estudaram as diferenças no comportamento das cercárias de quatro espécies de *Haematoloechus* quanto ao segundo hospedeiro intermediário e observaram que as cercárias de *H. longiplexus* penetram somente em ninfas de libélulas pertencentes a subordem Anisoptera e somente na base das brânquias caudais de ninfas de libélulas da subordem Zygoptera. Já *H. medioplexus* Stafford, 1902 e *H. varioplexus*, desenvolvem-se apenas em ninfas de libélulas da subordem Zygoptera e que suas cercárias nunca penetram em hospedeiros experimentais. *H. complexus* por outro lado são generalistas quanto ao segundo hospedeiro intermediário e penetram nas membranas intersegmentais de várias espécies de artrópodos. Em 1994, SNYDER & JANOBY registraram o desenvolvimento de *H. complexus* em três ordens de insetos (Coleoptera, Ephemeroptera e Odonata) e em três espécies de crustáceos de água doce (Amphipoda). Os autores ainda citam que VAN THEIL (1930) e DOLLFUS *et al.* (1960) obtiveram o desenvolvimento de xifidiocercárias de *H. variegatus* (Rud., 1819) em larvas de insetos da ordem Diptera.

4. EXPOSIÇÃO EXPERIMENTAL DE LARVAS DE MOSQUITOS (DIPTERA: CULICIDAE) A XIFIDIOCERCÁRIAS (TREMATODA)

4.1. INTRODUÇÃO

Na família Culicidae encontram-se várias espécies de mosquitos de importância à saúde pública, por serem transmissoras de arboviroses como a febre amarela, dengue e encefalites, protozooses como a malária e helmintoses como as filarioses. Além de transmitirem doenças, as picadas das fêmeas hematófagas podem ainda causar reações alérgicas, desconforto ao sono, e incômodo às atividades diurnas, que pode ocasionar redução da produtividade e consequentes perdas econômicas no trabalho e em áreas turísticas e recreacionais.

As larvas de mosquito têm grande número de predadores tais como copépodos, planárias, hidras, diversos tipos de insetos aquáticos e pequenos peixes entre outros. Também são conhecidos vários parasitas metazoários das larvas de mosquitos que inclusive podem ser utilizados no controle biológico. Segundo HOMINICK & TINGLEY (1984) os parasitas mais amplamente utilizados no controle são os nematódeos mermitídeos. Ainda entre os parasitas, podem ser relacionados como agente de controle biológico as xifidiocercárias entomofílicas de trematódeos digenéticos como: *Prosthogonimus* spp. Lühe, 1899 e *Plagiorchis* spp. Lühe, 1899. Tais cercárias já foram apontadas como eficientes no controle de larvas de mosquitos como *Culex quinquefasciatus* Say, 1823, *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 e *Anopheles quadrimaculatus* Say (RAO *et al.*, 1985; WEBBER *et al.*, 1987a,b,c; DEMPSTER & RAU, 1991 e ZAKIKHANI & RAU, 1999). São produzidas assexuadamente por esporocistos no hepatopâncreas de moluscos do gênero *Lymnaea*, que participam do ciclo destes trematódeos como primeiro hospedeiro intermediário (BLANKESPOOR, 1977). Após serem eliminadas pelos moluscos, penetram e encistam em larvas ou ninfas de insetos aquáticos, que participam do ciclo como segundo hospedeiro intermediário.

BUSTA & NASINCOVA (1986) demonstraram experimentalmente que o 2º hospedeiro intermediário de *Plagiorchis neomidis* pode ser larvas de mosquitos como *Culex* e *Dixa* ou ainda de simulídeos. YODER & COGGINS (1998) observaram que cercárias de plagiorquídeos penetraram e encistaram em larvas de quironomídeos. Segundo VAN THEIL (1930) e DOLFFUS *et al.* (1960), xifidiocercárias pertencentes a trematódeos da família

Haematoloechidae também encistam em larvas de mosquito.

Como uma característica da espécie hospedeira, o comportamento dos mosquitos determina a susceptibilidade à infecção por cercárias de *P. noblei* (WEBBER *et al.*, 1987a). Esses autores verificaram em experimentos de laboratório, que *Ae. aegypti* foi significativamente mais susceptível a infecção por cercárias do que larvas de *An. quadrimaculatus* e atribuíram esse fato à grande atividade na coluna d'água das larvas da primeira espécie.

RAU *et al.* (1991) observaram que quando larvas de *Ae. provocans* (Walker) eram expostas a cercárias de *P. noblei* sob condições de campo, ocorria uma redução do número de pupas devido ao controle exercido pelas xifidiocercárias sobre as larvas de 1° a 3° estádios, e que larvas parasitadas com mais de duas metacercárias raramente sobreviviam.

Nos capítulos anteriores do presente trabalho foram avaliadas algumas espécies de moluscos quanto ao parasitismo por xifidiocercárias. Também foram realizados estudos morfológicos destas cercárias e metacercárias obtidas do encistamento das mesmas. O presente estudo teve por objetivo avaliar experimentalmente o parasitismo de xifidiocercárias sobre larvas de culicídeos, com destaque para a susceptibilidade de *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* em diferentes estádios. Também foi acompanhado o desenvolvimento das larvas infectadas, observando-se o atraso ou o avanço do ciclo e localização de encistamento das metacercárias.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

As xifidiocercárias utilizadas nestes experimentos foram obtidas de infecção natural de exemplares de moluscos das espécies *Lymnaea columella* Say, 1817, *Biomphalaria tenagophila* Orbigny, 1835 e *Drepanotrema lucidum* Pfeiffer, 1839 coletados em um pasto de criação de bovinos na Fazenda Bananal, em Miracatu, SP, no Vale do Ribeira. O pasto possuía valas laterais que normalmente alagavam nos períodos de alto índice pluviométrico. As coletas foram realizadas nos meses de setembro e outubro de 1996, agosto, outubro e dezembro de 1997, janeiro, agosto a dezembro de 1998 e janeiro e fevereiro de 1999.

No presente trabalho utilizou-se a terminologia X-LC para as xifidiocercárias

eliminadas por *L. columella* e X-DL/BT para as eliminadas por *D. lucidum* e *B. tenagophila*. Como foi discutido no capítulo anterior, acredita-se que as cercárias X-LC sejam pertencentes a trematódeos da família Haematoloechidae.

Nos experimentos utilizou-se larvas de mosquito das espécies *Ae. albopictus* Skuse, 1894, *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, obtidas de criações estabelecidas no Departamento de Zoologia, Instituto de Biologia, UNICAMP. As criações foram mantidas em caixas de 93 por 60 por 75 cm em sala climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $75 \pm 5\%$, sendo que os experimentos foram também realizados nestas condições. Os mosquitos foram alimentados periodicamente com solução de mel a 10% e duas vezes por semana filhotes de ratos Wistar com aproximadamente quatro dias de idade (“baby”) foram deixados por 24 h na caixa para repasto sanguíneo das fêmeas.

Durante os experimentos as larvas de mosquito foram mantidas em frascos de plástico coletores de 4,5 cm de diâmetro por 8 cm de altura, contendo 40 ml de água de torneira decolorada (nos experimentos com larvas agrupadas). Quando individualizadas, foram mantidas em frascos de vidro de 3 cm de diâmetro por 3 cm de altura, com 6 ml de água de torneira decolorada e alimentadas com ração a base de pó de fígado, levedo de cerveja e açúcar (1,5: 5: 1), duas vezes por semana. Quando necessário, foi feita a reposição da água evaporada dos frascos para manter o volume inicial.

Os experimentos foram realizados de duas maneiras. Nos experimentos 1 a 4, verificou-se os tempos de desenvolvimento e de mortalidade das larvas, quando expostas agrupadas às cercárias e mantidas assim. Nos experimentos 5 a 10, também foram observados os tempos de mortalidade e de emergência de adultos, sendo adicionalmente as larvas, pupas e adultos analisados em observações sob lupa e microscópio ópticos quanto a intensidade e conseqüências da infecção (número e localização de metacercárias no interior dos indivíduos, má formações de adultos e quantidade de metacercárias necessárias para causar mortalidade). As metacercárias foram localizadas e quantificadas 24 h após a exposição das larvas de mosquito às cercárias e também após a morte das larvas e pupas. Nos experimentos 5, 6, 8 e 9, as larvas foram expostas individualizadas às xifidiocercárias, enquanto que nos experimentos 7 e 10 as larvas foram expostas agrupadas e então individualizadas 24 h após, para facilitar as observações.

As exposições das larvas de culicídeos foram realizadas de acordo com a

disponibilidade de xifidiocercárias determinando em alguns casos diferentes concentrações por larva e por volume de água. Após a exposição dos moluscos à luz, as cercárias recém-emergidas eram quantificadas sob lupa estereoscópica para a utilização do maior número possível destas. Em algumas ocasiões o número de cercárias obtidas não foi suficiente para a montagem de experimentos com concentrações iguais, mas de qualquer forma, e considerando-se que seu modo de ação é indicado por WEBBER *et al.* (1987b) como essencialmente densidade independente, procurou-se sempre estabelecer uma relação cerc./ml entre 0,83 e 3 e uma relação cerc./larva entre 3,5 e 10 (Tabela 1).

Tabela 1 - Relação dos experimentos com larvas de culicídeos em diferentes estádios (L₁ a L₄) expostas às xifidiocercárias (X-LC = xifidiocercárias eliminadas por *L. columella*, X-DL = eliminadas por *D. lucidum* e X-BT = eliminadas por *B. tenagophila*).

Experimentos	Tipo de xifidiocercária	Espécie de mosquito exposta / tipo de exposição	nº de larvas e estádios larvais	Concentrações de cercárias/larva	xifidiocercárias cercárias/ml
Exp. 1 (Preliminar)	X-LC	<i>Ae. albopictus</i> / larvas sempre agrupadas	8 L ₁	8,75	1,75
			17 L ₂	4,11	1,75
			14 L ₃	5,00	1,75
			8 L ₄	8,75	1,75
Exp. 2	X-LC	<i>Ae. albopictus</i> / larvas sempre agrupadas	20 L ₁	3,65	1,82
			20 L ₂	3,50	1,75
			20 L ₃	5,20	2,60
			20 L ₄	5,20	2,60
Exp. 3	X-LC	<i>Ae. aegypti</i> / larvas sempre agrupadas	20 L ₃	5,20	2,60
			20 L ₄	5,20	2,60
Exp. 4	X-LC	<i>Cx. quinquefasciatus</i> / larvas sempre agrupadas	20 L ₁	4,00	2,00
			20 L ₄	5,40	2,70
Exp. 5 3 repetições	X-LC	<i>Ae. albopictus</i> / larvas individualizadas	70, 60 e 20 L ₄	10,0	1,66
Exp. 6	X-LC	<i>Ae. albopictus</i> / larvas individualizadas	60 L ₄	5,00	0,83
Exp. 7 2 repetições	X-LC	<i>Ae. albopictus</i> / larvas agrupadas por 24 h	40 L ₄ cada	10,0	10,0
Exp. 8	X-DL	<i>Ae. albopictus</i> / larvas individualizadas	18 L ₄	5,00	0,83
Exp. 9	X-DL	<i>Ae. albopictus</i> / larvas individualizadas	20 L ₄	10,0	1,66
Exp. 10	X-BT	<i>Ae. albopictus</i> / larvas agrupadas por 24 h	20 L ₄	6,00	3,00

Os resultados quanto ao tempo de desenvolvimento e mortalidade do grupo testemunha do experimento 2 foram utilizados para os demais experimentos com larvas de *Ae. albopictus*. As avaliações em larvas de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* tiveram seus próprios grupos testemunha.

Nos experimentos 5 a 10 acompanhou-se as infecções diariamente pela contagem do

número de metacercárias (xifidiocercárias encistadas) formadas e desenvolvidas, caracterizando-se a localização das mesmas no interior de cada larva e/ou pupa, anotando-se o tempo de desenvolvimento e de mortalidade das larvas ou o tempo para emergência de adultos.

O atraso ou o avanço do ciclo biológico dos mosquitos nos experimentos foram comparados à testemunha utilizando-se o Teste “t” de Student com o nível de significância $p = 0,05$. Corrigiu-se a mortalidade dos tratamentos utilizando-se a fórmula de Abbott¹ quando esta ocorreu entre as larvas mantidas como testemunha (ALVES *et al.*, 1998).

1

$$\% \text{ de mortalidade corrigida} = \frac{(\% \text{ mortalidade tratam.} - \% \text{ mortalidade testemunha}) \times 100}{100 - \% \text{ mortalidade testemunha}}$$

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Exposição de larvas de culicídeos às xifidiocercárias eliminadas por *L. columella* (X-LC). – Experimentos 1 a 7.

4.3.1.1. Experimento 1 (Preliminar) – Larvas agrupadas de *Ae. albopictus* (L₁ a L₄)

As mortalidades finais para as larvas de 1° a 4° estádios expostas às X-LC foram de 87,5%, 93,4%, 92,4% e 72,2% respectivamente. A Fig. 1 mostra de forma acumulada quando essas mortalidades ocorreram (linhas) e as barras indicam a fase de desenvolvimento dos indivíduos vivos nos diferentes dias.

Entre as larvas de *Ae. albopictus* expostas no 1° estádio, uma demorou 39 dias para desenvolver-se até 4° estádio, permanecendo neste até 54 dias quando morreu. Somente uma larva alcançou o estágio adulto, também em 54 dias.

Para as larvas expostas à xifidiocercárias no 2° estádio de desenvolvimento a mortalidade se expressou quando atingiram o 4° estádio, entre o 18° e 39° dia após a exposição. Da mesma forma que as L₁ expostas, apenas um adulto se formou após 54 dias.

A maioria das L₃ morreu até o 21° dia (84,9%), na forma de: 5 L₃, 6 L₄ e uma pupa, e apenas uma alcançou o estágio adulto aos 34 dias após a exposição às cercárias. Uma larva empupou aos 67 dias e morreu no dia seguinte.

A maioria das L₄ expostas às xifidiocercárias morreu até o 21° dia (58,3%), no mesmo estádio, e apenas duas larvas chegaram ao estágio adulto, após 27 e 39 dias.

