

***EFEITOS HISTOPATOLÓGICOS DAS δ -ENDOTOXINAS DE Bacillus
thuringiensis sorovar israelensis EM LARVAS DE Simulium pertinax
(DIPTERA:SIMULIIDAE)***

CLARA DE FÁTIMA GOMES CAVADOS

2000

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

EFEITOS HISTOPATOLÓGICOS DAS δ -ENDOTOXINAS DE Bacillus thuringiensis sorovar israelensis EM LARVAS DE Simulium pertinax (DIPTERA:SIMULIIDAE)

CLARA DE FÁTIMA GOMES CAVADOS, 1966 -

Sob a orientação do DR. LEON RABINOVITCH (IOC/FIOCRUZ).

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau
de Philosophiae Doctor em MEDICINA VETERINÁRIA,
Área de Concentração em PARASITOLOGIA VETERINÁRIA.

Seropédica, Rio de Janeiro
Julho/ 2000.

TÍTULO DA TESE

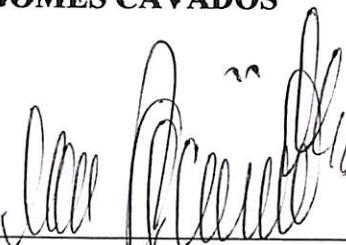
EFEITOS HISTOPATOLÓGICOS DAS δ-ENDOTOXINAS DE Bacillus thuringiensis sorovar israelensis EM LARVAS DE Simulium pertinax
(DIPTERA:SIMULIIDAE)

AUTOR

CLARA DE FÁTIMA GOMES CAVADOS

APROVADO EM, / /2000

LEON RABINOVITCH.



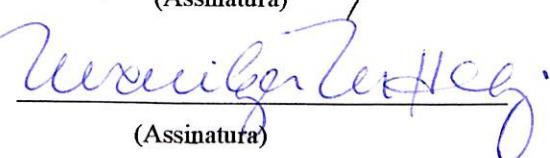
(Assinatura)

VÂNIA RITA ELIAS PINHEIRO BITTENCOURT ..



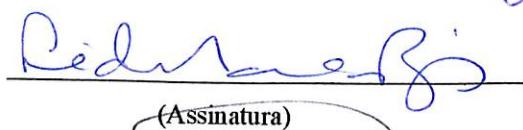
(Assinatura)

MARILZA MAIA HERZOG



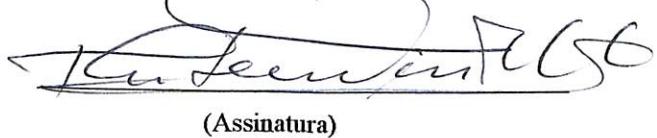
(Assinatura)

LEDA NARCISA RÉGIS



(Assinatura)

RUBENS PINTO DE MELLO



(Assinatura)

AGRADECIMENTOS:

Ao Prof. Dr. Leon Rabinovitch, do Laboratório de Fisiologia Bacteriana do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, pela orientação, estímulo, ajuda nos momentos difíceis e apoio durante a execução deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt, do Departamento de Parasitologia Animal do Instituto de Biologia da UFRRJ, pela co-orientação e constante disposição em ajudar.

Ao Prof. Dr. Carlos José P.C.A. Coutinho, Pesquisador Visitante (Convênio FIOCRUZ/SUCEN) do Laboratório de Simulídeos e Oncocercose do Departamento de Entomologia/IOC, pela identificação das larvas de *Simulium pertinax*, ajuda nos bioensaios de atividade biológica, preparo das larvas para a microscopia eletrônica, revisão dos manuscritos, incentivo, paciência e apoio em todos os momentos durante estes anos..

Ao Dr. Lawrence Anthony Lacey, do United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service, Yakima Agricultural Research Laboratory, Yakima, WA/EUA, pela inestimável ajuda na interpretação dos resultados dos danos histopatológicos e na análise das imagens.

Ao Dr. James J. Becnel do Center for Medical, Agricultural and Veterinary Entomology do United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service, Gainesville, FL/EUA, pela orientação no preparo do material para a microscopia eletrônica e histologia de insetos

À Jeane Quintanilha Chaves, bolsista do Laboratório de Fisiologia Bacteriana, pela ajuda inestimável na elaboração e execução dos experimentos e também pelo incentivo nos momentos difíceis.

Aos bolsistas PIBIC André Felipe das Mercês Santos e Rodrigo Nunes da Fonseca, do Laboratório de Fisiologia Bacteriana do Departamento de Bacteriologia/IOC, e a estagiária Fátima Cristina Lima Mendes do Laboratório de Simulídeos e Oncocercose do Departamento de Entomologia/IOC, pela ajuda nos trabalhos a campo para a realização dos bioensaios de atividade biológica.

À Dr^a Ortrud Monica Barth e a Prof^a Selma Majerowicz do Laboratório de Ultraestrutura Viral do Departamento de Virologia/IOC/FIOCRUZ, pela preparação e observação do material na microscopia eletrônica

Ao Romney Lima, do Laboratório de Produção e Tratamento de Imagens do Instituto Oswaldo Cruz, pela confecção do material fotográfico.

Ao pessoal do Laboratório de Fisiologia Bacteriana pela ajuda.

À Rosângela da Costa, secretária do Laboratório de Fisiologia Bacteriana pela presteza no fornecimento do material para a confecção do trabalho.

Ao Instituto Oswaldo Cruz, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro pelo apoio parcial ao desenvolvimento deste trabalho.

À gráfica da FIOCRUZ, em nome do Sr. Walter Duarte de Sousa pela impressão e encadernação dos exemplares deste trabalho.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

CLARA DE FÁTIMA GOMES CAVADOS, filha de Oswaldo da Silva Cavados e Joaquina Lage Gomes, nasceu no dia 17 de agosto de 1966, no Bairro de Botafogo, Rio de Janeiro.

Em agosto de 1984 ingressou na Universidade do Rio de Janeiro, graduando-se em Ciências Biológicas, Modalidade Médica em julho de 1988.

No ano de 1990 foi contratada, por projeto, pela Fundação Oswaldo Cruz no cargo de Auxiliar de Pesquisa, lotada no Laboratório de Fisiologia Bacteriana do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, desenvolvendo pesquisas sobre isolamento e identificação de Bacillus entomopatogênicos.

Em março de 1992, ingressou no Curso de Mestrado em Microbiologia Veterinária da UFRRJ. Em setembro deste mesmo ano, foi efetivada pelo Regime Jurídico Único, na Fundação Oswaldo Cruz no Cargo de Pesquisador Auxiliar.

Em Março de 1995, obteve o Grau de Mestre em Ciências em Microbiologia Veterinária pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Ainda neste ano, tornou-se

Assistente de Pesquisa lotada no Laboratório de Fisiologia Bacteriana do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

Em Março de 1996, ingressou no Curso de Doutorado em Medicina Veterinária, área de concentração, Parasitologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Como parte integrante dos estudos necessários para realização de sua tese, realizou estágio em Junho de 1997 sobre “Modo de Ação das Toxinas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* em larvas de *Culex* e *Anopheles*” no Centro de Bactérias Entomopatogênicas do Instituto Pasteur, Paris, França, sob orientação das Doutoras Christina Nielsen-LeRoux e Armelle Dèlecluse; e em Setembro de 1998 no Center for Medical, Agricultural and Veterinary Entomology - Agricultural Research Unit- United States Department of Agricultural(USDA), desenvolvendo estudos histopatológicos dos efeitos de toxinas de *Bacillus thuringiensis israelensis* no intestino médio de larvas de simulídeos e técnicas de microscopia eletrônica, sob orientação do Dr. James J. Becnel.

A partir de Agosto de 1997 atua como Coordenadora Adjunta da disciplina “Controle Biológico de Insetos Vetores de Doenças – Bactérias Entomopatogênicas”, do programa do Curso de Pós – Graduação “Stricto Sensu” do Instituto Oswaldo Cruz.

RESUMO

Visando conhecer-se os efeitos histopatológicos das toxinas originadas pela hidrólise das δ- endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis*, linhagem IPS-82 (LFB-FIOCRUZ 584) cepa padrão do Instituto Pasteur de Paris para o sorotipo flagelar H-14, sobre larvas de *Simulium pertinax* com vistas ao aprimoramento do uso desse tipo de inseticida microbiano no controle biológico desse inseto, o presente estudo foi concebido para localizar o sítio do dano histopatológico das δ-endotoxinas no trato digestivo de larvas, como também, avaliar a progressão dos efeitos histopatológicos no interior do intestino médio.

Para os experimentos foram coletadas larvas de *Simulium pertinax* com histoblasto respiratório completo aderidas a substratos naturais no Rio Soberbo, município de Guapimirim, Rio de Janeiro. As formas imaturas foram mantidas em seis becheres com um sistema de borbulhamento de ar originado de bombas de aquário que promoveu a oxigenação e a circulação da água, necessários para a troca gasosa e captação do alimento pelas larvas. Foram aplicadas dosagens do inseticida biológico equivalentes

a 2 mg/l, 4 mg/l e 6 mg/l. Os tempos de exposição das larvas ao inseticida biológico variaram de 1 hora até 4 horas, de modo a se poder acompanhar a evolução dos danos causados. E somente foram utilizadas larvas vivas, isto é, que reagiram à estímulos físicos.

Ao término de cada um desses tempos, as larvas foram levadas para microscópio estereoscópico onde tiveram retiradas sua cabeça e região anal. O restante do corpo larvar foi fixado e preparado para observações dos cortes histológicos sob microscopia óptica e eletrônica de transmissão.

As larvas expostas as protoxinas hidrolisadas de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* apresentaram debrís celulares nos espaços entre o epitélio e a membrana peritrófica e degeneração nuclear das células na porção anterior do intestino médio

Observando-se a porção posterior do intestino médio, encontrou-se além dos danos anteriormente descritos, vacúolos, causados pela hipertrofia celular e rupturas aparentes nas microvilosidades. As junções laterais das células apresentavam um espaçamento diminuto e evidenciava-se uma vacuolização do citoplasma sendo que alguns núcleos encontravam-se deformados. Podia-se também notar a ruptura das microvilosidades.

Verificou-se, também, que a progressão dos danos era diretamente proporcional à concentração utilizada do inseticida biológico e, ou, o tempo de exposição ao agente supressor. Não foram notados danos na estrutura histológica no grupo de larvas controle, tanto na porção anterior do intestino médio quanto na porção posterior.

As alterações histopatológicas observadas para larvas de **Simulium pertinax** submetidas à ação das toxinas de **Bacillus thuringiensis** sorovar **israelensis**, foram compatíveis com as relatadas na literatura para outras espécies de simulídeos e mosquitos .

SUMMARY

The present study sought to determine the histopathological effects of the toxins originating from hydrolysis of the δ -endotoxins of **Bacillus thuringiensis** serovar *israelensis* upon **Simulium pertinax** larvae, with the general objective of improving the usage of this type of microbial insecticide for the control of this insect. The strain of **Bacillus thuringiensis** serovar *israelensis* employed was IPS-82 (LFB-FIOCRUZ 584), the flagellar serotype H-14 type strain of the Institute Pasteur, Paris. Specifically, this investigation was undertaken to localize the site of histopathological damage caused by δ -endotoxins in the larval digest tract, as well as to evaluated the progression of histopathological effects within the midgut.

The experiments employed **Simulium pertinax** larvae with complete respiratory histoblast, which were collected, adhered to natural substrates, from the Soberbo River in the municipality of Guapimirim, Rio de Janeiro state. The immature forms were maintained in six beakers with aeration supplied via an aquarium pump, which promoted the oxygenation and circulation of the water necessary for gas exchange and nutrient acquisition by the larvae. Biological insecticide doses equivalent to 2mg/l, 4mg/l and 6mg/l

were applied to the different groups of larvae. The exposure times employed ranged from between 1 to 4 hours, in order to follow the evolution of the toxin induced tissue damage. Only live larvae were examined, that is to say, larvae which reacted to physical stimuli.

At the end of each time period the larvae were viewed under a stereoscopic microscope and the head and anal region were dissected. The remainder of the larval body was fixed and processed for observation as histological sections using light and transmission electron microscopy.

Larvae exposed to hydrolyzed protoxins of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* presented cellular debris in the spaces between the epithelium and the peritrophic membrane. In addition, nuclear degeneration of cells within the anterior portion of the midgut was observed.

Examination of the posterior portion of the midgut revealed the presence of tissue damage identical to that described above, as well as vacuoles caused by cellular hypertrophy and apparent ruptures in the microvilli. The lateral junctions of the cells presented a diminished spacing and there was evidence of cytoplasmic vacuolation with some nuclei observed to be deformed. In addition, rupturing of the microvilli was noted.

It was verified that the progress of the tissue damage was directly related to the concentration of biological insecticide which was applied. A similar relationship was also determined with regard to the time of exposure to the suppressive agent.

In the case of control larvae, no damage was observed to the histological integrity of either the anterior or posterior regions of the midgut.

The histopathological alterations observed in this study with *Simulium pertinax* larvae exposed to the action of the toxins of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* were comparable to those reported in the literature for other species of simuliids and mosquitoes.

ÍNDICE:

	Página
1- INTRODUÇÃO	01
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
3- MATERIAIS & MÉTODOS	32
3.1- Linhagem Bacteriana Utilizada	32
3.2- Preparação da Biomassa Contendo o Complexo Esporo-Toxina	32
3.2.1- Meio de Cultura	32
3.2.2- Produção da Biomassa Bacteriana	33
3.2.3- Determinação do Peso Seco	34
3.2.4- Contagem do Número de Células Viáveis	34
3.3- Preparação da Suspensão Bacteriana para os Bioensaios de Avaliação do Dano Histopatológico	35
3.4- Bioensaios com Larvas de <i>Simulium pertinax</i> para Avaliação do Dano Histopatológico	36

Página

3.5- Preparação das Amostras para Observação sob Microscopias Óptica e Eletrônica	39
3.5.1- Fixação	39
3.5.2- Pós-Fixação	39
3.5.3- Desidratação	39
3.5.4- Inclusão em Epon	40
3.5.5- Preparação para Observação sob Microscopia Óptica	40
3.5.6- Preparação para Observação sob Microscopia Eletrônica	40
4- RESULTADOS	42
6- DISCUSSÃO	62
7- CONCLUSÃO	73
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

- Figura 1** - Rio Soberbo, criadouro onde foram coletadas as larvas de *Simulium pertinax*, Município de Guapimirim, Rio de Janeiro. 37
- Figura 2** - Becheres com 400ml de água do criadouro onde foram colocadas as larvas de *Simulium pertinax* com um sistema de borbulhamento de ar originado de bombas de aquário que permitia a oxigenação e circulação da água 38
- Figura 3** - Cortes transversais da porção anterior do intestino médio de larvas de *Simulium pertinax* pertencentes ao grupo controle onde se observam as estruturas em monocamada das células epiteliais com microvilos, núcleos apresentando tamanhos normais, citoplasma regular e o espaço entre a membrana peritrófica; o epitélio está com o aspecto límpido. Observações realizadas sob microscopia óptica com um aumento de 50x (A) e 100x (B). 43

Figura 4 - Corte transversal do intestino médio posterior de larva de *Simulium pertinax*. do grupo controle com aparência íntegra onde se pode observar células pequenas com microvilos normais, bem juntas lateralmente, núcleos de tamanho normal e o aspecto límpido do espaço entre a membrana peritrófica e o epitélio intestinal. Observação realizada sob microscopia óptica com um aumento de 100x.

44

Figura 5 - Corte transversal da porção anterior do intestino médio de larvas de *Simulium pertinax* submetidas a 2 mg/l de um preparado inseticida à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* por um período de 1 hora, onde se observa a presença de conteúdo celular no espaço entre a membrana peritrófica e o epitélio e deformação nuclear. Observação realizada sob microscopia óptica com um aumento de 100x.

46

Figura 6 – Cortes transversais do intestino posterior de larva de *Simulium pertinax* exposta durante 2 horas a 2 mg/l de um preparado à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* apresentando hipertrofia celular, vacuolização do citoplasma, deformação nuclear (A), presença de grande quantidade de conteúdo celular no espaço entre a membrana peritrófica e o epitélio intestinal e dobras na membrana peritrófica (B). Observações feitas sob microscopia óptica com aumento de 100x.

47

Figura 7 - Cortes transversais do intestino médio posterior de larvas de *Simulium pertinax* submetidas a 2 mg/l de um preparado inseticida à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* por um período de 3 horas, onde se observam rupturas das microvilosidades, turgidez celular, vacuolização do citoplasma (A) e presença de conteúdo celular no espaço entre a membrana peritrófica e o epitélio (B). Observações realizadas sob microscopia óptica com um aumento de 100x.

49

Figura 8- Corte transversal do intestino posterior de larva de *Simulium pertinax* exposta durante 1 hora a 4 mg/l de um preparado à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* apresentando danos moderados como hipertrofia celular, leve espaçamento lateral entre as células epiteliais, deformação nuclear, presença de conteúdo celular no espaço entre a membrana peritrófica e o epitélio intestinal. Observação feita sob microscopia óptica com aumento de 50x.

50

Figura 9 - Cortes transversais do intestino posterior de larva de *Simulium pertinax* exposta durante 1 hora a 4 mg/l de um preparado à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* apresentando danos moderados como hipertrofia celular, vacuolização do citoplasma, leve espaçamento lateral entre as células epiteliais

Página

(A), deformação nuclear, presença de conteúdo celular no espaço entre a membrana peritrófica e o epitélio intestinal (B)

Observação feita sob microscopia óptica com aumento de 100x.

51

Figura 10 - Cortes transversais do intestino médio posterior de larvas

Simulium pertinax expostas a 4 mg/l de um preparado inseticida de **Bacillus thuringiensis** sorovar **israelensis** durante 1 hora, onde se observa ruptura e deformação celular acentuadas, alguns núcleos encontram -se hipertrofiados e outros já degenerados (A). Conteúdo celular no espaço entre a membrana peritrófica e o epitélio intestinal (B). Observações realizadas sob microscopia óptica com um aumento de 100x.

52

Figura 11 - Cortes transversais do intestino posterior de larva de

Simulium pertinax apresentando acentuada hipertrofia celular, degeneração nuclear (A), presença de conteúdo celular no espaço entre a membrana peritrófica e o epitélio, como também, ruptura das microvilosidades (B) após 3 horas da exposição ao preparado inseticida de **Bacillus thuringiensis** sorovar **israelensis** na concentração de 4 mg/l. Observação sob microscopia óptica com aumento de 50 x.

53

Figura 12 - Corte transversal do intestino médio posterior de larvas de **Simulium pertinax** submetidas a 6 mg/l de um preparado inseticida à base de **Bacillus thuringiensis** sorovar **israelensis** por um período de 1 hora, onde se observam a ruptura das microvilosidades, desorganização celular do epitélio intestinal, degeneração nuclear, vacuolização do citoplasma e presença de conteúdo celular no espaço entre a membrana peritrófica e o epitélio. Observações realizadas sob microscopia óptica com um aumento de 100x.

55

Figura 13 - Micrografia eletrônica de cortes transversais do intestino posterior de larvas de **Simulium pertinax**, pertencentes ao grupo controle, observando-se a aparência normal do citoplasma celular com microvilosidades íntegras em um aumento de 5200 x (A) e 12800x (B).

56

Figura 14 – Micrografia eletrônica de cortes transversais do intestino posterior de larvas de **Simulium pertinax**, pertencentes ao grupo controle, observando- se a aparência normal do núcleo e das mitocôndrias. Aumento de 21600 x (A) e 12352 x (B).

57

Página

Figura 15: Micrografias eletrônicas de cortes transversais do intestino posterior de larvas de **Simulium pertinax**, expostas a 6 mg/l de uma preparação inseticida à base de **Bacillus thuringiensis** sorovar **israelensis** durante 1 hora. Observa-se a presença de membrana peritrófica íntegra (MP), porém com células epiteliais altamente desorganizadas, com grandes vacúolos (V) (A), mitocôndrias concentradas em uma determinada região (M) e ausência das microvilosidades (B). Observações realizadas com um aumento de 5000x.

58

Figura 16 - Micrografia eletrônica de corte transversal do intestino posterior de larvas de **Simulium pertinax**, expostas a 6 mg/l de uma preparação inseticida à base de **Bacillus thuringiensis** sorovar **israelensis** durante 1 hora, observando-se a degeneração nuclear com a fragmentação da cromatina (CM). Observação realizada com aumento de 11530x.

59

Figura 17 - Micrografias eletrônicas de cortes transversais da porção posterior do intestino médio de larvas de **Simulium pertinax** expostas a 6 mg/l de uma preparação inseticida à base de **Bacillus thuringiensis** sorovar **israelensis** durante 1 hora, onde se observa a completa degeneração das microvilosidades. Observações realizadas com aumento de 24000 x (A) e 18860x (B)

60

Figura 18 - Micrografias eletrônicas de cortes transversais da porção posterior do intestino médio de larvas de **Simulium pertinax** expostas a 6 mg/l de uma preparação inseticida à base de **Bacillus thuringiensis** sorovar **israelensis** durante 1 hora. Observa-se a completa destruição do epitélio intestinal com grandes vacúolos no interior do citoplasma das células (A) e alterações no aspecto das mitocôndrias (B). Observações realizadas com aumento de 12116 x (A) e 20400 x (B)

1-INTRODUÇÃO

Dentre as bactérias entomopatogênicas conhecidas e pertencentes ao Gênero **Bacillus**, duas espécies se destacam pelo fato de terem oferecido os melhores resultados práticos: **Bacillus sphaericus** e **Bacillus thuringiensis**, que apresentam elevado interesse devido ao seu poder entomotóxico e viabilidade econômica, em virtude de serem os princípios ativos de inseticidas bacterianos industrializados.

O **B. sphaericus** é uma bactéria Gram-positiva, estritamente aeróbia, que apresenta endósporos de forma esférica em posição terminal dentro do esporângio. Esta espécie possui linhagens cristalogênicas e acristalogênicas, sendo que estas últimas podem apresentar baixa toxicidade para insetos (DAVIDSON et al., 1975; MYERS et al., 1979; SINGER, 1981; DAVIDSON & MYERS, 1981; YOUSTEN & DAVIDOSN, 1982 e PRIEST, 1992).

São conhecidas, aproximadamente, 365 linhagens de **B. sphaericus** entomopatogênicas, classificadas através da sorologia pela reação de aglutinação com o antígeno flagelar em 10 sorotipos (INSTITUTO PASTEUR, 1996). O espectro de ação

desta espécie restringe-se a algumas espécies de insetos da Ordem Diptera (SINGER, 1981), possui toxicidade somente para larvas de mosquitos, principalmente de *Culex* sp., *Anopheles* sp. e *Aedes* sp. (PRIEST, 1992; BERRY, 1994 e YOUSTEN, 1996).

As cepas altamente tóxicas sintetizam corpos para-esporais com forma poliédrica, onde estão contidas as proteínas tóxicas para larvas de mosquitos. Esta estrutura é composta em sua maior parte por uma toxina binária (Btx), com proteínas de peso molecular 51,4 kDa e 41,9 kDa (P51 e P42, respectivamente) (CHARLES, et al., 1996 e PORTER et al., 1993). Estas duas proteínas não possuem atividade tóxica quando testadas separadamente, segundo PORTER et al. (1993), a P42 exerceia função na especificidade, enquanto que o fator toxicidade seria uma função conjunta.

Estudos feitos comparando-se a seqüência de aminoácidos da P51 e P42 com as proteínas do cristal de *B. thuringiensis*, observaram a inexistência de similaridade significante entre elas, indicando que a Btx compõe uma classe distinta de toxina (BAUMANN et al., 1987; 1988).

Algumas cepas de *B. sphaericus* (cristalogênicas ou acristalogênicas) podem, também, produzir outras três toxinas, denominadas de toxinas de membrana – Mtx, denominadas de Mtx, Mtx2 e Mtx3, com pesos moleculares de 100 kDa; 31,8 kDa e 35,8 kDa, respectivamente. Estas proteínas são sintetizadas durante a fase vegetativa de crescimento da célula e não formam corpos para-esporais. Suas localizações dentro da célula ainda não são conhecidas (YOUSTEN, 1996, LIU et al., 1996 e THANABALU & PORTER, 1996).

