

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**CARACTERIZAÇÃO MORFO-HISTOQUÍMICA DE TECIDOS DO SISTEMA
DIGESTÓRIO DE LARVAS DE *Aedes aegypti***

ALESSANDRA BITTENCOURT DE LEMOS

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Onilda Santos da Silva

Porto Alegre

Março/2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**CARACTERIZAÇÃO MORFO-HISTOQUÍMICA DOS TECIDOS DO SISTEMA
DIGESTÓRIO DE LARVAS DE *Aedes aegypti***

Alessandra Bittencourt de Lemos
Bióloga, especialista em Vigilância em Saúde

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do
Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
como parte dos requisitos necessários à obtenção do título
de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia Ambiental

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Onilda Santos da Silva

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Março/2016

CIP - Catalogação na Publicação

de Lemos, Alessandra Bittencourt
Caracterização morfo-histoquímica de tecidos do
sistema digestório de larvas de *Aedes aegypti* /
Alessandra Bittencourt de Lemos. -- 2016.
77 f.

Orientadora: Onilda Santos da Silva.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. *Aedes aegypti*. 2. mosquito. 3. histologia. 4.
diferenciação celular. I. da Silva, Onilda Santos,
orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Musical score for violin and piano. The upper staff (violin) includes markings: *(ponticello)*, *(ordinario)*, and *(ponticello)*. The lower staff (piano) includes markings: *mf*, *crest.*, and *p*.

Rimsky-Korsakov
 (trecho da música *Flight Of The Bumblebee*)

AGRADECIMENTOS

À minha família, amor maior, pelo total apoio e compreensão nos momentos difíceis e felizes desta jornada. Em especial ao Felipe Tormen da Costa pelo apoio e dedicação e aos meus pais Vera Bittencourt e Tulio Flores de Lemos pelas palavras amigas e ajuda direta no desenvolvimento deste trabalho;

À minha orientadora Prof^a Dr^a Onilda Santos da Silva, pelos ensinamentos técnicos, conversas, discussões, almoços e por todos os momentos especiais;

A todas as instituições envolvidas, que foram fundamentais para a execução deste trabalho nas suas diversas facetas: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) e Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC);

À Prof^a Dr^a Kiev Resende Souza de Moura, pelo *show* de conhecimento em histologia e pelo exemplo de profissional e de pessoa;

À Dra. Yoná Garcia Simom pela ajuda e ensinamentos em histologia e histoquímica de mosquitos;

Ao médico veterinário Dr. Lucas Brunelli de Moraes e demais técnicos, colegas e amigos do IPVDF pelo apoio a este projeto, além dos momentos especiais de discussões e troca de conhecimento;

Aos chefes Liege Ferrari, Maria de Fátima Sturza Gomes e Jorge Rossi, além dos colegas e amigos Denise Marques Garcia, Fernando Alison Varani, Leticia Berta da Silva e demais colegas, pelo total apoio e força nos momentos difíceis, inclusive na flexibilidade de horário de trabalho;

A todos meus amigos, especialmente à Paola Duarte Moreira pela compreensão e apoio.

A todos os colegas de laboratório João Luiz Rosa da Silva, Thiago Nunes Pereira, Keli Cristiane Carvalho Barroso, Vinicius José Maschio e demais amigos pelos pequenos e grandes momentos;

Agradecimento em especial aos colegas Guilherme Liberato da Silva pelas conversas e ajuda na adaptação das figuras e Flávia Montagner pelas incansáveis colaborações neste trabalho;

Aos IC's Fernanda Schwalm, Franciele Caroline Adam e Nicolás Felipe Drumm Müller pela ajuda e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho;

Ao professor da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Dr. David Driemeier pela cedência de reagentes e simpatia;

A todos os demais professores que contribuíram para a construção de meu conhecimento, formal ou informalmente.

CARACTERIZAÇÃO MORFO-HISTOQUÍMICA DOS TECIDOS DO SISTEMA DIGESTÓRIO DE LARVAS DE *Aedes aegypti*

Autor: Alessandra Bittencourt de Lemos
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Onilda Santos da Silva

RESUMO

Muitos trabalhos são desenvolvidos para identificar substâncias ou microrganismos capazes de controlar a população de insetos importantes para a saúde pública, sendo a identificação de lesões histológicas um critério para compreender o mecanismo de ação e eficácia do produto. As análises histopatológicas são baseadas na comparação entre tecidos de indivíduos controle e indivíduos expostos. Entretanto, são raros os trabalhos que referenciam o estado dos tecidos saudáveis. Neste trabalho caracterizou-se morfo-histoquimicamente os principais tecidos saudáveis do sistema digestório de larvas em 3^o a 4^o ínstar de *Aedes aegypti*, mostrando diversas imagens das variações que podem ser esperadas, além de apresentar as técnicas de processamento. Para isto, um total de trinta larvas foram fixadas, desidratadas e incluídas em historesina. Cortes foram realizados e corados com HE para morfologia e azul do Nilo, azul bromofenol, azul de toluidina e PAS para a caracterização histoquímica. Como resultados, o intestino das larvas se mostrou um tubo reto, formado por uma camada simples de células cúbicas, moderadamente acidófilas, com núcleo central e uma borda em escova voltada para o lúmen. Foram registradas variações celulares, uma vez que as células epiteliais também são secretivas das enzimas digestivas. Cortes sequenciais foram importantes para definir a morfologia, uma vez que o ângulo e altura de corte podem influenciar na sua aparência. O PAS revelou a presença de muitos grânulos de glicogênio por todos os tecidos, inclusive nas vesículas secretivas. Estas ainda possuem muitas proteínas e foram coradas fracamente para lipídios. Não foram registrados eventos de metacromasia na cor vermelha com o azul de toluidina, entretanto os tecidos parecem se corar diferentemente do tegumento.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (60 p.) março/2016.

MORPHO-HISTOCHEMICAL DESCRIPTION OF THE TISSUES OF THE DIGESTIVE SYSTEM OF *Aedes aegypti* LARVAE

Author: Alessandra Bittencourt de Lemos
Adviser: Professor Doctor Onilda Santos da Silva

ABSTRACT

Many surveys are designed to identify substances or microorganisms capable of controlling the population of insects that are important to public health, and the identification of resulting histological injuries is a criterion for understanding the mechanism of action and the efficacy of the product. The histopathological analyses are based on the comparison between tissues of control subjects and exposed subjects, but there are rare studies that mention the state of healthy tissues. This work characterized the main morpho-histochemically healthy tissues of the digestive system of larvae in the 3rd and the 4th instar of *Aedes aegypti*, showing several images of the variations that can be expected, as well as displaying processing techniques. For this, a total of thirty larvae were pinned, dehydrated and embedded in historesin. Sections were made and stained with hematoxylin for morphology and Blue Nile, bromophenol blue, toluidine blue and PAS staining for the immunohistochemical characterization. As a result, the intestines of the larvae showed an upright tube formed by a single layer of cuboidal cells, moderately acidophilic, with a central nucleus and a brush border facing the lumen. Cellular changes were recorded, since epithelial cells also secrete digestive enzymes. Sequential slices were important in defining the morphology, since the angle and height of the cut may affect its appearance. The PAS revealed the presence of many glycogen granules in all tissues, including the secretory vesicles. These still have protein and were weakly colored to lipids. There were no metachromasia events in red with toluidine blue, though the tissues seem to blush differently from the integument.