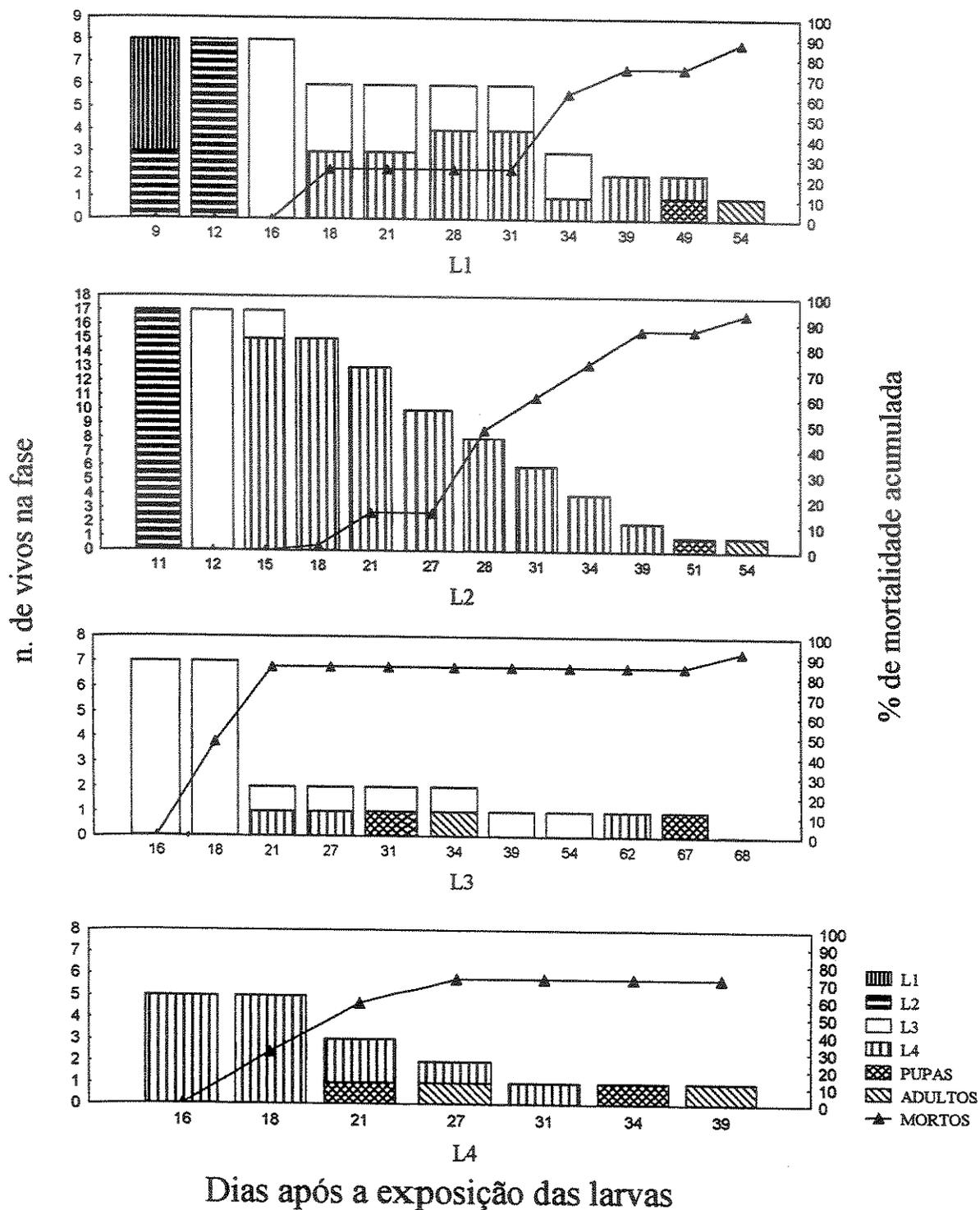


Fig. 1 - Número de indivíduos vivos nas fases de desenvolvimento alcançado (colunas) e porcentagem de mortalidade acumulada (linhas) para larvas de *Ae. albopictus* de 1º a 4º estádios, expostas agrupadas às concentrações de 8,75, 4,11, 5,0 e 8,75 cerc./larva (= 1,75 cerc./ml).

É fato conhecido que quando sujeitos à infecção ou ao parasitismo, as formas imaturas dos insetos podem avançar ou atrasar seu desenvolvimento. De maneira geral, pode-se entender esses dois fenômenos com base em distintos fatores adaptativos. O atraso do desenvolvimento como sendo provocado pelo parasita, no sentido de aumentar seu tempo de permanência no hospedeiro, e o avanço como sendo uma tentativa do hospedeiro de escapar do parasita, ao mudar de fase.

Vários pesquisadores relataram o parasitismo atrasando o crescimento e desenvolvimento dos insetos. WÜLKER (1961) e WELCH (1960) citados por WELCH (1963) relataram o atraso no desenvolvimento de larvas de quironomídeos e culicídeos parasitados por nematódeos mermitídeos. O oposto também pode acontecer, e um avanço no desenvolvimento do inseto hospedeiro ser desencadeado VARLEY & BUTLER (1933).

O atraso no desenvolvimento larval chamado de metatetelia por STRICKLAND em 1911, pode ser explicado considerando-se que a ação do parasita sobre o tecido de reserva provavelmente o comprometa de modo que este não exerça plenamente as suas funções metabólicas, incluindo a síntese e o armazenamento de lipoproteínas e glicogênio. Assim, as células cerebrais possivelmente fiquem sem receber estímulo responsável pelo desencadeamento do processo neuro-endócrino da ecdise, ou então que o limiar de estímulo cerebral demore a ser atingido (GORDON *et al.*, 1973; CUPP, 1981; WEISER & UNDEEN, 1981; PETERSEN, 1985).

Observou-se neste primeiro experimento (preliminar) que as larvas de *Ae. albopictus* infectadas com xifidiocercárias tiveram de maneira geral seu desenvolvimento muito atrasado e na maioria das vezes chegaram a morte. CASTELLO BRANCO Jr. (1991 e 1994) relata em larvas de simulídeos fenômeno semelhante ao observado no presente estudo, isto é, o atraso no desenvolvimento de larvas parasitadas. O autor citado, diagnosticou um atraso no desenvolvimento larval de *Simulium pertinax* parasitados pelos microsporídeos *Polydispyrenia simulii* e pelos nematódeos *Gastromermis viridis*. Além do atraso no desenvolvimento larval, os indivíduos parasitados por *G. viridis* apresentaram também modificações comportamentais como menor resposta a estímulos, por exemplo, ao serem tocados ou quando o fluxo da lâmina

d'água era diminuído. Uma das consequências imediatas deste comportamento é que larvas parasitadas por mermitídeos possivelmente tornam-se mais susceptíveis ao ataque de predadores e outros parasitas.

Neste experimento foi comparado o tempo médio para um estágio atingir os estádios ou estágios seguintes. A Tabela 2 mostra que quando significativo ($p \leq 0,05$), o atraso no desenvolvimento de *Ae. albopictus* foi entre 2,0 a 6,4 vezes maior quando comparado ao grupo testemunha. Pode-se observar assim, que os atrasos mais expressivos foram para as L₃ se transformarem em L₄ (6,4X) e estas em pupas (5,2X).

Tabela 2 – Variação no tempo de desenvolvimento (A = avanço; T = atraso) de larvas de *Ae. albopictus* de diferentes estádios expostas a diferentes concentrações de X-LC, probabilidade para o Teste “t” quando comparadas à testemunha não exposta e porcentagem final de mortalidade.

Exposta	Fase		Variação		p	Mortalidade final %
	Alcançada	A/T	n° de vezes			
L ₁	L ₂	--	--	> 0,05	NS	
	L ₃	T	3,3	0,00	**	
	L ₄	T	2,0	0,00	**	
	P ou Ad	--	--	> 0,05	NS	87,5
L ₂	L ₃	--	--	> 0,05	NS	
	L ₄	T	2,4	0,00	**	
	P ou Ad	--	--	> 0,05	NS	93,4
L ₃	L ₄	T	6,4	0,00	**	
	P	T	3,2	0,00	**	
	Ad	T	1,7	0,00	**	92,4
L ₄	P	T	5,2	0,00	**	
	Ad	T	3,9	0,00	**	72,2

L_n – estádios larvais; P – pupa; Ad - adulto

4.3.1.2. Experimento 2 – Larvas agrupadas de *Ae. albopictus* (L₁ a L₄)

Após o experimento preliminar 1, novo experimento com larvas de *Ae. albopictus* e X-LC foi estabelecido, utilizando-se um número maior e padronizado de larvas por estágio (n = 20), e concentrações de cercárias (por larva ou por ml) em geral distintas daquelas do experimento anterior.

Somente uma das L₁ de *Ae. albopictus* expostas a xifidiocercárias alcançou o estágio adulto 43 dias após a exposição, enquanto todas as larvas mantidas como testemunha atingiram o estágio adulto 20 dias após o início do experimento. Uma larva com maior atraso mudou para o 4º estágio no 37º dia e permaneceu assim até o 56º dia quando morreu, totalizando para o grupo 95% de mortalidade acumulada (Fig. 2). Apesar de ter sido usada uma concentração de cercárias por larva equivalente à metade do 1º experimento, o efeito da exposição pode ser considerado semelhante. Deve-se considerar entretanto, que como foi mencionado, o parasitismo por essas cercárias é essencialmente densidade independente, e de qualquer forma as concentrações foram próximas em termos de cercárias por ml.

Nenhuma das larvas de 2º estágio, alcançou o estágio adulto, sendo que a última morreu no 4º estágio 38 dias após a exposição (100% de mortalidade). As larvas testemunhas L₂ tiveram 10% de mortalidade, com a emergência dos adultos após 20 dias do início do experimento (Fig. 3).

As larvas expostas no 3º estágio também tiveram alta mortalidade (94,7%), sendo que apenas uma originou adulto. As mortes iniciaram-se seis dias após a exposição e a última (uma pupa), ocorreu 37 dias após. Entre as larvas testemunhas houve 5% de mortalidade e os adultos se formaram entre 19 e 20 dias após a exposição (Fig. 4).

Das larvas expostas a X-LC no 4º estágio emergiram sete adultos seis dias após a exposição. As últimas mortes ocorreram até 9 dias após a exposição, cinco no estágio de pupa e um adulto mal formado, totalizando 61,1% de mortalidade. Entre as larvas testemunhas ocorreu 10% de mortalidade e entre seis a nove dias após o início do experimento emergiram adultos normais (Fig. 5).

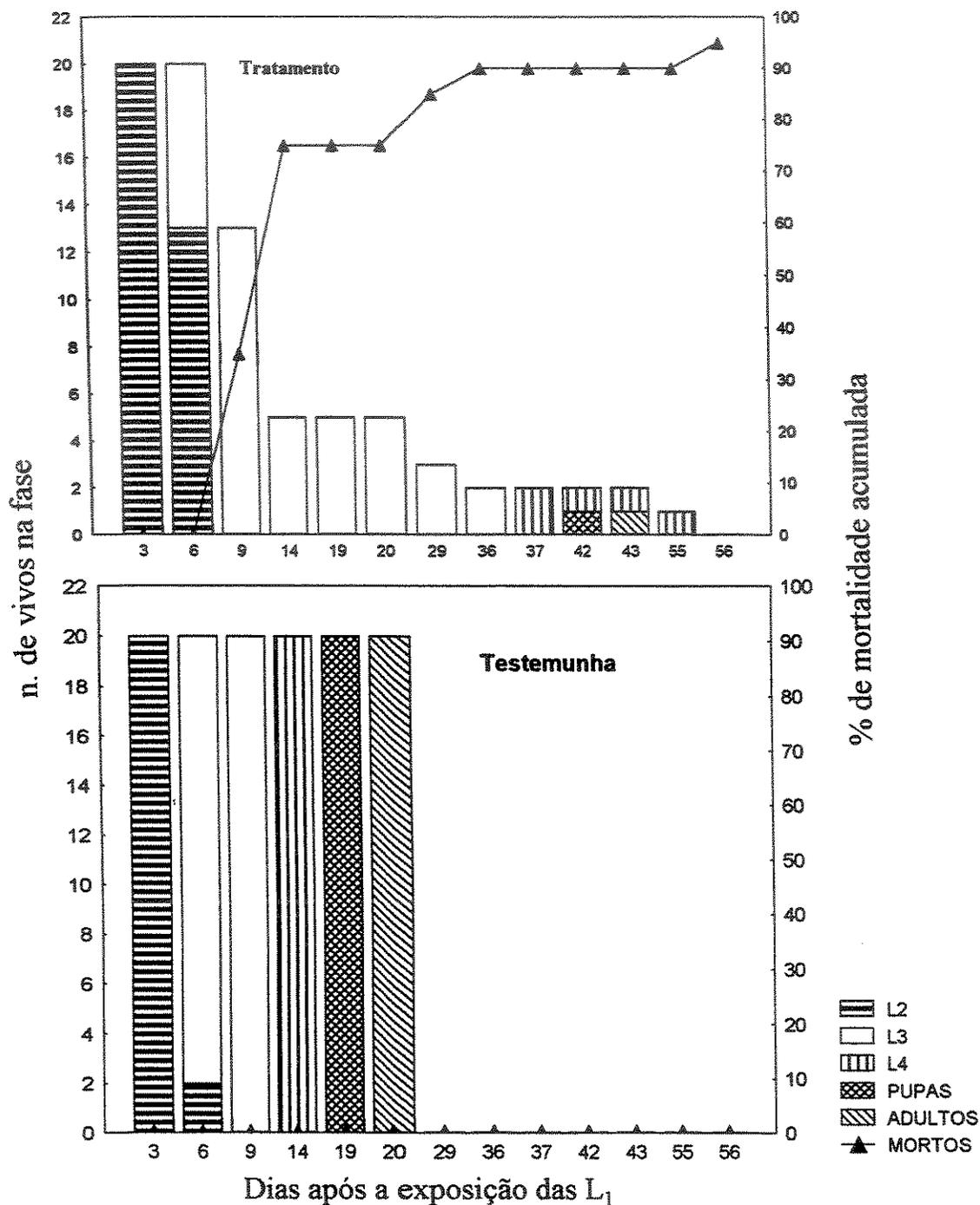


Fig. 2 - Número de indivíduos vivos nas fases de desenvolvimento alcançado (colunas) e porcentagem de mortalidade acumulada (linha) para larvas de *Ae. albopictus* de 1^o estágio, expostas agrupadas à concentração de 3,65 cerc./larva (1,82 cerc./ml), ou não expostas (Testemunha).

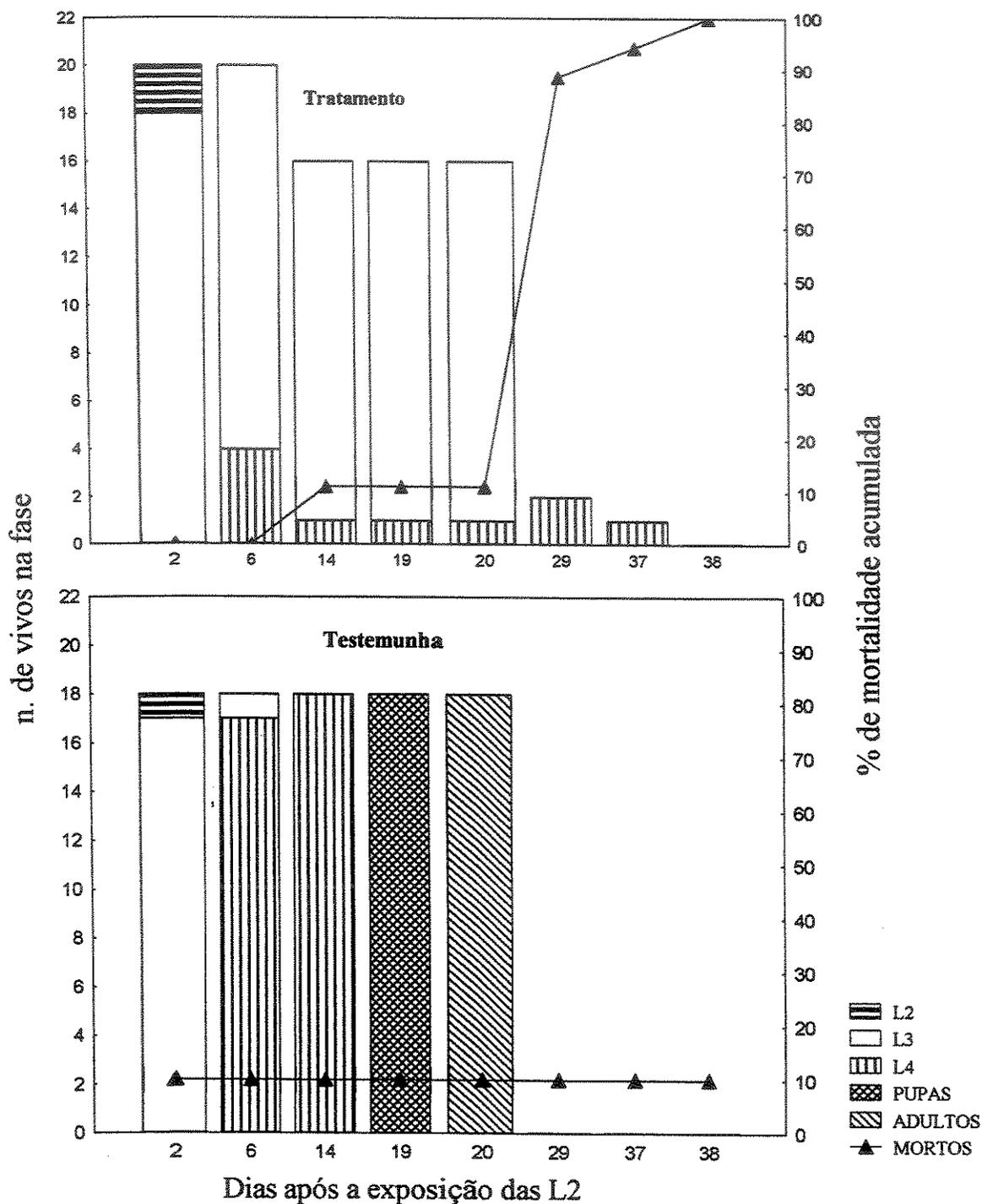


Fig. 3 - Número de indivíduos vivos nas fases de desenvolvimento alcançado (colunas) e porcentagem de mortalidade acumulada (linha) para larvas de *Ae. albopictus* de 2º estágio, expostas agrupadas à concentração de 3,5 cerc./larva (1,75 cerc./ml), ou não expostas (Testemunha).