O *B. thuringiensis* é Gram-positivo, anaeróbio facultativo, formador de endósporos predominantemente cilíndricos e sub-terminais; possui a propriedade de produzir inclusões

glicoprotéicas, corpo para-esporal, durante os estágios III a V do processo de esporulação. Estas glicoproteínas, também chamadas de δ - endotoxinas ou protoxinas, são as responsáveis pela toxicidade seletiva para larvas de insetos de diversas Ordens como: Diptera, Lepidoptera e Coleoptera (DE BARJAC & FRACHON, 1990; PRIEST, 1992 e KNOWLES, 1994). Já foram isolados até hoje 68 sorovares de *B. thuringiensis*, classificados de acordo com as características antigênicas do flagelo (LECADET et al., 1999), não havendo, porém, relação entre a sorologia pelo antígeno flagelar (DE BARJAC & BONNEFOI, 1962 e BONNEFOI & DE BARJAC,1963), e a atividade patogênica. Por exemplo, para os sorovares *oswaldocruzi* (H-38) e *brasiliensis* (H-39) de *B. thuringiensis* cristalogênicos, ainda não se conhece os insetos sensíveis (RABINOVITCH et al., 1995)

Em 1989, HOFTE & WHITELEY, propuseram uma classificação para estas proteínas, baseada no grau de homologia da seqüência nucleotídica e no espectro de toxicidade. Naquela época eram conhecidos 42 genes de toxinas, chamados de genes *cry* que foram agrupados em 14 tipos distintos, e as proteínas que eles codificavam, chamadas toxinas Cry, foram alocadas em 4 classes: Cry I (atividade para Lepidoptera), Cry II (atividade para Lepidoptera e Coleoptera), Cry III (atividade para Coleoptera) e Cry IV (atividade para Diptera).

Existe ainda um outro grupo de proteínas, denominadas de Cyt, que possuem atividade citolítica e são codificadas pelo gene *cyt*. FEITELSON et al., (1992), identificaram duas novas classes de proteínas Cry: V e VI, que possuíam atividade contra nematódeos.

Com a identificação de novas proteínas, membros do Comitê para Nomenclatura dos genes *cry*, revisaram a nomenclatura anteriormente proposta por HOFTE & WHITELEY (1989), propondo uma nova nomenclatura baseada exclusivamente na identidade dos aminoácidos que as compõem. Assim, existem hoje, aproximadamente, 59 genes agrupados em 19 grupos (CRICKMORE et al., 1998).

Dentre os sorovares de *B. thuringiensis*, o de número H-14 é muito utilizado no controle de larvas de dípteros de interesse médico-sanitário. Este corresponde ao *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*, isolado em 1976 de larvas moribundas coletadas num lago no Deserto de Negev em Israel (GOLDBERG & MARGALIT, 1977, DE BARJAC, 1978 e MARGALIT, 1990). O *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* produz um corpo par-esporal com 5 tipos de proteínas: Cry 4A, Cry 4B, Cry 10A e Cry 11A, além da proteína citolítica Cyt 1A (CRICKMORE et al., 1998). O *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* possui toxicidade para larvas de mosquitos e simulídeos (DE BARJAC, 1978; LACEY et al., 1982; BECKER, 1990, , ARAÚJO-COUTINHO, 1995 e RABINOVITCH et al., 1999).

Os simulídeos pertencem à Família Simuliidae, possuem ampla distribuição geográfica e a maioria das espécies é hematófaga (CROSSKEY, 1981). Sua principal importância sanitária é ser vetor de um filarídeo, *Onchocerca volvulus*, agente etiológico da oncocercose, que é de relevante expressão epidemiológica, principalmente, na África Central e Oeste, na América Central, na parte amazônica da América do Sul e no México (REY, 1991).

No Brasil, este inseto é vetor da *Onchocerca volvulus* na região Norte, extremo Norte do Estado de Roraima (MORAES & CHAVES, 1974), sendo que, na década de 80

foi descrito um caso autóctone no município de Minaçú, ao Norte do Estado de Goiás (GERAIS & RIBEIRO, 1986). Nas outras regiões brasileiras, a importância destes insetos está relacionada ao incômodo causado à população pelas suas picadas. São de importância econômica nas regiões agropecuárias no Sul do País e nas estâncias turísticas ao longo da encosta da Serra do Mar (ARAÚJO-COUTINHO, 1998).

Os simulídeos são insetos holometábolos, suas fases aquáticas vivem em ambientes lóticos de alta drenagem. Segundo KURTAK (1978) o aumento da corrente da água faz com que ocorra um decréscimo na captação de alimento pelas larvas. As larvas são filtradoras não seletivas (CUMMINS, 1973), ingerindo partículas inferiores a 100 µm em suspensão na água (WALLACE & MERRIT, 1980 apud ARAÚJO-COUTINHO, 1998).

Por suas características alimentares, bem como a especificidade dos sítios de criação, fazem com que as larvas sejam o elo mais frágil, sob o ponto de vista de controle, da cadeia de desenvolvimento, isto por que, a atuação do inseticida, tanto químico quanto biológico, se dá por um processo de ingestão. As pupas, pelo fato de não se alimentarem, não são susceptíveis a esses agentes supressores. As formas aladas, por apresentarem grande capacidade de dispersão passiva e ativa, baixa domiciliação e endofagia, não permitem estratégias eficazes de controle com os inseticidas existentes (ARAÚJO-COUTINHO, 1998). Por tudo isso, as atividades de controle desses insetos têm como principal estratégia o controle da população larvária.

Até a síntese do Diclorodifeniltricloroetano – DDT na década de 40, as atividades de controle de simulídeos eram pouco eficazes e de elevado custo. A partir de então, várias classes de inseticidas se sucederam, até a utilização na década de 70 de um

organofosforado de toxicidade III – Temephos – que possui grande eficiência sobre as larvas de simulídeos e de menor impacto no ambiente que os inseticidas anteriores (MUIRHEAD-THOMPSON, 1977 e BACK& HAMPER, 1979). Dez anos após, no início da década de 80, surgiram os primeiros casos de resistência em algumas áreas de controle com o Temephos (GUILLET et al., 1990), bem como a outros inseticidas organofosforados (KURTAK et al., 1982), levando a um decréscimo da efetividade das atividades de controle.

Com o isolamento do *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* em 1976 (GOLDBERG & MARGALIT, 1977 e DE BARJAC, 1978), tiveram início os testes para se avaliar a existência de toxicidade deste novo sorovar para as larvas de simulídeos. Os primeiros experimentos, tanto em laboratório (UNDEEN & BERL, 1979), quanto em campo (GUILLET & DE BARJAC, 1979 e LACEY & UNDEEN, 1986), apresentaram resultados satisfatórios. Em 1981, a Organização Mundial da Saúde iniciou o uso de larvicidas à base de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* nas áreas do Onchocerciasis Control Program (OCP), no Oeste da África, nas áreas onde constatou-se o aparecimento de resistência aos inseticidas organofosforados (GUILLET et al., 1990).

No Brasil, a despeito da ocorrência de transmissão de oncocercose, as atividades de controle são realizadas somente nas Regiões Sul e Sudeste, onde estes insetos são de importância econômica como citado anteriormente.

O programa pioneiro no controle de simulídeos é realizado na região do litoral Norte do Estado de São Paulo, abrangendo uma área de 893 Km². As atividades de controle foram iniciadas em 1957 com o emprego de inseticidas químicos (ARAUJO-COUTINHO, 1995). A partir dos anos 80, com o aparecimento de resistência do *Simulium pertinax* ao

Temephos (RUAS NETO, 1984b), principal espécie na região litorânea dos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro (ARAÚJO-COUTINHO et al., 1988 e MAIA-HERZOG et al., 1988), foram iniciados os estudos visando encontrar métodos alternativos de controle.

Baseados nos trabalhos que demonstraram a eficiência do **B. thuringiensis** sorovar **israelensis** no controle de simulídeos, foram realizados estudos por RUAS NETO, (1984a) no Rio Grande do Sul e por ARAÚJO-COUTINHO & LACEY, (1990) em São Paulo, que também demonstraram a boa eficácia de preparações à base de **B. thuringiensis** sorovar **israelensis** para larvas de **S. pertinax**, viabilizando assim, o uso desse agente no controle desta espécie.

A partir de 1990, pelo aumento da resistência do **S. pertinax** ao Temephos, o programa de controle realizado em São Paulo, passou a utilizar exclusivamente formulações à base de **B. thuringiensis** sorovar **israelensis** (ARAÚJO-COUTINHO, 1992, 1995).

Apesar do uso de **B. thuringiensis** sorovar **israelensis** no controle de larvas de simulídeos ser realizado desde o início da década de 80, poucos estudos foram feitos no intuito de se identificar a região do intestino das larvas de simulídeos que era afetada pelas δ-endotoxinas de **B. thuringiensis**, bem como, avaliar como ocorria o dano histopatológico no interior do aparelho digestivo. Em 1979, LACEY & FEDERICI estudaram a patogenia e a histopatologia do intestino médio de **S. vittatum** para as δ-endotoxinas de **B. thuringiensis**, demonstrando que as regiões mais afetadas eram o cecos gástricos e o estômago posterior. Já REY et al., (1998), estudaram, comparativamente, a histopatologia de alguns dipteros e crustáceos depois do tratamento com **B. thuringiensis**.

sorovar *israelensis* e demonstraram que a concentração de inseticida usada em aplicações operacionais de campo era deletéria para todas as espécies de dípteros em questão, mas não para os crustáceos. Observaram também, que a vulnerabilidade das células epiteliais do intestino ao inseticida microbiano depende do tipo da célula e que o fato dos crustáceos não apresentarem susceptibilidade estaria relacionado à não possuírem as células mais sensíveis em seu epitélio. Seu estudo indicou ainda, que o impacto do *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* em diferentes regiões do intestino médio continua controverso e a vulnerabilidade das células epiteliais às endotoxinas permanece pouco entendida.

Estudos sobre os efeitos ultraestruturais de toxinas de *B. thuringiensis* e *B. sphaericus* em larvas de culicídeos datam do final da década de 70. Podemos destacar o estudo de DAVIDSON (1979), onde observou a patogenia causada pela cepa SSII-1 de *B. sphaericus* no interior de larvas de *Culex quinquefasciatus*. Esta cepa hoje considerada de baixa toxicidade, possui a toxina denominada Mtx com peso molecular de 100 kDa. Em 1983, LAHKIM-TSOR et al., estudaram os efeitos histopatológicos das δ-endotoxinas de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* no intestino médio e cecos gástricos de larvas de *Aedes aegypti*. CHARLES (1987), estudou sob o aspecto ultraestrutural os eventos que aconteciam no intestino médio de larvas de *C. pipiens* subespécie *pipiens*, *Anopheles stephensi* e *Aedes aegypti*, após a alimentação com o complexo esporo-toxina de *B. sphaericus* cepa 2297.

Mais recentemente, HILL & PINNOCK (1998) estudaram os efeitos das δ-endotoxinas de *B. thuringiensis* sorovar *kurstaki* no canal alimentar de *Bovicola ovis*,

demonstrando haver modificações citopatológicas nas células epiteliais do intestino médio 4 horas após a alimentação.

Além de estudos sobre os efeitos histopatológicos das toxinas de *B. thuringiensis* e *B. sphaericus*, tem sido realizados estudos com o intuito de se observar os danos que outras substâncias naturais possam causar nas larvas de insetos vetores com o objetivo de poder utilizá-las no controle integrado dessas espécies. REY et al., (1999) estudaram os efeitos histopatológicos do ácido tânico (tanino) para larvas de alguns dípteros das Famílias Culicidae, Chaoboridae, Chironomidae e Simuliidae, demonstrando que o sítio de atividade tóxica dessa substância também é o epitélio do intestino médio das larvas.

Tendo em vista o número reduzido de trabalhos sobre os efeitos histopatológicos das δ- endotoxinas de *B. thuringiensis* em larvas de simulídeos, principalmente quanto ao fato da susceptibilidade das diferentes regiões do intestino médio às endotoxinas continuar controverso e também, o pouco conhecimento sobre a vulnerabilidade das células epiteliais e a necessidade deste conhecimento para o aprimoramento do uso deste tipo de inseticida microbiano no controle biológico deste inseto, este trabalho teve como objetivos: (1) localizar o sítio do dano histopatológico das δ-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* no trato digestivo de larvas de *Simulium pertinax*, como também, (2) avaliar a progressão deste efeito histopatológico no interior do intestino médio dessas larvas.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em 1902, Ishiwata isolou um **Bacillus** patogênico para larvas de **Bombyx mori** (bicho da seda), que foi denominado de *sotto disease Bacillus*, porém esta descoberta só foi publicada em 1915 (STEINHAUS, 1961 e HEIMPEL & ANGUS, 1963). Já BERLINER em 1911, isolou a partir de larvas de **Anagasta kuhniella** a mesma bactéria, na região de Thuringia, Alemanha. Este autor publicou seu trabalho em 1915, antes da comunicação de ISHIWATA, e, em consequência, a espécie ficou conhecida como **Bacillus thuringiensis** Berliner, sendo que a cepa isolada por Ishiwata passou a ser uma subespécie ou sorovar, o **B. thuringiensis** var. **sotto** (BERLINER, 1915 e HEIMPEL & ANGUS, 1963).

A atividade entomopatogênica desta espécie é devida a um corpo protóico intracitoplasmático, produzido durante os estágios III a V do processo de esporulação, sendo este uma característica importante na definição da espécie (STAHLY et al., 1991 e KNOWLES, 1994). Em 1953, HANNAY foi a primeiro a detectar a presença de cristais em forma de “diamante” em preparações de células de **B. thuringiensis** sendo, então, denominados de corpos para-esporais, devido a sua localização dentro da célula. HANNAY (1953) também relacionou a presença destes cristais com a toxicidade para insetos. Já

HEIMPEL (1967) denominou esses corpos para-esporais de δ – endotoxinas, que são glicoproteínas que possuem toxicidade seletiva para larvas de insetos de diversas Ordens, como: Lepidoptera, Coleoptera, Diptera (DE BARJAC & FRACHON, 1990, PRIEST, 1992 e YOUTEN, 1996). Atualmente existem 68 sorovares de *B. thuringiensis*, classificadas de acordo com as características antigênicas dos flagelos (LECADET et al., 1999).

Alguns dos vários sorovares de *B. thuringiensis* podem produzir além das δ – endotoxinas, a β – exotoxina. Estes dois tipos de substâncias, possuem estrutura química e modo de ação bastante distintos.

McCONNEL & RICHARDS (1959) fizeram o primeiro relato sobre a β – exotoxina, quando injetaram uma substância tóxica e termoestável em larvas de *Galleria mellonella*. A seguir, BURGERJON & DE BARJAC (1960a, b) demonstraram a existência de uma atividade *per os* de uma toxina solúvel e termoestável, que supostamente era o *fly factor* (*thuringiensina*), descrita por vários autores como sendo tóxica para larvas de *Musca domestica* (HALL & ARAKAWA, 1959, DUNN, 1960 e BURGERJON & GALICHER, 1965). Foi demonstrado que esta toxina extracelular possuía natureza nucleotídica (DE BARJAC & DEDONDER, 1965 e BENZ, 1966) e era excretada no meio de cultura (BURGERJON & DE BARJAC, 1964; CANTWELL et al., 1966 e DE BARJAC et al., 1966). Deve se notar que a produção desta exotoxina não é uma propriedade geral dos *B. thuringiensis*, como é a δ – endotoxina, que é considerada um critério taxonômico básico para a espécie. A β – exotoxina possui um amplo espectro de ação, sendo tóxica para insetos de várias Ordens: Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Orthoptera,

Hemiptera e Isoptera, como também para nematódeos (PRASAD, et al., 1972) e ácaros (KRIEG, 1968 e HALL et al., 1971).

A estrutura desta exotoxina foi definida como sendo um análogo estrutural do ATP, inibindo reações que envolvam o papel do ATP (FARKAS, et al., 1969 e BOND et al., 1969). Possui efeito inibitório na síntese *in vitro* de RNA, especialmente na reação de polimerização catalisada pela RNA-polimerase DNA dependente. Estas enzimas de mamíferos são muito sensíveis à inibição pela exotoxina (LECADET & DE BARJAC, 1981). Nos insetos, atua impedindo o desenvolvimento normal dos mesmos, podendo apresentar efeitos teratológicos quando administrada em doses sub-letais (BURGERJON & BIACHE, 1967 e BURGERJON et al., 1969).

Já as δ – endotoxinas, são glicoproteínas sintetizadas dentro do esporângio e neste momento, ainda não são propriamente tóxicas, sendo chamadas quando, dentro da célula, de protoxina. Em um grande número de sorovares de *B. thuringiensis*, este corpo paraesporal possui a forma bipiramidal, sendo que esta forma pode variar desde um cristal amorfo até um de formato cuboidal (FEDERICI et al., 1990). Estas protoxinas são codificadas por genes denominados de genes *cry*, que aparentemente possuem uma origem evolucionária comum, pelo fato de apresentarem uma grande homologia de DNA (GILL et al., 1992).

HOFTE & WHITELEY (1989) propuseram um critério de classificação para as proteínas, baseado no grau de homologia da seqüência nucleotídica e no respectivo espectro de toxicidade. Naquele momento, eram conhecidos 42 genes de toxinas, genes *cry*, que foram então agrupados em 14 tipos distintos, e as proteínas por eles codificadas, foram

alocadas em 4 classes: Cry I, Cry II, Cry III e Cry IV, cada uma apresentando toxicidade para distintas Classes de insetos (Lepidoptera, Coleoptera e Diptera). Em algumas sorovares de *B. thuringiensis* existe ainda um outro tipo de toxina, a citolítica – Cyt, que é codificada pelo gene *cyt*. Em 1992, foram identificadas duas novas classes de proteínas, Cry V e Cry VI, que possuíam atividade contra nematódeos (FEITELSON et al., 1992). Com a identificação de novas proteínas, o sistema de nomenclatura foi revisto, sendo proposto um novo, baseado exclusivamente na identidade dos aminoácidos que compõem as proteínas. Sendo assim, existem hoje aproximadamente, 59 genes que foram agrupados em 19 grupos (CRICKMORE et al., 1998).

As toxinas Cry de *B. thuringiensis* possuem uma estrutura tridimensional e quando ativadas dividem-se em três regiões: uma região N-terminal, que é o chamado domínio tóxico e é formado por vários sítios hidrofóbicos; uma região C-terminal que é uma região conservada e parece possuir uma função estrutural, estando envolvida na formação e estabilidade das inclusões cristalinas; e por último, uma região variável entre essas duas, onde se localizada a maioria das diferenças entre os aminoácidos que formam as diversas proteínas (ARONSON et al., 1986 e GILL et al., 1992). A estrutura que corresponde à fração ativa destas proteínas, consiste de três domínios distintos: domínio I, que é formado por um feixe de seis α – hélices anfipáticas, que circundam uma hélice hidrofóbica central (α 5), este domínio parece estar envolvido na formação do poro na membrana das células; domínio II é constituído por três folhas β – antiparalelas ao redor de um cerne hidrofóbico, que termina em forma de alças no ápice da molécula, este domínio parece estar ligado à seletividade da toxina; domínio III, consiste de um β - sanduíche, onde se encontra a região

C-terminal da maioria das toxinas Cry, por isso estaria envolvido na estabilidade estrutural e talvez, atue na toxicidade (GILL et al., 1992; KNOWLES, 1994 e YOUSTEN, 1996).

HEIMPEL & ANGUS (1959), fizeram o primeiro relato sobre o modo de ação das toxinas, eles observaram que as membranas intestinais foram rompidas permitindo assim, o fluxo iônico para a hemolinfa.

Quando as larvas dos insetos ingerem as protoxinas, estas são solubilizadas no intestino médio pela ação do pH alcalino, isto ocorre, aparentemente, pela destruição das ligações iônicas entre as subunidades da proteína. Este processo é uma etapa importante, visto que diferenças no grau de solubilização, podem explicar as diferenças no grau de toxicidade entre as proteínas Cry. Uma redução na solubilidade, é um mecanismo suposto de resistência do inseto a esse tipo de proteína (ARONSON et al., 1991 e DU et al., 1994). Em seguida, estas protoxinas sofrem clivagens pela ação de proteases intestinais, dando origem a peptídeos de menor tamanho, chamados então de toxinas. As toxinas ativadas perdem grande parte de sua porção C-terminal e alguns poucos aminoácidos da região N-terminal (HOFTE & WHITELEY, 1989; KNOWLES, 1994 e SCHNEPF et al., 1998).

Após a ativação, esses peptídeos tóxicos ligam-se a receptores específicos nas microvilosidades apicais das células colunares (BBMF ou BBMV) do epitélio intestinal (VAN RIE et al., 1989, 1990 e GILL et al., 1992), esta ligação é um processo de duas estágios: uma etapa reversível e outra irreversível. Esta última etapa parece envolver uma firme ligação entre a toxina e o receptor, inserção da toxina dentro da membrana apical, ou ambos. Tem sido assumido que a ligação irreversível está, exclusivamente associada com a inserção na membrana (VAN RIE et al., 1989 e RAJAMOHAN et al., 1995, 1996).

Segundo HONÉE & VISSER, (1993) os receptores nas células epiteliais são a chave que determina a especificidade da proteína e que o aumento de toxicidade poder ser o resultado de uma grande afinidade entre eles, ou então, do elevado número de receptores presentes na membrana.

Alguns estudos têm sido feitos com o intuito de se identificar os tipos de receptores das toxinas de *B. thuringiensis*. Já foram identificados em *Heliothis virescens*, proteínas receptoras de massa molecular variando de 45 kDa a 170 kDa. Uma proteína de 210 kDa, foi identificada em *Manduca sexta*, sendo que esta parece ter similaridade com proteínas da super-família Caderina (“cadherin”) (FRANKLIN et al., 1997 e KEETON & BULLA., 1997). Outro tipo de receptor que também foi identificado em larvas de *M. sexta* foi uma aminopeptidase de 120 kDa (KNIGHT et al., 1994, 1995; MASSON et al., 1995 e RAJAMOHAN et al., 1996).

Após a etapa de ligação irreversível, com a inserção da proteína na membrana plasmática das células do epitélio intestinal, ocorre a formação subsequente dos poros ou canais cátions-seletivos. Com a formação deste, ocorre um desequilíbrio osmótico nas células, o que acarreta rompimento das membranas citoplasmáticas, levando à lise celular e morte do inseto por inanição, pela paralisia do estômago posterior ou então, por septicemia, pela germinação dos esporos em contato com a hemolinfa (GILL et al., 1992 e KNOWLES, 1994).

Na tentativa de se explicar a participação dos receptores na formação desses canais transmembrana, foram propostos três modelos. O primeiro considera que este canal seria o próprio receptor, que é ativado pela ligação com a toxina de maneira análoga ao mecanismo de formação de canais existentes nos neurotransmissores. O segundo modelo sugere, que a

toxina junto com o receptor formem o poro. E o terceiro e último modelo proposto sugere, que o receptor atuaria somente como um catalisador da associação da toxina na membrana do inseto, não desempenhando nenhuma função na formação do poro. Neste caso, o receptor teria a função de uma alça, permitindo assim, a inserção da toxina na membrana (KNOWLES & DOW, 1993).

No caso da toxina Cyt , que atua por um mecanismo similar ao das Cry, a única diferença seria o receptor onde esta se ligaria, que neste caso, seriam fosfolipídeos existentes nas membranas plasmáticas das células dos insetos-alvo (GILL et al., 1992). Alguns experimentos mostraram que esta toxina era neutralizada, quando incubada, previamente, com lipídeos extraídos das células de *Aedes albopictus*, levando-se a considerar que fosfolipídeos da membrana seriam o alvo primário dessas toxinas (THOMAS & ELLAR, 1983). Outro grupo confirmou a existência de interação específica entre a toxina citolítica e certos fosfolipídeos insaturados. Inicialmente esta toxina se liga como um monômero e vai se agregando até formar o poro que resultará na citólise (GILL et al., 1992)

Além das toxinas Cry e Cyt, recentemente foi identificado um terceiro tipo de proteínas sintetizadas por algumas linhagens de *B. thuringiensis*, chamadas de proteína vegetativa inseticida – VIP (ESTRUCH et al., 1996). Este tipo de proteína é sintetizado durante a fase vegetativa, foi detectada sua presença em sobrenadantes de culturas com 15 horas de crescimento, não formam cristais protéicos e são, aparentemente, excretadas para fora das células. São três as chamadas proteínas VIP: VIP 1 A, VIP 2 A e VIP 3 A. Destas, a mais estudada é a VIP 3 A, que possui toxicidade para lepidópteros, em especial para aqueles que possuem baixa susceptibilidade para as delta-endotoxinas (ESTRUCH et al.,

1996). Quando insetos susceptíveis são alimentados com concentrações letais, a VIP 3 A causa paralisia do intestino e lise das células do epitélio intestinal, muito semelhante ao que ocorre na intoxicação causada pelas proteínas Cry (YU et al., 1997). Apesar disso, as proteínas VIP 3 A não possuem nenhuma homologia com as δ - endotoxinas, não havendo indícios de similaridade no seu mecanismo de ação (ESTRUCH et al., 1996). As propriedades biológicas e moleculares das proteínas VIP 3 A, tem mostrado que estas podem ser novos agentes inseticidas que possam complementar e aumentar o uso das conhecidas proteínas inseticidas derivadas de linhagens de *Bacillus* (ESTRUCH et al., 1996).