¹Master's thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (60 p.) march/2016.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GERAL	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. JUSTIFICATIVAS	4
4. REVISÃO DA LITERATURA	5
4.1 EPIDEMIOLOGIA DE ALGUMAS ARBOVIROSES E SUAS ROTAS NO VETOR...5	
4.2 TAXONOMIA E SISTEMÁTICA DO <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (LINNAEUS, 1762)	9
4.3 BIOLOGIA DE <i>Aedes aegypti</i>	10
4.4 ANATOMIA INTERNA E FISILOGIA DE LARVAS	14
4.5 A HISTOLOGIA DAS LARVAS E O CONTROLE VETORIAL.....	16
4.6 ELEMENTOS DE HISTOQUÍMICA	18
5. MATERIAIS E MÉTODOS	21
5.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE <i>Aedes aegypti</i>	21
5.2 HISTOLOGIA	23
5.2.1 PROCESSAMENTO	23
5.2.2 MICROTOMIA	25
5.2.3 COLORAÇÃO E MONTAGEM DAS LÂMINAS	26
5.3 CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA	26
5.4 ANÁLISE DAS LÂMINAS HISTOLÓGICAS	27
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6.1 HISTOLOGIA DO INTESTINO DAS LARVAS	28
6.2 HISTOQUÍMICA DO INTESTINO MÉDIO DE LARVAS.....	37
7. CONCLUSÃO	53
8. REFERÊNCIAS	55
9. APÊNDICES	64

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 01: Situação epidemiológica da dengue no Rio Grande do Sul, entre 2007 e 2015	6
Quadro 02: Comparação entre os diferentes corantes histoquímicos relacionados às substâncias detectadas, coloração final e autor	20
Quadro 03: Proporção das soluções de álcool absoluto e solução resinada utilizadas na etapa de impregnação das larvas com os respectivos tempos de exposição	24

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 01 – Gráfico comparando o número casos de microcefalia ocorridos em alguns Estados brasileiros em 2015, cujas causas entraram em investigação no Ministério da Saúde.	8
Figura 02 – Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	10
Figura 03 – Divisão corporal da larva	12
Figura 04 – Diferenciação de instares	13
Figura 05 – Divisão do aparelho digestório da larva	14
Figura 06 – Método de transmissão da bactéria <i>Wolbachia</i> para sua prole e seus efeitos	17
Figura 07 – Bandeja contendo ovos para eclosão larvária	21
Figura 08 – Gaiola de criação de mosquitos	22
Figura 09 – Protótipo de alimentador	22
Figura 10 – Sequência de retirada de fixador do material	23
Figura 11 – Amostras incluídas em resina	24
Figura 12 – Disposição dos cortes nas lâminas	26
Figura 13 – Divisão do corpo da larva em segmentos abdominais	28
Figura 14 – Visão geral do intestino anterior da larva	29
Figura 15 – Cortes evidenciando os cecos gástricos	30
Figura 16 – Corte da região mediana do intestino médio	32
Figura 17 – Tecido epitelial mostrando a morfologia celular	32
Figura 18 – Células epiteliais lançando secreção para o lúmen, na região do intestino médio posterior	33
Figura 19 – corte tangencial na região de transição entre o intestino médio e intestino posterior	35
Figura 20 – transição entre mesêntero e proctodeu, onde o tecido epitelial passa por uma mudança abrupta de morfologia	36
Figura 21 – Comparação da variação no aspecto do tecido epitelial	39
Figura 22 – Diferentes alturas de corte de uma larva	41
Figura 23 – Histoquímica do proventrículo	43
Figura 24 – Histoquímica das células epiteliais e suas secreções	45

Figura 25 – Intestino médio corado em PAS	47
Figura 26 – Mesêntero e proctodeu corados em azul de bromofenol	49
Figura 27 – Histoquímica das larvas em azul do Nilo e azul de toluidina	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ae.	<i>Aedes</i>
BE	Borda em Escova
BF	Bomba Faringiana
BTi	<i>Bacillus thuringienis var. israelenses</i>
CE	Célula Epitelial
CG	Corpo Gorduroso
CGT	Ceco Gástrico
CHIKV	Vírus da Chikungunya
CP	Câmara Pilórica ou Píloro
CR	Célula de Regeneração
DENV	Vírus da Dengue
EEct	Espaço Ectoperitrófico
EEnd	Espaço Endoperitrófico
EQ	Espessamento quitinoso
ES	Esôfago
EXO	Exoesqueleto
Gli	Grânulo de glicogênio
GS	Glândula salivar
HE	Hematoxilina-eosina
IL	Íleo
IM	Intestino Médio
MB	Membrana Basal
MP	Membrana Peritrófica
N	Núcleo
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAHO	Organização Panamericana de Saúde
PAS	Reação Ácido Periódico-Schiff
PV	Proventrículo
SE	Semana Epidemiológica
SES	Secretaria Estadual de Saúde
SGB	Síndrome de Guillain-Barré

Si	Sinos por onde passa a hemolinfa
OPAS	Organização Panamericana de Saúde
TM	Túbulos de Malpighi
WHO	Organização Mundial de Saúde
ZIKV	Vírus Zika

1. INTRODUÇÃO

Desde 2015 o Brasil vem enfrentando um problema grave de saúde pública: o aumento significativo de casos de microcefalia. As causas não estão bem esclarecidas, entretanto há indícios de que estejam relacionadas com o zika vírus, um patógeno transmitido pelo vetor *Aedes aegypti* (Brasil, 2016a). Este mosquito também está relacionado com outros surtos no Brasil, principalmente dengue, febre amarela e chikungunya (Brasil, 2015a; OMS, 2016).

Como estratégia para diminuir a incidência destas doenças, o Ministério da Saúde indica o controle populacional do vetor (Brasil, 2001). As larvas são o principal alvo, pois sendo aquáticas ficam restritas a pequenas coleções d'água contidas principalmente em recipientes artificiais, como pneus, garrafas e pratinhos de plantas. Já os adultos são capazes de voar e se dispersar a distâncias significativas, dificultando seu controle (Consoli e Lorenço-de-Oliveira, 1998; Forattini, 2002).

A aplicação de produtos químicos pode causar uma série de impactos ambientais, entre eles o desenvolvimento de populações resistentes. Por este motivo, muitos trabalhos são desenvolvidos para identificar substâncias ou microrganismos capazes de servir como alternativa aos larvicidas e adulticidas usados atualmente. Assim, a identificação das lesões histológicas decorre como um fator complementar para compreender o mecanismo de ação do produto e confirmar sua eficácia. As análises são baseadas na comparação entre tecidos de indivíduos controle e indivíduos expostos, na busca por diferenças morfológicas (Bailey and Gordon, 1973; Arruda et al., 2003; Cavados et al., 2004; Barreto et al., 2006; Abed et al., 2007; Oliveira et al., 2009; Valotto et al., 2010; Valotto et al., 2011; Leite et al., 2012).

Um dos produtos biológicos entomopatogênicos mais estudado é a bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses* (BTi). Durante sua esporulação, esta bactéria produz protoxinas que são ativadas no intestino médio das larvas de mosquitos levando à ruptura da membrana peritrófica e das células epiteliais. Como consequência, ocorre o bloqueio das funções intestinais e a morte das larvas (Bravo et al., 2007). Silva et al. (2008) também mostraram os efeitos do BTi nos tecidos do intestino de mosquitos, avaliando as alterações histológicas decorrentes.