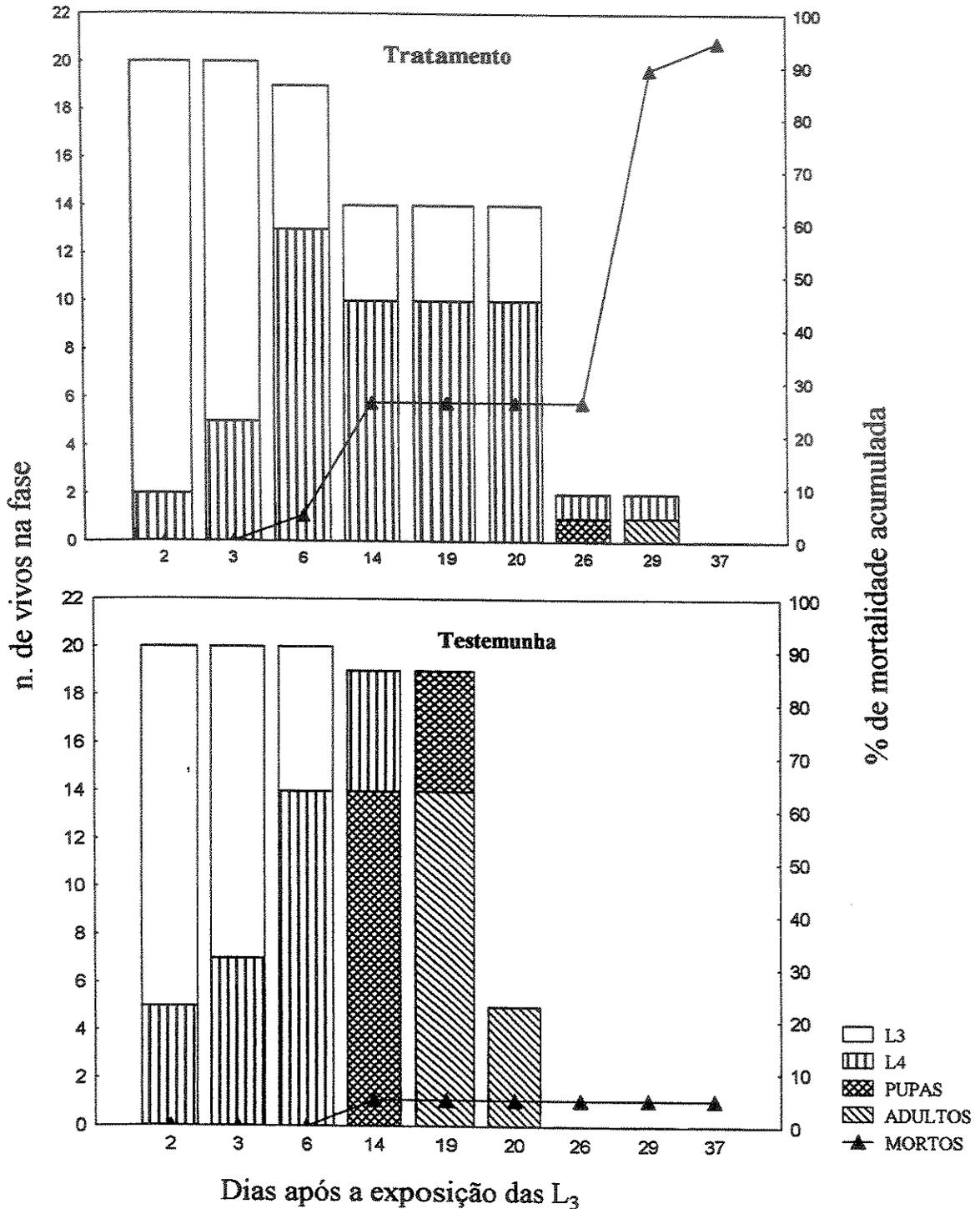


Fig. 4 - Número de indivíduos vivos nas fases de desenvolvimento alcançado (colunas) e porcentagem de mortalidade acumulada (linha) para larvas de *Ae. albopictus* de 3^o estágio, expostas agrupadas à concentração de 5,2 cerc./larva (2,6 cerc./ml), ou não expostas (Testemunha).

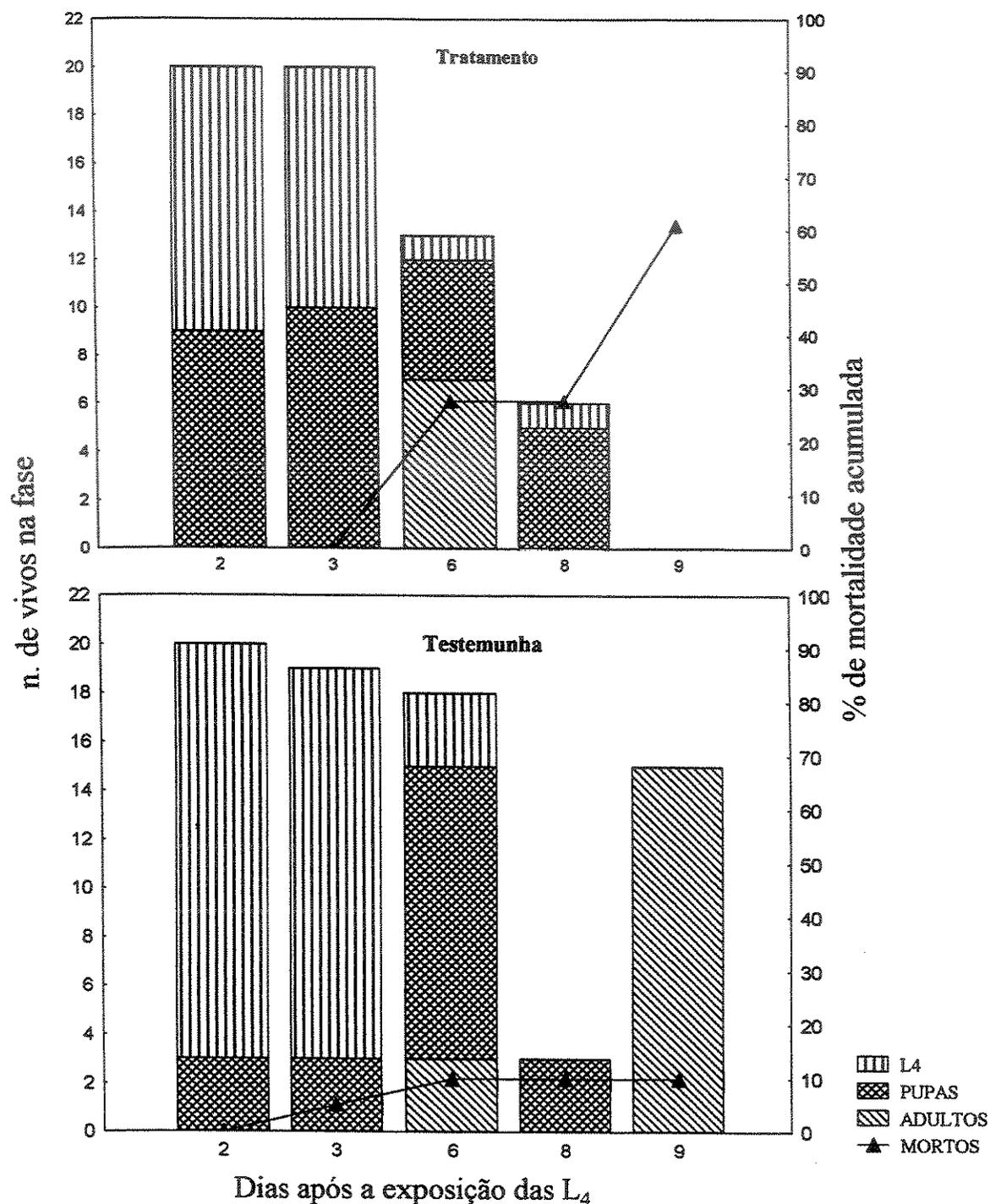


Fig. 5 - Número de indivíduos vivos nas fases de desenvolvimento alcançado (colunas) e porcentagem de mortalidade acumulada (linha) para larvas de *Ae. albopictus* de 4º estágio, expostas agrupadas à concentração de 5,2 cerc./larva (2,6 cerc./ml), ou não expostas (Testemunha).

Neste segundo experimento confirmou-se que as larvas de *Ae. albopictus* expostas a X-LC realmente têm seu tempo de desenvolvimento atrasado (nesse caso entre cerca de 1,3 a 5,3 vezes) e sofrem elevada mortalidade. A Tabela 3 permite, ainda, verificar que os maiores atrasos no desenvolvimento, ocorreram quando as larvas foram expostas nos primeiros estádios (L₁ e L₂) e não nos finais (L₃ e L₄), como parece sugerir o experimento preliminar. Ao contrário das larvas expostas no 4º estágio no experimento preliminar, que sofreram um atraso no desenvolvimento de até 5,2 vezes, as L₄ deste segundo experimento avançaram significativamente o seu tempo de desenvolvimento para pupa e desta para adulto. Esse resultado aparentemente discrepante será melhor discutido frente aos dos experimentos a seguir.

Tabela 3 – Variação no tempo de desenvolvimento (A = avanço; T = atraso) de larvas de *Ae. albopictus* de diferentes estádios expostas a diferentes concentrações de X-LC, probabilidade para o Teste “t” quando comparadas à testemunha não exposta e porcentagem final de mortalidade.

Fase		Variação			Mortalidade final	
Exposta	Alcançada	A/T	nº de vezes	p		%
L ₁	L ₂	T	1,3	0,01	**	
	L ₃	T	1,9	0,00	**	
	L ₄	T	3,0	0,00	**	
	P ou Ad	--	--	> 0,05	NS	95,0
L ₂	L ₃	T	5,3	0,00	**	
	L ₄	T	1,7	0,00	**	100
L ₃	L ₄	T	2,2	0,00	**	
	P	T	1,7	0,00	**	
	Ad	T	1,5	0,00	**	94,7
L ₄	P	A	1,6	0,00	**	
	Ad	A	1,4	0,00	**	61,1

L_n – estádios larvais; P – pupa; Ad - adulto

Os experimentos a seguir (3 e 4) foram realizados de forma semelhante (larvas agrupadas), mas com duas outras espécies de culicídeos; *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*.

4.3.1.3. Experimento 3 – Larvas agrupadas de *Ae. aegypti* (L₃ e L₄)

As larvas de *Ae. aegypti* expostas às X-LC no 3º estágio sofreram 95% de mortalidade sendo que um adulto emergiu aos 19 dias e a última morte ocorreu em 29 dias após a exposição. O grupo mantido como testemunha teve 100% de sobrevivência e a emergência dos adultos iniciou-se no 7º dia e estendeu-se até o 21º dia (Fig. 6).

As L₄ expostas apresentaram baixa mortalidade (40%), mas ainda assim, bastante significativa quando comparada a testemunha (0%). A mortalidade das L₄ infectadas estendeu-se até 19 dias após a exposição (Fig. 7).

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

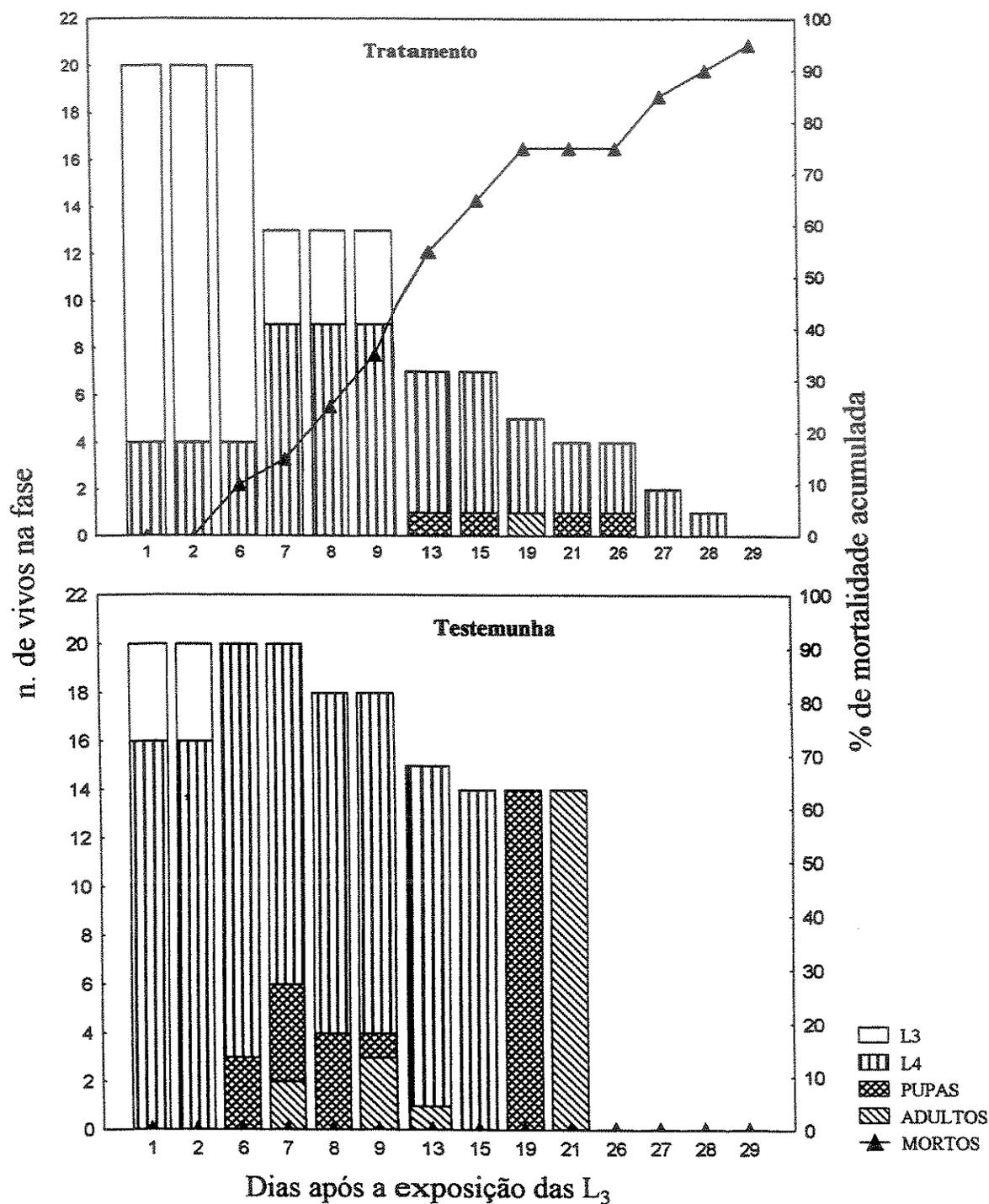


Fig. 6 - Número de indivíduos vivos nas fases de desenvolvimento alcançado (coluna) e porcentagem de mortalidade acumulada (linha) para larvas de *Ae. aegypti* de 3º estágio, expostas agrupadas à concentração de 5,2 cerc./larva (2,6 cerc./ml), ou não expostas (Testemunha).