Até meados da década de 70, todos os sorovares de *B. thuringiensis* isolados possuíam atividade contra insetos pragas da agricultura. Com o isolamento, a partir de larvas infectadas no Deserto de Negev em Israel, de uma bactéria que possuía um cristal amorfo, abriu-se um novo campo para o controle biológico de insetos vetores de doenças em Saúde Pública. A bactéria isolada por GOLBERG & MARGALIT (1977), recebeu a denominação de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*, sorotipo H-14 (DE BARJAC, 1978). Esta bactéria possui em seu corpo para-esporal 5 tipos de proteínas: Cry 4 A, Cry 4 B, Cry 10 A, Cry 11 A e Cyt 1 A (CRICKMORE et al., 1998). Essas proteínas possuem uma atividade sinérgica e são tóxicas para larvas de dípteros vetores, como mosquitos e simulídeos (GOLBERG & MARGALIT, 1977; DE BARJAC, 1978; LACEY et al., 1982; COLBO & O'BRIEN, 1984, ARAÚJO-COUTINHO & LACEY, 1990; GILL et al., 1992 e RABINOVITCH et al., 1999).

A partir da década de 70, o controle de insetos do gênero **Simulium** começou a ser feito com um organofosforado de grau III de toxicidade, menos agressivo que os organoclorados que o precederam, porém que apresentava uma baixa especificidade, podendo causar danos à insetos não-alvo (RUAS NETO, 1984).

O Temephos – O,O,O’,O’ – tetrametil O,O’ – ditio-p-fenileno fosforiato, é metabolizado no trato gastrointestinal das larvas. Durante a metabolização ocorre uma oxidação produzindo análogos oxigenados (WHO, 1986). Em seguida, esses análogos sofrem hidrólise através de esterases, produzindo substâncias inibidoras da produção da enzima acetilcolinesterase. Esta enzima é importante, pois ela é a responsável pela hidrólise de um neurotransmissor, a acetilcolina, que então, se acumula nas terminações nervosas, causando a intoxicação da larva (CCI-UNICAMP, 1991 *apud* ARAÚJO-COUTINHO, 1998).

Por este mecanismo de ação, esse grupo de inseticidas é potencialmente tóxico a insetos de uma maneira geral, como também, para aves e mamíferos, estes apresentando uma maior atividade hidrolítica por esterases (WHO, 1986).

No caso das atividades de controle de simulídeos, o Temephos não apresenta ação residual significante, pelas características físicas do criadouro (alta drenagem), bem como pela rápida degradação do ingrediente ativo pela ação dos raios ultravioleta (WHO, 1986).

No início dos anos 80, apareceram os primeiros relatos de resistência dos simulídeos não só ao Temephos (GUILLET et al., 1990), como também a outros organofosforados (KURTAK et al., 1982).

Nesta época já se sabia da existência de uma bactéria com toxicidade para larvas deste inseto e assim, foram iniciados os primeiros experimentos em laboratório (UNDEEN

& BERL, 1979) e em campo (GUILLET, 1979 & DE BARJAC), que demonstraram a eficácia deste agente.

Em 1981, foi aprovado pela Agência de Proteção Ambiental, dos EEUU – EPA o uso de preparações que continham como ingrediente ativo o **B. thuringiensis** sorovar **israelensis**. Com isso, o Programa de Controle da Oncocerose, na África, passou a utilizar esses inseticidas no controle de **S. damnosum**, em uma área que abrange cerca de 11 países na região neotropical do continente. Atualmente, utiliza-se nessa região o manejo integrado, com aplicação do inseticida biológico em áreas com o aparecimento de populações resistentes ao químico e nas áreas sem resistência, continua a ser utilizado o Temephos (BECKER & MARGALIT, 1993; SILVA-FILHA, 1994).

Como já foi dito anteriormente, desde a década de 90 o controle de simulídeos no Brasil é feito com inseticidas à base de **B. thuringiensis** sorovar **israelensis**, com excelentes resultados (ARAÚJO-COUTINHO, 1995).

A despeito de duas décadas de uso do **B. thuringiensis** sorovar **israelensis** como princípio ativo dos inseticidas biológicos utilizados no controle de simulídeos, somente dois trabalhos foram feitos com o intuito de se verificar de que modo as δ - endotoxinas desta espécie bacteriana atuam no interior das larvas deste inseto.

LACEY & FEDERICI (1979), publicaram o primeiro trabalho sobre a patogenicidade e histopatologia de **B. thuringiensis** em larvas de **S. vittatum**. Foram investigados vários intervalos de tempos de exposição e diferentes temperaturas. Os autores utilizaram a linhagem de **B. thuringiensis** HD-255 (**B. thuringiensis** sorovar **kurstaki**), com atividade para lepidópteros, numa concentração de 10ppm. As

temperaturas estudadas foram 10° C, 15° C, 19° C e 24° C e foi observado que a cada aumento de 4-5° C na temperatura acima de 15° C, o início da mortalidade encurtava em 24 horas. Foi observado também, que exposições breves de 15 minutos a concentrações de 10 ppm de uma preparação total de esporos das linhagens, resultava numa mortalidade média de 29% dos estádios larvares mais velhos. Foi verificado também, que a mortalidade aumentava acentuadamente em exposições acima de 3 horas, chegando a um máximo de 80%. Os sinais flagrantes de “adoecimento” das larvas incluíam parada na alimentação e tetania com diminuição anômala do tamanho da larva. Foi observado que o tecido mais afetado era o epitélio intestinal nas regiões do cecos gástricos e na primeira metade do estômago posterior. A formação de vacúolos citoplasmáticos seguidos por lise celular e, ou, esfoliação eram muito aparentes em larvas moribundas. A morte não era resultado de uma bacteremia. Os autores citados identificaram a região anterior do intestino médio como a mais afetada. O ceco saudável era caracterizado por uma grande camada única, com células poligonais achatadas com amplos microvilos nas vesículas membranais. Essas células contêm núcleos largos com nucléolos alongados e o citoplasma é uniformemente regular, sem a presença de grandes vacúolos, mas freqüentemente contendo grande número de grânulos de glicogênio. Nas larvas doentes, a aparência do ceco depende do estágio de intoxicação. Durante os estágios iniciais, as células aparecem levemente hipertrofiadas e parcialmente separadas umas das outras. Em estágios mais avançados, o ceco aparece com multi-camadas como um resultado da proliferação celular, pleomórfico e sem as microvilosidades. Adicionalmente, as células e núcleos variam de tamanho e o citoplasma, freqüentemente, está vacuolizado. Nas etapas finais, muitas células já lisaram ou caíram dentro do lúmen cecal e se encontram altamente degeneradas. Porções da membrana basal

aparecem sem células. Neste estudo foi demonstrado que o estômago anterior, com exceção das áreas contínuas ao ceco, não era afetado nas larvas doentes, prosseguindo distalmente na observação destas larvas, a próxima região aonde se distinguia dano era o estômago posterior. Pela comparação de cortes longitudinais de larvas saudáveis e doentes, podia ser observado que os danos começavam na mudança de tipos de células que ocorria na junção entre o estômago anterior e o posterior. Na junção, as células uniformes achatadas da porção anterior davam lugar a células mais colunares, bulbosas, do estômago posterior. A progressão da doença e o dano que ocorre nas células no estômago posterior, são similares àqueles que acontecem na parte anterior. A fase inicial se caracteriza por uma leve hipertrofia nas células e pela separação das mesmas. Espaços no epitélio saudável não são incomuns devido a natural lise das células secretoras encontradas nessa região. Entretanto, o dano observado nas larvas afetadas excede em muito aquele observado em exemplares sadios. Conforme a "doença" progride, aumenta a dissociação celular, as células tornam-se aumentadas e vacuolizadas e se desprendem para o lúmen onde continua o processo de degradação. Núcleos regenerativos formam novas células que se tornam doentes e também se desprendem. Em muitos casos, essas células, são desprendidas antes mesmo de se tornarem funcionais. Neste estágio, a membrana peritrófica está freqüentemente convoluta e a luz intestinal desprovida de alimento. Nos estágios mais avançados, todo o epitélio já foi desprendido e o intestino, na porção posterior, consiste somente de uma flácida membrana basal. Uma invasão bacteriana secundária do intestino torna-se aparente em muitas larvas e a morte ocorre logo em seguida (LACEY & FEDERICI, 1979).

O outro trabalho existente faz um estudo comparativo sobre a histopatologia de alguns dípteros (Culicidae, Chironomidae e Simuliidae) e crustáceos (Cladocera) aquáticos,

depois do tratamento com *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* (REY et al., 1998). Neste trabalho eles utilizam uma concentração de 0,4 mg/l de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*. Eles subdividiram o intestino em duas partes, cada uma com um tipo característico de célula: a porção anterior se estende desde o cecos gástricos até o 1º e 2º segmentos abdominais, composta por células grandes e com citoplasma cristalino, chamadas de *clear cells**; a porção posterior se estende abdominalmente do 3º ao 6º segmento, composto por células pequenas, bem juntas lateralmente com um citoplasma elétron – denso e com microvilosidades bem desenvolvidas, as *dark cells**. Os resultados demonstraram que todas as larvas de dípteros tratadas apresentavam o mesmo padrão de alterações histopatológicas que apareciam primeiramente na porção anterior através da hipertrofia degenerativa vacuolar das *clear cells*, estas células incham e dobram de tamanho, na porção apical, as microvilosidades e organelas celulares tornam-se significantemente desorganizadas. Oito horas após o tratamento, o citoplasma apical clareia e fica vesiculado, 12 horas após, o inchamento do citoplasma apical chega ao máximo, antes da célula se romper em direção ao lúmen. Quando ocorre a lise epitelial da porção anterior, o inseto morre. Durante esse período, a desorganização da porção posterior é mais lenta e mais atenuada que na porção anterior, na região apical.

N.A.: * Neste momento optou-se pela não tradução, mantendo-se o que está escrito no artigo original. O autor esclarece que as *clear cells*, são as células globulares da porção anterior do intestino médio e as *dark cells*, são as chamadas células colunares ou caliciformes da porção posterior.

Um pequeno inchamento apical das *dark cells* ocorreu depois de 2 horas de tratamento, mas o epitélio não apresentou hipertrofia. O citoplasma das células gradualmente tornou-se denso e fibrogranular, porém o núcleo da célula não sofreu alteração. Doze horas pós-tratamento, as microvilosidades pareciam estar intactas (REY et al., 1998).

Outro trabalho sobre os efeitos histopatológicos de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* foi o realizado por LAHKIM-TSOR et al., (1983), porém neste estudo foi utilizado o *Aedes aegypti*. Os autores observaram que quando utilizavam 4 µg/ml do patógeno, a mortalidade das larvas começava seis minutos após a aplicação, chegando ao máximo 27 minutos depois. Quando eles aplicavam a CL₅₀ (10ng/ml) de uma preparação em pó contendo cristais, esporos e debris celulares em copos plásticos contendo 20 larvas (L₂-L₃) em 100 ml de água destilada, a mortalidade das larvas começava em 37 minutos e chegava a seu máximo 120 minutos após o tratamento. Com isso, observaram que as alterações histopatológicas ocorriam na região dos cecos gástricos e no intestino médio. Quando foram observadas larvas mortas pelo *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*, notou-se que a camada epitelial encontrava-se desorganizada, a maioria das células tinha desaparecido e a membrana peritrófica estava destruída. Observando-se larvas tratadas, porém vivas, os autores constataram que o epitélio ainda mantinha sua estrutura de monocamada, mas com uma marcante hipertrofia celular e vacuolização do citoplasma e as microvilosidades estavam mais finas e arrebatadas. Esse processo, assim como demonstrado por LACEY & FEDERICI, (1979), é gradual. As observações de LAHKIM-TSOR et al., (1983) sobre as larvas não tratadas de *Ae. aegypti* revelaram similaridades

estruturais entre o cecos gástricos e a porção posterior do intestino médio (um epitélio em monocamada, coberto por microvilos bem desenvolvidos). Baseados nessas observações, eles puderam concluir que o ceco toma parte no processo de absorção alimentar, em consequência, parece óbvio para os autores o porquê desta região ser afetada pelas proteínas de **B. thuringiensis** sorovar **israelensis**, uma vez que, pela hipótese por eles formulada, as partes mais afetadas do sistema digestivo são aquelas que apresentam microvilosidades bem desenvolvidas, uma vez que estas são as responsáveis pela absorção de fluidos e nutrientes diferentemente da região anterior que segundo CIOFFI (1979) não possui microvilos verdadeiros.

Em relação aos efeitos histopatológicos de **Bacillus entomopatogênicos** para larvas de dipteros, os outros trabalham existentes são sobre os efeitos de **B. sphaericus** para larvas de **Culex quinquefasciatus**. Um dos primeiros foi o de DAVIDSON (1979) que utilizou a linhagem **B. sphaericus SSII-1**, hoje considerada como de baixa toxicidade, para observar os danos causados nas larvas deste inseto. A autora verificou que ao redor de 10 – 12 horas pós – tratamento já se podia observar sintomas externos flagrantes, as larvas estavam lentas. O conteúdo intestinal dentro da membrana peritrófica estava desprendido dentro de dobras no formato de zig-zag, devido a deformação do intestino médio. Esta deformação progrediu até que a parede intestinal encostou-se à parede externa do corpo da larva, eliminando assim a maior parte do espaço da hemocele. Nenhuma marcante mudança histológica nas células do epitélio foi observada antes de 10 horas após a alimentação. A partir deste tempo, os lisossomos das células epiteliais tornam-se maiores e mais numerosos. Com a deformação do intestino médio, as células tornam-se separadas uma das outras na sua parte basal. Foi observado que neste período de exposição, as mitocôndrias e

os microvilos pareciam intactos. Com 12 horas pós – tratamento, os efeitos histológicos variavam amplamente em severidade. Em algumas larvas, as células intestinais pareciam estar no mesmo estágio, enquanto em outras, podiam ser vistos grandes lisossomas e a perda das microvilosidades nas células da porção anterior. Ocasionalmente podia ocorrer citólise e o desprendimento das células do intestino posterior. As membranas basais permaneciam intactas. Nesse trabalho DAVIDSON (1979), observou que todas as larvas estavam mortas ou moribundas em 24 horas. Nas moribundas, podiam ser observados vários lisossomas grandes com membranas e grânulos variados no seu interior, as mitocôndrias encontravam-se inchadas, as células estavam bem separadas nas bases e a maioria dos microvilos não existiam mais.

Utilizando a cepa 2297 de **B. sphaericus**, umas das que são consideradas como possuidora de alta toxicidade, CHARLES (1987) observou os efeitos ultraestruturais que ocorriam no epitélio intestinal de larvas de **Anopheles stephensi**, **Cx. pipiens** e **Ae. aegypti**. Como as três espécies de mosquitos apresentam diferentes graus de susceptibilidade ao **B. sphaericus** 2297, a cinética das alterações citopatológicas também foi diferente para cada uma das espécies. No caso de **Anopheles stephensi**, as alterações celulares começaram logo após a ingestão do complexo esporo – toxina. Com 15 minutos já se podia observar grandes áreas pouco elétron – densas, tanto nos cecos gástricos quanto no estômago posterior. Mitocôndrias com configurações anormais eram visíveis neste tempo, tanto na região apical, quanto na basal. Poucos horas depois (3-6 horas), o autor observou o aumento nas áreas de baixa densidade de elétrons, essencialmente nas partes basais do ceco e do estômago posterior. As células regenerativas, as quais não estão em contato direto com o lúmen, pareciam continuar inalteradas. Ao final do primeiro dia de intoxicação, as

mitocôndrias da porção anterior, estavam um pouco distendidas e o retículo endoplasmático rugoso formava estruturas concêntricas nos cecos e no estômago. Quando as larvas começaram a morrer, quase todas as células do intestino médio exibiam mitocôndrias deformadas, mas somente algumas células tinham sido lisadas. Nas larvas de *Cx. pipiens*, foi também relatado pelo autor (CHARLES, 1987) que as alterações ocorriam logo após a ingestão do complexo, aos 35 minutos já se observava a deformação das mitocôndrias. Com 1- 3 horas, apareciam grandes vacúolos dentro dos citoplasmas das células do ceco, de 6-12 horas esses vacúolos podiam ser vistos nas células do estômago anterior e em 12 – 24 horas, no estômago posterior. Em muitas células estomacais, algumas mitocôndrias estavam numa forma condensada enquanto outras estavam distendidas. O retículo endoplasmático rugoso encontrava-se arrebentado e formado por pequenas vesículas. Como ocorreu com o *An. stephensi*, somente poucas células estavam lisadas quando os insetos começavam a morrer. As células do *Ae. aegypti* apresentaram os primeiros sintomas com 1 hora pós-tratamento, as mitocôndrias apresentavam uma densa matriz com dilatação das cristas internas nas células do estômago anterior. Em contraste com isso no ceco e na porção posterior, as mitocôndrias estavam inchadas e o retículo endoplasmático liso era formado por vários vacúolos. Nenhuma outra grande alteração nas células foi observada nas horas seguintes até a morte das larvas. CHARLES (1987) observou, também, que embora as células da cárdia continuassem a secretar a membrana peritrófica, ocorriam algumas alterações em sua estrutura, nas larvas de *An. stephensi* e *Cx. pipiens*. Essas alterações consistiam, essencialmente, na hipersecreção de diferentes camadas. Este fenômeno não foi observado pelo autor nas larvas de *Ae. aegypti*.

Ainda em relação a histopatologia, valem ser destacados ainda, alguns trabalhos sobre os efeitos das toxinas de **B. thuringiensis** para insetos de importância agrícola.

Assim, ENDO & NISHIITSUTSUJI-UWO (1980), fizeram um estudo sobre o modo de ação das δ - endotoxinas de **B. thuringiensis** e suas alterações histopatológicas no intestino médio de **Bombyx mori**. Os autores observaram que logo após a ingestão das toxinas, as dobras profundas que existiam na membrana basal das células colunares tornavam-se irregulares em seu formato e as mitocôndrias próximas à região basal ficavam condensadas. As primeiras patologias eram quase imperceptíveis e estavam localizadas entre o 1º e o 2º terço do intestino médio. Com o passar do tempo, os efeitos se espalhavam anterior e posteriormente até que dois terços do intestino apresentavam alterações. O citoplasma das células colunares torna-se elétron-transparente, a maioria das mitocôndrias encontra-se na forma condensada e o retículo endoplasmático assume uma configuração do tipo vacúolo. As dobras basais da membrana quase desaparecem. Já nas células globulares, o citoplasma tornava-se muito elétron – denso, as dobras basais da membrana celular aumentavam fazendo um acentuado contraste com o citoplasma denso. As mitocôndrias e os retículos não sofriam nenhuma deformação patológica.

MATHAVAN et al. (1989), fizeram um estudo sobre os efeitos histopatológicos e histoquímicos de **B. thuringiensis** sorovar **israelensis** nas células intestinais de larvas de **B. mori**. A alimentação das larvas com preparações da bactéria induziram alterações no intestino médio. A toxina penetrava através da membrana peritrófica e afetava as células epiteliais. As alterações histopatológicas observadas pelos autores com auxílio da microscopia óptica incluíam a hipertrofia das células, vacuolização do citoplasma e do

núcleo, desintegração das microvilosidades, destruição da membrana plasmática, desaparecimento das estrias basais, necrose do núcleo, desorganização das organelas citoplasmáticas e desintegração da célula.

Nessa mesma época, LANE et al. (1989) estudaram as alterações nas microvilosidades e nas membranas do complexo de Golgi de células epiteliais do intestino anterior de **Manduca sexta** induzidas pelas δ - endotoxinas. As células do intestino são primariamente as colunares ou caliciformes e as globulares, sendo que nas primeiras o efeito da toxina é mais pronunciado. Observando tecidos com apenas 1–5 minutos de exposição já se notava finas alterações estruturais. As mais notáveis eram nas microvilosidades e nas membranas do complexo de Golgi: aumento dos vacúolos associados a estes. Sendo este efeito intensificado com o maior período de exposição, resultando num aumento dos vacúolos e no número de corpos lisossomais. As partículas intra – membranais das microvilosidades das células colunares mostravam pequenas alterações, bem como, danos nos contornos dos microvilos foram relatados também. Os espaços laterais entre as células, algumas vezes se encontravam rompidos ou internalizados. A hipótese explicativa destes autores é que, primeiramente a toxina modificava as membranas das microvilosidades e subseqüentemente, são afetados os sacos associados ao Golgi, dando origem aos vacúolos e lisossomas (LANE et al., 1989).

Posteriormente, BRAVO et al., (1992) estudando a localização imunocitoquímica dos cristais protéicos em larvas intoxicadas de **Manduca sexta** (Lepidoptera), **Plutella xylostella** (Lepidoptera) e **Leptinotarsa decemlineata** (Coleoptera), relataram que as mudanças histopatológicas causadas por estas proteínas incluíam o rompimento das

microvilosidades, vacuolização do citoplasma, hipertrofia das células epiteliais, levando a completa desintegração da célula. Neste estudo também foi observado, que as células colunares são as primeiras a serem afetadas.

BAUER & PANKRATZ (1992) estudaram os efeitos ultraestruturais do **B. thuringiensis** sorovar **san diego** em larvas de um coleóptero, **Chrysomela scripta**. As observações foram feitas até 3 horas após a ingestão das toxinas. Os primeiros sinais de rompimento celular só foram observados depois de 2 horas. As células epiteliais das larvas tratadas encontravam-se mais alongadas e deformadas que as células das larvas não-tratadas, com a região apical das células inchando em direção ao lúmen intestinal. As células apresentavam grandes espaços citoplasmáticos, expansões no labirinto basal, ruptura do retículo endoplasmático rugoso e um deslocamento apical do núcleo. Nenhum efeito adverso foi observado nas microvilosidades, nas membranas e organelas. Com 3 horas, houve um aumento nos danos celulares, com a ruptura das células em sua porção apical e o vazamento do material citoplasmático no lúmen intestinal. Os autores citados compararam os efeitos do **B. thuringiensis** sorovar **san diego** com os causados pelas toxinas de **B. thuringiensis** sorovar **kurstaki** e observaram similaridade, porém, existiam algumas diferenças: não ocorreram lesões na membrana e nas microvilosidades e, comparativamente, a resposta foi mais lenta.

Na área veterinária, um único trabalho foi realizado sobre os efeitos histopatológicos de **B. thuringiensis** no trato digestivo de **Bovicola ovis**. HILL & PINNOCK, (1998) utilizando uma linhagem de **B. thuringiensis** sorovar **kurstaki**, fizeram observações dos efeitos ultraestruturais nas células epiteliais do intestino médio dos insetos, após estes serem alimentados com uma preparação em pó de esporos, δ -

endotoxinas e componentes celulares lisados. Utilizando microscopia eletrônica de transmissão verificaram que as microvilosidades das células epiteliais começavam a romper, 4 horas a 8 horas pós – alimentação. Em seguida, as células iniciavam um processo de vacuolização e rompiam, liberando as organelas celulares. Entre 8 horas e 12 horas pós – alimentação ocorria a paralisia e morte do inseto, coincidindo com a lise das células do intestino e liberação do conteúdo citoplasmático para dentro do lúmen.

Outro trabalho muito interessante sobre danos histopatológicos foi o realizado por REY et al., (1999), que observou os efeitos do ácido tântico ou tanino no epitélio intestinal de algumas larvas de dípteros aquáticos. O tanino é um polifenol derivado das plantas, solúvel em água, que possui a propriedade de se ligar com proteínas e outras moléculas biológicas. Os autores realizaram bioensaios de atividade biológica e verificaram que utilizando-se concentrações de 0,25 mM a 4 mM de ácido tântico, este possuía efeito deletério sob larvas de **Cx. pipiens**, **S. variegatum** e **Chironomus annularius**, porém não possuía para larvas de **Aedes** sp., **Anopheles** sp., **Culiseta** sp. e **Chaoborus**. Os autores observaram que o principal órgão-alvo do tanino foi o epitélio do intestino médio. Porém, a extensão do dano variava de acordo com o táxon, a duração do tratamento e as concentrações ensaiadas. Os autores também constataram que a vulnerabilidade das células epiteliais difere entre os tipos celulares, as *clear cells* da porção anterior apresentavam os sintomas de intoxicação antes das chamadas *dark cells* da região posterior. As larvas de simulídeos tratadas com ácido tântico apresentavam as primeiras lesões no intestino anterior com 6 horas pós-tratamento, estas lesões se caracterizavam pelo inchamento da porção apical das *clear cells* e a ruptura das junções laterais, levando à lise da célula e a liberação de seu conteúdo na luz intestinal. Concomitantemente, começam as lises parciais do

intestino posterior, onde as *dark cells* desprendem-se em pequenos grupos, produzindo uma espécie de labirinto basal. Com 12 horas, a lise da porção anterior progride até a degeneração das células que restaram e no posterior a ruptura das junções laterais progride em direção ao ápice, junto com a lise do citoplasma e do núcleo, seu desprendimento da lámina basal e degeneração das microvilosidades. Após 24 horas, o intestino anterior encontrava-se quase que completamente necrosado, a degeneração da região posterior progredia tanto extra quanto intracelularmente. Com 48 horas, ocorria a morte da larva pela lise completa do intestino. Na região do ceco, a degeneração das células assemelhava-se com o observado no intestino posterior. Do mesmo modo, ocorria necrose celular dentro dos túbulos de Malpighi, que envolviam vacuolização intracelular e deformação do citoplasma antes da ruptura celular (REY et al., 1999).