Estudos como estes ressaltam a importância de conhecer o modo de ação e o sítio-alvo dos larvicidas. Entretanto, há poucos estudos que apresentem

descrições detalhadas e ou imagens relacionadas aos tecidos sadios de larvas de *Ae. aegypti*, de forma a referenciar as amostras controle. A forma sadia como os tecidos se apresentam, o arranjo celular, o aspecto histológico geral e a composição bioquímica básica dos tecidos são características importantes que podem servir de parâmetro para sugerir futuras alterações decorrentes de infecção ou intoxicação.

Neste trabalho pretende-se apresentar aspectos da histologia de *Aedes aegypti* de forma a contribuir no estudo de patogêneses causadas por produtos químicos ou biológicos aplicados como forma de controle larval.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar morfo-histoquimicamente os principais tecidos sadios do sistema digestório de larvas em 3^o a 4^o ínstar de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae).

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Comparar elementos importantes no processamento de larvas de mosquito para estudos de histologia;
- 2.2.2 Caracterizar os tecidos do intestino médio de larvas de 3^o instar final a 4^o ínstar inicial de *Ae. aegypti*, utilizando corante padrão e corantes histoquímicos;
- 2.2.3 Apresentar elementos para observação dos intestinos anterior e posterior das larvas.

3. JUSTIFICATIVAS

A busca por produtos eficientes no controle vetorial de *Ae. aegypti* estimula o desenvolvimento de estudos relacionados à ação larvicida de novas substâncias químicas e microbiológicas. Em muitos deles é possível acompanhar mudanças histológicas decorrentes através da apresentação de imagens comparativas entre tecidos de larvas controle e expostas.

Apesar de haver diversas bibliografias citando alterações histológicas, não são comuns materiais que descrevem a morfologia e histoquímica dos tecidos sadios de mosquitos, de forma que a comparação fica deficitária e muitas vezes dificulta ao pesquisador descrever lesões.

Em 2012, Costa et al. publicaram um artigo descrevendo as mudanças no intestino de *Ae. aegypti* após sua exposição ao extrato botânico de *Annona coriacea* (Magnoliales: Annonaceae). Para ilustrar as alterações, apresentaram uma imagem de tecido controle, com células bem definidas, mas sem especificação da região ao qual pertence. Em seguida apresentaram três imagens sugerindo as diferenças, entre elas protusão citoplasmática e vacuolização celular.

Em 2014, Narciso et al. estudaram a bioatividade da burquelina isolada de um vegetal como larvicida. Da mesma forma, como resultados apresentam oito imagens de tecidos sadios em aumento máximo de 40X somadas a mais cinco imagens de tecidos expostos em iguais tamanhos.

Assim como em outras pesquisas, as imagens apresentadas parecem insuficientes para a avaliação das lesões devido às suas baixas qualidades, pouco aumento, falta de informações quanto ao local exato que está sendo avaliado, cortes sequenciais, falta de bibliografia descrevendo tecidos sadios e suas variações a atividades fisiológicas normais, entre outros.

Este trabalho deverá trazer informações pertinentes quanto aos tecidos sadios, facilitando a posterior análise de variações histológicas no intestino das larvas.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Epidemiologia de algumas arboviroses e suas rotas no vetor

Arboviroses (do inglês *Arthropod Borne Virus*) são viroses zoonóticas, transmitidas por artrópodes vetores infectados a vertebrados suscetíveis (Figueiredo, 2007). A importância epidemiológica de *Ae. aegypti* é devido a sua participação no ciclo de transmissão de diversos arbovírus importantes para a saúde pública, tais como febre amarela urbana, dengue, chikungunya, zika, entre outras, sendo um dos principais vetores destes patógenos (Pialoux, 2007; Brasil, 2010; Weaver et al., 2010; PAHO, 2011; Li et al., 2012; Brasil, 2015a; OMS, 2016).

Os hábitos hematofágicos do vetor são determinantes na manutenção dos arbovírus (Lehane, 2005). O ciclo de transmissão se inicia quando a fêmea adulta realiza o repasto sanguíneo em vertebrados no período virêmico. Após sua ingestão, os arbovírus iniciam a migração através dos tecidos intestinais do vetor, onde se amplificam. Seguem entre tecidos secundários realizando novas ampliações e, ao invadirem as glândulas salivares, são lançados junto com a saliva a outro hospedeiro vertebrado suscetível (Clements, 2012; Forattini, 2002; Franz et al., 2015; Lehane, 2005).

A Febre Amarela é uma doença causada por um arbovírus do gênero *Flavivirus* (Flaviviridae), transmitido pela picada de um mosquito vetor (Brasil, 2010). Do ponto de vista epidemiológico, a doença pode ser classificada de duas formas: Febre Amarela Silvestre (FAS) e Febre Amarela Urbana (FAU), onde a localização geográfica, espécie do vetor e hospedeiros são os critérios para diferenciá-las (Brasil, 2010).

No Brasil, o vírus da febre amarela é mantido no interior das matas pelo ciclo silvestre, o qual envolve primatas não-humanos como reservatórios e mosquitos principalmente dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* como vetores. Já no ciclo urbano, o vírus é transmitido pelo *Ae. aegypti* diretamente ao ser humano (Vasconcelos, 2003).

Esta doença possui importância epidemiológica devido à sua mortalidade relacionada. De acordo com OMS (2016c) estão estimados de 84.000 a 170.000 casos com mais de 60.000 mortes por ano.

Os primeiros relatos desta doença no Brasil datam do final do século XVII, quando estados do nordeste brasileiro foram acometidos por sucessivas epidemias

(Ferreira et al., 2011). Após a identificação dos mosquitos como agentes vetores, diversas medidas de controle foram adotadas no início do século XX, dentre elas a instituição das brigadas sanitárias. Sua função era identificar casos de febre amarela e eliminar focos dos vetores. Estas medidas de controle também causaram impacto da transmissão de outras doenças associadas ao vetor, entre elas a dengue (Braga & Valle, 2007a).

A dengue é considerada uma das grandes preocupações de saúde pública internacional. A Organização Mundial de Saúde (2015) estima que ocorram de 50 a 100 milhões de novas infecções anuais, sendo 500.000 casos de febre hemorrágica do dengue (FHD) com necessidade de hospitalização, e mortalidade média de 2,5% dos casos (OMS, 2015b).

A doença pode ser causada por quatro sorotipos diferentes de *Flavivirus* (Flaviviridae), sendo DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4 (Brasil, 2010). Entretanto, em 2013 foi descrito um quinto sorotipo (DENV5) encontrado na Ásia, considerado a mais nova ameaça da dengue (Normile, 2013).

No Rio Grande do Sul, a primeira ocorrência de circulação viral da dengue foi em 2007, quando foram confirmados 271 casos autóctones, ou seja, contraídos no território (SES/RS, 2013; SES/RS, 2016b). Desde então, vem sendo observada uma flutuação na incidência da doença no Estado, como apresenta o Quadro 01:

Quadro 01: Situação epidemiológica da dengue no Rio Grande do Sul, entre 2007 e 2015.