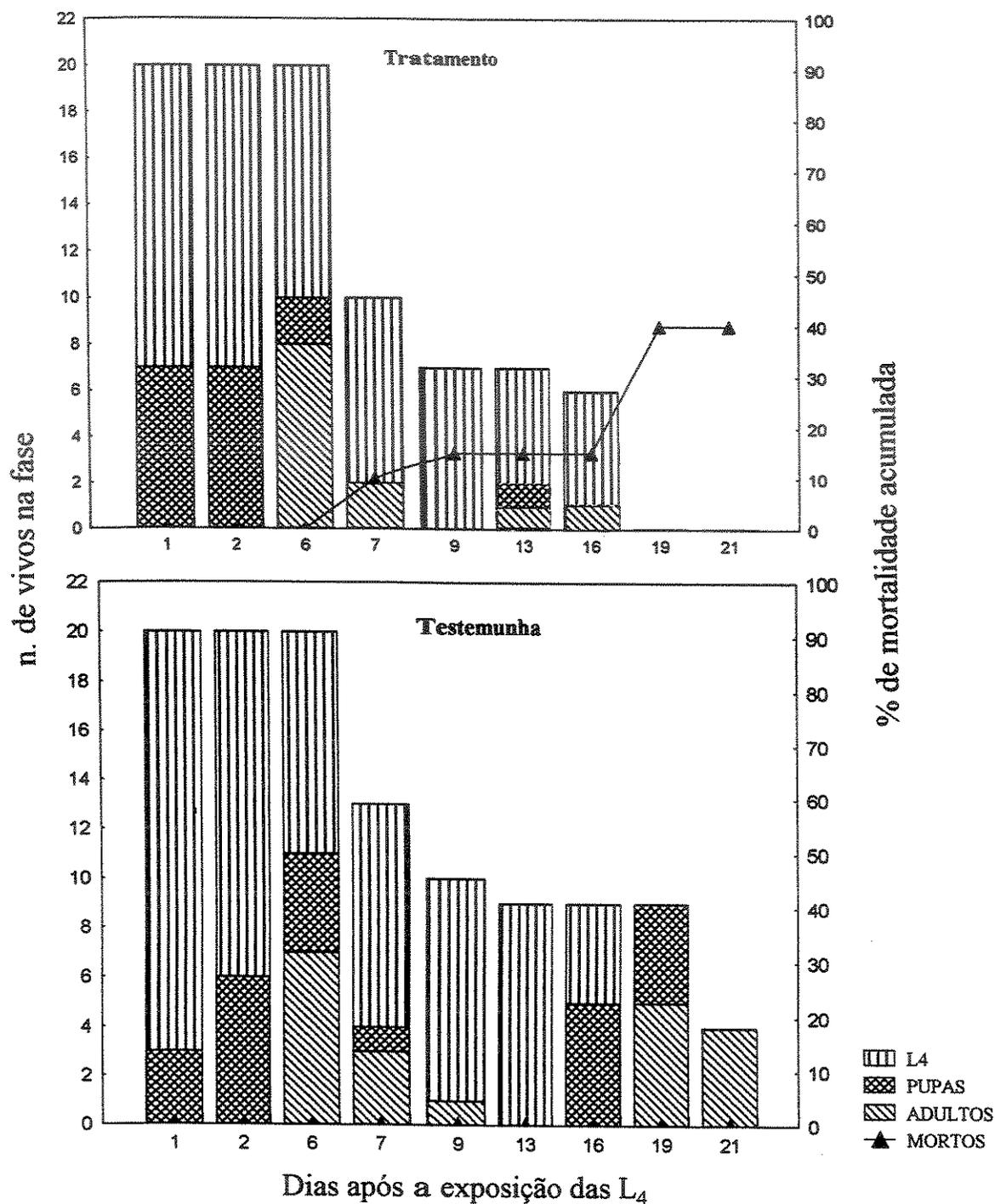


Fig. 7 - Número de indivíduos vivos nas fases de desenvolvimento alcançado (coluna) e porcentagem de mortalidade acumulada (linha) para larvas de *Ae. aegypti* de 4º estágio, expostas agrupadas à concentração de 5,2 cerc./larva (2,6 cerc./ml), ou não expostas (Testemunha).

Neste terceiro experimento observou-se que as larvas de *Ae. aegypti* expostas à infecção por X-LC, quando no 3º estágio, tiveram seu tempo de desenvolvimento atrasado em até 1,3 vezes e/ou chegaram a morte. Quanto às larvas expostas em 4º estágio no entanto, da mesma forma que no experimento anterior com *Ae. albopictus*, também ocorreu avanço do desenvolvimento (até 3,2 vezes). Tanto o atraso quanto esse avanço foram estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) quando comparados ao grupo testemunha (Tabela 4).

Tabela 4 – Variação no tempo de desenvolvimento (A = avanço; T = atraso) de larvas de *Ae. aegypti* de diferentes estádios expostas a diferentes concentrações de X-LC, probabilidade para o Teste “t” quando comparadas à testemunha não exposta e porcentagem final de mortalidade.

Fase		Variação			Mortalidade final	
Exposta	Alcançada	A/T	nº de vezes	p		%
L ₃	L ₄	T	1,3	0,01	**	
	P	--	--	> 0,05	NS	
	Ad	--	--	> 0,05	NS	95,0
L ₄	P	A	3,2	0,00	**	
	Ad	A	1,6	0,02	*	40,0

L_n – estádios larvais; P – pupa; Ad - adulto

Considerando-se que a quantidade de cercárias/ml ou cerc./larva foi a mesma que a do experimento anterior (2), variando apenas a espécie de mosquito, observa-se que as L₃ de *Ae. aegypti* expostas às X-LC demonstraram um atraso no desenvolvimento não significativo ou bem menor quando comparado com larvas de *Ae. albopictus*, sugerindo uma menor susceptibilidade. De fato, essa menor susceptibilidade de *Ae. aegypti* parece se confirmar no experimento com L₄, uma vez que as larvas tiveram um avanço maior no seu tempo de desenvolvimento quando comparado à testemunha e sofreram menor mortalidade final (40%) quando comparada a outra espécie (61,1%).

4.3.1.4. Experimento 4 – Larvas agrupadas de *Cx. quinquefasciatus* (L₁ e L₄)

O presente experimento permitiu uma exposição das larvas de 1º estágio de *Cx. quinquefasciatus* semelhante àquela feita no experimento 2 com *Ae. albopictus*, e das larvas de 4º estágio, semelhante ao experimento 2 e ao experimento 3, com *Ae. aegypti* (cf. Tabela 1).

Somente cinco L₁ de *Cx. quinquefasciatus* expostas a X-LC alcançaram o estágio adulto entre o 21º dia e o 32º dia após a exposição representando 72,2% de mortalidade final, enquanto 18 larvas testemunha alcançaram o estágio adulto a partir de 11 dias (10% de mortalidade). Uma larva exposta desenvolveu-se de forma acelerada até o 4º estágio em nove dias, mas morreu 31 dias após, nesse mesmo estágio. A mortalidade nesse grupo iniciou-se com uma larva que atingiu o 3º estágio oito dias após a exposição e estendeu-se até 31 dias (Fig. 8).

Das larvas de 4º estágio infectadas com xifidiocercárias emergiram 75% de adultos. Uma larva de 4º estágio e quatro pupas morreram no quarto dia após a exposição, totalizando uma mortalidade de apenas 6,2% (Fig. 9). A emergência dos adultos iniciou-se sete dias após a exposição, enquanto que a metade das larvas testemunhas alcançaram o estágio adulto três dias após o início do experimento. As larvas testemunhas desse grupo tiveram mortalidade alta (20%).

No presente estudo os valores obtidos para L₁ de *Cx. quinquefasciatus* são melhor comparáveis aos obtidos para o mesmo estágio de *Ae. albopictus*, uma vez que a concentração de cercárias por ml (2 e 1,82 respectivamente) ou por larva (4 e 3,65 respectivamente) são próximos. A mortalidade final das larvas de *Cx. quinquefasciatus* foi de 75%, enquanto que as L₁ de *Ae. albopictus* tiveram uma mortalidade de 95%, indicando que esta última espécie foi mais susceptível à infecção.

Ainda, os valores para as L₄ de *Cx. quinquefasciatus* são comparáveis aos de *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti*, uma vez que a concentração de cercárias utilizadas foram muito próximas (2,7, 2,6 e 2,6 cerc./ml e 5,4, 5,2 e 5,2 cerc./larva respectivamente). O total de mortalidade obtido para *Cx. quinquefasciatus* no entanto (6,2%), foi muito inferior ao obtido para as larvas de *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti* (61,1% e 40%, respectivamente).

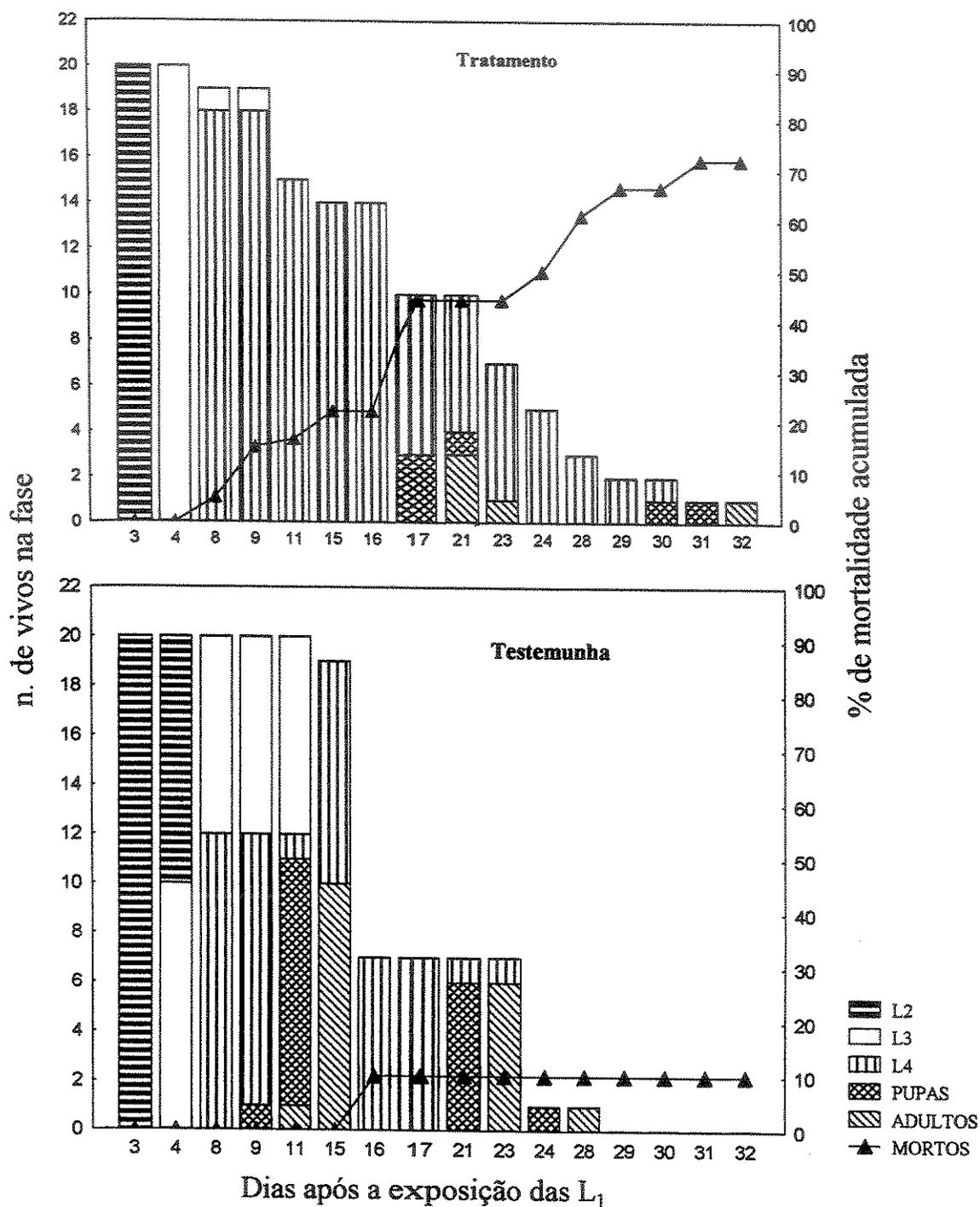


Fig. 8 – Número de indivíduos vivos nas fases de desenvolvimento alcançado (coluna) e porcentagem de mortalidade acumulada (linha) para larvas de *Cx. quinquefasciatus* de 1º estágio, expostas agrupadas à concentração de 4 cerc./larva (2,0 cerc/ml), ou não expostas (Testemunha).

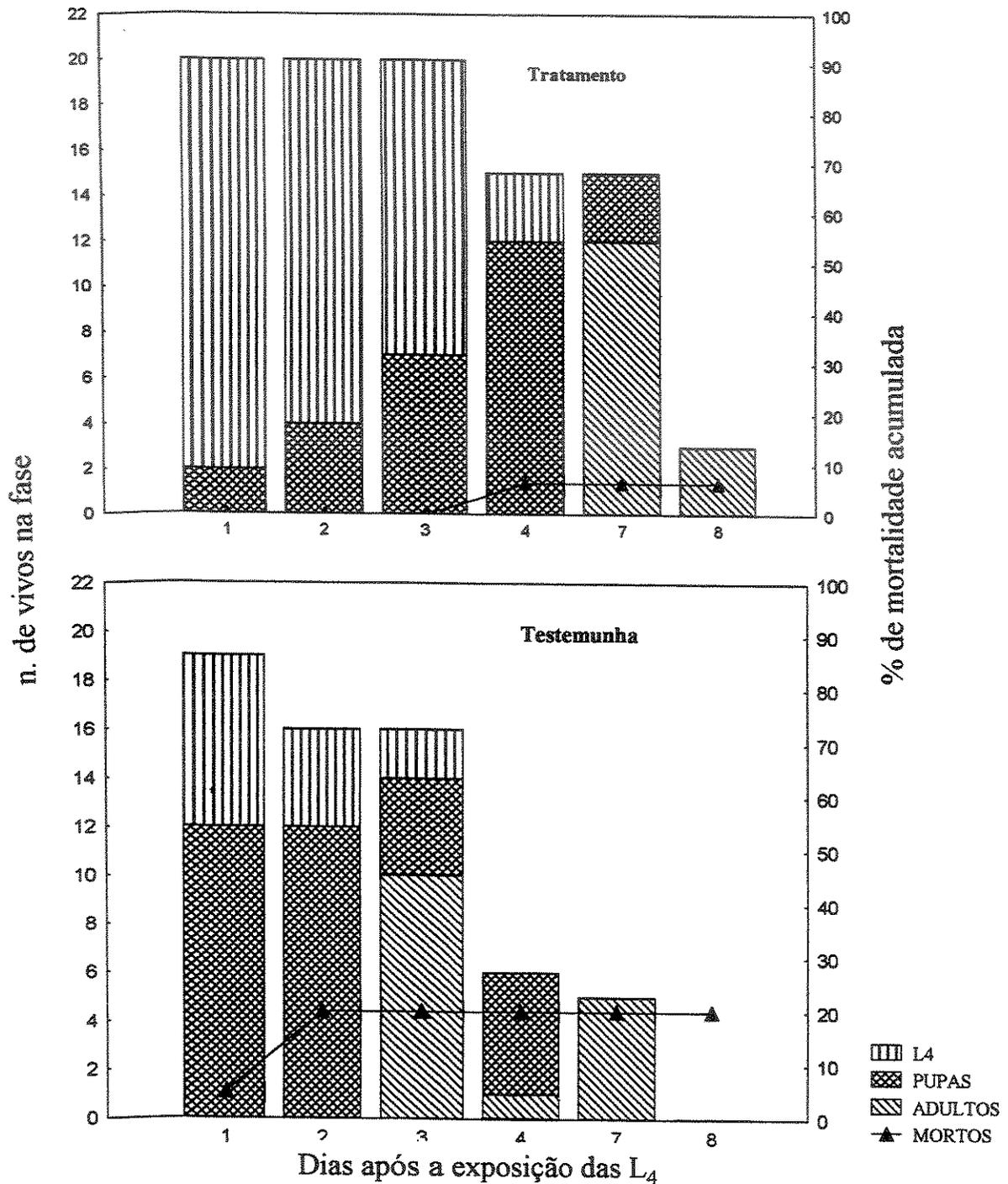


Fig. 9 - Número de indivíduos vivos nas fases de desenvolvimento alcançado (coluna) e porcentagem de mortalidade acumulada (linha) para larvas de *Cx. quinquefasciatus* de 4º estágio, expostas agrupadas à concentração de 5,4 cerc./larva (2,7 cerc/ml), ou não expostas (Testemunha).