3 – MATERIAIS & MÉTODOS

3.1. - Linhagem bacteriana utilizada:

Para este estudo foi utilizado o **Bacillus thuringiensis** sorovar **israelensis**, linhagem IPS-82 (LFB-FIOCRUZ 584), cepa padrão do Instituto Pasteur de Paris para o sorotipo flagelar H-14. É, também, a cepa utilizada como princípio ativo de inseticidas comerciais à base de **B. thuringiensis** sorovar **israelensis**. A linhagem foi preservada sob a forma de liofilizado e mantida em geladeira.

3.2. - Preparação da biomassa contendo o complexo esporo-toxina:

3.2.1 - Meio de Cultura

Para a produção da biomassa bacteriana foram utilizados um meio básico e procedimentos desenvolvidos no Laboratório de Fisiologia Bacteriana – IOC/FIOCRUZ, composto por (g/l): Extrato de lêvedo (1), NaCl (2), MgSO₄.7H₂O (0,3), Mn SO₄.H₂O (0,02), ZnSO₄.7H₂O (0,02), FeSO₄.7H₂O (0,02), CaCl₂(0,1) e água destilada (q.s.p.).

O pH do meio foi ajustado com solução de NaOH 1N a 7,0 e, a seguir, o meio de cultura foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a 120°C. Separadamente foram preparadas: uma solução de glicose (3 g/l), esterilizada por 20 minutos e uma suspensão de farinha de soja micronizada, (20 g/l), sendo o pH desta última ajustado para 9,5 – 10 por meio de NaOH 1N, a preparação foi autoclavada por 20 minutos a 120°C. Após a esterilização, tanto a solução de glicose quanto a suspensão de farinha de soja foram adicionadas assepticamente ao meio de cultura.

3.2.2. - Produção da biomassa bacteriana

A primeira etapa do crescimento consistia na realização de um pré-inóculo, onde a linhagem foi inoculada com o objetivo de adaptá-la ao meio, fazendo com que a fase *lag* de crescimento bacteriano tivesse seu tempo de duração reduzido e com isso, ganhando-se tempo para o crescimento. Após a inoculação de uma alíquota da cultura bacteriana jovem em um Erlenmeyer de 250 ml contendo 100ml do meio citado, o frasco foi incubado em agitador New Brunswick R76, a 120 o.p.m., à uma temperatura de 30°C ± 1°C, por um período de aproximadamente 6 horas.

Para a produção da biomassa bacteriana foi utilizado um fermentador New Brunswick, modelo FS 314, com reator 14 litros de capacidade, contendo 6 litros do meio de cultura descrito que foram adicionados com 30 ml do pré-inóculo.

O mosto foi fermentado à 33°C, com uma agitação de 500 r.p.m. e com a aeração de 0,5 v.v.m. (ou 3 litros/minuto), por um período de 24 horas. Periodicamente, retiravam-se amostras para a determinação do pH e observação das condições de

crescimento do *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*, assim como, o nível de esporulação da cultura, ao microscópio óptico.

Quando a fermentação atingia mais de 95% de esporos e cristais livres no meio, o mosto era submetido à centrifugação em centrífuga Alfa-laval de vazão contínua à 12000 rpm por aproximadamente 1 hora. A biomassa bacteriana era colhida e formulada para melhor conservação da mesma, e teve seu pH ajustado em torno de 4,5 – 5,0 com ácido propiônico para melhor preservar as protoxinas.

3.2.3 - Determinação do Peso-Seco

Pesava-se 0,5 g de biomassa em cadinhos de porcelana, previamente tarados até a quarta casa decimal, usando-se uma balança analítica. Foram utilizadas três tomadas de amostras. Após as pesagens, os cadinhos permaneciam em estufa à vácuo, a uma temperatura de 70°C, sob pressão de 620mmHg, por um período de 24 horas. Ao final deste tempo, eram transferidos para dessecador, submetendo-os ao vácuo por 1 hora, para atingirem a temperatura ambiente. Então, foi pesado até a quarta casa decimal, em balança analítica, para a obtenção do peso médio da biomassa seca e assim, calcular-se o valor médio da umidade por diferença.

3.2.4 - Contagem do Número de Células Viáveis

Após a determinação do peso seco da biomassa, uma alíquota correspondente a 25 mg da biomassa seca foi transferida para um balão volumétrico de 50 ml. Com auxílio de água destilada, suspendia-se e completava-se o volume até o traço e a suspensão era homogeneizada por cinco minutos. Esta suspensão-mãe, que encerrava

0,5mg/ml, era utilizada para a quantificação do número de esporos viáveis na preparação. Cinco mililitros desta solução foram submetidos a aquecimento (85°C durante 12 minutos) em banho-maria. Após o resfriamento para atingir a temperatura ambiente, procedia-se às diluições decimais seriadas (1 ml de suspensão em 9ml de NaCl a 0,85% estéril) em tubos de rosca esterilizados, até 1:10⁵. Das três últimas diluições (1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵), retirava-se 0,1ml para ser semeado por espalhamento na superfície de Ágar Simples contido em placas de Petri. Foram utilizadas três placas para cada diluição e, a seguir, as placas foram incubadas em estufa do tipo B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) à 33°C por 24 horas. Contava-se, em seguida, o número de colônias, determinando-se assim a média, computando-se para esse fim todas as placas de uma diluição com um número de colônias entre 30 e 300, e então, calculava-se o número de esporos por mg de biomassa bacteriana.

3.3 - Preparação da suspensão bacteriana para os bioensaios de avaliação do dano histopatológico

Após a produção da biomassa e o cálculo da umidade, foi feita a preparação da suspensão bacteriana que seria aplicada no inseto-alvo. Foram pesados 32 mg de biomassa (peso seco) do bioinseticida (biomassa formulada), sendo passados para balão volumétrico de 5 ml e então, o volume foi completado com água destilada isenta de cloro. Esta suspensão encerrava 0,064 mg/ml.

3.4 - Bioensaios com larvas de *Simulium pertinax* para avaliação do dano histopatológico:

Para a realização dos testes de avaliação do dano causado pelas δ- endotoxinas de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* em larvas de *Simulium pertinax*, foram coletadas larvas com histoblasto respiratório completo, aderidas a substratos naturais no Rio Soberbo, município de Guapimirim, Rio de Janeiro (Figura 1). Essas foram, então, separadas em seis becheres com capacidade para 600 ml, contendo cada um, 400 ml de água do criadouro mais 100 larvas. As formas imaturas de *S. pertinax* identificadas através das manchas cefálicas, foram mantidas dentro dos becheres com um sistema de borbulhamento de ar originado de bombas de aquário que permitia a oxigenação e a circulação da água, necessários para a troca gasosa e captação do alimento pelas larvas. Tentou-se, assim, reproduzir o ambiente no qual elas vivem naturalmente. Isso feito, procedeu-se à aplicação das seguintes doses de inseticida biológico à base de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*: 2, 4 e 6 mg/l (Figura 2). Os tempos de exposição das larvas ao inseticida biológico variaram de 1 hora à 4 horas, de modo a se poder acompanhar a evolução dos danos causados.

Ao término de cada um desses tempos, as larvas que respondiam à estímulos físicos (ao toque usando-se pipetas descartáveis de poliestireno), foram retiradas dos becheres e levadas para microscópio estereoscópico onde tiveram cortadas suas cabeça e região anal. Em seguida, o material foi submetido a uma série de procedimentos descritos a seguir, visando a observação aos microscópios óptico e eletrônico de transmissão, com o intuito de se identificar o local e a progressão dos danos causados pelas toxinas.



Figura 1 – Rio Soberbo, criadouro onde foram coletadas as larvas de *Simulium pertinax*, Município de Guapimirim, Rio de Janeiro.



Figura 2 – Becheres com 400ml de água do criadouro onde foram colocadas as larvas de *Simulium pertinax* com um sistema de borbulhamento de ar originado de bombas de aquário que permitia a oxigenação e circulação da água.

3.5 - Preparação das amostras para observação sob microscopias óptica e eletrônica

3.5.1 - Fixação

As larvas foram fixadas em uma solução de Glutaraldeído a 2,5% por uma noite em temperatura de refrigerador. Após a fixação, os espécimes foram lavados 3 vezes em tampão Cacodilato de Sódio 0,1M pH 7,2 durante 15 minutos. As larvas foram encaminhadas ao Laboratório de Ultraestrutura Viral do Departamento de Virologia nesse tampão, aonde foram preparadas para a observação sob microscopia óptica e eletrônica.

3.5.2 - Pós-fixação

As larvas foram submetidas a uma pós-fixação em uma solução de Tetróxido de Ósmio a 1% por 1 hora e 45 minutos e em seguida submetidas à lavagem utilizando-se tampão Cacodilato de Sódio a 0,2M pH 7,2 com sacarose a 7,5% durante 10 minutos.

3.5.3 - Desidratação

A desidratação das larvas era feita através de uma série crescente de soluções feitas com Acetona Anidra variando-se as concentrações e tempo de 30% e 50 % durante 10 minutos, 70% (mais Acetato de Uranila a 1%) por 30 minutos, 90% durante cinco minutos, e 100% Anidra por duas vezes durante cinco minutos.

3.5. 4 - Inclusão em Epon

A inclusão em resina Epon foi feita por impregnação gradativa com misturas de Epon com Acetona Anidra como a seguir: Acetona a 100% nas proporções 1:3 por 30 minutos, 3:1 por uma noite e, em seguida, Epon puro por 5 horas à temperatura ambiente. A polimerização dos blocos ocorreu em estufa à 60°C durante 72horas.

3.5.5 - Preparação para Observação sob Microscopia Óptica

O material incluído em Epon foi cortado com navalha de diamante em um ultramicrotomo Reichert-Jung Ultracut E.

Foram obtidos cortes com 0,5 μ m de espessura que eram recolhidos em lâminas de vidro, corados com uma solução de Azul de Metileno - Azul II em tampão Fosfato 0,2M pH 6,9 (volumes iguais de Azul II a 1% em água destilada e 1% de Azul de Metileno numa solução de Bórax a 1%), em uma placa aquecida à 80°C, por 5 minutos. A seguir, as lâminas foram lavadas em água destilada (RICHARDSON et al., 1960). Em seguida, as lâminas foram observadas em microscópio óptico Zeiss modelo Axiophot, com o objetivo de se identificar a região que apresentasse alterações morfológicas utilizando-se para tanto objetivas de 10 , 20 e 40 vezes. As lâminas contendo os cortes histológicos foram fotografadas com filme KODAK ULTRA 400 A.

3.5.6 - Preparação para observação sob Microscopia Eletrônica de Transmissão

Das preparações impregnadas em Epon, foram feitos cortes ultrafinos de aproximadamente 60nm, utilizando-se o ultramicrotomo Reichert-Jung Ultracut E com

a navalha de diamante. Os cortes foram recolhidos sobre grades de cobre e contrastados com solução de Acetato de Uranila a 2% em Etanol 50% durante 15 minutos, posteriormente em uma solução composta de Nitrato de Chumbo (4,43%) e Citrato de Sódio (5,86%) por 4 minutos (REYNOLDS, 1963). Os cortes foram observados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM-900 com 3000, 7000 e 12000 vezes de aumento.

4 - RESULTADOS

Primeiramente, os resultados serão apresentados demonstrando as características histológicas do trato intestinal das larvas de **Simulium pertinax** do grupo controle e o seu aspecto íntegro de até 4 horas de observação. Posteriormente, vai se discorrer sobre as tratadas com **Bacillus thuringiensis** sorovar **israelensis** nas diversas concentrações e submetidas a diferentes tempos de exposição, destacando-se as alterações histopatológicas no trato intestinal.

Não foram notados danos na estrutura histológica na porção anterior do intestino médio, onde se pode observar nas Figuras 3a e 3b uma camada única de células poligonais com amplos microvilos, núcleos de tamanho normal e citoplasma regular; o mesmo ocorrendo com a porção posterior onde foram observadas células pequenas de aspecto caliciforme, bem unidas lateralmente, núcleos de tamanho normal e o espaço entre a membrana peritrófica e o epitélio apresentando aspecto límpido (Fig. 4).

Para as larvas expostas à concentração de 2 mg/l de bioinseticida à base de **B. thuringiensis** sorovar **israelensis** colocados em becheres contendo 400ml de água do

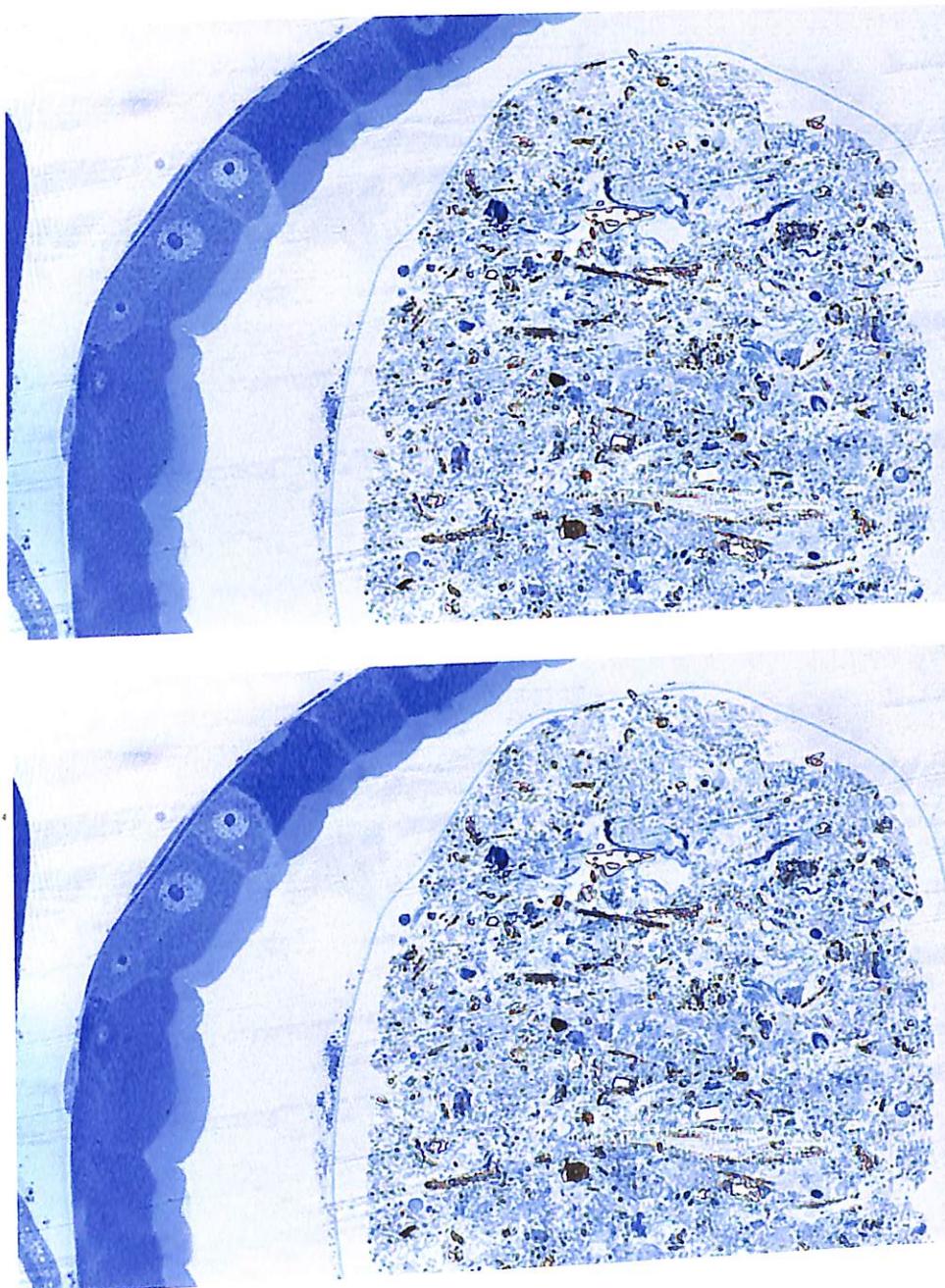


Figura 3: Cortes transversais da porção anterior do intestino médio de larvas de *Simulium pertinax* pertencentes ao grupo controle onde se observam as estruturas em monocamada das células epiteliais com microvilos (bordas em escova), núcleos apresentando tamanhos normais, citoplasma regular e o espaço entre a membrana peritrófica; o epitélio está com o aspecto límpido. Observações realizadas sob microscopia óptica com um aumento de 50X (A) e 100X (B).

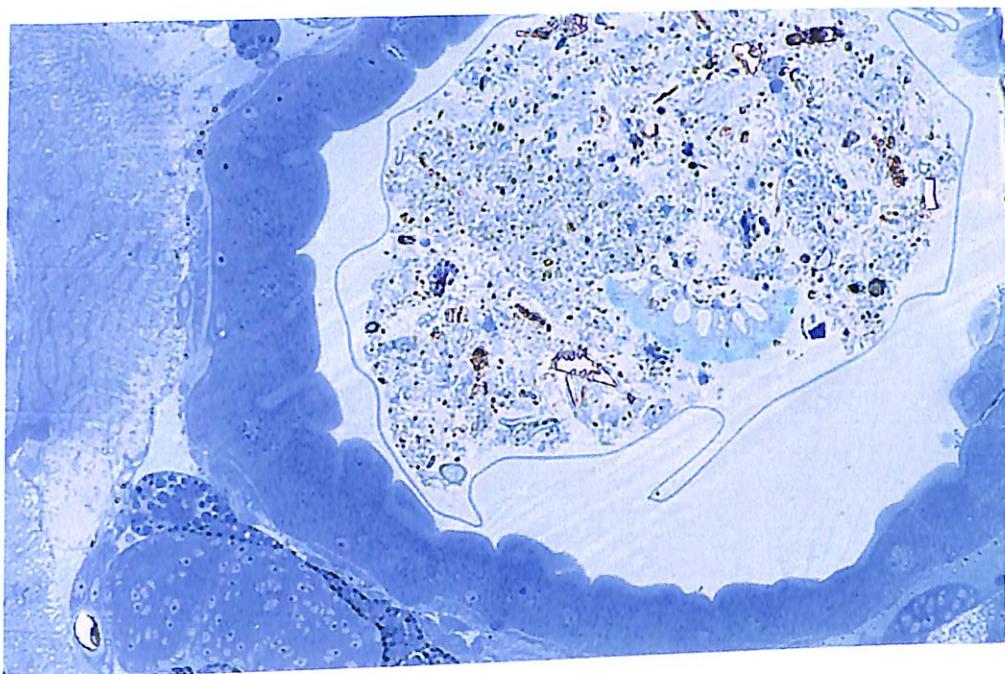


Figura 4: Corte transversal do intestino médio posterior de larva de *Simulium pertinax*, do grupo controle com aparência íntegra onde se pode observar células pequenas com microvilos normais (bordos em escova), bem juntas lateralmente, núcleos de tamanho normal e o aspecto límpido do espaço entre a membrana peritrófica e o epitélio intestinal. Observação realizada sob microscopia óptica com um aumento de 100X.

criadouro com 100 larvas durante 1 hora, observou-se debríis celulares, causados provavelmente pelo desprendimento de parte das células afetadas na porção anterior do intestino médio, resultando no aparecimento de conteúdo celular no espaço entre o epitélio e a membrana peritrófica, como também, deformação nuclear das células ambos os efeitos com características de dano causados por toxinas de **Bacillus thuringiensis** sorovar **israelensis** (Fig. 5).

Ainda com essa mesma concentração (2 mg/l), porém, após 2 horas de exposição, observando-se a porção posterior do intestino médio, encontrou-se vacúolos, causados pela hipertrofia celular, tênue deformação em células intactas, células já rompidas levando a presença de grande quantidade de conteúdo celular no espaço entre a membrana peritrófica e o epitélio, como também, dobras na membrana peritrófica, além dos danos anteriormente descritos (Figs. 6 a e 6b).

Após 3 horas, as células da porção posterior, apresentavam rupturas aparentes nas microvilosidades, turgidez celular, além dos danos já descritos para os tempos anteriores (Figs. 7 a e 7b), pode-se observar a progressão do dano causado no epitélio intestinal pelo **Bacillus thuringiensis** sorovar **israelensis**.

Quando foi aplicada uma maior concentração do bioinseticida, 4 mg/l, após 1 hora de observação, as células ainda não estavam severamente afetadas, já apresentando sinais iniciais de dano por toxinas de **Bacillus thuringiensis** sorovar **israelensis**. Vale destacar, que o espaço entre as microvilosidades e a membrana peritrófica estava ocupado por conteúdo celular oriundo da ruptura das células adjacentes. As junções laterais das células já exibiam um pequeno espaçamento; evidenciava-se uma

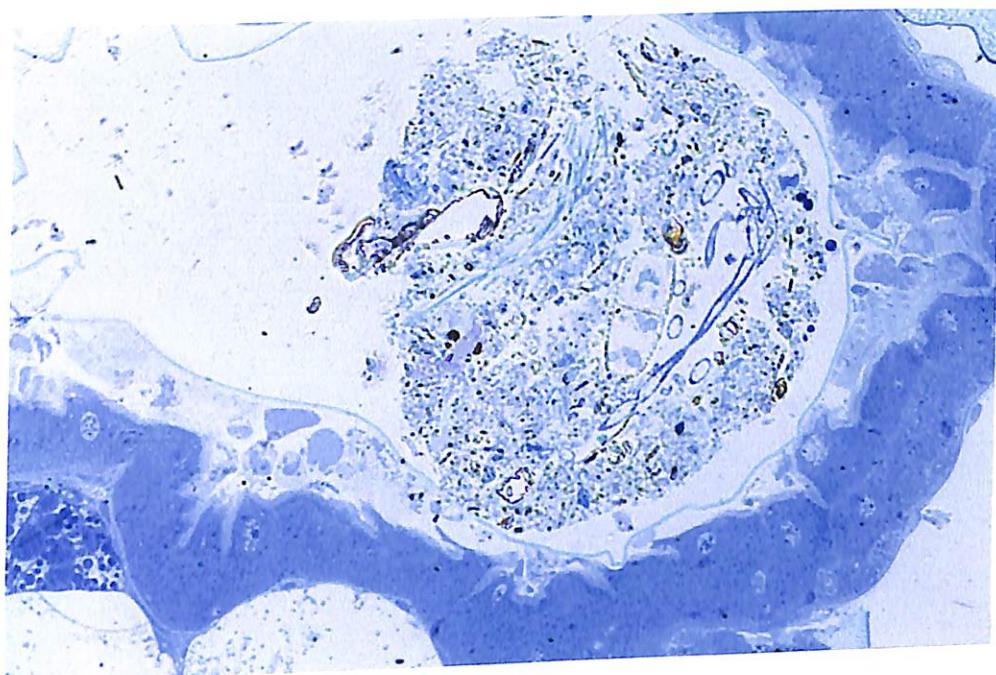


Figura 5: Corte transversal da porção anterior do intestino médio de larvas de *Simulium pertinax* submetidas a 2 mg/l de um preparado inseticida à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* por um período de 1 hora, onde se observa a presença de conteúdo celular no espaço entre a membrana peritrófica e o epitélio e deformação nuclear. Observação realizada sob microscopia óptica com um aumento de 100X.