	Casos suspeitos	Casos confirmados		Sorotipo circulante
		Autóctones	Importados	
2007	1.408	271	107	DENV3
2008	813	0	98	NA
2009	263	0	38	NA
2010	4.943	3.348	141	DENV1 E DENV2
2011	1.649	201	107	DENV1 E DENV4
2012	587	43	78	DENV1 E DENV4
2013	2.356	239	177	DENV2 E DENV4
2014	801	46	44	DENV1 E DENV4
2015	4.067	1.039	219	DENV1

Fontes: SES/RS, 2011 SES/RS, 2012; SES/RS, 2013; SES/RS, 2016b.

Assim como a dengue, a febre chikungunya (CHIKV) é uma doença viral que tem *Ae. aegypti* como vetor principal (Figueiredo, 2007; Leroy, 2009). É causada por um vírus africano do gênero *Alphavirus* (Togaviridae) e mantém seu ciclo de transmissão da mesma forma que a Dengue, ou seja, homem > vetor > homem (Pialaux, 2007).

Os primeiros registros de ocorrência do CHIKV foram na Tanzânia durante um suposto surto de dengue, em 1952 (Robinson, 1955; Ross, 1956). Desde então, tem se propagado pelo mundo e atualmente circula em muitos países da África e da Ásia (OMS, 2016a; Powers, 2007; Staples, 2009). De acordo com a Organização Mundial da Saúde – OMS (2016a), o vírus já foi identificado em mais de 60 países.

Em dezembro de 2013 a OMS e a Organização Panamericana de Saúde – OPAS receberam a confirmação do primeiro caso de transmissão autóctone do CHIKV nas Américas (PAHO/WHO, 2016). A partir daí, passaram a disponibilizar atualizações da situação epidemiológica da virose. Entre 2015 até a SE 04/2016, foram 31.907 casos autóctones confirmados em 23 países, incluindo o Brasil que registrou 560 casos (PAHO/WHO, 2016). A primeira notificação brasileira de CHIKV ocorreu em 2010, e tratava-se de um caso importado da Indonésia (OMS, 2013).

No Rio Grande do Sul não há registros de autoctonia desta doença. Entretanto, entre 2015 e 2016 (até final da SE 04/2016) foram registrados 105 casos suspeitos com 4 confirmações (SES/RS, 2016a).

Recentemente, outra arbovirose vem causando preocupação no Brasil: o zika vírus (ZIKV). Assim como os DENV's, o ZIKV pertence ao gênero *Flavivirus* (Hayes, 2009) e também causa uma doença febril aguda.

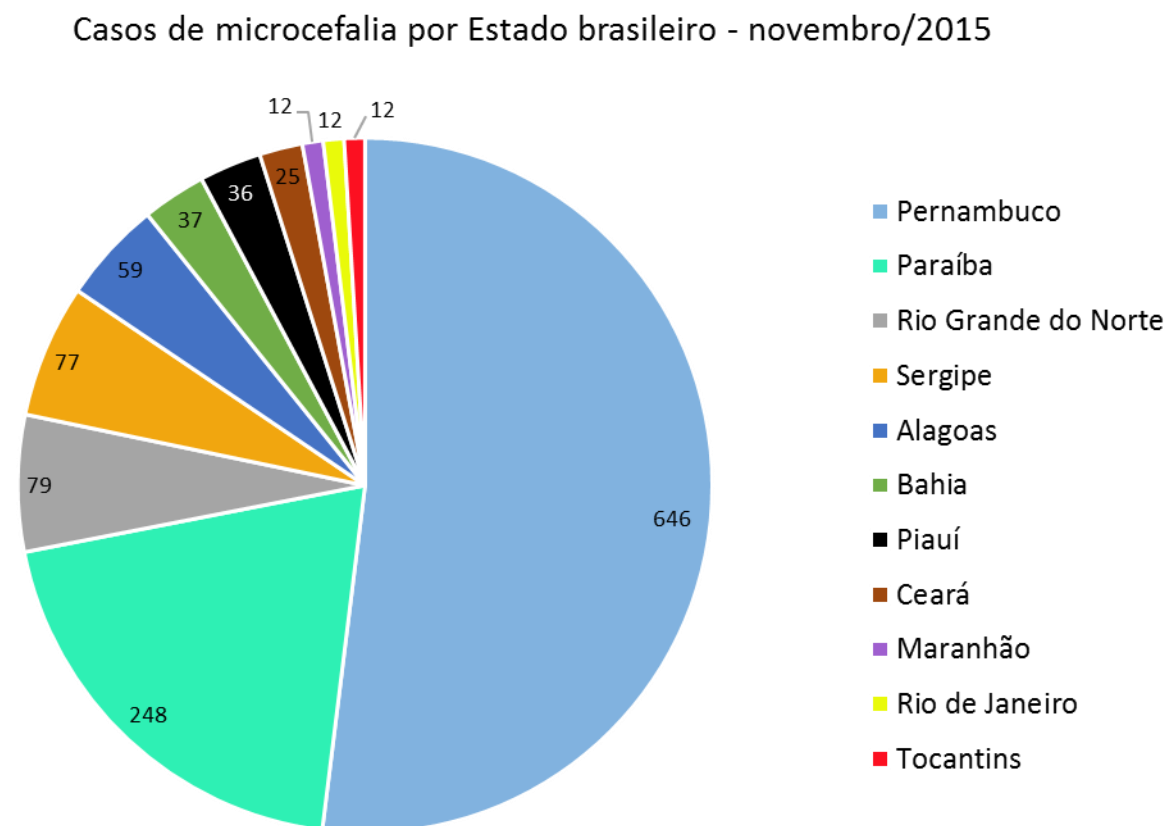
Sua descoberta ocorreu em 1947 em macacos *Rhesus* da região de Zika, em Uganda. Em 1968 o vírus foi isolado de pacientes nigerianos (PAHO/WHO, 2015a) e sua primeira ocorrência fora da África foi na Ilha de Yap, nos Estados Federados da Micronésia do Oceano Pacífico (Hayes, 2009).

Desde então, os casos de zika vírus tem se espalhado pelas Américas e pelo mundo. Em dezembro de 2015, a Organização Panamericana de Saúde divulgou a ocorrência de casos autóctones da febre causada pelo zika vírus no México, Guatemala, El Salvador, Panamá, Colômbia, Venezuela, Suriname, Brasil e Paraguai (PAHO/WHO, 2015b).

A febre zika normalmente apresenta evolução benigna e seus sintomas tendem a desaparecer espontaneamente após 3 a 7 dias (Brasil, 2015a). Entretanto,

em 2015 o Ministério da Saúde observou uma alteração significativa na incidência de casos de microcefalia no país quando comparados os registros de 2010 a 2014 com 2015.

Entre 2010 e 2014 as notificações de microcefalia variaram entre 139 e 175. Em 2015 o número saltou para 1.248 casos, sendo pouco mais da metade apenas no Estado de Pernambuco, conforme a Figura 01 (Brasil, 2015b). A partir da identificação do ZIKV no líquido amniótico de uma gestante, ele se tornou o principal suspeito de causar o aumento expressivo do número de casos de microcefalia. No final de 2015 o Ministério da Saúde reconhece uma possível relação entre o aumento da incidência de microcefalia com a ocorrência de zika vírus (Brasil, 2016a).



Fonte: Brasil, 2015b

Figura 01: Gráfico comparando o número casos de microcefalia ocorridos em alguns Estados brasileiros em 2015, cujas causas entraram em investigação no Ministério da Saúde.