As larvas infectadas em 1º estágio tiveram variações significativas no tempo de desenvolvimento com um avanço até o 3º estágio (1,8 vezes), após isso ocorreu atraso de até 1,3 vezes na continuação do desenvolvimento até adulto (Tabela 5). Porém, quando comparado com as larvas do gênero *Aedes*, foram muito menos susceptíveis à infecção.

Tabela 5 – Variação no tempo de desenvolvimento (A = avanço; T = atraso) de larvas de *Cx. quinquefasciatus* de 1º e 4º estádios expostas a duas concentrações de X-LC, probabilidade para o Teste “t” quando comparadas à testemunha não exposta e porcentagem final de mortalidade.

Fase		Variação			Mortalidade final	
Exposta	Alcançada	A/T	nº de vezes	p		%
L ₁	L ₂	A	1,1	0,00	**	
	L ₃	A	1,8	0,00	**	
	L ₄	T	1,2	0,04	*	
	P	--	--	> 0,05	NS	
	Ad	T	1,3	0,03	*	72,2
L ₄	P	T	1,8	0,00	**	
	Ad	T	1,7	0,00	**	6,2

L_n – estádios larvais; P – pupa; Ad - adulto

Os experimentos 1 a 4 demonstraram que larvas de *Ae. albopictus* foram mais susceptíveis ao parasitismo por xifidiocercárias que as de *Ae. aegypti*, e ambas mais susceptíveis que *Cx. quinquefasciatus*. A ocorrência dessa relação, como foi mencionado, poderia estar relacionada à atividade das larvas na coluna d'água, entre outros fatores. Pode-se propor assim que *Cx. quinquefasciatus* seja mais resistente à infecção por essas xifidiocercárias devido à mecanismos intrínsecos de defesa. Larvas de *Cx. quinquefasciatus* poderiam adquirir menos parasitas que *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti* pelo fato de possuírem mais cerdas, o que dificultaria a fixação e penetração das cercárias e também por apresentarem comportamento mais lento na coluna d'água. Nesse sentido, KAVELAARS (1965) citado por WEBBER *et al.* (1987a) indicou que a atividade reduzida na coluna d'água das larvas de *Cx. pipiens* (Linn.) torna-as menos susceptíveis à infecção por cercárias de *P. noblei* que as larvas de *Ae. aegypti*. De fato, segundo ainda DEMPSTER & RAU (1991) a atividade larval é o maior fator de aquisição desses parasitas, e portanto quanto maior a atividade, maior a prevalência e intensidade da infecção.

Nos quatro experimentos apresentados observou-se de maneira geral atraso no desenvolvimento dos mosquitos. Fenômeno similar foi descrito por DEMPSTER *et al.* (1986) para o estágio larval de *Ae. aegypti* durando além do tempo normal, e em muitas vezes levando as larvas à morte ao empuparem. GALLOWAY & BRUST (1985) observaram efeito similar em larvas de *Ae. vexans* infectadas pelo nematódeo *Romanomermis culicivorax* e CASTELLO BRANCO Jr. (1994) em larvas de *Simulium pertinax* parasitadas pelo nematódeo *Gastromermis viridis*. O aumento no tempo de desenvolvimento das larvas de mosquitos não parece ser de todo detrimental porque continuam alimentando-se, porém, muitas vezes acabam morrendo quando passam ao estágio de pupa. A emergência de adultos malformados (que não podem voar por exemplo), facilitaria muito a transmissão do parasita ao hospedeiro definitivo, se este realmente for um anfíbio como foi sugerido, e a maior permanência nos estágios de larva e pupa, ao contrário, teria menor importância uma vez que a maioria dos anfíbios tem comportamento predatório somente acima da superfície da água. Porém, *Rana catesbeiana* e algumas espécies de *Bufo* e *Leptodactylus* podem preda girinos de outras espécies (P. MANZANI, Depto. de Zoologia/IB/UNICAMP, COMUNICAÇÃO PESSOAL), sendo possível assim, que alguns anfíbios predem imaturos de mosquito e adquiram a infecção pelo trematódeo. WEBBER *et al.* (1986) indicaram que quando os imaturos dos culicídeos infectados permanecem por mais tempo na superfície da água, são predados mais facilmente por aves.

4.3.1.5. Experimento 5 – Larvas individualizadas de *Ae. albopictus* (L₄) com três repetições

A sobrevivência média para as três repetições com larvas de *Ae. albopictus* expostas a X-LC foi de 42% (DP = 25,6), com emergência de adultos ocorrendo em média entre 9,5 e 12,5 dias após a exposição. A mortalidade estendeu-se até o 65º dia após a infecção e totalizou 58% (DP = 25).

Neste experimento houve 100% de infecção e a porcentagem média de penetração de cercárias nas larvas de mosquito foi de 24,2 (DP = 4,0).

O número de metacercárias encontradas nas larvas de *Ae. albopictus* variou de 1 a 8 (Tabela 6) podendo matá-las ou originar adultos infectados. A mesma tabela ainda mostra que houve variação quanto a localização das metacercárias nas larvas de mosquito, ocorrendo um maior número no tórax, seguido por abdome, cabeça, lobo anal e cérvix. A emergência de adultos infectados ocorreu em indivíduos com até 4 metacercárias. Desses adultos (total de 63) apenas cinco emergiram malformados, dos quais três não conseguiram se desprender da exúvia, um possuía apenas uma asa normal e o outro apresentava-se com as duas asas atrofiadas. Os três adultos que emergiram presos à exúvia e o adulto que apresentou uma asa atrofiada, originaram-se de larvas com apenas uma metacercária no tórax. Já o mosquito que emergiu com as duas asas atrofiadas, desenvolveu-se de uma larva infectada com três metacercárias, sendo duas no tórax e uma no terceiro segmento abdominal. Percebe-se assim, que a localização das metacercárias na larva, pode ser também relevante, além da quantidade destas.

Tabela 6 – Porcentagem média e desvio padrão (DP) do parasitismo resultante da exposição individual de larvas de *Ae. albopictus* de 4º estágio à X-LC na concentração de dez cerc./larva (= 1,66 cerc./ml) para 3 repetições.

nº de metac por larva	ocor-rência %	Localização na larva %					% de mortos em			% adult emergidos	média dias p/emergir
		ce	ca	to	ab	la	L ₄	PP	P		
1	35,0 (8,6)		2,5 (0,7)	8,2 (4,6)	4,3 (1,4)	0,2 (0,3)	7,9 (8,6)	3,7 (4,2)	1,0 (1,6)	22,3 (11,9)	9,5 (3,0)
2	27,6 (2,9)		4,4 (3,0)	9,0 (2,4)	8,8 (0,9)	1,1 (0,7)	11,8 (6,8)	4,3 (1,2)	0	11,5 (8,5)	12,5 (2,9)
3	15,1 (4,4)	0,2 (0,3)	2,3 (2,1)	7,8 (2,1)	8,7 (2,9)	0,6 (0,9)	5,0 (5,0)	3,1 (2,7)	1,0 (0,9)	6,0 (4,3)	12,3 (3,5)
4	12,5 (8,4)	0,2 (0,3)	2,0 (0,4)	7,1 (3,9)	9,8 (9,4)	0,6 (0,5)	8,2 (4,3)	1,7 (2,8)	0,5 (0,8)	2,2 (2,5)	11,7 (13,8)
5	4,7 (1,2)		1,0 (1,3)	4,1 (2,0)	3,2 (2,9)	1,4 (1,1)	4,7 (1,2)	0			
6	3,6 (1,7)		3,6 (3,7)	2,8 (1,6)	1,5 (1,9)	0,8 (1,0)	2,6 (2,5)	1,0 (0,9)			
7	1,0 (1,6)		0,3 (0,3)	0,9 (1,5)	1,2 (2,1)		1,0 (1,6)				
8	0,5 (0,8)		0,5 (0,5)	0,2 (0,3)	0,7 (1,2)		0,5 (0,8)				
Soma	100	0,4	16,6	40,1	38,2	4,7	41,7	13,8	2,5	42	

ce - cérvix; ca - cabeça; to - tórax; ab - segm. abdominais; la - lobo anal; metac - metacercárias; L₄ - larvas; PP - pré-pupa; P - pupa.

Como nos experimentos com larvas agrupadas, as larvas de *Ae. albopictus* infectadas neste quinto experimento tiveram seu desenvolvimento atrasado e na maioria das vezes morreram nesse estágio (41,7%), como pré-pupa (13,8%) ou como pupa (2,5%). As larvas que chegaram até o estágio adulto tiveram seu tempo de desenvolvimento significamente atrasado em 1,67 e 1,42 vezes na primeira e segunda repetições, sendo que o tempo de desenvolvimento das larvas da terceira repetição não diferiu em relação ao tempo necessário para o desenvolvimento das larvas testemunhas (Tabela 7).

Tabela 7 – Variação no tempo de desenvolvimento (A = avanço; T = atraso) de larvas de *Ae. albopictus* de 4º estágio expostas à X-LC na concentração de dez cerc./larva (= 1,66 cerc./ml) e probabilidade para o Teste “ χ ”.

Repetições	Fase		Variação		p	
	Exposta	Alcançada	A/T	nº de vezes		
Rep. 1	L ₄	P	--	--	> 0,05	NS
		Ad	T	1,67	0,00	**
Rep. 2	L ₄	P	--	--	> 0,05	NS
		Ad	T	1,35	0,00	**
Rep. 3	L ₄	P	--	--	> 0,05	NS
		Ad	--	--	> 0,05	NS

L₄ – larvas de 4º estágio; P – pupa; Ad - adulto

Os resultados desse experimento além de permitirem uma avaliação da localização das metacercárias na larva hospedeira confirmam os obtidos no experimento 2, quanto à mesma porcentagem de larvas infectadas (100%), porcentagem de mortalidade final próximas (61,1 e 58%) e atraso (quando significativo) das larvas L₄ em tornarem-se adultas (1,4 vezes e entre 1,67 a 1,35 vezes respectivamente). Convém salientar que o presente experimento difere do 2º pela forma como as larvas foram expostas, nesse caso isoladas cada uma em um frasco, e naquele, em grupos de 20 indivíduos.

4.3.1.6. Experimento 6 – Larvas individualizadas de *Ae. albopictus* (L₄)

Neste experimento onde foi utilizada a metade da concentração de cercárias por larva e de cercárias por ml do experimento anterior, também houve 100% de infecção entre as larvas e emergência de 34 adultos entre 9 e 23 dias após a exposição (Tabela 8). A mortalidade final foi de 43,4%, tendo início três dias após a infecção e estendendo-se até o 35º dia.

O número de metacercárias encontradas nas larvas de *Ae. albopictus* variou de uma a quatro (Tabela 8), sendo que a maioria dos adultos infectados (46,5%) surgiu de larvas com uma metacercária.

Tabela 8- Porcentagem do parasitismo resultante da exposição individual de larvas de *Ae. albopictus* de 4º estágio à X-LC na concentração de cinco cerc./larva (= 0,83 cerc./ml).

nº de metac por larva	ocor-rência %	localização na larva %					% de mortos em			% adult emergidos	Média dias p/ emergir
		ce	ca	to	ab	la	L ₄	PP	P		
1	61,7		14,9	11,7	12,8		13,3	0	1,7	46,5	12,0 (4,9)
2	25,0		11,7	10,6	7,4	2,1	16,6	1,7	0	6,7	9,0 (6,0)
3	8,3		8,5	2,1	5,3		6,7	0	0	1,7	20 (0)
4	5,0		3,2	4,3	4,3	1,1	1,7	1,7	0	1,7	23 (0)
Soma	100		38,3	28,7	29,8	3,2	38,3	3,4	1,7	56,6	

ce - cérvix; ca - cabeça; to - tórax; ab - segm. abdominais; la - lobo anal; metac - metacercárias; L₄ - larvas; PP - pré-pupa; P - pupa.

Como nos experimentos com larvas agrupadas e também nos experimentos com larvas individualizadas expostas à concentração de dez cerc./larva ou 1,66 cerc./ml, as larvas de *Ae. albopictus* infectadas neste experimento tiveram seu desenvolvimento atrasado e uma mortalidade acentuada (43,4%). As larvas que chegaram ao estágio adulto tiveram seu tempo de desenvolvimento significativamente atrasado em até 1,42 vezes como pode ser observado na Tabela 9.

Tabela 9 – Variação no tempo de desenvolvimento (A = avanço; T = atraso) de larvas de *Ae. albopictus* de 4º estágio expostas à X-LC na concentração de cinco cerc./larva (=0,83 cerc./ml) e probabilidade para o Teste “t”.

Fase		Variação		p	
Exposta	Alcançada	A/T	nº de vezes		
L ₄	P	--	--	> 0,05	NS
	Ad	T	1,42	0,00	**

L₄ – larvas de 4º estágio; P – pupa; Ad - adulto

Comparando-se este experimento com o anterior observa-se que a infecção por X-LC nas concentrações de cinco ou dez cercárias por larva (que corresponde a 0,83 ou 1,66 cerc./ml) produzem essencialmente resultados semelhantes para concentrações que diferem da ordem de duas vezes, como pode ser observado na Tabela 10:

Tabela 10 – Comparação dos resultados das exposições de larvas de *Ae. albopictus* à duas concentrações de X-LC.

	% infecção	% penetração de cercárias	% mortalidade
5 cerc./larva (0,83 cerc./ml)	100	31,3	43,4
10 cerc./larva (1,66 cerc./ml)	100	24,2	58,0

4.3.1.7. Experimento 7 – Larvas de *Ae. albopictus* (L₄) expostas agrupadas e individualizadas 24 h após a exposição, com duas repetições

Tanto quanto nos outros experimentos com larvas de *Ae. albopictus* expostas a X-LC houve neste experimento uma mortalidade acentuada. Pouco mais que 60% das larvas morreram entre o 1º e o 16º dia após a exposição, enquanto que os adultos emergiram (total de 49) em média com 3,5 dias e cerca de 7 dias dependendo da quantidade de cercárias que penetraram.

Após a exposição agrupada por 24 h, as larvas foram examinadas quanto à presença e localização de metacercárias e então acompanhadas individualmente. Todas estavam parasitadas (100%), portando entre 1 a 4 cercárias, resultando que no total, 15,75% (DP = 6,0) das xifidiocercárias penetraram nas larvas de *Ae. albopictus*. A distribuição das metacercárias no interior das larvas foi predominante no tórax, seguido da localização nos segmentos abdominais, cabeça, lobo anal e cérvix (Tabela 11). A presença de uma ou até quatro metacercárias no corpo das larvas, dependendo da localização, causaram-lhes a morte, enquanto que a emergência de adultos ocorreu a partir de larvas infectadas com no máximo três metacercárias. Porém, dos adultos emergidos três estavam malformados, um com asas deformadas e os outros dois presos à exúvia pupal. Dos adultos que após a emergência não conseguiram se desprender da exúvia, um originou-se de uma larva infectada com uma metacercária no tórax e o outro desenvolveu-se de uma larva com três metacercárias, sendo uma no tórax e duas nos segmentos abdominais (terceiro e sétimo). Esses dados reforçam a observação feita no experimento 5 que a localização das metacercárias na larva de mosquito pode causar distúrbios no metabolismo do hospedeiro levando a morte ou causando anomalias.

Ocorreu um avanço estatisticamente significativo (1,2 vezes) no tempo de desenvolvimento das L₄ até adulto, em relação ao tempo necessário para as larvas testemunha atingirem o mesmo estágio.