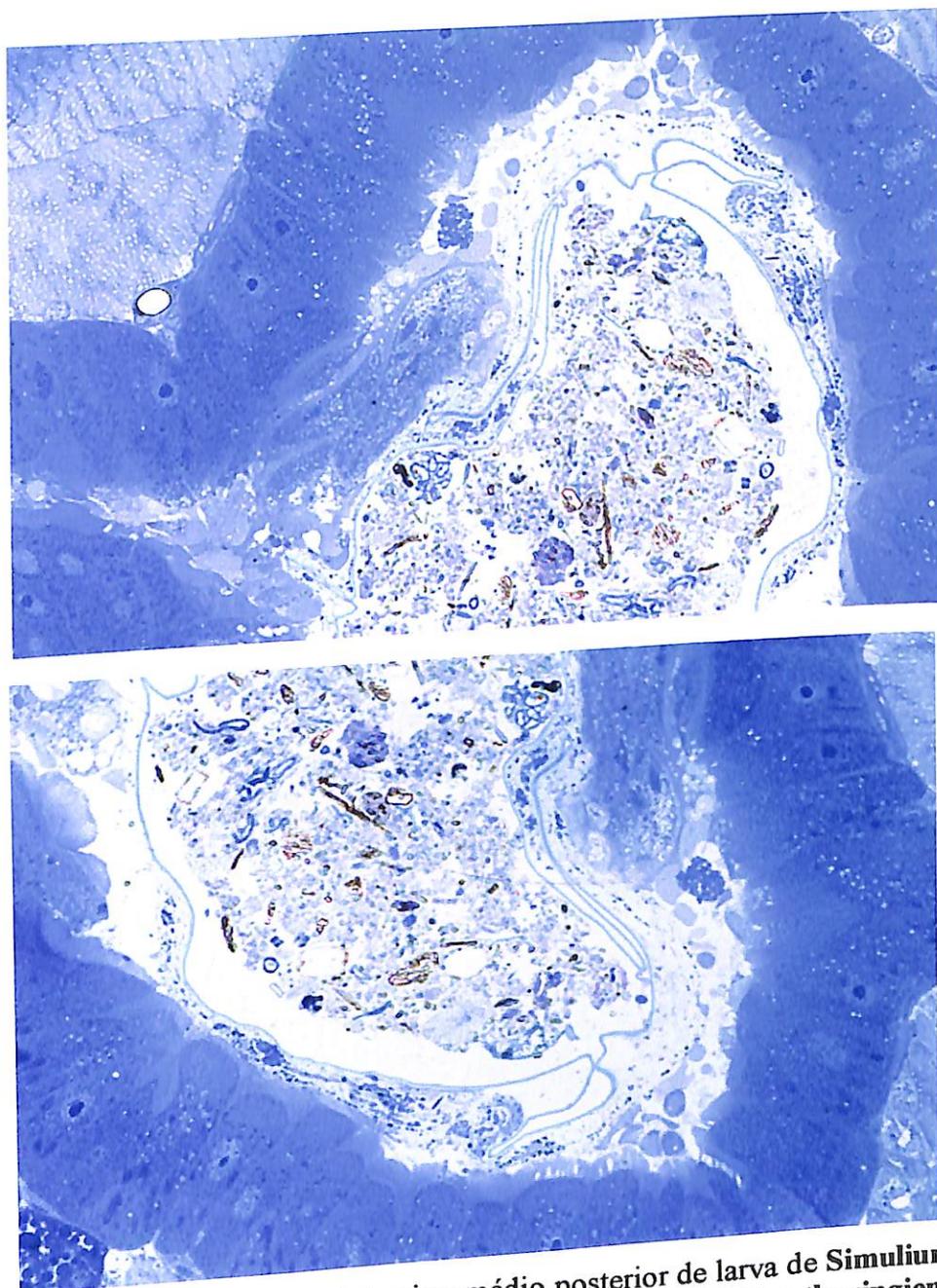


Figura 6: Cortes transversais do intestino médio posterior de larva de *Simulium pertinax* exposta durante 2 horas a 2 mg/l de um preparado à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* apresentando hipertrofia celular, vacuolização do citoplasma, deformação nuclear (A), presença de grande quantidade de conteúdo celular no espaço entre a membrana peritrófica e o epitélio intestinal e dobras na membrana peritrófica (B). Observações feitas sob microscopia óptica com aumento de 100X.

vacuolização do citoplasma e alguns núcleos encontravam-se alterados, em virtude, muito provavelmente, da deformação celular motivada pelo desequilíbrio osmótico (Figs. 8, 9a e 9b).

Nessa mesma concentração, e nesse mesmo período de exposição, observando-se outro lote de larvas, constatou-se danos muito mais severos, tais como, ruptura e deformação celular muito acentuada, levando ao desprendimento das células em direção ao lúmen embora tendo a membrana peritrófica como barreira, resultando na presença de resíduos celulares no espaço entre a membrana peritrófica e as microvilosidades, alguns núcleos se encontravam hipertrofiados, outros porém, já tinham sido completamente destruídos (Figs. 10a e 10b).

Acompanhando a progressão do dano, sendo analisados os efeitos na porção posterior após 3 horas de exposição, observou-se claramente o agravamento das alterações histológicas anteriormente descritas, como também, o início da ruptura das microvilosidades (Figs. 11a e 11b).

Quando se empregou a concentração de 6 mg/l de bioinseticida à base de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*, só foi possível a observação das larvas com 1 hora de exposição, visto que, após esse período todas as larvas já tinham morrido com características típicas de morte por intoxicação por *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis*, isto é, curvatura atípica do corpo das larvas devido à paralisia muscular, escurecimento da cutícula na região posterior do corpo em virtude da destruição do epitélio intestinal, bem como a não reação das larvas ao toque. Nessa concentração, constatou-se os mesmos sintomas anteriormente observados, porém de maneira severa, onde foi possível observar a completa desorganização celular do epitélio (Fig. 12).

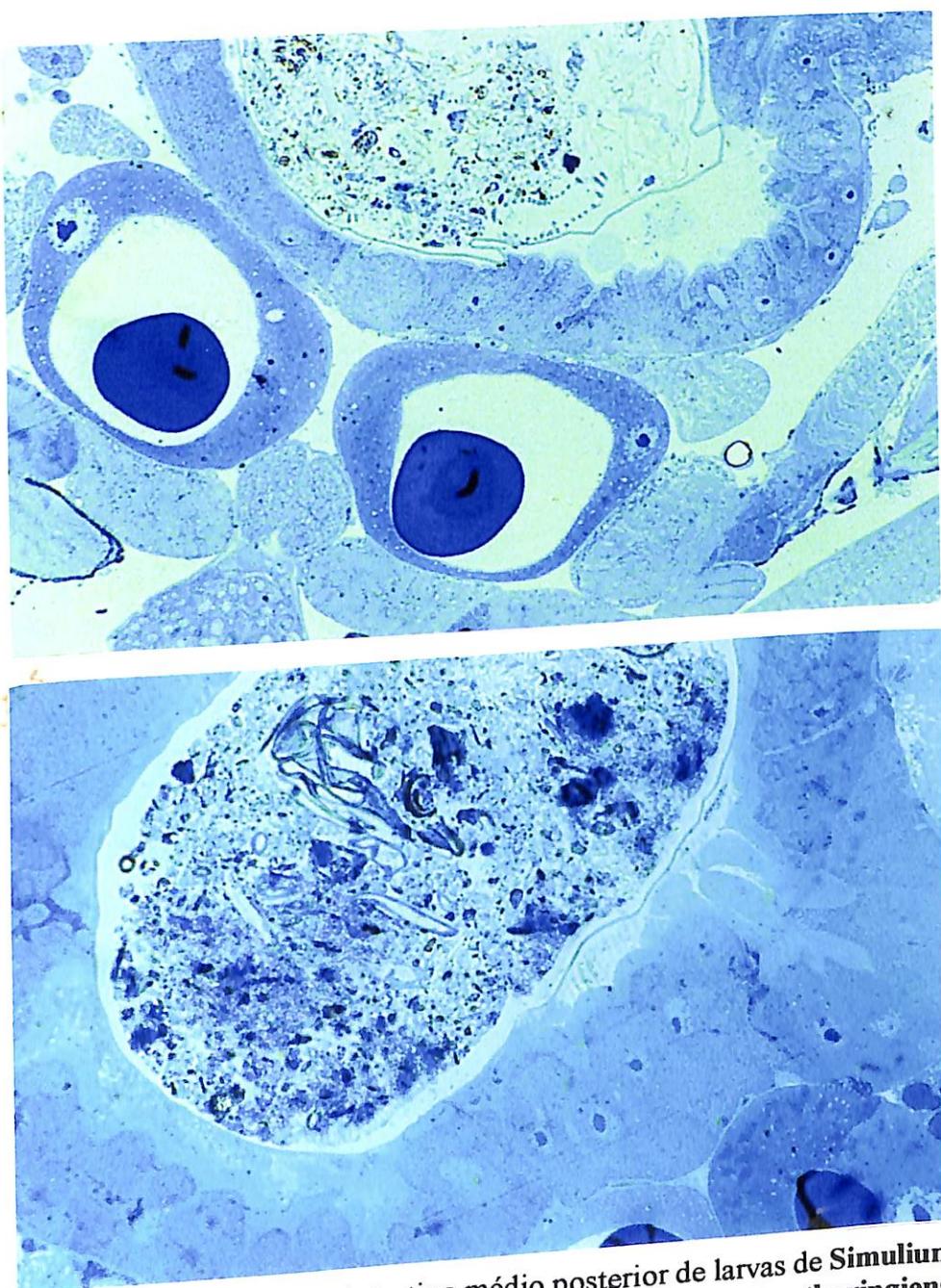


Figura 7: Cortes transversais do intestino médio posterior de larvas de *Simulium pertinax* submetidas a 2 mg/l de um preparado inseticida à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* por um período de 3 horas, onde se observam rupturas das microvilosidades (bordos em escova), turgidez celular, vacuolização do citoplasma (A) e presença de conteúdo celular no espaço entre a membrana peritrófica e o epitélio (B). Observações realizadas sob microscopia óptica com um aumento de 100X.

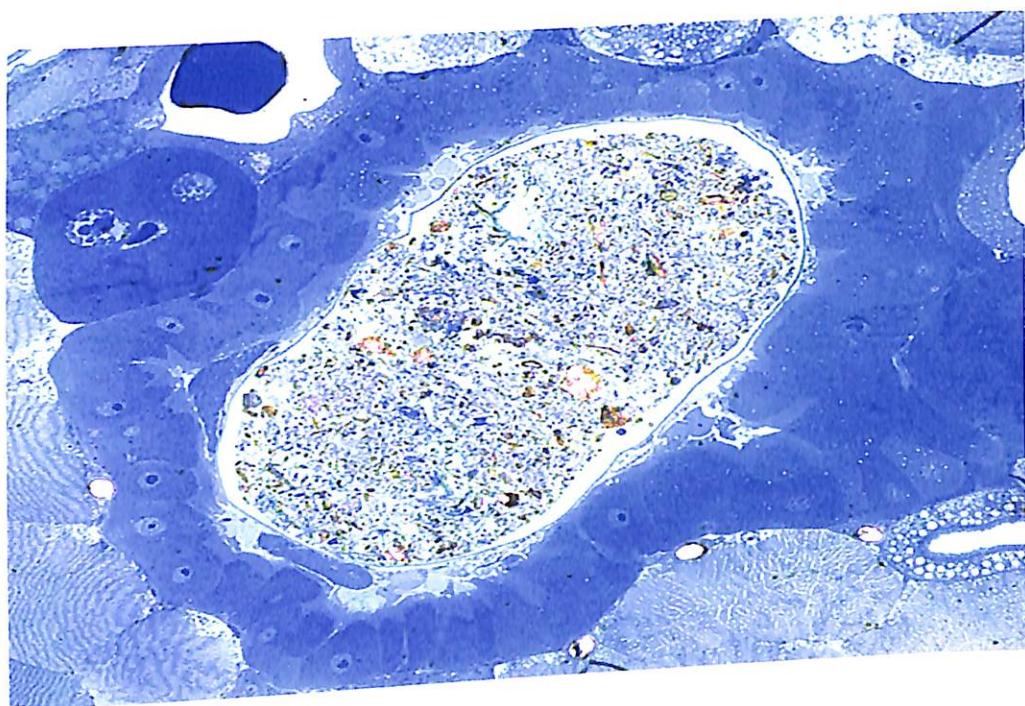


Figura 8: Corte transversal do intestino médio, porção posterior, de larva de *Simulium pertinax* exposta durante 1 hora a 4 mg/l de um preparado à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* apresentando danos moderados como hipertrofia celular, leve espaçamento lateral entre as células epiteliais, deformação nuclear, presença de conteúdo celular no espaço entre a membrana peritrófica e o epitélio intestinal. Observação feita sob microscopia óptica com aumento de 50X.

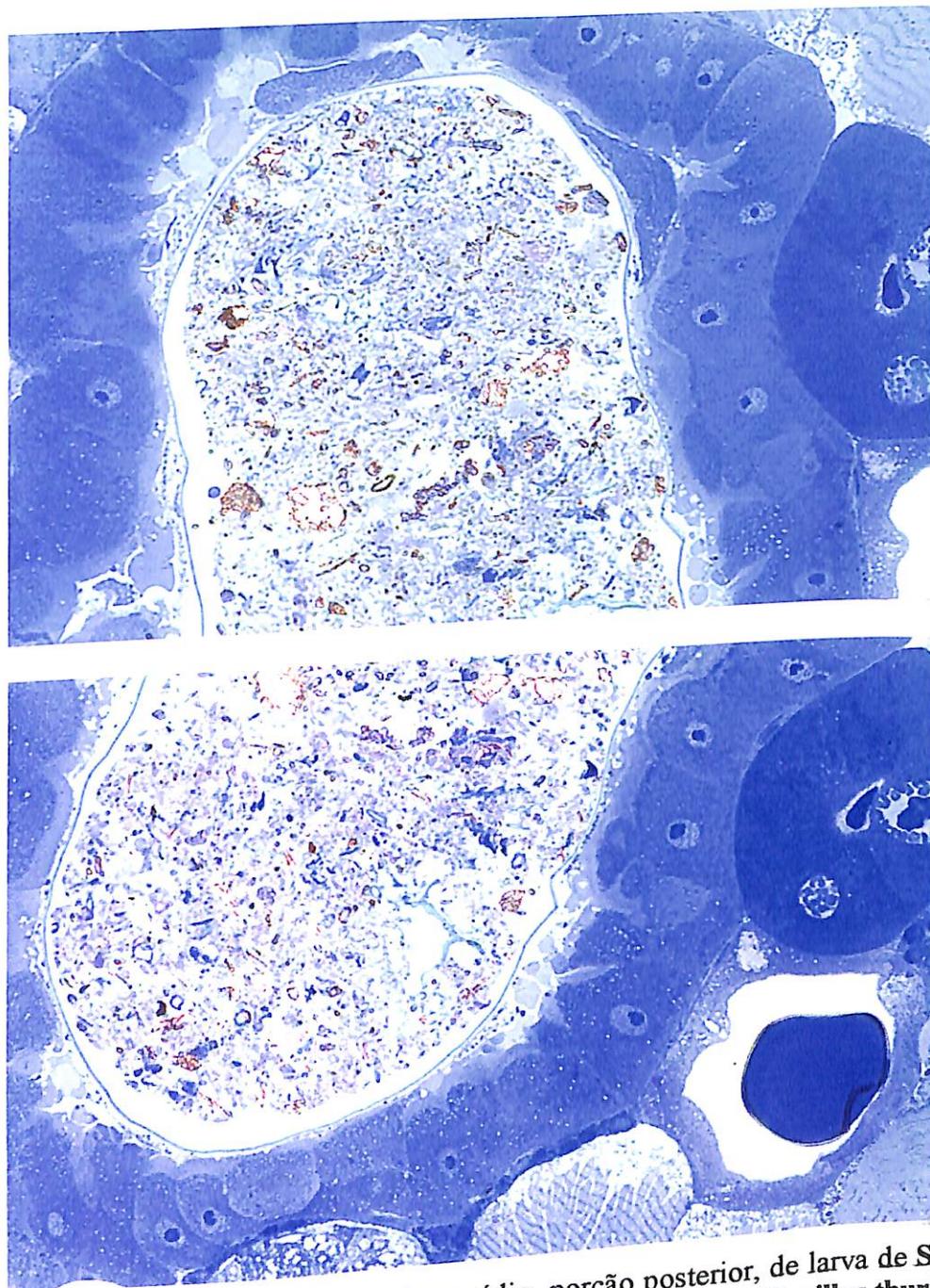


Figura 9: Cortes transversais do intestino médio, porção posterior, de larva de *Simulium pertinax* exposta durante 1 hora a 4 mg/l de um preparado à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* apresentando danos moderados como hipertrofia celular, vacuolização do citoplasma, leve espaçamento lateral entre as células epiteliais (A), deformação nuclear, presença de conteúdo celular no espaço entre a membrana peritrófica e o epitélio intestinal (B). Observação feita sob microscopia óptica com aumento de 100X.

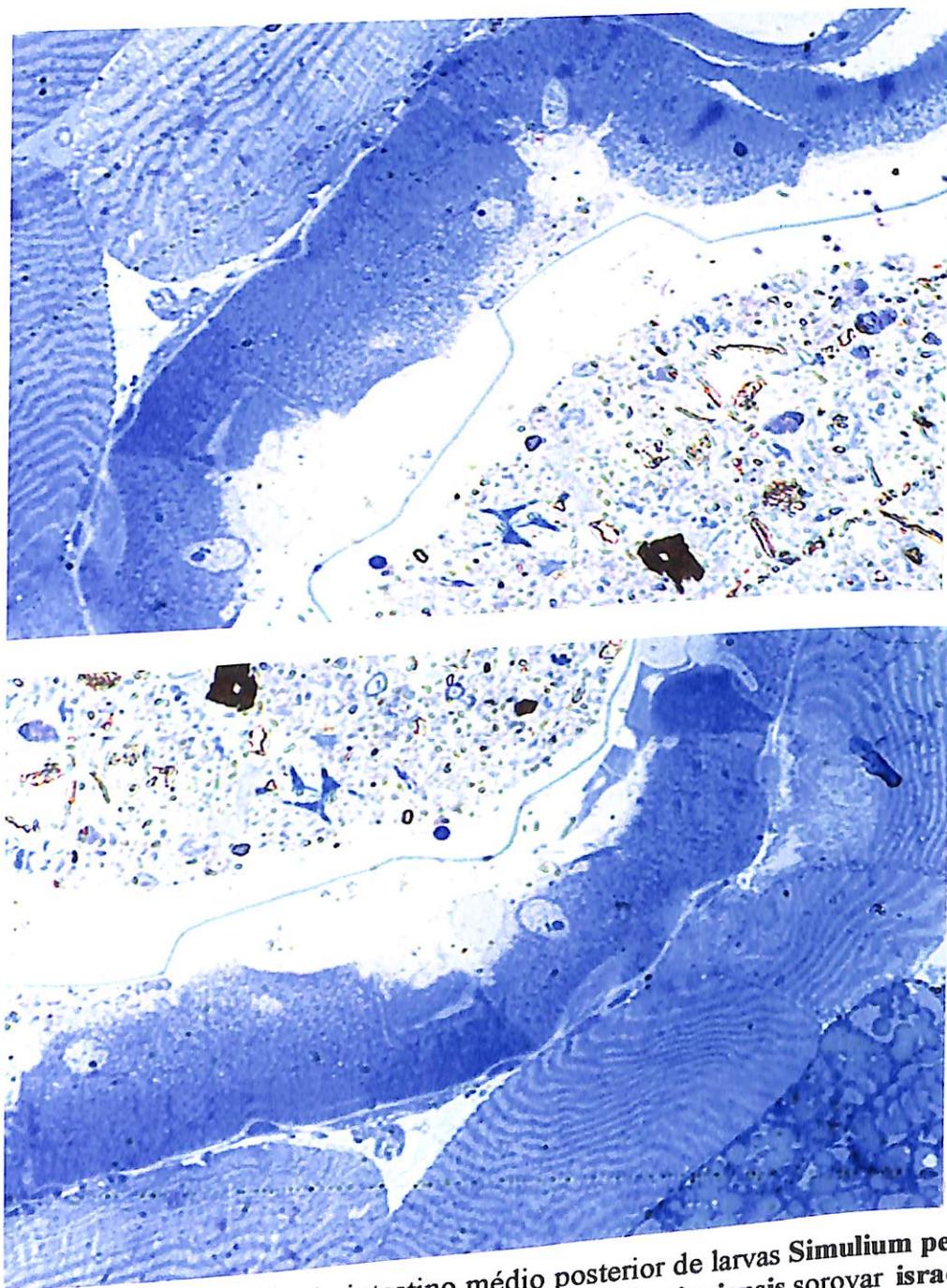


Figura 10: Cortes transversais do intestino médio posterior de larvas *Simulium pertinax* expostas a 4 mg/l de um preparado inseticida de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* durante 1 hora, onde se observa ruptura e deformação celular acentuadas, alguns núcleos encontram-se hipertrofiados e outros já degenerados (A). Conteúdo celular no espaço entre a membrana peritrófica e o epitélio intestinal (B). Observações realizadas sob microscopia óptica com um aumento de 100X.

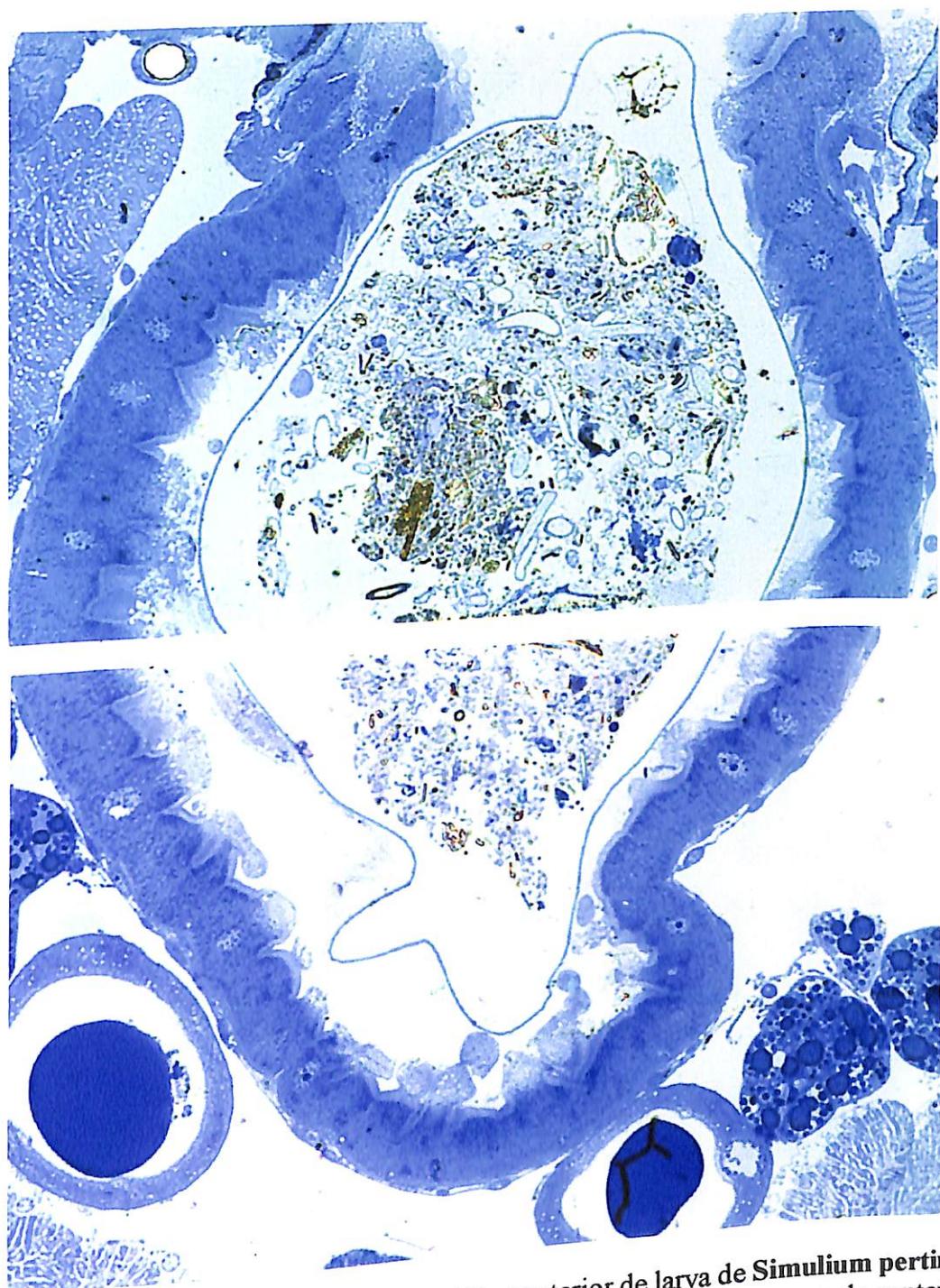


Figura 11: Cortes transversais do intestino médio posterior de larva de *Simulium pertinax* apresentando acentuada hipertrofia celular, degeneração nuclear (A), presença de conteúdo celular no espaço entre a membrana peritrófica e o epitélio, como também, ruptura das microvilosidades (bordos em escova) (B) após 3 horas da exposição ao preparado inseticida de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* na concentração de 4 mg/l. Observação sob microscopia óptica com aumento de 50 X.

Para a microscopia eletrônica de transmissão, os materiais escolhidos visando observação dos efeitos ultraestruturais foram as larvas tratadas com suspensão de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* na concentração de 6 mg/l, tendo em vista que estas foram as que apresentaram uma maior extensão do dano celular. Antes, porém, foi observado o grupo controle, quando se pode notar, com 5200 e 12800 vezes de aumento, que a organização celular era normal com microvilosidades íntegras (Figs. 13a e 13b). O núcleo e as mitocôndrias mantinham também, seu aspecto normal, neste caso, as observações foram realizadas com 21600 e 12352 vezes (Figs. 14a e 14b).

Já para as larvas tratadas, pode-se observar com um aumento de 5000 vezes que a membrana peritrófica encontrava-se íntegra, mas as células epiteliais estavam altamente desorganizadas contendo em seu interior grandes vacúolos, ausência dos microvilos desorganizadas (Figs. 15a e 15b). Fazendo-se observações com aumentos maiores, pode-se observar a degeneração nuclear com a fragmentação da cromatina (Fig. 16), a degeneração completa das microvilosidades (Figs. 17a e 17b), restando apenas seu contorno e uma melhor visualização da destruição do epitélio intestinal apresentando grandes vacúolos no interior do citoplasma das células (Fig 18a) e das alterações ocorridas nas mitocôndrias (Fig. 18b).