Outra importância epidemiológica deste vírus se refere aos indícios de sua relação com o aumento da incidência da Síndrome de Guillain-Barré (SGB) no Brasil.

Entretanto, o fato ainda necessita evidências comprobatórias (Cardoso et al., 2015). Esta é uma doença autoimune multifatorial onde o sistema nervoso do paciente é atacado pelo seu sistema imunológico, causando desde fraqueza muscular até paralisia total. Dentre os fatores já descritos que desencadeiam a SGB estão as infecções virais diversas, infecções bacterianas, vacinações, cirurgias, anestésias e trauma (Fiocruz, 2015).

4.2 Taxonomia e sistemática do *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762)

Aedes aegypti é uma espécie de mosquito pertencente à ordem Diptera (do grego *di*=dois e *ptera*=asas). Esta ordem compreende também as moscas, borrachudos e afins, além das outras espécies de mosquitos. É composta por um grupo muito diverso, tanto em termos ecológicos quanto em riqueza de espécies, contemplando mais de 150.000 espécies distribuídas nas seis regiões zoogeográficas: afrotropical, paleártico, oriental, australiano/Oceania, neoártico e neotropical (Pape et al., 2009). Suas principais características são a presença de um par de asas completamente funcionais e um par de asas vestigiais, chamadas de halteres (Lehane, 2005; Neves, 2005).

Nessa Ordem a família Culicidae possui representantes popularmente conhecidos no Brasil por diversos nomes, entre eles pernilongos, muriçocas, carapanãs, sovelas, mosquitos-prego e zancudos. Sua distribuição mundial é bastante ampla, ocorrendo em praticamente todos os ambientes terrestres, excetuando-se apenas a Antártida e algumas ilhas (Eiras, 2005; Lozovei, 2005). Esta família se divide em três subfamílias: Toxorhynchitinae, Anophelinae e Culicinae. Nesta última subfamília, encontram-se todas as espécies de *Aedes* (Consoli & Lorenço-de-Oliveira, 1998).

A primeira subfamília se caracteriza por um grupo de mosquitos de grande porte e fêmeas não hematófagas na fase adulta. As demais subfamílias possuem representantes hematófagos e se diferenciam por características morfológicas, como tamanho de palpo e posição de pouso na fase adulta, além de presença ou ausência de sifão na fase de larva, entre outros (Consoli & Lorenço-de-Oliveira, 1998; Rueda, 2004).

A subfamília Culicinae é subdividida em 7 tribos, sendo Aedini aquela que compreende o gênero *Aedes*, que juntamente com os gêneros *Psorophora* e *Haemagogus* reúnem representantes de espécies (Consoli & Lorenço-de-Oliveira,

1998).

Reinert et al. (2004) compararam caracteres morfológicos de indivíduos da tribo Aedini e reclassificaram taxonomicamente algumas espécies. Assim, a espécie *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* foi inserida em um novo gênero, passando a ser considerada *Stegomyia aegypti*. Também apresentaram uma forma de abreviatura para os gêneros *Aedes* e *Stegomyia*, sendo *Ae* e *St* respectivamente.

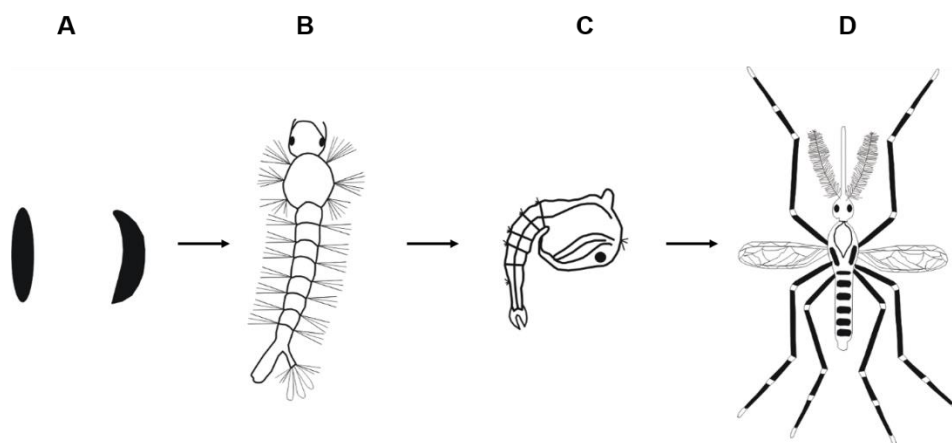
Em 2009, Reinert reafirma a nova classificação e a forma de abreviatura anteriormente sugerida para os gêneros e subgêneros da família Culicidae.

Mesmo após estas propostas, o Catálogo Sistemático de Culicidae disponível em plataforma digital (Gaffigan et al., 2016) ainda considera a espécie pertencente ao gênero *Aedes*.

4.3 Biologia de *Aedes aegypti*

A distribuição mundial deste mosquito está relacionada às regiões tropicais e subtropicais. Entretanto, pode ser encontrado no sudeste da Ásia (incluindo toda a Índia) e algumas áreas da Europa e América do Norte (Kraemer et al., 2015).

Seu desenvolvimento pós-embrionário é holometábolo, ou seja, se desenvolve com metamorfose completa passando pelos estágios de ovo, larva, pupa e adulto (Forattini, 2002), como ilustra a Figura 02.



Fonte: UNESP, 2016. Adaptado por Alessandra Lemos

Figura 02 – Ciclo de vida do *Aedes aegypti*, passando pelos estágios de (A) ovo, (B) larva, (C) pupa e (D) adulto.

Machos e fêmeas adultos realizam a cópula durante o voo, no período do amanhecer ao anoitecer (Forattini, 2002) e este ato dura apenas poucos segundos

(Chapman, 1998). Os espermatozoides são armazenados em uma espermateca e a fertilização só ocorre no momento em que o óvulo passa pelo oviduto, durante a postura (Lozovei, 2005). Para que ocorra o desenvolvimento dos ovos é necessário que a fêmea faça um repasto sanguíneo. Os nutrientes provenientes do sangue serão convertidos em substâncias proteicas que integrarão o vitelo (Forattini, 2002; Lozovei, 2005).

A postura dos ovos é realizada em período diurno, com um pico matutino e outro vespertino, diretamente nas paredes úmidas dos criadouros, próximo à superfície da água. Superfícies rugosas são preferenciais, uma vez que fornecem condições fisicamente mais favoráveis para a fixação desses ovos do que superfícies lisas (Forattini, 2002).

A quantidade de ovos em cada postura depende da quantidade de sangue ingerido no repasto. Segundo Forattini (2002) o repasto completo implica cerca de 3,0 a 3,5 mg de sangue e cada fêmea gerará cerca de 120 ovos. A oviposição é realizada em parcelas, sendo colocados poucos ovos em diferentes depósitos.