Tabela 11 – Porcentagem média e desvio padrão (DP) do parasitismo resultante da exposição agrupada de larvas de *Ae. albopictus* de 4º estágio à X-LC na concentração de dez cerc./larva (= 10cerc./ml) e individualizadas 24 h após, para 2 repetições.

nº de metacercária por larva	ocor-rência %	localização na larva %					% de mortos em			% adult emergidos	média dias p/ emergir
		ce	ca	to	ab	la	L ₄	PP	P		
1	62,5 (10,6)		3,8 (2,8)	28,4 (9,4)	8,3 (5,6)		8,8 (1,7)	5,0 (0)	13,8 (1,7)	35,0 (10,6)	6,8 (1,2)
2	22,5 (10,6)		2,1 (3,0)	13,3 (3,8)	10,0 (4,2)	2,1 (3,0)	7,5 (3,5)	2,5 (3,5)	10,0 (7,0)	2,5 (3,5)	4,5 (6,3)
3	10,0 (3,5)		1,8 (2,4)	6,4 (0,8)	11,5 (6,0)		7,5 (3,5)	1,2 (1,7)	0	1,2 (1,7)	3,5 (4,9)
4	5,0 (3,5)	0,8 (0,8)	1,5 (2,1)	2,1 (3,0)	7,9 (1,2)		3,8 (5,3)	0	1,2 (1,7)		
Soma	100	0,8	9,2	50,2	37,7	2,1	27,6	8,7	25	38,7	

ce - cérvix; ca - cabeça; to - tórax; ab - segm. abdominais; la - lobo anal; metac - metacercárias; L₄ - larvas; PP - pré-pupa; P - pupa.

Comparado aos experimentos anteriores com larvas de *Ae. albopictus* expostas individualizadas, este experimento apresentou uma mortalidade um pouco mais elevada [61,3% (DP = 5,3)] que os experimentos 5 e 6 [58% (DP = 25) e 43,4%], e praticamente igual à obtida no experimento 2 (61,1%), mas de qualquer forma não diferindo pelo Teste “t” ($p > 0,05$).

Confirma-se assim nesse experimento uma aparente independência da densidade de cercárias (por volume) na taxa de larvas parasitadas (sempre 100%), e na mortalidade final.

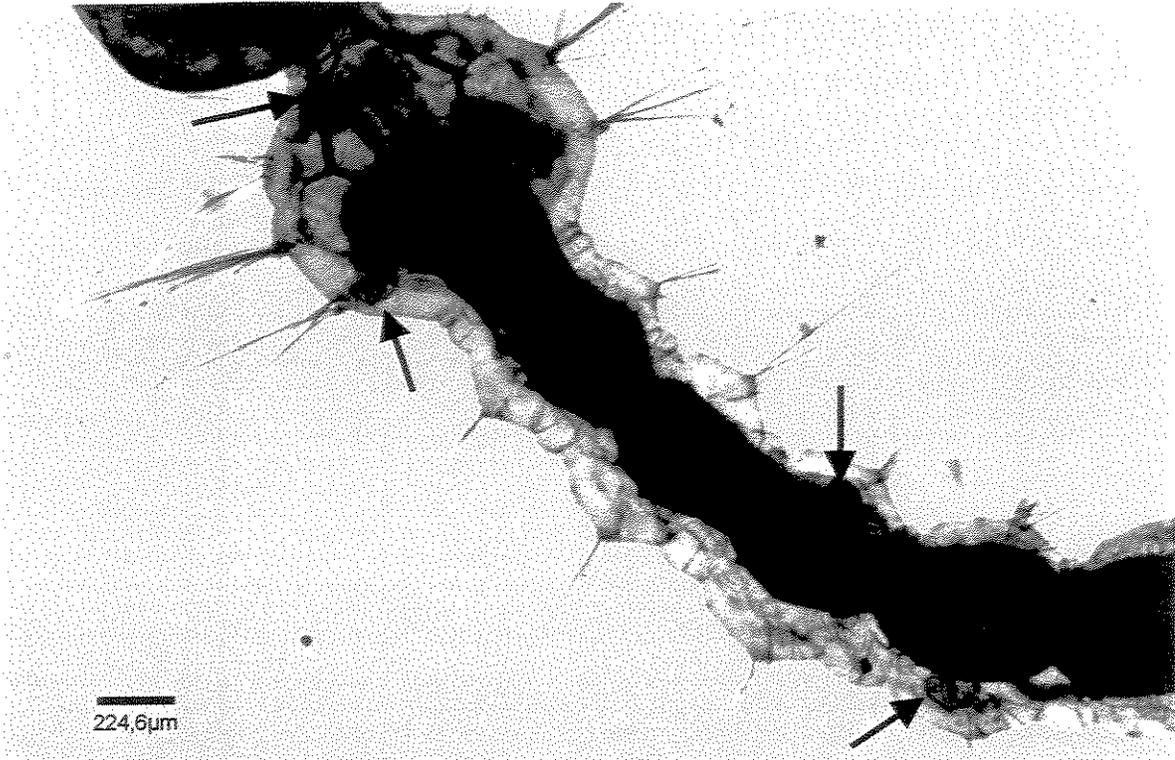
Comparando-se entretanto a porcentagem de xifidiocercárias que penetraram nas larvas de *Ae. albopictus* no experimento com larvas individualizadas [24,2% (DP = 4,0)], com a do experimento 7 onde as larvas foram expostas agrupadas [15,75% (DP = 6,0) de penetração de xifidiocercárias] nota-se uma diferença significativa ($p \leq 0,05$). Apesar da quantidade de cercárias por larvas ser a mesma (10), no 5º experimento cada larva estava dispersa em 6 ml de água, enquanto no 7º experimento, 40 larvas foram agrupadas em 40 ml de água, confirmando as observações de WEBBER *et al.* (1989) de que larvas confinadas são realmente menos susceptíveis.

4.3.1.1.8. Metacercárias

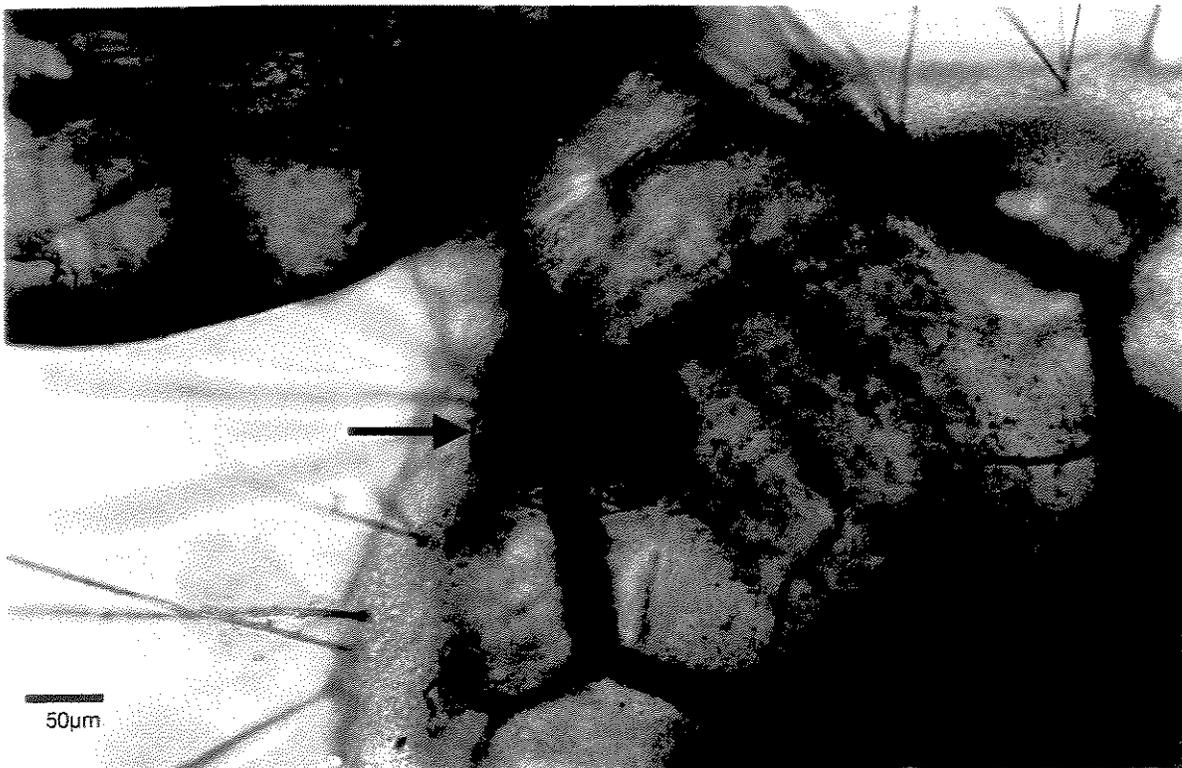
Nos experimentos 5 a 7 observou-se as metacercárias no interior das larvas dos mosquitos, sendo que a variação da sua localização nas larvas de *Ae. albopictus* provavelmente pode ser atribuída a diferença nos locais de penetração das cercárias (Fig. 10). Nos experimentos como um todo, encontrou-se maior porcentagem média de metacercárias encistadas no tórax com 39,7 (DP = 10,7), nos segmentos abdominais com 35,2 (DP = 4,7) e cabeça com 21,4 (DP = 15,1), um pequeno número foi encontrado no lobo anal com 3,3 (DP = 1,3) e cérvix com 0,4 (DP = 0,4).

Mesmo em pequeno número, dependendo da localização no interior das larvas de *Ae. albopictus*, as metacercárias podem causar mortalidade. Assim, acredita-se que do ponto de vista patológico a localização das metacercárias possa ser algumas vezes mais importante que a quantidade, pois além da absorção de nutrientes, elas também impõem uma ação mecânica devido à compressão de órgãos e estruturas essenciais à sobrevivência das larvas.

Observou-se que mosquitos adultos originados de larvas infectadas tinham metacercárias vivas e muito ativas quando esmagados. Experimentalmente portanto, adultos sugerem ter papel importante na disseminação do parasita.



A – metacercárias encistadas nos segmentos abdominais e tórax.



B – metacercária encistada no tórax.

Fig. 10 – Larva de *Ae. albopictus* parasitada por X-LC, mostrando metacercárias encistadas.

Os resultados dos estudos descritos no presente trabalho estão de acordo com estudos realizados por outros pesquisadores, que indicam ser as cercárias entomofílicas, como por exemplo as pertencentes aos trematódeos dos gêneros *Plagiorchis*, *Prosthogonimus* e *Haematoloechus*, de elevado potencial como agentes de controle biológico de mosquitos.

Do ponto de vista ecológico, um parasita para ser bem sucedido contra determinada espécie alvo não pode ser tão patogênico a ponto de causar rapidamente a mortalidade do hospedeiro de forma a inviabilizar sua multiplicação (ANDERSON, 1982). Um bom equilíbrio entre patogenicidade e habilidade para reciclar ocorre freqüentemente nos trematódeos. Os Digenea entomofílicos promovem uma patogenicidade acentuada e periódica, com a liberação de cercárias em quantidade, onde moluscos uma vez infectados nas populações naturais dos criadouros podem ser infectadas com ovos do parasita. As xifidiocercárias são essencialmente densidade independente em sua ação, podendo ser facilmente integradas com outros agentes como os inseticidas químicos, B.t.i. ou peixes predadores (WEBBER *et al.*, 1987). Porém, segundo HAMON (1981), poderiam atuar como os inseticidas biológicos, que necessitam de repetições freqüentes das aplicações.

Os trematódeos necessitam como pré-requisito que exista no ambiente os hospedeiros intermediários e definitivos para que completem o ciclo. A introdução de moluscos infectados ou a infecção natural de populações locais com ovos do parasita garantem a manutenção do ciclo por longo período de tempo. Devido a esses requisitos, as xifidiocercárias entomofílicas devem proporcionar naturalmente algum controle sobre as populações de mosquitos em criadouros onde ocorrem. Criadouros como os de *Anopheles* e *Culex* são mais prováveis para a manutenção do ciclo desses trematódeos. Já para mosquitos das espécies *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* é pouco viável a utilização dessas cercárias, por terem como criadouros pequenas coleções de água e principalmente dentro das habitações humanas. Mesmo porque, o controle mais eficiente para estas espécies deve vir da mudança de hábito das pessoas e eliminação de criadouros. Porém, *Ae. albopictus* cada vez mais tem sido encontrado no Brasil em criadouros incomuns para a espécie. Já foi relatado seu encontro em ocos de bambus (NEVES & SILVA, 1989), em bromélias (FORATTINI *et al.*, 1998a) e em um buraco no solo provocado pela queda de uma árvore em mata residual. Juntamente com *Ae. albopictus* foram encontrados Cx.

declarator, *Cx. quinquefasciatus* e espécies de *Culex* do grupo *Coronator* (FORATTINI *et al.*, 1998b). Para criadouros como este último, a possibilidade de utilização de agentes naturais como as xifidiocercárias torna-se bastante tentadora.

Os mosquitos *Ae. scapularis* (Rondani, 1848), *Cx. coronator* Dyar e Knab, 1906 e *Cx. declarator* Dyar e Knab, 1906, que têm como criadouros locais silvestres, foram encontrados durante a execução desse trabalho. Ocorreram sintopicamente com os moluscos infectados por xifidiocercárias na água acumulada em pegadas de bovinos e poderiam perfeitamente estar sendo infectados naturalmente embora tenham sido avaliados e não apresentavam infecção. A importância médica de *Ae. scapularis* é que em condições experimentais se mostrou vetor eficiente do vírus da febre amarela, encefalite de Saint Louis em Trinidad e da encefalite venezuelana, além de em Florianópolis, SC, Brasil, ter sido incriminado como transmissor de *Wuchereria bancrofti* (FORATTINI, 1965). O mesmo autor relata que *Cx. coronator* e *Cx. declarator* por sua vez podem transmitir os vírus da encefalite de Saint Louis, no Brasil e em Trinidad e encefalite venezuelana, no México.

Do ponto de vista da segurança do emprego de xifidiocercárias, o impacto da introdução desses parasitas sobre espécies não alvo necessita ainda de alguns estudos, principalmente quando se refere a algumas espécies de trematódeos do gênero *Plagiorchis* que possuem mamíferos como hospedeiro definitivo. Estes, poderiam infectar o homem acidentalmente. Já no caso de espécies de *Haematoloechus* que tem anfíbios como hospedeiros definitivos, esse risco seria provavelmente desprezível.

Além do controle natural que xifidiocercárias realizam sobre as larvas de mosquitos que infectam, poderiam também ser utilizadas em programas de controle integrado de mosquitos onde comunidades locais, por exemplo na Amazônia, ou mesmo no Vale do Ribeira, fariam a manutenção do ciclo desses trematódeos em tanques semi-naturais com supervisão e treinamento de agentes de saúde, e introduziriam moluscos infectados com xifidiocercárias nos criadouros de *Anopheles* ou outros mosquitos alvo. Outra possibilidade de utilização de xifidiocercárias no controle biológico também, seria para o controle de mosquitos em áreas recreacionais como pesqueiros (pesque & pague). Esses ambientes frequentemente estão circundados por regiões alagadas que tornam-se importantes criadouros de mosquitos e óbvio incômodo ao lazer. Como alternativa ao controle químico, poderiam ser

mantidos viveiros com o ciclo dos digenéticos e a liberação de moluscos infectados com xifidiocercárias.

4.3.2. Exposição às xifidiocercárias eliminadas por *D. lucidum* e *B. tenagophila*

4.3.2.1. Experimentos 8 e 9 – Larvas individualizadas de *Ae. albopictus* (L₄)

Quando as larvas de *Ae. albopictus* foram expostas à concentração de cinco xifidiocercárias eliminadas por *D. lucidum* por indivíduo, apresentaram 61,1% de mortalidade, iniciada cinco dias após a exposição e prolongando-se até o 35º dia. Já a exposição a dez xifidiocercárias por larva, resultou em 90% de mortalidade, iniciando-se quatro dias após a exposição e prolongando-se até o 34º dia. Apesar da alta mortalidade nas exposições às duas concentrações de cercárias, não foi possível confirmar a presença de nenhuma metacercária no interior das larvas. Observou-se em sete larvas apenas estruturas que sugeriam ser metacercárias, mas como não havia movimento e órgãos definidos dentro dessas estruturas, não se pôde afirmar a formação desta fase evolutiva do parasita.

4.3.2.2. Experimento 10 - Larvas agrupadas de *Ae. albopictus* (L₄)

Neste experimento onde as larvas foram expostas a xifidiocercárias eliminadas por *B. tenagophila* houve mortalidade de 40%, sendo duas larvas de 4º estágio de *Ae. albopictus* 22 dias após a infecção e seis pré-pupas (quatro, seis dias após e duas, oito dias após a infecção). A sobrevivência foi representada por adultos que emergiram (total de 12) entre o sexto e sétimo dia após a infecção.