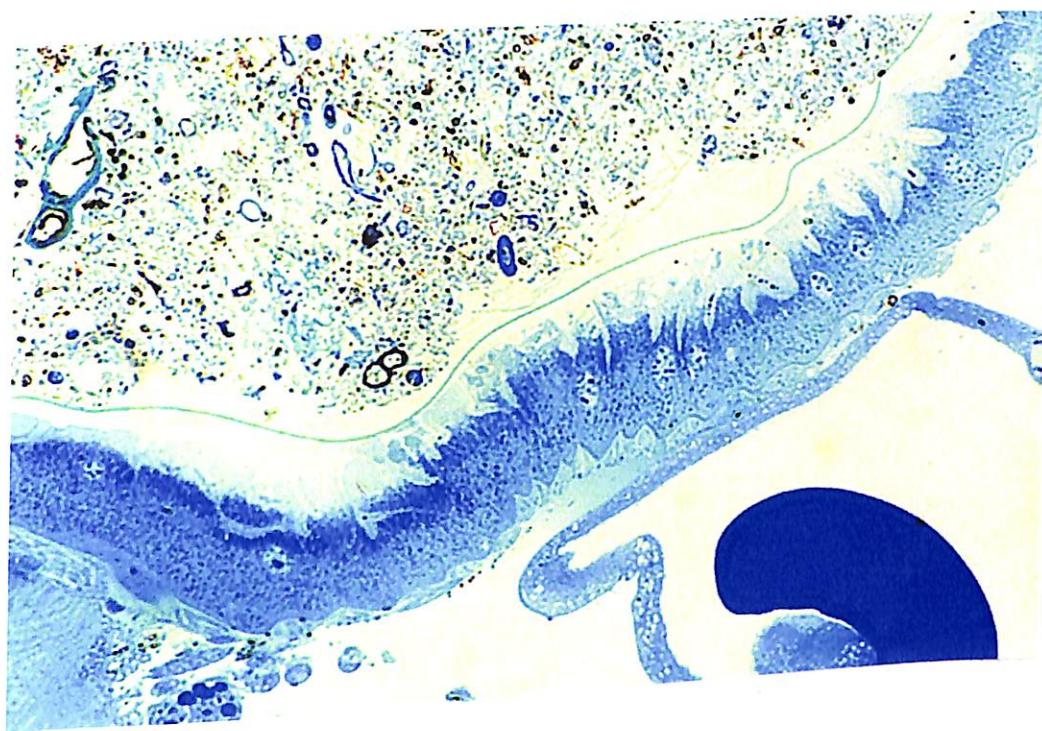


Figura 12: Corte transversal do intestino médio posterior de larvas de *Simulium pertinax* submetidas a 6 mg/l de um preparado inseticida à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* por um período de 1 hora, onde se observam a ruptura das microvilosidades (bordos em escova), desorganização celular do epitélio intestinal, degeneração nuclear, vacuolização do citoplasma e presença de conteúdo celular no espaço entre a membrana peritrófica e o epitélio. Observações realizadas sob microscopia óptica com um aumento de 100X.

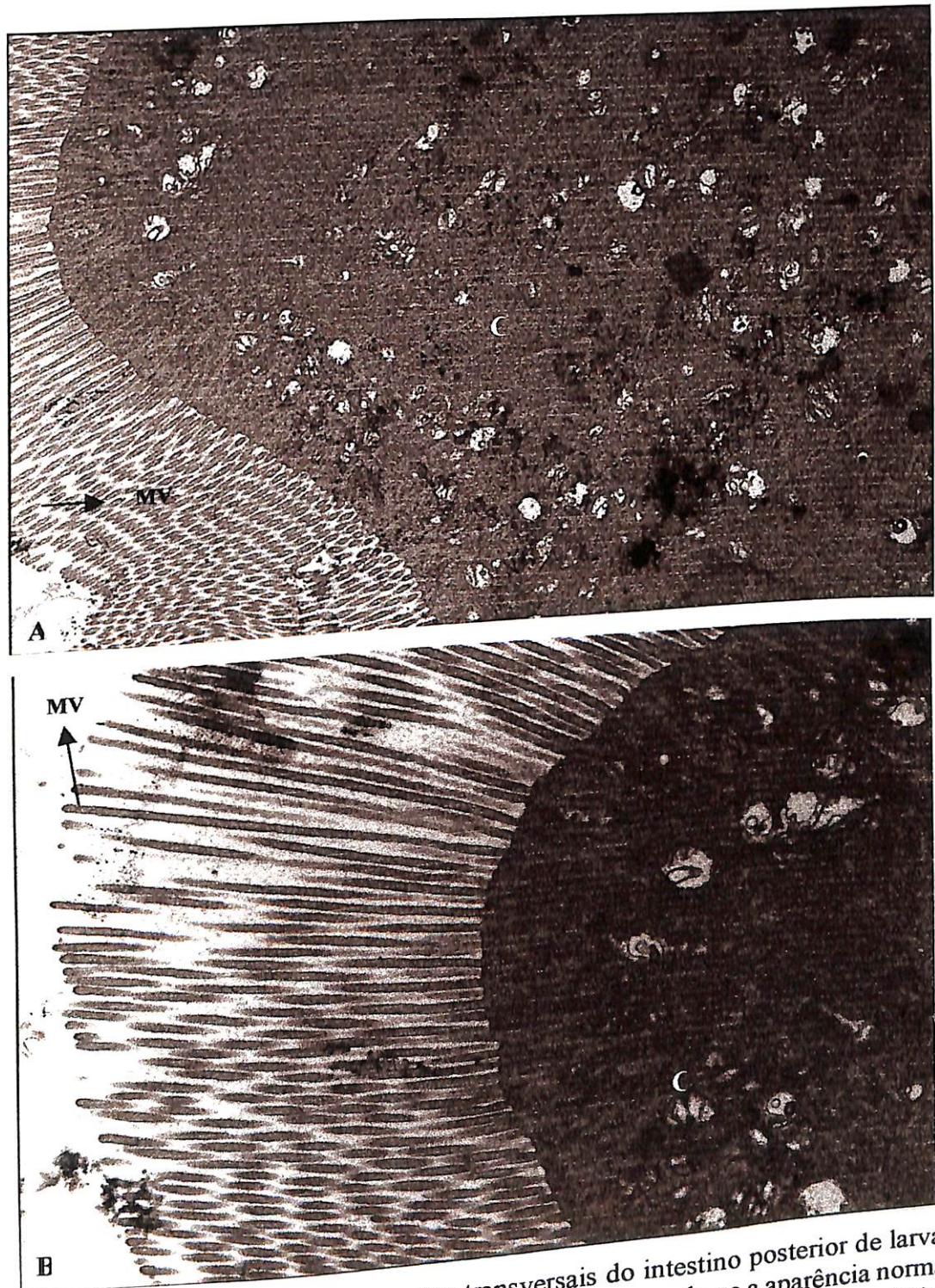


Figura 13: Micrografia eletrônica de cortes transversais do intestino posterior de larvas de *Simulium pertinax*, pertencentes ao grupo controle, observando-se a aparência normal do citoplasma celular com microvilosidades íntegras em um aumento de 5200x (A) e 12800x (B).

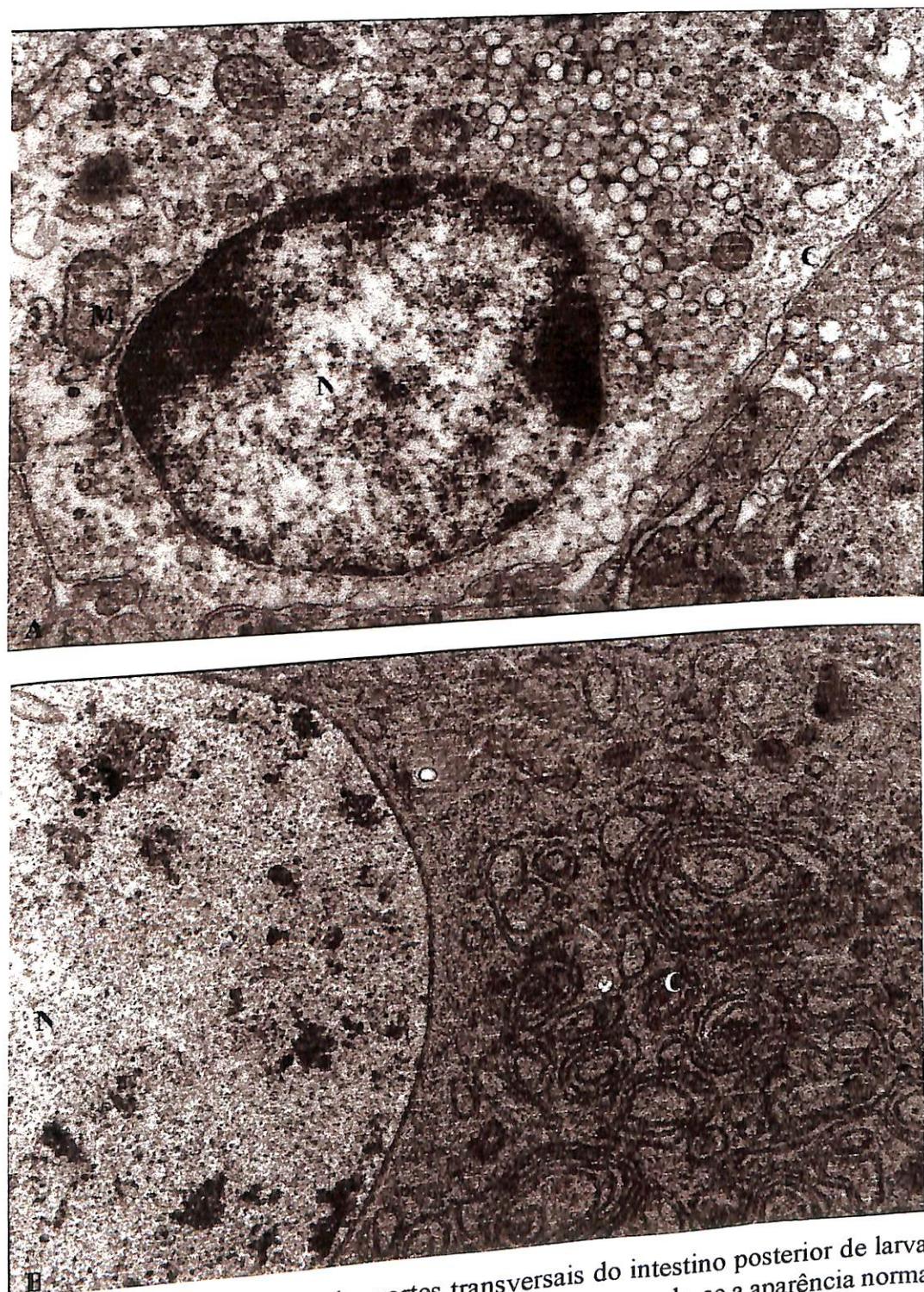


Figura 14: Micrografia eletrônica de cortes transversais do intestino posterior de larvas de *Simulium pertinax*, pertencentes ao grupo controle, observando-se a aparência normal do núcleo e das mitocôndrias. Aumento de 21600x (A) e 12352x (B).

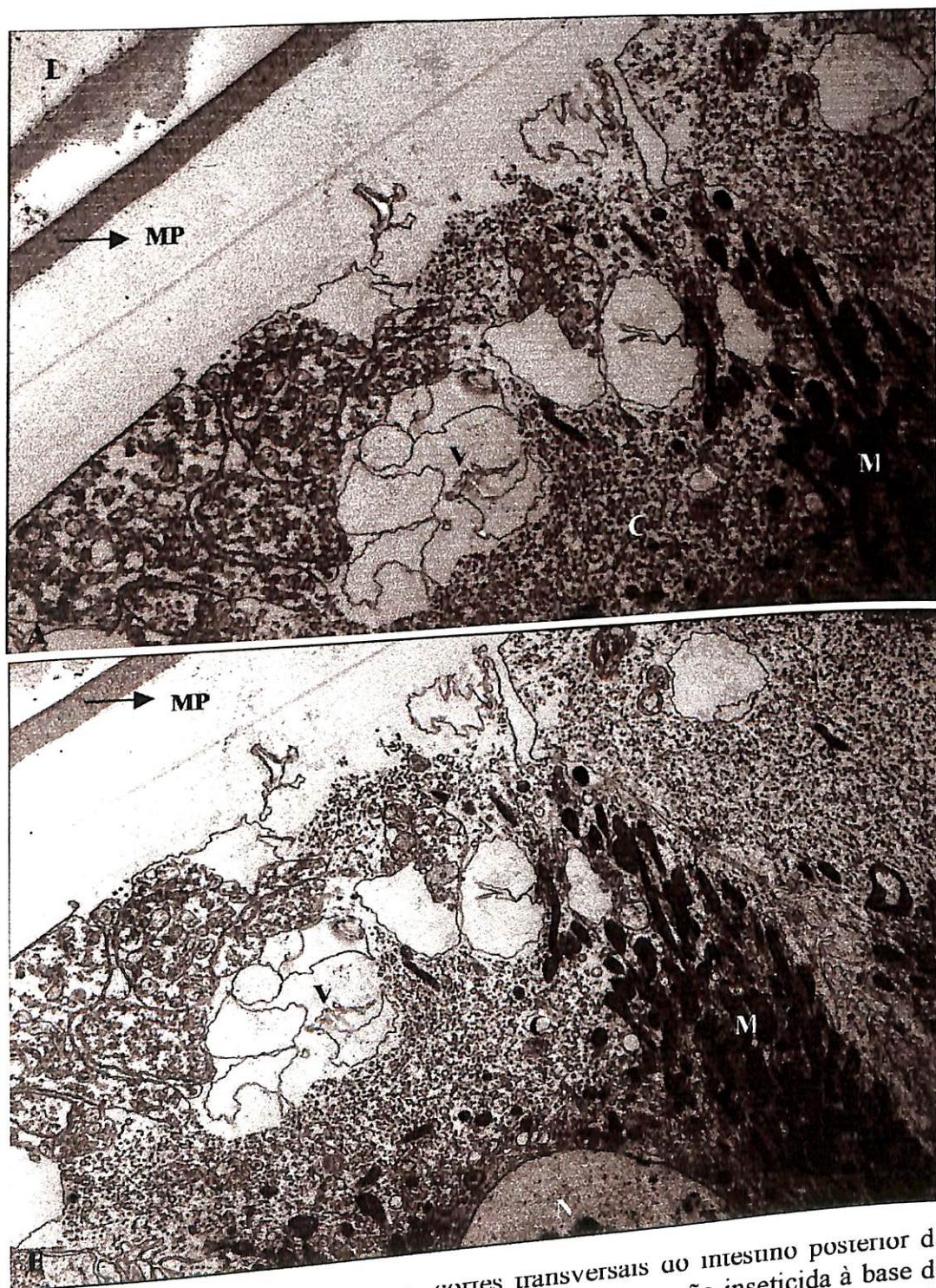


Figura 15: Micrografia eletrônica de cortes transversais do intestino posterior de larvas de *Simulium pertinax*, expostas a 6 mg/l de uma preparação inseticida à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* durante 1 hora. Observa-se a presença de membrana peritrófica íntegra (MP), porém com células epiteliais altamente desorganizadas, com grandes vacúolos (V) (A), mitocôndrias concentradas em uma determinada região (M) e ausência das microvilosidades (B). Observações realizadas com um aumento de 5000x.

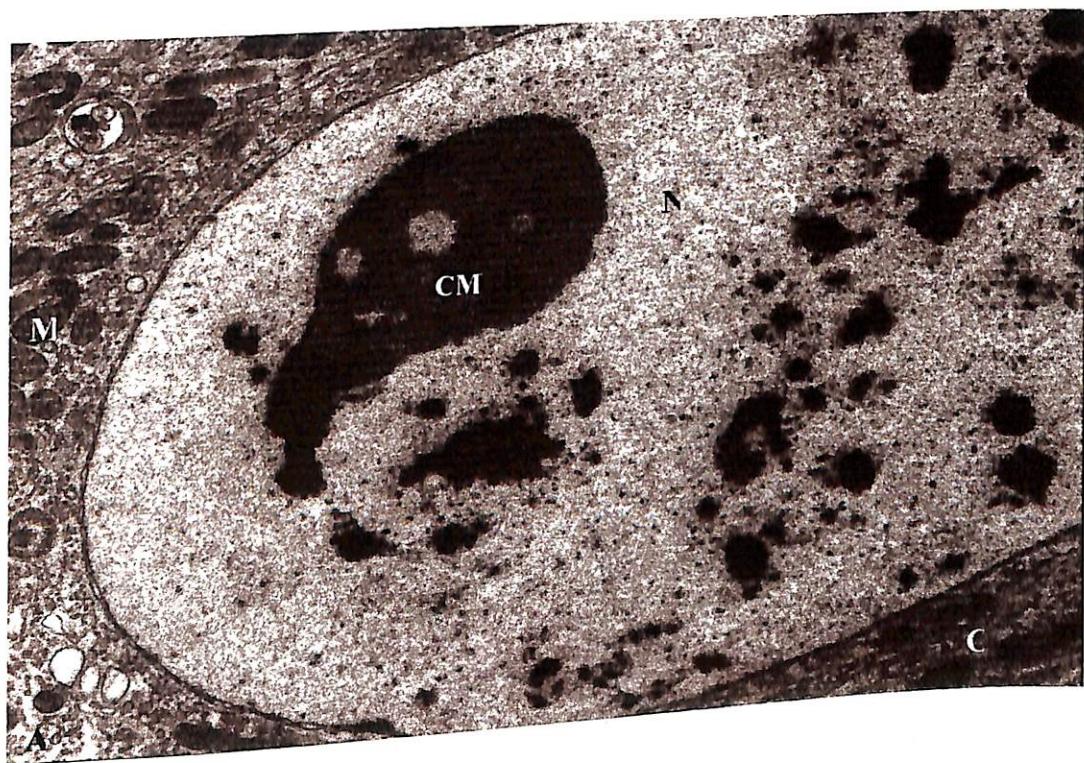


Figura 16 Micrografia eletrônica de corte transversal do intestino posterior de larvas de *Simulium pertinax*, expostas a 6 mg/l de uma preparação inseticida à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* durante 1 hora, observando-se a degeneração nuclear com a fragmentação da cromatina (CM). Observação realizada com aumento de 11530x.

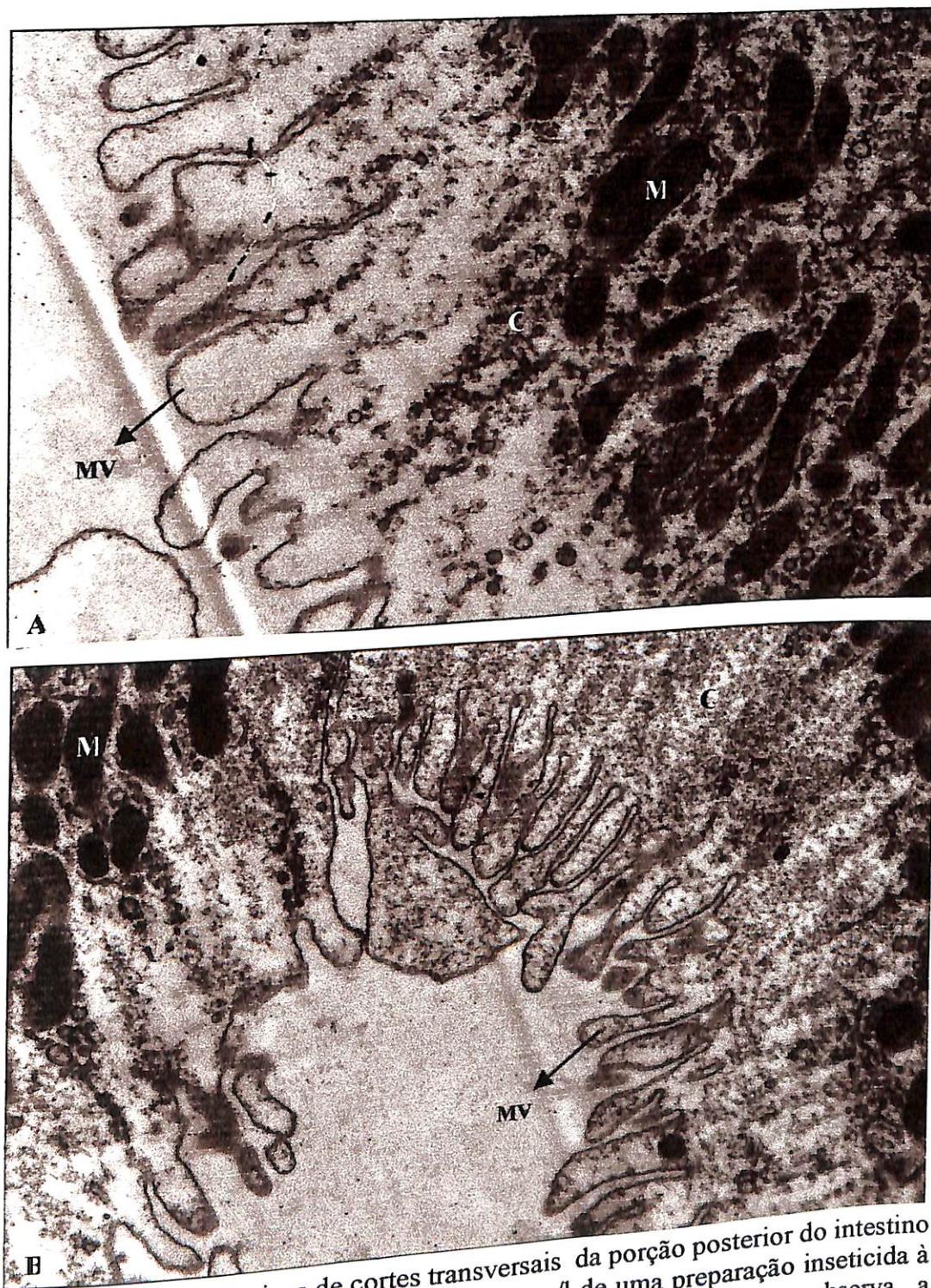


Figura 17: Micrografias eletrônicas de cortes transversais da porção posterior do intestino médio de larvas de *Simulium pertinax* expostas a 6 mg/l de uma preparação inseticida à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* durante 1 hora, onde se observa a completa degeneração das microvilosidades. Observações realizadas com aumento de 24000x (A) e 18860x (B)

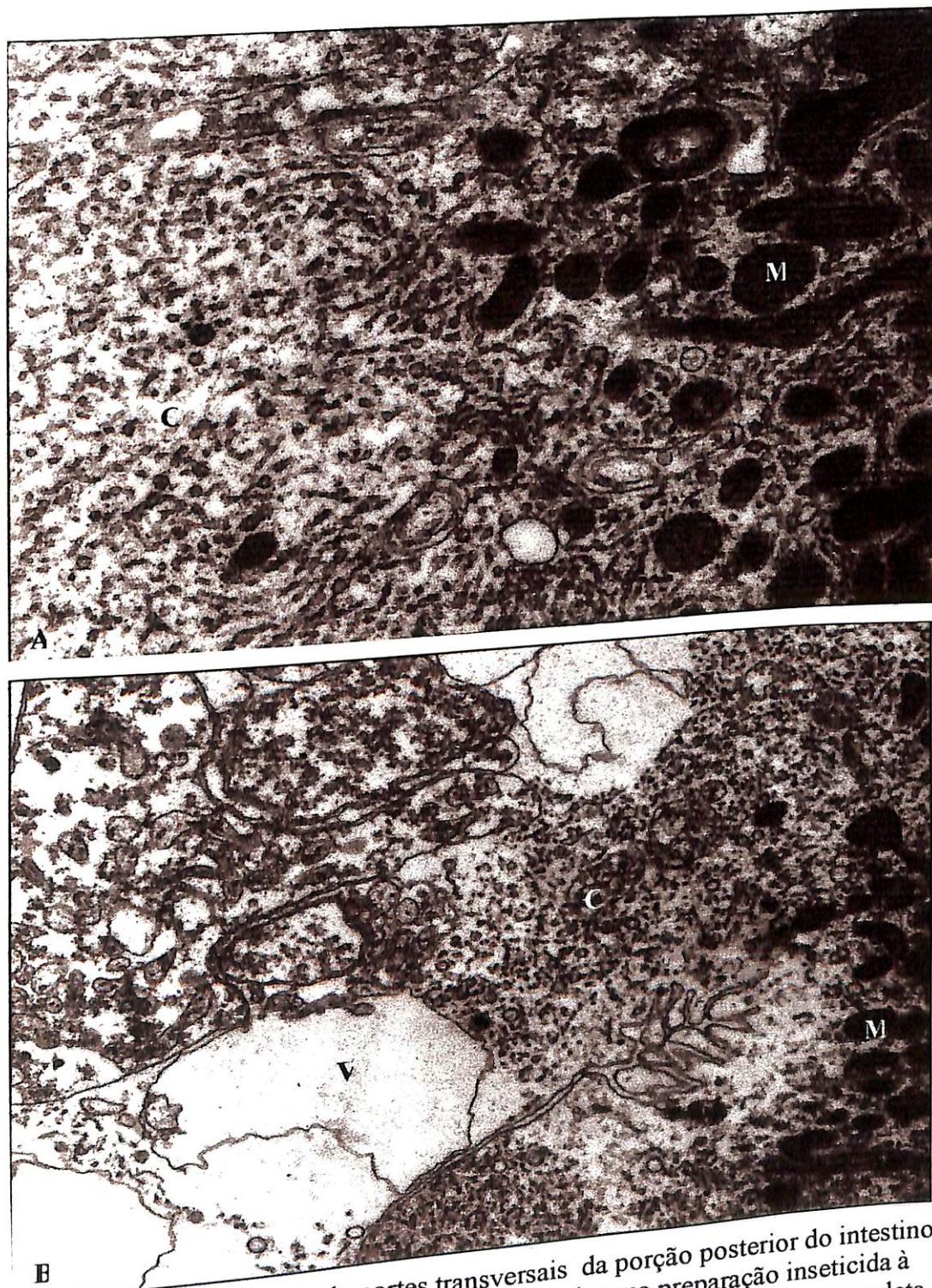


Figura 18: Micrografias eletrônicas de cortes transversais da porção posterior do intestino médio de larvas de *Simulium pertinax* expostas a 6 mg/l de uma preparação inseticida à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* durante 1 hora. Observa-se a completa destruição do epitélio intestinal com grandes vacúolos no interior do citoplasma das células (B) e alterações no aspecto das mitocôndrias (A). Observações realizadas com aumento de 12116x (B) e 20400x (A).