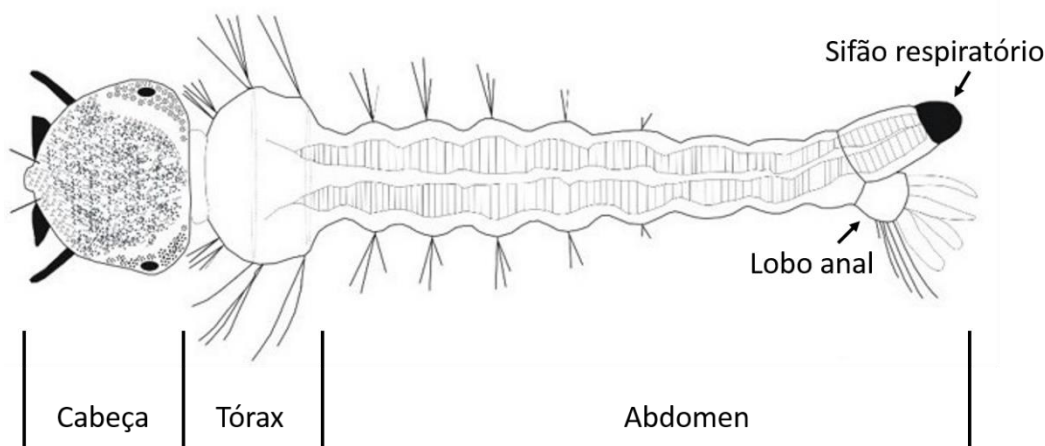
O desenvolvimento embrionário acontece logo após a postura e fatores como temperatura e umidade afetam diretamente este processo (Consoli & Lorenço-de-Oliveira, 1998).

Após o período de maturação inicial dos ovos, que corresponde de 30 a 40 horas, poderá ocorrer uma diapausa que garante aos ovos uma resistência a fatores ambientais adversos, como baixas temperaturas, dessecação e insolação. O fenômeno será interrompido quando da mudança destes fatores. Em *Ae. aegypti* a resistência a ambientes secos poderá ultrapassar um ano (Consoli & Lorenço-de-Oliveira, 1998).

Em condições favoráveis de temperatura e umidade, o período de incubação dos ovos dura de quatro a sete dias. Após este período eclode uma larva aquática, sendo a submersão dos ovos um fator determinante para este processo.

O estágio larvário compreende quatro estádios aquáticos, também chamados ínstars, que são livres natantes. As larvas possuem aspecto vermiforme e seu corpo é dividido em cabeça, tórax e abdomen (Figura 03). A cabeça possui um par de antenas e ocelos laterais que se mostram como manchas escuras que permanecem na fase de pupa e representam os olhos compostos dos adultos. Na porção anterior da cabeça existem as escovas orais cuja função é direcionar o alimento para a boca formando um sistema de corrente hídrica (Consoli & Lorenço-

de-Oliveira, 1998). Logo após a cabeça se encontra o tórax seguido do abdome e sua diferenciação taxonômica é a partir da quantidade de cerdas existentes, sendo o oitavo segmento abdominal aquele onde se encontram estruturas respiratórias e de onde parte o segmento X, também chamado lóbulo anal.



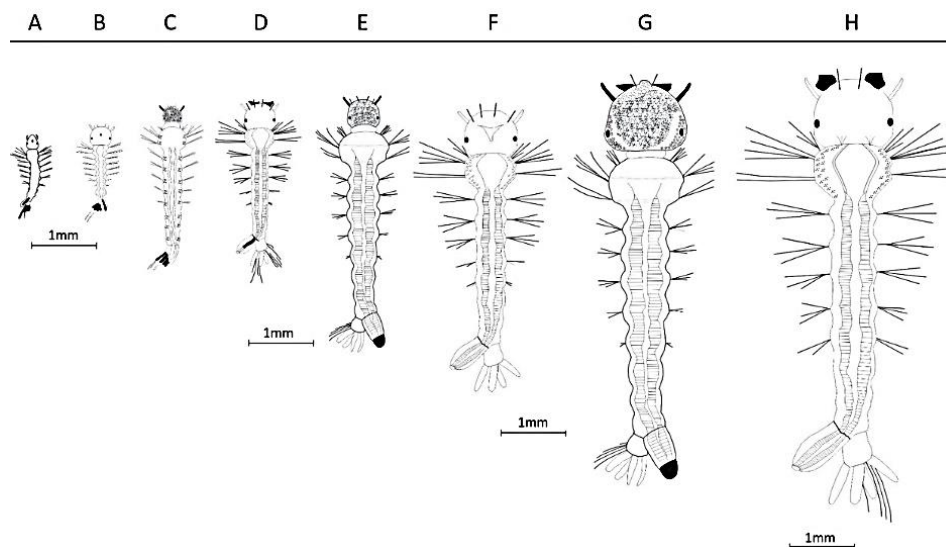
Fonte: Christophers, 1960. Adaptado por Alessandra Lemos

Figura 03 – Divisão corporal da larva em cabeça, tórax e abdome.

A captação de oxigênio nas larvas é feita através de sifão respiratório contendo um espiráculo coberto por pelos hidrófugos. Este se abre na superfície da água permitindo a entrada do ar atmosférico. Quando a larva submerge, esta abertura se fecha e os pelos impedem a entrada de água no sistema respiratório (Klowden, 2013).

A diferenciação dos estádios larvais pode ser feita por análise morfológica externa. No primeiro ínstar as larvas são muito pequenas e claras, de difícil visualização a olho nu. Possuem uma característica diferencial que é a presença de um “dente” quitinoso na região anterior da cabeça, cuja função é auxiliar na eclosão do ovo. O segundo, terceiro e quarto estádios são muito semelhantes, diferenciando-se apenas pelo seu tamanho e quantidade de cerdas ao longo do corpo. Estes estádios são facilmente vistos a olho nu (Christophers, 1960; Consoli & Lorenço-de-Oliveira, 1998).

Logo após as ecdises, as larvas possuem a cabeça clara que aos poucos enegrece até ficar quase preta, característica de final de instar ou pré-ecdise (Figura 04). O quarto estágio larval é o mais longo e a cabeça não chega a enegrecer, ficando sempre clara. Em condições favoráveis de temperatura e disponibilidade de alimento, a fase larvária completa tem duração de sete a oito dias (Christophers, 1960; FIOCRUZ, 2014).



Fonte: Christophers, 1960. Adaptado por Alessandra Lemos

Figura 04 – Diferenciação de instares. (A) Primeiro instar recém eclodida. (B) Primeiro instar inicial. (C) Primeiro instar final. (D) Segundo instar inicial. (E) Segundo instar final. (F) Terceiro instar inicial. (G) Terceiro instar final. (H) Quarto instar.

As pupas correspondem ao estágio de transição entre as larvas e os adultos. Nesta fase, o inseto sofre as adaptações necessárias para a sobrevivência no ambiente terrestre (Forattini, 2002).

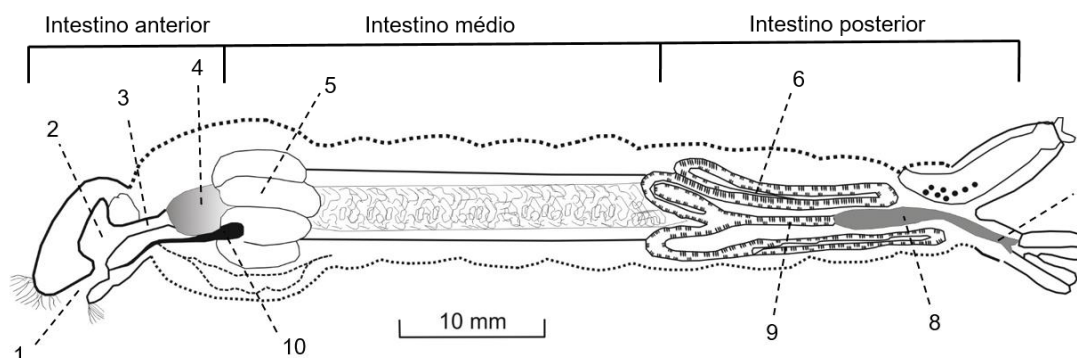
Diversos sistemas são afetados nesta fase, entre eles o traqueal, muscular, circulatório, nervoso e digestório. De forma geral, os tecidos são desorganizados, lisados e substituídos pelas células embrionárias de regeneração que irão se diferenciar nos novos tecidos do imago. No canal alimentar estas modificações são tão profundas que a pupa é incapaz de alimentar-se (Christophers, 1960).