Nas larvas e pré-pupas mortas também observou-se somente estruturas que sugeriam ser metacercárias, porém não houve constatação de movimentos nem de órgãos definidos no interior das mesmas. Por esse motivo não foi possível também confirmar a presença de metacercárias em nenhum dos indivíduos.

Nos experimentos 8 a 10 acredita-se que tenha ocorrido penetração de xifidiocercárias nas larvas de *Ae. albopictus*, porém talvez por especificidade do hospedeiro estas não tenham se desenvolvido, mas sendo de qualquer forma suficiente para causar mortalidade.

5. CONCLUSÕES

- 1) Os moluscos coletados nas localidades estudadas foram: *Lymnaea columella*, *Physa marmorata*, *Biomphalaria tenagophila*, *Drepanotrema lucidum* e *D. cimex*. Também foram coletados exemplares de *Biomphalaria* e *Drepanotrema*, dos quais não foram identificadas as espécies, podendo pertencer às acima mencionadas.
- 2) A maior prevalência de parasitismo em moluscos foi observada em exemplares coletados em Miracatu, SP, sendo que *B. tenagophila* apresentou 1,5% de parasitismo por furcocercárias, 1,5 a 15,6% por xifidiocercárias e 14,1% por cercárias de equinostomatídeo. Enquanto que em *L. columella* o parasitismo por xifidiocercárias teve uma ocorrência que variou de 0,4 a 8,3%, cercárias de *Fasciola hepatica* ocorreram na faixa de 0,2 a 1,0% e o parasitismo por cercárias de equinostomatídeo foi de 3,3%.
- 3) As xifidiocercárias eliminadas por *L. columella* possuíam uma membrana terminal na cauda e as xifidiocercárias que foram eliminadas por moluscos das espécies *B. tenagophila* e *D. lucidum* tinham morfologia similar, porém não tinham a referida membrana. Estudos morfológicos comparativos as descrições da literatura, indicam que as xifidiocercárias eliminadas por *L. columella* pertencem a um trematódeo da família Haematoloechidae, mais provavelmente pertencente ao gênero *Haematoloechus*.
- 4) As xifidiocercárias eliminadas por *L. columella* são seguramente entomopatogênicas, pois observou-se nos experimentos que penetraram e encistaram nas larvas de mosquito das espécies *Aedes albopictus*, *Ae. aegypti* e *Culex quinquefasciatus* formando metacercárias. O caráter entomopatogênico das xifidiocercárias eliminadas por *B. tenagophila* e *D. lucidum* não pôde ser comprovado.
- 5) O parasitismo causou na maioria das vezes grande atraso no desenvolvimento do ciclo e/ou mortalidade dos imaturos de mosquitos.

6) Larvas de *Ae. aegypti* (95% de mortalidade máxima) e *Ae. albopictus* (100%) foram mais susceptíveis ao parasitismo por X-LC que *Cx. quinquefasciatus* (72,2%) nas avaliações.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M.; MOINO Jr., A. & ALVES, L.F.A. 1998. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2a. ed., Piracicaba: FEALQ, p. 637 – 711.
- ANDERSON, R.M. 1982. Theoretical basis for the use of pathogens as biological control agents of pest species. **Parasitology**, **84**: 3 – 33.
- ANDRADE, C.F.S. 1989. **Ecologia de supressão de populações de culicídeos e simulídeos**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 253 pp.
- ANDRADE, C.F.S. 1995. Manejo integrado de mosquitos. I **Seminário Nacional sobre Pragas Urbanas e Saúde Pública**. Passo Fundo, RS, 15 a 17 de maio, 12-22.
- ARRUDA, M.E.; CARVALHO, M.B.; NUSSENZWEIG, R.S.; MARACIC, M.; FERREIRA, A.W. & COCHRANE, A.H. 1986. Potential vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in northern Brazil identified by immunoassay. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **35**: 873 – 881.
- ASADA, J.I.; OTAGAKI, H.; MORITA, M.; TAKEUCHI, T.; SAKAI, Y.; KONOSHI, T. & OKAHASHI, K. 1962. A case report on the human infection with *Plagiorchis muris* Tanabe, 1922 in Japan. **Japan. J. Parasitol.**, **11**: 512 - 516.
- AXTELL, R.C. 1979. Principles of integrated pest management (IPM) in relation to mosquito control. **Mosq. News**, **39**(4): 709 – 736.
- BAYSSADE-DUFOUR, C. & GRABDA-KAZUBSKA, B. 1993. Systematic revision of *Omphalometra flexuosa* (Digenea, Plagiorchiata): Relationship with *Opisthioglyphe*, *Lecithopyge* and *Plagiorchis* genera. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.**, **68**(2): 82-87.
- BLANKESPOOR, H.D. 1977. Notes on the biology of *Plagiorchis noblei* Park, 1936 (Trematoda: Plagiorchiidae). **Proc. Helminthol. Soc.**, **44**(1): 44-50.
- BOCK, D. 1984. The life cycle of *Plagiorchis spec.* 1, a species of the *Plagiorchis elegans* group (Trematoda, Plagiorchiidae). **Z. Parasitenkd.**, **70**(3): 359-373.
- BOCK, D. & JANSSEN, O. 1987. The life-cycle of *Plagiorchis maculosus* (Rudolphi, 1802) Braun, 1902 (Trematoda: Plagiorchiidae), a parasite of swallows (Hirundinidae). **Syst. Parasitol.**, **9**(3): 203-212.
- BOURGAT, R. & KULO, S.D. 1979. Cycle biologique d'*Haematoloechus johnsoni* Bourgat, 1977, (Trématode) parasite pulmonaire de *Dicroglossus occipitalis* (Günther, 1858) (Amphibien, Anoure) au Togo. **Rev. S. Zool.**, **86**(2): 467 – 472.

- BROKS, D.R. & McLENNAN, D.A. 1993. **Parascript. Parasites and the language of evolution.** Washington, D.C., Smithsonian Institution Press.
- BROOKE, J.P. & KING, J.B. 1977. Some entomological aspects of integrated control of vector borne disease. *Mosq. News*, **37**: 339-343.
- BUSTA, J. 1985. Scanning electron microscopy of the cercaria, metacercaria and adult of *Plagiorchis elegans* (Trematoda: Plagiorchiidae). *Prague*, **32**(4): 317-321.
- BUSTA, J. & NASINCOVA, V. 1986. *Plagiorchis neomidis*, new record (Trematoda: Plagiorchiidae) in Czechoslovakia and studies on its life cycle. *Prague*, **33**(2): 123-129.
- CASTELLO BRANCO Jr., A. 1991. **Estudos ecológicos e patológicos da infecção por *Polidispyrenia simulii* (Microspora: Pleiostophoridae) em uma comunidade de simulídeos.** Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 83 pp.
- CASTELLO BRANCO Jr., A. 1994. **Patologia e epizootiologia de *Simulium pertinax* (Diptera: Simuliidae) infectado por *Polidispyrenia simulii* (Microspora: Duboscqiidae) e *Gastromermis viridis* cf. (Nematoda, Mermithidae).** Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 120 pp.
- CONSOLI, R.A.G.B. & OLIVEIRA, R.L. 1994. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, 228 pp.
- CORREA, L.R. & PARAENSE, W.L. 1971. Susceptibility of *Biomphalaria amazonica*, to infection with two strains of *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **13**: 387 – 390.
- CUPP, E.W. 1981. Blackfly Physiology. *In*: LAIRD, M. **Blackflies – The future for biological methods in integrated control.** Academic Press Inc., Orlando, p. 199 – 206.
- CUPP, E.W.; TRAVI, B.L. & GONZÁLEZ, R. 1994. Filariasis. *In*: TRAVI, B.L. & MONTOYA-LERMA, J. **Manual de entomologia medica para investigadores de America Latina.** 1^a ed., CIDEIM, Cali, p. 85 – 160.
- DANIELL, D.L. & ULMER, M.J. 1964. Life cycle of *Plagiorchis noblei* Park, 1936 (Trematoda: Plagiorchiidae). *J. Parasitol.*, **50**(2/3):46.
- DEANE, L.M. 1986. Malaria vectors in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **81** Suppl. II: 5 – 14.
- DEMPSTER, S.J. & RAU, M.E. 1989. *Plagiorchis noblei* in *Aedes aegypti*: cercarial age and infectivity. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.*, **5**(2): 261 – 263.

- DEMPSTER, S.J. & RAU, M.E. 1987. Factors affecting the acquisition of *Plagiorchis noblei* (Trematoda: Plagiorchiidae) metacercariae by larvae and pupae of *Aedes aegypti* in the laboratory. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, 3(4): 607-610.
- DEMPSTER, S.J. & RAU, M.E. 1990. The effects of single exposures of *Aedes aegypti* larvae and pupae to *Plagiorchis noblei* cercariae in the laboratory. **J. Parasitol.**, 76(3): 307-309.
- DEMPSTER, S.J. & RAU, M.E. 1991. *Plagiorchis noblei* (Plagiorchiidae) in *Aedes aegypti*: Parasite acquisition and host mortality in trickle infections. **J. Parasitol.**, 77(1): 111-112.
- DEMPSTER, S.J.; WEBBER, R.A.; RAU, M.E. & LEWIS, D.J. 1986. The effects of *Plagiorchis noblei* metacercariae on the development and survival of *Aedes aegypti* larvae in the laboratory. **J. Parasitol.**, 72(5): 699-702.
- DOLLFUS, R.P.; DOBY, J.M. & LAURENT, P. 1960. Sur une xiphidiocercaire parasitant *Limnaea truncatula* (O. F. Muller) en Haute-Savoie et s'enkystant dans des larves de moustiques. **Bull. Soc. Zool. France**, 85(5-6): 331-347.
- DRONEN, N.O. 1975. The cycle of *Haematoloechus coloradensis* Cort 1915 (Digenea: Plagiorchiidae), with emphasis on host susceptibility to infection. **J. Parasitol.**, 61(4): 657-660.
- DRONEN, N.O. 1977. Studies on the population structures of two species of *Haematoloechus* Loss, 1899 (Digenea: Plagiorchiidae) in Raniid frogs in New Mexico. **Proc. Helminthol. Soc.**, 44(1): 68-72.
- EKLU-NATEY, D.T.; AL-KHUDRI, M.; GAUTHEY, D.; WUEST, J.; VAUCHER, C. & HUGGEL, H. 1985. Contribution to the study of the cercariae in the Lake of Geneva (Switzerland): II. Simple tail cercariae. **Rev. Suis. Zool.**, 92(4): 927-938.
- ESTRADA-FRANCO, J.G. & CRAIG, Jr., G.B. 1995. **Biología, relaciones con enfermedades y control de *Aedes albopictus***. Cuaderno Técnico n° 42, OPS, Washington, 52 pp.
- FARIAS, J.D. & CANARIS, A. G. 1986. Gastrointestinal helminths of the Mexican duck, *Anas platyrhynchos diazi*, from north central Mexico and southwestern USA. **J. Wildl. Dis.**, 22(1): 51-54.
- FERNANDEZ, J. & ESCH, G.W. 1991. Guild structure of larval trematodes in the snail *Helisoma anceps*: patterns and processes at the individual host level. **J. Parasitol.**, 77(4): 528 - 539.
- FORATTINI, O. P. 1965. **Entomologia Médica**. vol. II. Fac. Saúde Pública. Univ. São Paulo, São Paulo. 506 pp.
- FORATTINI, O.P. 1996. **Culicidologia Médica**. vol. I. da Univ. de São Paulo, São Paulo. 549 pp.

- FORATTINI, O.P.; MARQUES, G.R.A.M.; KAKITANI, I.; BRITO, M. & SALLUM, M.A.M. 1998a. Significado epidemiológico dos criadouros de *Aedes albopictus* em bromélias. *Rev. Saúde Pública*, **32**(2): 186 – 188.
- FORATTINI, O.P.; MARQUES, G.R.A.M.; KAKITANI, I.; BRITO, M. & SALLUM, M.A.M. 1998b. An unusual ground larval habitat of *Aedes albopictus*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **40**(2): 121-122.
- FRIED, B. 1994. Metacercarial excystament of trematodes. *Adv. Parasitol.*, **33**: 91 – 144.
- GALLOWAY, T.D. & BRUST, R.A. 1985. The effects of parasitism by *Romanomermis culicivorax* (Nematoda: Mermithidae) on growth and development of *Aedes vexans* (Diptera: Culicidae) in laboratory fields tests. *Can. J. Zool.*, **63**: 2437 – 2442.
- GORDON, R.; EBSARY, B.A. & BENNETT, G.F. 1973. Potentialities of mermithid nematods for the biocontrol of blackflies (Diptera: Simuliidae) – A Review. *Exp. Parasitol.*, **33**: 226 – 238.
- GRABDA, B. 1960. Life cycle of *Haematoloechus similis* (Looss, 1899) (Trematoda - Plagiorchiidae). *Acta Parasitol. Polonica*, **8**(23): 357-367.
- HAMON, J. 1981. Control of vectors by parasites and pathogens. *Parasitology*, **82**: 117 – 129.
- HARRY, H.W.; CUMBIE, B.C. & JESUS, M. 1957. Studies on the quality of fresh waters of Puerto Rico relative to the occurrence of *Australorbis glabratus* (Say). *Am. J. Trop. Med. Hygiene*, **6**: 313 – 322.
- HARWOOD, R.F. & JAMES, M.T. 1979. *Entomology in human and animal health*. 7th ed., Macmillan Publ. Co., Inc., New York, p. 169 – 233.
- HAAS, W. 1992. Physiological analysis of cercarial behavior. *J. Parasitol.*, **78**(2): 243 – 255.
- HOMINICK, W.M. & TINGLEY, G.A. 1984. Mermithid nematodes and the control of insects vectors of human disease. *Biocontrol News Inform.*, **5**: 7 – 21.
- HONG, S.J.; WOO, H.C. & CHAI, J.Y. 1996. A Human case of *Plagiorchis muris* (Tanabe, 1922: Digenea) infection in the republic of Korea: freshwater fish as a possible source of infection. *J. Parasitol.*, **82**(4): 647 - 649.
- HYMAN, L.H. 1967. *The invertebrates*: volume VI, Mollusca I. McGraw-Hill Book Company, New York, vii + 792 pp.
- ISLAM, M.R.; SHAIKH, H. & BAKI, M.A. 1988. Prevalence and pathology of helminth parasites in domestic ducks of Bangladesh. *Vet. Parasitol.*, **29**(1): 73-78.

- JACOBS, P.; RAU, M.E. & LEWIS, D.J. 1993. Factors affecting acquisition of *Plagiorchis noblei* (Trematoda: Plagiorchiidae) cercariae by black fly (Diptera: Simuliidae) larvae and the effect of metacercariae on host survival. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, 9(1): 36-45.
- KENNEDY, M.J. 1981. A revision of species of the genus *Haematoloechus* Looss, 1899 (Trematoda: Haematoloechidae) from Canada and the United States. **Can. J. Zool.**, 59: 1836-1846.
- KRULL, W.H. 1930. The life history of two North American frog lung flukes. **J. Parasitol.**, 16: 207-212.
- KRULL, W.H. 1931. Life history studies on two frog lung flukes, *Pneumobites medioplexus* and *Pneumobites parvioplexus*. **Trans. Amer. Microsc. Soc.**, 50: 215-277.
- KRULL, W.H. 1932. Studies on the life history of *Pneumobites longioplexus* (Stafford). **Zool. Anz.**, 99: 231-239.
- KRULL, W.H. 1933a. Studies on the life history of a frog lung fluke, *Haematoloechus complexus* (Seely, 1906) Krull, n. comb. **Parasitol. Res.**, 6: 192-206.
- KRULL, W.H. 1933b. The snail *Pseudosuccinea columella* (Say) as a potentially important intermediate host in extending the range of *Fasciola hepatica* Linn. **J. Wash. Acad. Sci.**, 23: 389-391.
- KRULL, W.H. 1934. Some additional notes on the life history of a frog lung fluke, *Haematoloechus complexus* (Seely, 1906) Krull. **Trans. Amer. Microsc. Soc.**, 53: 196-199.
- LACEY, L.A. & ORR, B.K. 1994. The role of biological-control of mosquitoes in integrated vector control. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 50(6): 97 – 115, Suppl. S.
- LEME, J.L.M. 1995. Morfologia geral dos moluscos, em particular da classe Gastropoda. In: BARBOSA, F.S. **Tópicos em Malacologia Médica**. Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, p. 15 – 49.
- LOWENBERGER, C.A. & RAU, M.E. 1993. *Plagiorchis elegans*: Requirements for metacercarial development to infectivity, and conditions required for excystment. **J. Helminthol. Soc. Washington**, 60(1):67-71.
- LOWENBERGER, C.A. & RAU, M.E. 1994. *Plagiorchis elegans*: Emergence, longevity and infectivity of cercariae, and host behavioural modifications during cercarial emergence. **Parasitology**, 109(1): 65-72.
- LOWENBERGER, C.A.; CHADEE, K. & RAU, M.E. 1994. In vitro uptake and incorporation of (3H)glucosamine and (3H)leucine by *Plagiorchis elegans* metacercariae. **J. Parasitol.**, 80(3): 363-370.