5 - DISCUSSÃO

As alterações histopatológicas observadas nesse trabalho em células epiteliais de *Simulium pertinax* submetidas à ação de toxinas de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis*, foram compatíveis com os relatados na literatura. Como fora dito anteriormente, existem somente dois registros de trabalhos que observaram os danos causados pelos produtos das δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* em larvas de simulídeos, um utilizando o *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* (REY et al. 1998), e o outro usando o *B. thuringiensis* sorovar *kurstaki* (LACEY & FEDERICI, 1979). Ainda relacionado com dipteros, destacamos o que utilizou o *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* para avaliar os efeitos causados pela hidrólise de suas δ -endotoxinas sobre larvas de *Aedes aegypti* (LAHKIM-TSOR et al. 1983), por este motivo estes serão os mais enfocados.

Em todas as dosagens (2, 4 e 6 mg/l) e tempos de exposição (1 à 4 horas) utilizados foram observadas alterações no mesmo local do trato digestivo de larvas de *S. pertinax*, ou seja, na porção posterior do intestino médio. Estas alterações, representando danos às células epiteliais, foram de uma maior ou menor gravidade, dependendo do

tempo e da concentração. Todavia, observou-se uma progressão, quanto maior a dosagem ou o período de exposição, maior o dano observado. As mudanças histopatológicas notadas no epitélio intestinal principalmente, como a hipertrofia celular, a vacuolização do citoplasma, os debríis celulares no espaço entre a membrana peritrófica e o epitélio, provavelmente devido à ruptura das células epiteliais, a degeneração nuclear, a ruptura das microvilosidades e total desorganização celular foram eventos típicos. Essas alterações estão de acordo com o observado por LACEY & FEDERICI (1979) que utilizando uma linhagem de *B. thuringiensis* sorovar *kurstaki* em uma dosagem de 10 ppm, notaram a formação de vacúolos intracitoplasmáticos seguidos de lise celular e, ou, esfoliação do epitélio intestinal, nas regiões do cecos gástricos e intestino médio posterior. Também observaram a progressão do dano em função do período de exposição ao inseticida.

A primeira alteração observada foi a hipertrofia das células, seguida de desorganização da estrutura em monocamada das células epiteliais, ruptura das microvilosidades, hipertrofia dos núcleos e vacuolização do citoplasma. Nos estágios finais, as células se encontravam altamente degeneradas e se desprendiam em direção ao lúmen. Assim como observado por estes autores, no trabalho ora em tela também foi notado que os efeitos histopatológicos eram progressivos, iniciando-se com a hipertrofia e vacuolização do citoplasma até a completa desorganização da estrutura epitelial, degeneração nuclear e ruptura total das microvilosidades nas larvas de *Simulium*. Entretanto, vale ressaltar que a linhagem escolhida pelos autores não é pertinax. Entretanto, vale ressaltar que a linhagem escolhida pelos autores não é considerada como possuidora de toxicidade para dípteros, e sim para lepidópteros, por este fato, a dosagem utilizada por LACEY & FEDERICI(1979) é muito superior (cerca de 60%) à maior dosagem usada neste trabalho.

Uma observação feita por LACEY & FEDERICI (1979) nos estágios finais de intoxicação, e não observada no presente estudo, foi o aspecto convoluto da membrana peritrófica e a luz intestinal desprovida de alimento, esta observação foi feita em larvas com três horas de exposição na concentração de 10mg/l. Quando se utilizou a concentração de 6 mg/l, somente se conseguiu coletar larvas vivas, isto é, que respondiam à estímulos físicos até uma hora de exposição às δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*.

Um outro estudo que também obtém os mesmos resultados, foi o realizado por LAHKIM-TSOR et al. (1983) com larvas de *Aedes aegypti* e utilizando o *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*, sendo que a dosagem por eles utilizada foi de 10ng/ml de uma preparação em pó contendo cristais, esporos e debris celulares em copos plásticos contendo 20 larvas (L_2-L_3) em 100ml de água destilada, muito menor do que a utilizada por LACEY & FEDERICI (1979), uma vez que a bactéria é altamente tóxica para larvas de *Ae. aegypti*, (DE BARJAC, 1978; BECKER, 1990 e RABINOVITCH et al., 1999) devido à presença das quatro proteínas Cry (CRICKMORE et al., 1998). Em consonância com o presente trabalho e o de LACEY & FEDERICI (1979), a porção posterior do intestino médio das larvas de *Ae. aegypti* foi a mais afetada e também apresentava um processo gradual de dano. Nessa região anatômica, foi observada acentuada hipertrofia das células, com o citoplasma vacuolizado e de aspecto esfoliado. As microvilosidades quando ainda presentes, estavam rompidas e mais delgadas, o que está de acordo com o que foi observado sob microscopia eletrônica, quando utilizou-se a dosagem de 6 mg/l de bioinseticida, em larvas de *S. pertinax*.

Os autores (LAHKIM-TSOR et al. 1983), utilizaram larvas tratadas vivas e mortas, e nas vivas não observaram nenhum sinal de dano na membrana peritrófica, sendo este resultado semelhante ao de LACEY & FEDERICI (1979), como também ao deste trabalho. Porém, fazendo observações em larvas tratadas mortas, foram encontrados danos nas membranas peritróficas, nesse caso, o epitélio estava totalmente destruído e a maioria das células tinha desaparecido. LAHKIM-TSOR et al. (1983) também verificaram que, assim como a porção posterior do intestino médio, a região dos cecos gástricos era bastante afetada pelas toxinas de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*, os resultados foram semelhantes ao de LACEY & FEDERICI (1979). Ambos os estudos levantaram a hipótese, de que estas regiões eram as mais afetadas por possuírem estruturas histológicas semelhantes, um epitélio em monocamada e recoberto por microvilosidades bem desenvolvidas, e pelo fato de que estas duas regiões estão envolvidas no processo de absorção de nutrientes. Já a região anterior, não possuiria "microvilos verdadeiros" como descrito por CIOFFI (1979) apud LAHKIM-TSOR et al., (1983). Portanto, esta região não estaria envolvida no processo de absorção de fluidos e nutrientes e devido a isto, as alterações que possam vir a ser observadas são moderadas (hipertrofia celular com leve vacuolização do citoplasma).

Mais recentemente REY et al. (1998) estudaram as alterações histopatológicas causadas por toxinas de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* em larvas de alguns dipteros aquáticos, entre eles, *Simulium variegatum*. Foi utilizada uma concentração de 0,4 mg/l de uma preparação de inseticida, que segundo os autores, era a dosagem preconizada para aplicações rotineiras em campo visando o controle de mosquitos na região alpina, porém deve-se destacar que esta dosagem é muito menor do que aquela preconizada para

Simuliidae (GUILLET & DE BARJAC, 1979 e RABINOVITCH et al., 1999). Estes autores descreveram o epitélio intestinal como o sítio de atividade das toxinas de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*, inferindo sobre o papel do intestino na absorção de nutrientes como a causa para sua sensibilidade às toxinas, como também, que a desorganização era um processo gradual e dependente da estrutura do epitélio. Entretanto, LACEY & FEDERICI (1979) e LAHKIM-TSOR et al. (1983), REY et al. (1998) afirmaram que as células da porção anterior, por eles denominadas de *clear cells*, foram as mais afetadas apresentando em estágios iniciais deformação apical, hipertrofia celular (as células incham e dobram de tamanho), separação celular, levando a alterações drásticas na permeabilidade epitelial, conclusão precipitada se levarmos em conta a descrição histofisiológica de CIOFFI (1979) e os mecanismos usuais de absorção intestinal (LAHKIM-TSOR et al., 1983). Com 12 horas pós-tratamento, o inchaço do citoplasma das células atinge seu máximo e elas rompem em direção ao lúmen intestinal. Quando isto ocorre, na porção anterior, segundo os autores, acontece a morte das larvas. Estas seqüências de alterações típicas de danos celulares causados por toxinas *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*, aparecem comumente no intestino médio de larvas tratadas com diferentes sorovares de *B. thuringiensis*, o que pode ser observado nas descrições anteriores, porém, o tempo que demanda para o aparecimento destas alterações pode diferir de uma espécie para a outra, dependendo da concentração da preparação inseticida utilizada. REY et al. (1998) concordam com os demais autores sobre o fato de que os sintomas de intoxicação variam de acordo com o tipo de célula epitelial, sugerindo com isso, vulnerabilidades diferenciadas aos inseticidas microbianos, provavelmente relacionadas com seu próprio status morfológico. Falam

ainda que as *clear cells* são consideradas células de secreção e que por serem frágeis seriam mais sensíveis ao *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*. Ao final do trabalho, contraditoriamente, os autores dizem que seus resultados estão de acordo com aqueles obtidos por LAHKIM-TSOR et al., (1983), quando esses dizem que o intestino médio na porção posterior e os cecos gástricos são reconhecidamente locais de ocorrência de danos deletérios em larvas de insetos, pelo fato de apresentarem microvilosidades desenvolvidas e que seriam o sítio de ligação para as toxinas. Eles reconhecem que, apesar da porção anterior não ter estas estruturas tão bem desenvolvidas, assim mesmo, altas doses da toxina podem ser capazes de penetrar nas *clear cells* e induzir a intoxicação, o que demonstra a contradição nas suas conclusões, o que leva a se suspeitar de vício metodológico.

DAVIDSON (1979), utilizando uma cultura de *B. sphaericus* SSII-1 numa concentração de 10^7 células/ml em recipientes contendo 25 larvas ($L_2 - L_3$) de *Culex pipiens quinquefasciatus*, observou em larvas vivas, em concordância com o presente trabalho, que somente as células do intestino médio apresentavam alterações. No interior do intestino, podia-se observar que o conteúdo intestinal delimitado pela membrana peritrófica, encontrava-se retido no interior de dobras em forma de zig-zag, devido à deformação do intestino médio. No presente trabalho foi observado algo semelhante, isto é, a membrana peritrófica encontrava-se com dobras, mas, sem que houvesse a presença de conteúdo intestinal em seu interior. Nenhum dos autores já citados, relatou a ocorrência desse fato. Ainda segundo DAVIDSON (1979) as células com 10 horas de pós-exposição apresentavam hipertrofia, porém sem alterações nas microvilosidades e nas mitocôndrias. Com 12 horas, podia-se observar tanto larvas ainda no mesmo estado que aquele anteriormente descrito, quanto situações de maior severidade nas alterações, onde se

observava a presença de grandes citolisossomas, a perda das microvilosidades na porção anterior e ocasionalmente na porção posterior, bem como a citólise e o conseqüente desprendimento do conteúdo celular. Observando larvas já mortas, após 24 horas de exposição às toxinas de *B. sphaericus*, a autora notou que nesses casos, as mitocôndrias encontravam-se deformadas, com a desorganização das cristas, as células do epitélio estavam amplamente separadas na sua base e a maior parte dos microvilos havia desaparecido. Ressalta-se que as diferenças nos tempos de exposição é uma decorrência da cepa SSII-1 ser considerada de baixa toxicidade, não possuidora da toxina binária, estando

presente apenas a toxina de 100kDa (Mtx), acarretando que somente após 10-12 horas posteriormente à alimentação, apareciam os sintomas externos e teciduais de intoxicação

O trabalho de CHARLES (1987), com uma linhagem de alta toxicidade de *B. sphaericus* (2297) demonstrou as alterações histopatológicas por ela produzidas em três

gêneros de mosquitos (*Anopheles stephensi*, *Culex pipiens pipiens* e *Ae. aegypti*). Esse autor, assim como LACEY & FEDERICI (1979), LAHKIM-TSOR et al.(1983), também

identificou o intestino médio, principalmente nas regiões dos cecos gástricos e estômago posterior, como os locais onde as alterações ocorriam. Estas mudanças ultraestruturais

diferiam entre si de acordo com o gênero do mosquito. O autor utilizou concentrações variáveis do complexo esporo-cristal da linhagem. Vale lembrar que a toxicidade de

(CL₉₀) para *Culex* sp, do que para *Anopheles* sp. e com baixa atividade *B. sphaericus* é maior para *Culex* sp, para *Aedes* sp. Para o experimento foram utilizadas as seguintes concentrações: 8,5x10⁻¹,

7x10⁻³ e 6x10⁻⁵. Os resultados obtidos são um pouco diferentes do que os observados no presente estudo. Apesar da alta concentração bacteriana utilizada, CHARLES (1987) não

observou em nenhuma dos três gêneros testados o rompimento das células intestinais nem o

total desaranjo da camada epitelial mesmo em larvas moribundas. No caso de *Anopheles*, somente poucas células tinham lisado, porém deformações nas mitocôndrias foram observadas. Em relação as larvas de *Culex* sp., o autor observou o aparecimento de grandes vacúolos de origem desconhecida, mas não os relaciona com a hipertrofia celular, conforme observado no presente trabalho. Esses vacúolos surgiam tanto no ceco, como no estômago anterior, quanto no posterior, nesse caso, algumas mitocôndrias encontravam-se compactadas e outras, deformadas. Quando as larvas morriam, somente poucas células intestinais possam ser similares entre os dois tipos de toxina (Cry e Btx).

Observando-se as mudanças ultraestruturais de células causados por toxinas de *B. thuringiensis* em larvas de insetos de interesse agrícola, pode-se notar que estas alterações não são diferentes das descritas até aqui. ENDO & NISHITSUTSJI-UWO (1980), usando mutantes asporogênicos de *B. thuringiensis* sorovar kurstaki e sorovar aizawai contra *Bombyx mori*, incapazes de produzir os esporos de durante o ciclo esporogênico, também observaram que as alterações eram um processo gradual, apresentando hipertrofia celular, núcleos deformados, vacuolização do citoplasma e ruptura das microvilosidades. As mitocôndrias também se apresentavam alteradas, com a forma condensada e os espaços intra-cristas irregularmente alargados. Da mesma forma como relatado por LACEY & FEDERICI (1979), LAHKIM-TSOR et al. (1983) e no presente trabalho, ENDO & NISHITSUTSJI-UWO (1980) demonstraram que é o epitélio da porção posterior do

intestino médio o mais afetado pelas toxinas. MATHAVAN et al.(1989), fizeram um estudo com o intuito de observar os efeitos causados sobre células do epitélio intestinal de larvas de *Bombyx mori* por uma preparação de esporos e cristais de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*. As observações resultantes estão em concordância com o encontrado em outros estudos, com hipertrofia celular, vacuolização do citoplasma e dos núcleos, ruptura das microvilosidades, desorganização das organelas intra-citoplasmáticas. Assim como postulado por LAHKIM-TSOR et al. (1983), MATHAVAN et al. (1989) também acreditam, baseados na histologia e histoquímica do epitélio de larvas pertencentes ao grupo controle, que as células colunares estão envolvidas na digestão e absorção de alimentos e, por isso, teriam uma maior susceptibilidade aos produtos da hidrólise das δ-endotoxinas de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*.

Quando analisamos os resultados obtidos no presente estudo, podemos verificar que a progressão das alterações histopatológicas possui uma relação direta com a dosagem utilizada e, ou, o período de exposição da larva ao inseticida biológico.

A primeira concentração de inseticida biológico utilizada, 2mg/l, dosagem menor do que a CL₅₀ (3,40mg/l) obtida para larvas de *Simulium pertinax* (RABINOVITCH et al. 1999), espécie encontrada em maior número nos criadouros da região do Maciço da Serra do Mar (ARAÚJO-COUTINHO et al., 1988), local de coleta dos espécimes utilizados neste estudo. Inicialmente estas mudanças estavam associadas à hipertrofia celular, provavelmente causada pelo desequilíbrio iônico e vacuolização do citoplasma. Com um maior período de exposição, os efeitos eram agravados com a ruptura das microvilosidades, desorganização e turgidez celular e presença de conteúdo celular no

espaço entre a membrana peritrófica e o epitélio. Ao se utilizar uma concentração (4mg/l) próxima da CL₅₀, verificou-se uma maior rapidez no aparecimento das alterações mencionadas. Vale ressaltar aqui um fato ocorrido nesta etapa: um grupo de larvas tratadas com 1 hora de exposição apresentou células severamente danificadas com ruptura e deformação celulares acentuadas, desprendimento das células em direção ao lúmen, núcleos hipertrofiados e outros já degenerados; um outro grupo, nesse mesmo tempo, apresentou danos, porém em menor intensidade do que o primeiro e podia-se notar espaçamento entre as células, vacuolização do citoplasma e deformação celular. Pode-se tentar explicar este fato pela influência de alguns fatores na captação de alimento pelas larvas de simulídeos. Estudos foram feitos para verificar os aspectos alimentares de imaturos de simulídeos (KURTAK, 1978). A capacidade de captação de alimento sofre forte influência da velocidade da corrente e da altura da coluna d'água do criadouro (KURTAK, 1978). Esse mesmo autor, estudando várias espécies de simulídeos em laboratório e em nível de campo, observou que quando há um aumento na corrente d'água, a capacidade de captar alimento decresce, relação também observada para a temperatura da água quando o experimento é realizado em laboratório. Para simulídeos, como não se conhece até o presente a possibilidade de criação em laboratório, foram utilizadas, no presente estudo, larvas silvestres. Sendo assim, não havia como se saber o estado nutricional de cada grupo do inseto e, por consequência, a capacidade de ingestão do inseticida. Além disso, por terem sido usados recipientes diferentes, não há garantia de que o vórtex da corrente d'água artificializado pelas bombas de aquário tenha sido o mesmo nos respectivos recipientes, não se podendo afirmar que a possibilidade de captação de alimentos tenha sido igual para os dois grupos em confronto.

Nos experimentos em que foram empregadas suspensões de 6 mg/l, muito maior do que o valor da CL₅₀, verificou-se a existência de larvas vivas somente até 1 hora de exposição ao inseticida e, mesmo assim, já haviam sinais externos flagrantes de "adoecimento" das larvas, isto é, escurecimento da cutícula no terço posterior e encurvamento anormal do corpo da larva. Internamente, na região posterior do intestino médio, observou-se uma completa desorganização celular com desprendimento das células, ruptura completa das microvilosidades, extensa vacuolização do citoplasma e núcleos degenerados com fragmentação da cromatina.

Vale aqui ressaltar que este é o primeiro trabalho realizado no Mundo, sobre as alterações histopatológicas observadas em larvas de *S. pertinax* tratadas com *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*. Os dados ainda que preliminares, contribuem para um melhor conhecimento dos sítios que são afetados pelas toxinas dessa bactéria, bem como um melhor entendimento das atividades de controle deste inseto.

6 - CONCLUSÕES

1- Nas alterações histopatológicas observadas durante o estudo aqui realizado, verificou-se que o intestino médio das larvas de *Simulium pertinax*, na sua porção posterior, é o local mais afetado pela ação das toxinas originadas da hidrólise digestiva das δ - endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* (H-14).

2- Os efeitos histopatológicos das toxinas originadas da hidrólise das δ - endotoxinas de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*, sobre as células do epitélio intestinal das larvas de *S. pertinax*, acontecem de maneira progressiva e com um relacionamento direta entre a concentração empregada e, ou, o período de exposição ao bioinseticida.

3 - Mais estudos devem ser realizados para o aprofundamento destes conhecimentos, visto que, no Brasil, a grande maioria dos programas de controle de simulídeos são realizados com inseticidas à base de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*, no entanto, sem conhecimentos mais aprimorados sobre seu mecanismo de ação e os efeitos histofisiológicos no inseto.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO-COUTINHO, C.J.P.C. (1992) - "Controle de Vetores no Estado de São Paulo com a Utilização de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*". Anais do III Simpósio de Controle Biológico, pp. 95. Águas de Lindóia, SP.

ARAÚJO-COUTINHO, C.J.P.C. (1995) - "Biological Control Programme Against Simuliids in The State of São Paulo, Brazil". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 90(1):131-134.

ARAÚJO-COUTINHO, C.J.P.C (1998) - "Avaliação do Impacto no Ambiente Lótico de Atividades de Controle Larvário de *Simulium (Chirostilbia) pertinax* Kollar, 1832 (Diptera, Simuliidae) com o Uso de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* e *Temephos*, no Município de Paraty, no Estado do Rio de Janeiro". Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

ARAÚJO-COUTINHO, C.J.P.C. & LACEY, L.A. (1990) - "Controle de Simulídeos com Concentrado Emulsionável de *Bacillus thuringiensis*". *Bol. de La Oficina Panamericana*, 103(3): 213-219.

ARAÚJO-COUTINHO, C.J.P.C., MAIA-HERZOG, M., SOUZA, B.C. (1988).- Levantamento das espécies do gênero *Simulium* Latreille (Diptera: Simuliidae) no litoral norte do Estado de São Paulo. *Revta. Bras. Ent.*, 32(1): 11-17.

ARONSON, A.J.; BECKMAN, W. & DUM, P. (1986) - "Bacillus thuringiensis and Related Insect Pathogens". *Microb. Rev.*, 50(1):1-24.

ARONSON, A.I.; HAN, E.S.; MCGAUGHEY, W. & JOHNSON, D. (1991)- "The Solubility of Inclusion Proteins from *Bacillus thuringiensis* is Dependent upon Protoxin Composition and is a Factor in Toxicity to Insects ". *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(5): 981-986.

BACK, C. & HAMPER P.P. (1979) - "Succession saisonnière, emergenge, voltinisme et répartition de mouches noires de Laurentides (Diptera: Simuliidae)". *Can. J. Zool.* 57: 627-639.

BAUER, L.S. & PANKRATZ, H.S. (1992) - "Ultrastructural Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* on Midgut Cells of the Cottonwood Leaf Beetle". *J. of Invert. Pathol.*, 60:15-25.

BAUMANN, L.; BROADWELL, A.H. & BAUMANN, P. (1988) - "Sequence Analysis of the Mosquitocidal Toxin Genes Encoding 51.4 and 41.9 Kilodalton Proteins from *Bacillus sphaericus* 2362 and 2297". *J. Bacteriol.*, 170: 2045-2050

BAUMANN, P.; BAUMANN, L.; BOWDITCH, R.D. & BROADWELL, A.H. (1987) - "Cloning of the Gene for the Larvicidal Toxin of *Bacillus sphaericus* 2362: Evidence for a Family of Related Sequences". *J. Bacteriol.*, 169: 4061-4069.

BECKER, N. (1990) - "Microbial Control of Mosquitoes and Blackflies". Proc. Int'l. Coll. Invert. Pathol. Microb. Control, pp: 84-89. Adelaide, Australia.

BECKER, N. & MARGALIT, J. (1993) - "Use of *Bacillus thuringiensis* against mosquitoes and blackflies". In: *Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice*. Edited by P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey and S. Higgs, Chapter 7, pp 147-170. John Wiley & Sons Ltd.

BENZ, G. (1966) - "On the Chemical Nature of Heat Stable Toxin of *Bacillus thuringiensis* Berliner in *Locusta migratoria*". *J. Invert. Pathol.*, 6: 381-383.

BERLINER, E. (1915) - "Über die Schlaffucht der Melmottenraupe (*Ephestia kuhniella* Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis*, n. sp. *Z. Ang. Entomol.* 2: 29-56.

BERRY, C. (1994) - "The binary and the 100-kDa Mtx toxins from **Bacillus sphaericus**".
In: *VIth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control*:
197-200. Society for Invertebrate Pathology, Montpellier, France

BOND, R.P.M.; BOYCE, C.B.C. & FRENCH, J. (1969) - "A Purification and Some
Properties of an insecticide Exotoxin from **Bacillus thuringiensis** Berliner." *Biochem. J*
.114: 477-488.