As pupas possuem corpo dividido em cefalotórax e abdome dando aspecto de vírgula. A captação de oxigênio é feita através de duas estruturas existentes no cefalotórax, chamadas trombetas. Nesta região também são encontradas as manchas ocelares bilaterais. O final do abdome das pupas é provido de pás ou paletas, tornando-as extremamente ágeis na água. As pupas não se alimentam, portanto estão desprovidas de aparelho bucal (Consoli & Lorenço-de-Oliveira, 1998).

Após cerca de dois dias de estágio pupal, emerge um mosquito adulto. A exúvia servirá temporariamente como um ponto de flutuação para que o adulto recém-emergido possa repousar e endurecer lentamente seu exoesqueleto (Forattini, 2002).

4.4 Anatomia interna e fisiologia de larvas

O trato digestório larval consiste em um tubo reto de células epiteliais simples, que vai desde a boca até o ânus. Segundo classificação de Nation (2008) e Klowden (2013) este é dividido em três grandes regiões (Figura 05), chamadas intestino anterior (estomodeu), intestino médio (mesêntero) e intestino posterior (proctodeu).



Fonte: Christophers, 1960. Adaptado por Alessandra Lemos

Figura 05 – Divisão do aparelho digestório da larva, ilustrando as três regiões do intestino. Boca (1), faringe (2), esôfago (3), proventrículo (4), cecos gástricos (5), túbulos de Malpighi (6), reto (7), cólon (8) e glândulas salivares (10).

Durante o desenvolvimento embrionário, os intestinos anterior e posterior se formam a partir de invaginações da ectoderme do embrião, enquanto o intestino médio surgirá a partir da endoderme (Klowden, 2013).

A alimentação é por filtração, ou seja, as substâncias suspensas na água são direcionadas à boca através do movimento das escovas. Este processo filtrante não é seletivo, portanto a ingestão de partículas alimentares é orientada apenas pelo seu tamanho (Forattini, 2002). Consoli & Lorenço-de-Oliveira (1998) indicam que uma larva é capaz de filtrar até 2 litros de água por dia.

O intestino anterior, também chamado de estomodeu, é formado pelo conjunto da cavidade pré-oral, boca, faringe, esôfago e proventrículo (Christophers, 1960). Suas células epiteliais produzem revestimento ligado à superfície celular composto basicamente de quitina e proteínas, semelhantes à cutícula externa do corpo. Esta parede cuticular interna fica voltada para o lúmen e acaba por limitar a absorção de nutrientes nesta região. A cada muda este revestimento é descartado para o intestino e os resíduos não digeridos são excretados com as fezes (Nation, 2008; Klowden, 2013).

O tecido epitelial do estomodeu é do tipo escamoso, com células achatadas e indiferenciadas, não absorvendo nem secretando enzimas digestivas (Chapman, 1998). Sendo assim, esta porção do intestino é responsável pela coleta do alimento e sua condução até o intestino médio, onde ocorrerá a efetiva absorção dos nutrientes.

A faringe é responsável pela sucção do alimento através de seus músculos que contraem e dilatam o lúmen, formando um vácuo temporário que conduz o alimento. O esôfago aparece logo em seguida como um tubo que conecta a faringe ao intestino médio e, finalmente, esta porção do intestino é marcada pela presença do proventrículo (Christophers, 1960). As células desta estrutura secretam e moldam uma membrana para dentro do intestino médio (Edwards & Jacobs-Lorena, 2000).

O intestino médio é o principal sítio de absorção de nutrientes, sendo uma região com grande atividade enzimática. A presença de oito cecos gástricos ao redor de um tubo intestinal marca o início do mesêntero, que se estenderá até o início do íleo, especificamente nas inserções dos túbulos de Malpighi (Christophers, 1960; Nation, 2008).

O mesêntero não possui revestimento cuticular ligado à superfície da célula. Entretanto, uma secreção igualmente quitinosa chamada Membrana Peritrófica (MP) é produzida para envolver o alimento e servir como barreira mecânica contra substâncias que possam danificar os tecidos. Esta MP compartimentaliza o intestino em um espaço endoperitrófico, referente à região dentro da membrana, e ectoperitrófico, referente ao espaço entre a MP e o tecido epitelial (Tellan et al., 1999; Edwards & Jacobs-Lorena, 2000). Nas larvas é produzida continuamente pelas células do proventrículo, também chamado de cárdia, localizado entre o intestino anterior e médio (Christophers, 1960).

O mesêntero apresenta células cúbicas e células regenerativas. As primeiras são mais abundantes, sendo responsáveis pela maioria da absorção e digestão dos nutrientes. Possuem numerosas microvilosidades na superfície voltada ao lúmen e diversas pregas de membrana que aumentam sua capacidade absorptiva, chamada “borda em escova”. Seu aspecto é semelhante a cílios. As células cúbicas possuem redes de retículos endoplasmáticos que possibilitam a alta produção das enzimas digestórias e se apresentam com núcleos grandes e globulares (Christophers, 1960; Nation, 2008).

As células regenerativas são aquelas que irão substituir as células desgastadas, velhas ou que foram perdidas pelas atividades secretoras apócrina ou

holócrina. Elas crescem na superfície próxima à hemolinfa em pequenos sacos contendo as células imaturas que se dividirão assimetricamente por estímulo da própria progenitora. Desta forma, é induzida a autoregeneração tecidual ao originar outra célula cúbica. Apresenta-se inicialmente com formato levemente triangular, com núcleo central e surgem de forma aleatória e isolada (Jones, 1960; Nation, 2008; Ribeiro, 2010).

O intestino posterior inicia na inserção dos cinco túbulos de Malpighi presentes na porção inicial do íleo, em uma região chamada piloro (Nation, 2008). Esta região intestinal constitui-se da câmara pilórica, íleo, cólon e reto, que termina na abertura anal (Christophers, 1960; Clements, 1963).

O alimento chega ao proctodeu na forma líquida e segue em direção ao reto, onde ocorre a absorção de líquidos, íons e substâncias dissolvidas da urina primária proveniente dos túbulos de Malpighi (Nation, 2008).

4.5 A histologia das larvas e o controle vetorial

A incidência de doenças vetoriadas pelos mosquitos é proporcional à presença do vetor (Gomes, 1998). Sendo assim, o Ministério da Saúde (2009) preconiza o controle populacional de *Ae. aegypti* como principal estratégia para diminuir ou evitar as doenças relacionadas a ele.

Uma das recomendações do Ministério da Saúde (2009) para as medidas de controle vetorial é o tratamento focal, que consiste na aplicação de produto larvicida em criadouros de mosquitos. Apesar de preconizar quatro tipos distintos de larvicidas, incluindo um químico (Temephos), um biológico (BTi) e dois reguladores de crescimento, o químico ainda é indicado como produto de primeira escolha.