- MACY, R.W. 1960. The life cycle of *Plagiorchis vespertilionis parorchis*, n. sp. (Trematoda: Plagiorchiidae), and observations on the effects of light on the emergence of cercariae. **J. Parasitol.**, **46**: 337-345.
- MALEK, E.A. 1958. Factors conditioning the habitat of bilharziasis intermediate hosts of the family Planorbidae. **Bull. Wld. Hlth. Org.**, **18**: 785 – 818.
- MANGA-GONZALEZ, Y.; GONZALEZ-LANZA, C. & KANEV, I. 1994. *Lymnaea truncatula*, intermediate host of some plagiorchiidae and notocotylidae species in Leon, NW Spain. **J. Helminthol.**, **68**(2): 135-141.
- MELO, A.S.; MACEDO, A.C.C. & ANDRADE, C.F.S. 1996. Eficiência de *Dugesia tigrina* (Girardia) (Turbellaria: Tricladida) como agente controlador de imaturos do mosquito *Aedes albopictus* (Skuse) em pneus-armadilha. **An. Soc. Entomol. Brasil.**, **25**(2): 321 – 327.
- MHAISEN, F.T.; KHAMEES, N.R. & SAYAB, A.A. 1990. Flat worms (Platyhelminthes) of two species of gull (*Larus ichthyaetus* and *Larus camus*) from Basrah, Iraq. **Zool. Mid. East**, **4**(0): 113-116.
- MIJARES, A.S. & BROCHE, R.G. 1987. Efecto de distintos fotoperiodos en la infestacion de *Romanormis culicivora* Ross y Smith, 1976 (Rhabditida: Mermithidae) en larvas de mosquito de la especie *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 en condiciones de laboratorio. **Rev. Cubana Med. Trop.**, **39**(1): 63 – 66.
- MUIRSON, D. 1997. Liver fluke disease and the liver fluke snail. **Farmnote**, <http://www.agric.wa.gov.au/AGENCY/PUBNS/FARMNOTE/1994/F05394.HTM>
- NEVES, D.P. & SILVA, R.F. 1989. Aspectos da biologia do *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae), a nível de campo. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **84**, Supl. IV, 403-404.
- OLSEN, O.W. 1974. **Animal parasites: Their life cycles and ecology**. University Park Press, Baltimore, Maryland, 562 p.
- PARAENSE, W.L. 1973. Susceptibility of *Biomphalaria peregriana* from Brazil and Ecuador to two strains of *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, **15**: 127 – 130.
- PARAENSE, W.L. 1981. Gastropoda. In: HURLBERT, S.H.; RODRIGUES, G. & SANTOS, N.D. **Aquatic Biota of Tropical South America, Part. 2: Anarthropoda**. San Diego State University, California, p. 200 – 207.
- PARAENSE, W.L. & CORREA, L.R. 1985. Further experiments on susceptibility of *Biomphalaria amazonica* to *Schistosoma mansoni*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **80**: 259 – 262.
- PETERSEN, J.J. 1985. Nematodes as biological control agents: part I. Mermithidae. **Adv. Parasitol.**, **24**: 307 – 344.

- PINHEIRO, F.P.; COSTA JR., D.; BENSABATH, G. & ANDRADE, A. 1982. Síndrome hemorrágica de Altamira. *In: VERONESI, R. Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, p. 1158-1159.
- POINTIER, J.P.; SALVAT, B.; DELPLANQUE, A. & GOLVAN, Y. 1977. Principaux facteurs regissant la densité des populations de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), mollusque vecteur de la schistosome en Guadeloupe (Antilles françaises). *An. Parasitol.*, **52**: 277 – 323.
- QIU, J. & LIU, Z. 1984. Life histories of *Prosthogonimus pellucidus*: larval development in the intermediate hosts (Trematoda: Prosthogonimidae). *Acta Zool. Sinica*, **30**(2): 167-172.
- QUAGIOTTO, A. & VALVERDE, F. 1995. Estadios larvales de trematodes digeneos en *Chilina* sp. (Mollusca, Pulmonata) de algunos cuerpos de agua de Patagonia, Argentina. *Bol. Chil. Parasitol.*, **50**: 33 – 36.
- RADOMYOS, P.; BUNNAG, D. & HARINASUTA, T. 1989. A new intestinal fluke, *Plagiorchis harinasutai* n. sp. *South. Asian J. Trop. Med. Pub. Health*, **20**: 101 – 107.
- RAI, K.S. 1991. *Aedes albopictus* in the Americas. *Ann. Rev. Entomol.*, **36**: 459 – 484.
- RAO, P.V.; BABU, R.; GURAPPA, K. & KUMAR, A.G. 1985. Larval mosquito control through deployment of xiphidiocercariae. *J. Invert. Pathol.*, **46**: 1-4.
- RAU, M.E. 1992. Les digéniens entomophiles et la lutte contre les moustiques. *In: VICENT, C & CODERRE, D. (eds.) La Lutte Biologique*. Morin, Boucherville, Québec. p. 251 - 263.
- RAU, M.E.; AHMED, S.S. & LEWIS, D.J. 1991. Impact of the entomophilic digenean *Plagiorchis noblei* (Trematoda: Plagiorchiidae) on the survival of *Aedes provocans* under field conditions. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, **7**(2): 194-197.
- REINERT, J.F. 1975. Mosquito generic and subgeneric abbreviations (Diptera: Culicidae). *Mosq. Syst.*, **7**: 105 – 110.
- REY, L. & PESSOA, S.B. 1953. Contribuição ao estudo dos focos de *Australorbis glabratus* (transmissor da esquistossomose mansônica) em Sergipe. *Rev. Ci. S. Paulo*, **29**: 85 – 108.
- RICCI, M. 1995. Contribution to a revision of the genus *Plagiorchis* (Trematoda: Digenea: Plagiorchiidae). *Parassitologia*, **37**: 25 – 28.
- ROBERTS, D.W. & CASTILLO, J.M. 1980. Bibliography on pathogens of medically important arthropods: 1980. *Bull. Wld. Hlth. Org. (Supl.)*, **58**, 197 pp.

- ROBERTS, D.W. & STRAND, M.A. 1977. Pathogens of medically important arthropods. **Bull. Wld. Hlth. Org.** (Supl. n. 1), **55**, 419 pp.
- ROBERTS, L.S. & JANOVY Jr, J. 1996. Digeneans: Plagiorchiformes and Opisthorchiformes. *In*: SCHMIDT, G.D. & ROBERTS, L.S. **Foundations of parasitology**. 5 th edition, Wm. C. Brown Publishers, Dubuque, p. 263 - 279.
- RUAS NETO, A.L.; CALDAS, E.P. & SOUZA, M.A.T. 1984. Projeto de controle de simuliídeos: plano de pesquisa e dados coligidos. **B. Saúde**, Porto Alegre, **11**(2): 17-20.
- SANTOS, L.U. 1997. **Estudos sobre *Mesocyclops longisetus* var. *longisetus* (Thiebaud) Dussart (Copepoda: Cyclopidae) visando o controle dos mosquitos vetores da dengue**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 89 pp.
- SHELL, S.C. 1965. The life history of *Haematoloechus breviplexus* Stafford, 1902 (Trematoda: Haplometridae McMullen, 1937), with emphasis on the development of the sporocysts. **J. Parasitol.**, **51**: 587-593.
- SERUFO, J.C.; OCA, H.M.; TAVARES, V.A.; SOUZA, A.M.; ROSA, R.V.; JAMAL, M.C.; LEMOS, J.R.; OLIVEIRA, M.A.; NOGUEIRA, R.M.R. & SCHATZMAYR, H.G. 1993. Isolation of dengue virus type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos city, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **83**(3): 503-504. Research Note.
- SHIELDS, J.D. 1987. Pathology and mortality of the lung fluke *Haematoloechus longiplexus* (Trematoda) in *Rana catesbeiana*. **J. Parasitol.**, **73**(5): 1005-1013.
- SNYDER, S.D. & ESCH, G.W. 1993. Trematode community structure in the pulmonate snail *Physa gyrina*. **J. Parasitol.**, **79**(2): 205 - 215.
- SNYDER, S.D. & JANOVY Jr, J. 1996. Behavioral basis of second intermediate host specificity among four species of *Haematoloechus* (Digenea: Haematoloechidae). **J. Parasitol.**, **82**(1): 94 - 99.
- SNYDER, S.D. & JANOVY, J. 1994. Second intermediate host-specificity of *Haematoloechus complexus* and *Haematoloechus medioplexus* (Digenea: Haematoloechidae). **J. Parasitol.**, **80**(6): 1052-1055.
- STRICKLAND, E.H. 1911. Some parasites of *Simulium* larvae and their effects on the development of the host. **Biol. Bull.**, **21**: 302 - 338.
- TAFT, S.J. 1990. Cinphotomicrographic and histochemical observations on cercarial penetration and encystment by *Plagiorchis* sp. in larvae of *Chaoborus* sp. **Trans. Am. Microsc. Soc.**, **109**(2): 160 - 167.

- TANG, C.; TANG, Z.; CAO, H.; TANG, L.; CUI, G.; QIAN, Y. & LU, H. 1986. A studies on larval trematodes of freshwater molluscs of Koersin Pasture in Inner Mongolia Autonomus Region (China). *Acta Zool. Sinica*, **32**(4): 335-343.
- TIETZE, N.S.; HESTER, P.G.; SHAFFER, K.R.; PRESCOTT, S.J. & SCHREIBER, ET. 1994. Integrated management of waste tire mosquitoes utilizing *Mesocyclops longisetus* (Copepoda, Cyclopidae), *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, *Bacillus sphaericus*, and Methoprene. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.*, **10**(3): 363 – 373.
- TRAVASSOS, L. & ARTIGAS, P.T. 1927. *Pneumonoeces neivai* n. sp. trematodes do pulmão de rã. *Bol. Biol. Fasc.*, **19**: 212 – 214.
- TRAVASSOS, L. & DARRIBA, A. 1930. Pesquisas helminthologicas realizadas em Hamburgo. III. Trematodeos dos generos *Pneumonoeces* e *Ostiolum*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **23**(5): 237 – 253.
- UETA, M.T. 1976. Aspectos morfométricos e biológicos de *Lymnaea columella* Say, 1817 (Gastropoda, Pulmonata). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 197 pp.
- VAN THEIL, P.H. 1930. Die Entwicklung von *Agamodistomon anopheles* zum *Pneumonoeces variegatus* Rud. *Zentralb. Bakt., u. Infektkr.*, **117**: 103 – 112.
- VARLEY, G.C. & BUTLER, C.G. 1933. The acceleration of insects by parasitism. *Parasitology*, **25**: 263 – 268.
- VASCONCELOS, A.W.; SLEIGH, A.C.; KAY, B.H.; CABRAL, C.P.; ARAÚJO, D.B.; RIBEIRO, Z.M.; BRAGA, P.H. & CAVALCANTE, J.S. 1992. Community use of copepods to control *Aedes aegypti* in Brazil. In: HALSTEAD, S.B. & GÓMEZ-DANTES, H. **Dengue a worldwide problem, a comon strategy**. Proc. International Conference on Dengue and *Aedes aegypti* Community-based Control, The Rockefeller Foundation and Ministry of Health, México, p. 139 – 144.
- VASCONCELOS, P.F.C.; ROSA, A.P.A.T.; PINHEIRO, F.P.; DEGALIER, N. & ROSA, J.F.S.T. 1997. Febre Amarela. In: LEÃO, R.N.Q. **Doenças infecciosas e parasitárias: enfoque amazônico**. Ed. CEJUP: UEPA: Inst. Evandro Chagas, Belém, PA, p. 207 – 225.
- VATTANODORN, S.; INDER-SINGH, K. & KRISHNASAMY, M. 1984. A preliminary survey of helminth endoparasites of the domestic fowl *Gallus domesticus* from aborigine settlements with some new records. *Malaysian Vet. J.*, **8**(1): 13-18.
- VILARINHOS, P.T.R.; DIAS, J.M.C.S.; ANDRADE, C.F.S. & ARAÚJO-COUTINHO, C.J.P.C. 1998. Uso de bactérias para o controle de culicídeos e simúlídeos. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2a. ed., FEALQ, Piracicaba, p. 447 – 480.

- WEBBER, R.A.; RAU, M.E. & LEWIS, D.J. 1986. The effects of various light regimens on the emergence of *Plagiorchis noblei* cercariae from the molluscan intermediate host, *Stagnicola elodes*. **J. Parasitol.**, **72**(5): 703-705.
- WEBBER, R.A.; RAU, M.E. & LEWIS, D.J. 1987a. Susceptibility of *Aedes aegypti* and *Anopheles quadrimaculatus* larvae to infection with the cercariae of *Plagiorchis noblei* (Trematoda: Plagiorchiidae). **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, **3**(2): 193-195.
- WEBBER, R.A.; RAU, M.E. & LEWIS, D.J. 1987b. The effects of *Plagiorchis noblei* (Trematoda: Plagiorchiidae) metacercariae on the behavior of *Aedes aegypti* larvae. **Can. J. Zool.**, **65**(6): 1340-1342.
- WEBBER, R.A.; RAU, M.E. & LEWIS, D.J. 1987c. The effects of *Plagiorchis noblei* (Trematoda: Plagiorchiidae) metacercariae on the susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to predation by guppies (*Poecilia reticulata*) and meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*). **Can. J. Zool.**, **65**(10): 2346-2348.
- WEBBER, R.A.; RAU, M.E. & LEWIS, D.J. 1989. The effects of host distributional patterns on parasite transmission: *Aedes aegypti* larvae and *Plagiorchis noblei* cercariae. **J. Parasitol.**, **75**(5): 810-812.
- WEISER, J. & UNDEEN, A.H. 1981. Diseases of blackflies. *In*: LAIRD, M. **Blackflies – The future for biological methods in integrated control**. Academic Press Inc., Orlando, p. 181 – 196.
- WELCH, H.E. 1963. Nematode Infections. *In*: STEINHAUS, E.A. ed. **Insect pathology – an advanced treatise**. Academic Press Inc., New York, p. 363 – 392.
- WILLIAMS, R.R. 1964. Life cycle of *Plagiorchis noblei* Park, 1936. **J. Parasitol.**, **50**(3/2): 29.
- WILLIAMS, N.V. 1970. Studies on aquatic pulmonate snails in Central Africa I. Field distribution in relation to water chemistry. **Malacologia**, **10**(1): 153 – 164.
- YAMAGUTI, S. 1958. The digenetic trematodes of vertebrates v. 1, pt. 1-2. *In*: **Systema helminthum**. Interscience, New York, 1200 pp.
- YODER, H.R. & COGGINS, J.R. 1998. Larval trematode assemblages in the snail *Lymnaea stagnalis* from southeastern Wisconsin. **J. Parasitol.**, **84**(2): 259 – 268.
- ZAKIKHANI, M. & RAU, M.E. 1999. *Plagiorchis elegans* (Digenea: Plagiorchiidae) infections in *Stagnicola elodes* (Pulmonata: Lymnaeidae): Host susceptibility, growth, reproduction, mortality, and cercarial production. **J. Parasitol.**, **85**(3): 454 – 463.