BONNEFOI , A. & DE BARJAC, H. (1963) - "Classification des Souches du Groupe
Bacillus thuringiensis par la Determination de l'Antigene Flagellaire". *Entomophaga*,
8: 223-229.

BRAVO, A.; JANSENS, S. & PEFEROEN, M. (1992) - "Immunocytochemical
Localization of **Bacillus thuringiensis** Insecticidal Crystal Proteins in Intoxicated
Insects". *J. of Invert. Pathol.*, 60:237-246.

BURGERJON, A. & BIACHE, G. (1967) - "Effets Tératologiques chez les Nymphes et les
Adults d'insects dont les Larves ont Ingéré des Doses Subléthales de Toxine
Thermostable de **Bacillus thuringiensis** Berliner". *C. R. Acad. Sci. Paris*, 264: 2423-
2425.

BURGERJON, A. BIACHE, G. & CALS, P. (1969) - "Teratology of the Colorado Potato Beetle *Leptinotarsa decemlineata* as Provoked by Larval Administration of the Thermostable Toxin of *Bacillus thuringiensis*". *J. Invert. Pathol.*, 14: 274-278.

BURGERJON, A. & DE BARJAC, H. (1960a) - "Nouvelles Données sur le Role de la Toxine Soluble Thermostable Produite par *Bacillus thuringiensis Berliner*". *C.R. Acad. Sci. Paris*, 251: 911-912.

BURGERJON, A. & DE BARJAC, H. (1960b) - "Essais Préliminaires sur le Role Inseticide de la Toxine Thermostable Produite par *Bacillus thuringiensis Berliner*". Proc. Int'l Congr. Entomol. Vienna, pp. 835-839.

BURGERJON, A. & DE BARJAC, H. (1964) - "Etude de la Toxine Thermostable chez Différentes Souches de *Bacillus thuringiensis Berliner*". *Entomophaga*, 2: 222-226.

BURGERJON, A. & GALICHET, P.F. (1965) - "The Effectiveness of the Heat-Stable Toxin of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis Berliner* on Larvae of *Musca domestica* Linnaeus". *J. Invert. Pathol.*, 7: 263-264.

CANTWELL, G.H.; HEIMPEL, A.M & THOMPSON, M.J. (1966) - "The Production of an Exotoxin by Various Crystal Forming Bacteria Related to *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis Berliner*". *J. Insect Pathol.*, 6: 466-480.

CCI - CENTRO DE CONTROLE DE INTOXICAÇÕES DA UNIVERSIDADE DE
CAMPINAS. Toxicologia dos agroquímicos - Compostos Organofosforados, p.40

CHARLES, J.-F. (1987) - "Ultrastructural Midgut Events in Culicidae Larvae Fed with
Bacillus sphaericus 2297 spore/complex". *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.*, 138: 471-
484 .

CHARLES, J.F.; NIELSEN-LEROUX, C.N. & DELÉCLUSE, A. (1996) - "Bacillus
sphaericus toxin: molecular biology and mode of action". *Annu. Rev. Entomol.*, 41:
451-472.

CIOFFI, M. (1979) - "The Morphology and Fine Structure of the Larval Midgut of a
Moth (*Manduca sexta*) in Relation to Active Ion Transport". *Tissue Cell*, 11: 476-479.

COLBO, M.H. & O'BRIEN, H. (1984) - "A Pilot Blackfly (Diptera: Simuliidae) Control
Program Using *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in Newfoundland". *Can.
Entomol.*, 116: 1085-1096.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; LERECLUS, D.;
BAUM, J.; VAN RIE, J. & DEAN, D.H. (1998) - "Bacillus thuringiensis delta-
endotoxin nomenclature" *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: (3) 807-

CROSKEY, R. W. (1981) - "Simuliid Taxonomy – The contemporary scene" In: Blackflies
Marshall Laird Editor, Academic Press, pp 3-18.

CUMMINS, K.W. (1973) - "Trophic relations of aquatic insects". *Annual Review of Entomology*, 18:183-206.

DAVIDSON E.W. (1979) - "Ultrastructure of Midgut Events in Pathogenesis of **Bacillus sphaericus** SSII-1 Infections of *Culex pipiens quinquefasciatus* Larvae". *Can. J. Microbiol.*, 25: 178-184.

DAVIDSON, E.W. & MYERS, P. (1981) - "Parasopral Inclusions in **Bacillus thuringiensis**". *FEMS Microbiol. Lett.*, 10: 261-265.

DAVIDSON, E.W.; SINGER, S. & BRIGGS, J.D. (1975) - "Pathogenesis of **Bacillus sphaericus** Strain SSII-1 in *Culex pipiens quinquefasciatus* (= *Culex pipiens fatigans*) Larvae". *J. Invert. Pathol.*, 25: 179-184.

DE BARJAC, H. (1978) - "Un Nouveau Candidat a la Lutte Biologique Contre les Moustiques: **Bacillus thuringiensis** var. *israelensis*". *Entomophaga*, 23: 309-319.

DE BARJAC, H. (1990) - "Characterization and Prospective View of **Bacillus thuringiensis israelensis**". In: *Bacterial Control of Mosquitoes and Blackflies*, (eds.) de Barjac, H & Sutherland, D.J., pp: 10-15. New Brunswick: Rutgers University Press.

DE BARJAC, H. & BONNEFOI, A. (1962) - "Essai de Classification Bichimique et Sérologique de 24 Souches de **Bacillus** du Type **B. thuringiensis**". *Entomophaga*, 7: 5-29.

DE BARJAC, H.; BURGERJON, A. & BONNEFOI, A. (1966) - "The Production of Heat-Stable Toxin by Nine Serotypes of **Bacillus thuringiensis**". *J. Invert. Pathol.*, 4: 537-538.

DE BARJAC, H. & DEDONDER, R. (1965) - "Isolement d'un Nucleotide Identifiable à la Toxine Thermostable de **Bacillus thuringiensis** var. Berliner". *C.R. Acad. Sci. Paris*, 260: 7050-7053.

DE BARJAC, H. & FRACHON, E. (1990) - "Classification of **Bacillus thuringiensis** Strains". *Entomophaga*, 35(2): 233-240.

DU, C.; MARTIN, P.A.W. & NICKERSON, K.W (1994) - "Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal **Bacillus thuringiensis** protein crystals". *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(10): 3847-3853.

DUNN, P.H. (1960) - "Control of House Flies in Bovine Feces by a Feed Additive Containing **Bacillus thuringiensis** var. **thuringiensis** Berliner". *J. Insect Pathol.*, 2: 13-16.

ENDO, Y. & NISHIITSUTSUJI-UWO, J. (1980) - "Mode of Action of **Bacillus thuringiensis** δ - endotoxins: Histopathological Changes in the Silkworm Midgut". *J. of Invert. Pathol.*, 36:90-103.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G.W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, J. A.; KOZIEL, M.G. (1996) - "Vip3A, a Novel **Bacillus thuringiensis** Vegetative Insecticidal Protein with a wide Spectrum of Activities Against Lepidopteran Insects". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:5389-5394.

FARKAS, J.; SEBESTA, K.; HORKAS, K.; SAMEK, Z.; DOLEJS, J. & SORM, F. (1969) - "The Structure of Exotoxin of **Bacillus thuringiensis** var. *gelechiae*". *Coll. Czech. Chem. Comm.*, 34: 1118-1120.

FEDERICI, B.A.; LÜTHY, P. & IBARRA, J.E. (1990) - "Parasporal Body of **Bacillus thuringiensis israelensis**: structure, Protein Composition and Toxicity". IN: *Bacterial Control of Mosquitoes and Blackflies*, (eds.) de Barjac, H. & Sutherland, D.J., pp.16-44. New Brunswick: Rutgers University Press.

FEITELSON, J.S.; PAYNE, J. & KIM, L. (1992) - "**Bacillus thuringiensis**: insects and beyond". *Bio/. Technology*, 10: 271-275.

FRANKLIN, S.E.; YOUNG, L.; WATSON, D.; CIGAN, A.; MEYER, T. & BULLA, L.A. Jr (1997) - "Southern analysis of BT-R1, the *Manduca sexta* gene encoding the receptor for the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*". *Mol. Gen. Genet.*, 256(5): 517-524.

GERAIS, B.B., RIBEIRO, T.C.. (1986)- "Relatos de casos - oncocercose: primeiro caso autóctone da região centro-oeste do Brasil". *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 19 (2):105-107.

GILL, S.S.; COWLES, E.A. & PIETRANTONIO, P.V.. (1992) - "The Mode of Action of *Bacillus thuringiensis* Endotoxins". *Ann. Rev. Entomol.*, 37: 615-636.

GOLDBERG, L.J. & MARGALIT, J. (1977) - "A Bacterial Spore Demonstrating Rapid Larvicidal Activity Against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculatta*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* e *Culex pipiens*". *Mosquito News*, 37: 355-358.

GUILLET, P. & DE BARJAC, H. (1979)- Toxite de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* pour les larves de simulides vectrices de l'onchocercose. *C. R. Acad. Scien.* 289: 549-552.

GUILLET, P.; KURTAK, D.C.; PHILIPPON, B. & MEYER, R. (1990) - "Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* for Onchocerciasis Control in West Africa". IN: *Bacterial*

Control of Mosquitoes and Blackflies, (eds.) de Barjac, H & Sutherland, D.J., pp: 187-201. New Brunswick: Rutgers University Press.

HALL, I.M. & ARAKAWA, K.Y. (1959) - "The Susceptibility of the HouseFly **Musca domestica** Linnaeus to **Bacillus thuringiensis** var. *thuringiensis* Berliner". *J. insect Pathol.*, 1: 351-355.

HALL, I.M.; HUNTER, D.K. & ARAKAWA, K.Y. (1971) - "The Effect of the β -Exotoxin Fraction of **Bacillus thuringiensis** on the Citrus Red Mite". *J. Invert. Pathol.*, 18: 359-362.

HANNAY, C.L. (1953) - "Crystalline Inclusions in Aerobic Sporeforming Bacteria". *Nature*, 172: 1004.

HEIMPEL, A.M. (1967) - "A Taxonomic Key for Crystalliferous Bacteria Related to **Bacillus thuringiensis** Berliner". *J. Invert. Pathol.*, 9: 364-375.

HEIMPEL, A.M. & ANGUS, A. (1959) - "The Site of Action of Crystalliferous Bacteria In Lepidoptera Larvae". *J. Insect Pathol.*, 1: 152-170.

HEIMPEL, A.M. & ANGUS, T.A. (1963) - "Diseases Caused by Certain Sporeforming Bacteria". IN: *Insect Pathology. An Advanced Treatise*, (ed.) E.A. Steinhaus, pp: 21-67. Academic Press, New York.

HILL, C. A & PINNOCK, D. (1998) - "Histopathological Effects of **Bacillus thuringiensis** on the Alimentary Canal of the Sheep Louse, **Bovicola ovis**". *J. of Invert. Pathol.*, 72:9-20

HÖFTE, H. & WHITELEY, H.R. (1989) - "Insecticidal Crystal Proteins of **Bacillus thuringiensis**". *Microbiol. Rev.*, 53: 242-255.

HONÉE, G. & VISSER, B. (1993) - "The Mode of **Bacillus thuringiensis** Crystal Proteins". *Entomol. Exp. Appl.*, 69: 145-155.

INSTITUT PASTEUR (1996) - Catalogue of strains n° 1, Collection of **Bacillus thuringiensis** and **Bacillus sphaericus**. International Entomopathogenic **Bacillus thuringiensis** and **Bacillus sphaericus**. Centre, Unité des Bactéries Entomopathogènes.

KEETON T.P. & BULLA, L.A. Jr (1997) - "Ligand specificity and affinity of BT-R1, the **Bacillus thuringiensis** Cry1A toxin receptor from **Manduca Sexta**, expressed in mammalian and insect cells cultures". *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(9):3419-3425

KNIGHT P.J.K.; CRICKMORE, N. & ELLAR, D.J. (1994) - "The receptor for **Bacillus thuringiensis** CryIA(c) delta endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran **Manduca sexta** is aminopeptidase-N". *Mol. Microbiol.*, 11(3):429-436.

KNIGHT P.J.K.; KNOWLES, B.H. & ELLAR, D.J. (1995) - "Molecular cloning of na insect aminopeptidase-N that serves as a receptor for **Bacillus thuringiensis** Cry !A (C) toxin". *J. of Biol. Chem.*, 270(30): 17765-17770.

KNOWLES, B.H. (1994) - "Mechanism of action of **Bacillus thuringiensis** insecticidal δ-endotoxin". *Adv. Insect Physiol.*, 24: 275-308.

KNOWLES, B.H. & DOW, J.A.T. (1993) - "The crystal δ-endotoxin of **Bacillus thuringiensis**: models for their mechanism of action on the insect gut". *Bioessays*, 15(7): 469-476.

KRIEG, A. (1968) - "Effectiveness of **Bacillus thuringiensis** Exotoxin on **Tetranychus telarius** (Acarina: Tetranychidae)". *J. Invert. Pathol.*, 12: 478-480.

KURTAK, D.C. (1978) - "Efficiency of Filter Feeding of Blackfly Larvae (Diptera: Simuliidae)". *Can. J. Zool.*, 56: 1608-1623.

KURTAK, D.C.; OUEDRAGO, M.; OCRAN, M.; RENAUD, P. & GUILLET, P. (1982) - Preliminary note on the appearance in Ivory Coast of resistance to chlorphoxim in *Simulium soubrense* - *sanctipauli* larvae already resistant to temephos (ABATE).

WHO/VBC/82.850.

LACEY , L.A.; ESCAFFRE, H.; PHILIPPON, B.; SEKETELI, A. & GUILLET, P. (1982)

- "Large River Treatment with **Bacillus thuringiensis** (H-14) for the Control of **Simulium damnosum** S. I. in the Onchoceriasis Control Programme". *Z. Tropenmed.*

Parasitol., 33: 97-101.

LACEY , L.A & FEDERICI, B. (1979) - "Pathogenesis and Midgut Histopathology of

Bacillus thuringiensis in **Simulium vittatum** (Diptera:Simuliidae)". *J. of Invert.*

Pathol., 33:171-182.

LACEY, L.A. & UNDEEN, A.H. (1986) - "Microbiol Control of Black Flies and

Mosquitoes". *Ann. Rev. Entomol.*, 31: 265-296.

LAHKIM-TSOR,L; PASCAR-GLUZMAN, C.; MARGALIT, J. & BARAK,Z. (1983) -
"Larvicidal Activity of **Bacillus thuringiensis** subsp. *israelensis*, serovar H-14 in
Aedes aegypti: Histopathological Studies". *J. of Invert. Pathol.*, 41:104-116.

LANE, N.J.; HARRISON, J.B. & LEE, W.M (1989)- "Changes in Microvilli and Golgi-
associated Membranes of Lepidopteran Cells Induced by na Insecticidally Active
Bacterial δ -Endotoxin. *J. Cell Science*, 93: 337-347.

LECADET, M-M. & DE BARJAC, H. (1981) - "Bacillus thuringiensis Beta- Exotoxin".

IN: *Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases*, Chapter 11, Section II, (eds.) E. Davidson, Allanheld, Osmun & C°. Totowa, N.J.

LECADET,M.; FRACHON, E.; COSMAO-DUMANOIR, V.; RIPOTEAU, H.; HAMON, S.; LAURENT, P.& THIÉRY, I. (1999) - "Updating the H- antigen classification of *Bacillus thuringiensis*". *J. Appl. Microbiol.*, 86:660-672.

LIU, J.W.; PORTER, A.G.; WEE, B.Y. & THANABALU, T. (1996) - "New Gene from Nine *Bacillus sphaericus* Strains Encoding Highly Conserved 35.8-Kilodalton Mosquitocidal Toxins". *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(6): 2174-2176.

MAIA-HERZOG, M. FELIPPE-BAUER, M.L., MALAGUTI, R., CARVALHO- LEITE, T.C. (1988) - "A Contribution to the Study of Simulium and Culicoides of Rio de Janeiro: Monthly Incidence and Biting Activity". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 83 (1): 95-99.

MARGALIT, J. (1990) - "Discovery of *Bacillus thuringiensis isarelensis*". IN: Bacterial Control of Mosquitoes and Blackflies, (eds.) De Barjac, H. & Sutherland, D.J., pp. 3-9. New Brunswick: Rutgers University Press.

MASSON, L.; LUN, Y.J.; MAZZA, A ; BROUSSEAU, R. & ADANG, M. J. (1995) - 'The Cry IA(C) Receptor Purified from **Manduca Sexta** Displays Multiple Specificities".
J. of Biol. Chem. 270(35): 20309-20315

McCONNEL, E. & RICHARDS, A.G. (1959) - "The Production by **Bacillus thuringiensis** Berliner of a Heat Stable Toxic for Insects". *Can. J. Microbiol.*, 5: 161-168.

MATHAVAN, S.; SUDHA, P. M. & PICHIMUTHY, S.M. (1989) - "Effects of **Bacillus thuringiensis israelensis** on the Midgut Cells of **Bombyx mori** Larvae: A Histopathological and Histochemical Study". *J. of Invert. Pathol.*, 53: 217-227

MORAES, M.A.P., CHAVES, G.M.. (1974) - "Um caso de oncocercose no Território de Roraima, Brasil". *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 16(2): 110-113.

MYERS, P.; YOUSTEN, A.A. & DAVIDSON, E.W. (1979) - "Comparation Studies of Mosquito-Larval Toxin of **Bacillus sphaericus** SSII-1 and 1593". *Can. J. Microbiol.*, 25: 1227-1231.

PORTRER, A.G (1996) - "Mosquitocidal toxins, genes and bacteria: the hit squad". *Parasitology Today*, 12(5): 175-179.

PORTER, A.G.; DAVIDSON, E.W. & LIU, J-W (1993) - "Mosquitocidal toxins of bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes". *Microbiol. Rev.*, 57(4): 838-861.

PRASAD, S.S.V.; TILAK, KV.B.R. & GOLLAKOTA, K.G. (1972) - "Role of **Bacillus thuringiensis** var. **thuringiensis** on the Larval Survivability and Egg Hatching of **Meloidogyne** sp., the Causative Agent of Root Knot Disease". *J. Invert. Pathol.*, 20: 377-378.

PRIEST, F.G. (1992) - "Biological Control of Mosquitoes and other Biting Flies by **Bacillus sphaericus** and **Bacillus thuringiensis**". *J. Appl. Bacteriol.*, 72: 357-369.

RABINOVITCH, L.; JESUS, F.F.; CAVADOS, C.F.G.; ZAHNER, V.; MOMEN, H.; SILVA, M.H.L.; COSMAO-DUMANOIR, V.; FRACHON, E. & LECADET, M-M. (1995) - "**Bacillus thuringiensis** subsp. **oswaldocruzi** and **Bacillus thuringiensis** subsp. **brasiliensis**, Two Novel Brazilian Strains which Determine New Serotype H38 and H39, Respectively". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 90(1): 41-42.

RABINOVITCH, L; CAVADOS, C.F.G; CHAVES, J.Q.; ARAUJO-COUTINHO, C.J.P.C.; ZAHNER, V.; SILVA, K.R.A.; SELDIN, L. (1999) - "A New Strain of **Bacillus thuringiensis** serovar **israelensis** Very Active Against Blackfly Larvae". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94: 683-685.

RAJAMOHAN, F.; ALCANTARA, E.; LEE, M.K.; CHEN, X.J.; CURTISS, A . & DEAN, D.H.(1995) – “Single amino-acid changes in domain-II of **Bacillus thuringiensis** CryIA (C) Beta-Endotoxin affect irreversible binding to **Manduca sexta** membrane vesicles”. *J. of bacteriol.*, 177(9): 2276-2282

RAJAMOHAN, F.; COTRIL, J.A.; GOULD, F.& DEAN, D.H.(1996) – “Role of domain-II, loop 2 residues of **Bacillus thuringiensis** Cry Iab delta-endotoxin in reversible and irreversible binding to **Manduca sexta** and **Heliothis virescens**”. *J. of Biol. Chem.*, 271(5): 2390-2396

REY, L. (1991) -: *Parasitologia*, (ed.) L. Rey, 2^a edição, pp. 731.. Editora Guanabara Koogan.

REY, D.; LONG, A., PAUTOU, M. P. & MEYRAN, J. C. (1998) – “Comparative Histopathology of Some Diptera and Crustacea of Aquatic Alpine Ecossystems, After Treatment with **Bacillus thuringiensis** var. *israelensis*”. *Entomology Experimentalis et Applicata*, 88: 255-263.

REY, D.; PAUTOU, M. P. & MEYRAN, J. C. (1999) – “Histopathological Effects of Tannic Acid on the Midgut Epithelium of Some Aquatic Diptera Larvae”. *J. Invert. Pathol.*, 73:173-181.

REYNOLDS, E.S. (1963) - "The Use of Lead Citrate at High pH as an Electron-Opaque Stain in Electron Microscopy". *J. Cell Biol.*, 17: 208-212.

RICHARDSON, K.C.; JARRET, & FINKE, E.H. (1960) - "Embedding in Epoxy Resins for Ultrathin Sectioning in Electron Microscopy". *Stain Technol.*, 35: 313- 323.

RUAS NETO, A.L.R. (1984a) - *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* como alternativa no controle de simulídeos no Rio Grande do Sul. I Susceptibilidade a campo. *B. Saúde*, 11 (2): 21-26.

RUAS NETO, A.L.R. (1984b)- Avaliação do uso de Temephos para o controle de simulídeos no Rio Grande do Sul. *B. Saúde*, 11 (2): 27-31.

SCHENPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R. & DEAN, D.H. (1998) - "Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(3): 775-806.

SILVA-FILHA, M.H . (1994) - "Aspectos do uso do entomopatógeno *Bacillus sphaericus* no controle de *Culex quinquefasciatus* say (Diptera): efeitos a longo termo e desenvolvimento de resistência". Tese de Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ.

SINGER, S. (1981) - "Potencial of **Bacillus sphaericus** and Related Bacteria for Pest Control". IN: *Microbial Control of Pests and Plant Diseases*, (ed.) H.D. Burges, pp. 283-298. Academic Press, New York.

STAHLY, D.P.; ANDREWS, R. & YOUSTEN, A.A. (1991) - "The Genus **Bacillus**: Insect Pathogens". IN: *The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria*, (eds) Ballows, A.; Truper, H.; Dworken, M.; Harder, W. & Schleifer, K., pp. 1697-1745, 2nd. Springer-Verlag, New York.

STEINHAUS, E.A. (1961) - "On the Correct Author of **Bacillus sotto**". *J. Insect Pathol.*, 3: 97-100.

THANABALU, T. & PORTER, A.G. (1996) - "A **Bacillus sphaericus** gene encoding a novel type of mosquitocidal toxin of 31.8 kDa". *Gene*, 170(1): 85-89.

THOMAS, W.E. & ELLAR, D.J. (1983) - "**Bacillus thuringiensis** var. *israelensis* Crystal δ-Endotoxin: Effects on Insect and Mammalian Cells *in vitro* and *in vivo*". *J. Cell Sci.*, 60: 181-197.

UNDEEN, A. H. & BERL, D. (1979) - "Laboratory studies on the effectiveness of **Bacillus thuringiensis** var. *israelensis-de-Barjac* against *Simulium damnosum* (Diptera, Simuliidae) larvae". *Mosq. News*, 39(4): 742-745

VAN RIE, J.; JANSENS, S.; HÖFTE, H.; DEGHELE, D. & VAN MELLAERT, H. (1989)

- "Specificity of **Bacillus thuringiensis** δ- Endotoxins. Importance of Specific Receptors on the Brush Border Membrane of the Mid-Gut of Target Insects". *Eur. J. Biochem.*, 186: 239-247.

VAN RIE, J.; JANSENS, S.; HÖFTE, H.; DEGHELE, D. & VAN MELLAERT, H. (1990)

- "Receptors on the Brush Border Membrane of the Insect Midgut as Determinants of the Specificity of **Bacillus thuringiensis** Delta-Endotoxins". *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 1378-1385.

WALLACE, J.B., MERRITT, R.W. (1980) - "Filter-Feeding Ecology of Aquatic Insects".

Ann. Rev. Entomol., 25: 103-132.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (1986)- "Report of an Informal Consultation on the Detection, Isolation, Identification and Ecology of Biocontrol Agent Diseases Vectors"
IN: TDR/BCV/IC-GE/ 87-3, Annex II, p.12. Geneva.

YOUSTEN, A.A (1996) - "Mosquitocidal toxins from bacteria of the genus **Bacillus**".

Anais do VSICONBIOL: 304-309. Foz do Iguaçu, Paraná .

YOUTEN, A.A. & DAVIDSON, E.W. (1982)- "Ultrastructural Analysis of Spores and Parasporal Crystal Formed by **Bacillus sphaericus** 2297". *Appl. Environ. Microbiol.*, 52(4): 758-764.

YU, C.G.; MULLINS, M. A.; WARREN, G. W.; KOZIEL, M.G. & ESTRUCH, J. J. (1997) - "The **Bacillus thuringiensis** Vegetative Insecticidal Protein Vip 3 A Lyses Midgut Epithelium Cells of Susceptible Insects". *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(2):532-536.