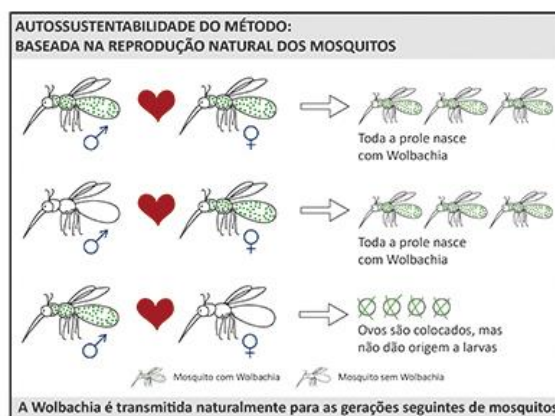
Esta preferência é problemática por alguns aspectos, pois atua na seleção de indivíduos resistentes aos inseticidas (Braga & Valle, 2007), produz efeitos adversos sobre organismos não-alvo, possui alto custo e tem efeito residual, causando danos ao ambiente (Blair et al., 2000).

Outro fator importante relacionado ao uso de inseticidas químicos se refere ao risco de sua aplicação para a saúde humana. No Brasil são preconizados o uso de produtos organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides, todos com potencial tóxico ao ser humano (Braga & Valle, 2007; Brasil, 2001).

Como alternativa ao uso de inseticidas químicos há o controle biológico, que atua no controle populacional através, principalmente, de competição, predação

e parasitismo. Os grupos potenciais nos controles são: insetos, vírus, bactérias, protozoários, fungos, plantas, etc (Forattini, 2002).

A Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ (2016) vem estudando métodos de controle biológico a partir da liberação de vetores infectados com a bactéria *Wolbachia*. O objetivo destes estudos é reduzir a transmissão do vírus da dengue pelo mosquito *Ae. aegypti* de forma natural e autossustentável, uma vez que a bactéria impede a transmissão do patógeno sem afetar a saúde humana ou animal. O método se baseia na soltura de mosquitos carregando as bactérias para que se misturem às populações locais. A transmissão para a prole ocorre conforme a Figura 06:



Fonte: FIOCRUZ, 2016

Figura 06 – Método de transmissão da bactéria *Wolbachia* para sua prole e seus efeitos.

Em 2014 uma empresa privada inaugurou a primeira biofábrica de mosquitos geneticamente modificados do Brasil. Seu objetivo é produzir machos transgênicos de *Ae. aegypti* que, ao serem liberados no ambiente, copulam com fêmeas selvagens e transferem seus genes para a prole. Esta, por sua vez, não consegue se desenvolver até a fase adulta (Oxitec, 2016).

Há muitas vantagens no uso de controle biológico, uma vez que utiliza espécie-alvo específica, não polui o ambiente e possui menor risco de provocar o desenvolvimento de resistência (Owuama, 2001).

Muitas pesquisas são desenvolvidas na busca por substâncias alternativas que atuem no controle biológico. A maioria testa diferentes concentrações e relaciona com as taxas de mortalidade e alterações morfo-histológicas consequentes.

As alterações mais frequentemente descritas são estratificação epitelial, desorganização histológica, vacuolização, aumento do espaço subperitrófico, dobras

cuticulares, encolhimento e dobraduras no tubo digestivo até destruição total das células (Arruda et al., 2003; Barreto et al., 2006; Narciso et al., 2014).

4.6 Elementos de Histoquímica

Chama-se de histoquímica o conjunto de métodos utilizados para identificar e diferenciar *in situ* a natureza das substâncias químicas presentes nos tecidos e na matriz extracelular (Figueiredo et al., 2007; Junqueira & Carneiro, 2013).

Tais métodos são baseados em reações químicas entre a substância de interesse que está disponível nos tecidos e os reagentes (corantes), de forma que o produto desta reação seja facilmente visualizado em microscopia através da sua coloração final (Stevens, 1975). Entretanto, não permitem uma análise quantitativa (Figueiredo et al., 2007).

Existem diversos corantes que podem ser utilizados na histoquímica e sua escolha dependerá do conhecimento prévio da interação entre eles e o tecido. Desta forma, existem corantes que levam a reações de basofilia, acidofilia, metacromasia e alochromasia (Figueiredo et al., 2007).

Corante básico é aquele carregado positivamente, que se liga a grupos aniônicos (negativos) dos componentes dos tecidos. Esta reação em pH controlado pode revelar a presença de diferentes grupos. A hematoxilina, mesmo não sendo um corante básico, se comporta como tal, utilizando um mordente que faz a ponte entre as substâncias do tecido e o corante evitando a dissociação durante a lavagem. Como resultado apresenta coloração azul (Ross & Romrell, 1993; Young & Wheath, 2000).

Os corantes de caráter ácido possuem carga negativa e se comportam de forma oposta aos corantes básicos, reagindo com grupos catiônicos (positivos). A eosina é um corante ácido e age nas estruturas básicas como mitocôndrias e componentes do citoplasma corando-os de rosa (Ross & Romrell, 1993; Young & Wheath, 2000).

Sendo assim, basofilia é o termo utilizado para descrever a fixação de um corante básico catiônico a uma substância ácida ionizada e acidofilia é quando um corante ácido aniônico se liga a uma substância catiônica (Figueiredo et al., 2007).

A metacromasia é identificada quando a interação entre o tecido e o corante gera uma coloração diferente da cor original, mostrando contrastes no tecido. Muitos corantes possuem esta capacidade, entretanto o termo normalmente é utilizado para se referir às reações causadas pelo grupo tiazina, em colorações que mudam do azul

ao violeta ao vermelho (Pearse, 1961; Figueiredo et al., 2007).

A alochromasia, semelhante à metacromasia, cora as estruturas diferentes com cores diferentes. Na alochromasia o corante não é puro, contendo outras substâncias também corantes (Figueiredo et al., 2007).

O azul de toluidina-borax, sulfato azul do Nilo e azul mercúrio de bromofenol, apesar de referenciarem suas cores, tingem os tecidos de maneiras distintas a partir de diferentes afinidades.

O azul de toluidina-borax é um corante metacromático, acidofílico, ou seja, básico ou catiônico (Sridharan & Shankar, 2012). O bórax é utilizado como tampão do azul de toluidina a fim de manter o pH elevado, necessário para evidenciar a coloração vermelha da metacromasia (Figueiredo et al., 2007). Este corante possui um espectro de absorção com três bandas distintas, sendo alfa (α) a forma monomérica que expressa azul, beta (β) a forma dimérica que expressa púrpura e gama (γ) a forma polimérica que expressa vermelho (Pearse, 1961).

O sulfato azul do Nilo é um corante alochromático utilizado para detecção e diferenciação de lipídios. O corante é constituído parcialmente por uma oxazona que possui coloração vermelha e uma oxazina, que é uma base livre com coloração azul (Cain, 1947; Pearse, 1961). Cain (1947) demonstrou que lipídios neutros dissolvem a oxazona e as bases livres, corando-se de vermelho, enquanto lipídios ácidos irão dissolver as oxazonas e se combinar com as oxazinas, tornando-se azuis.

Azul mercúrio de bromofenol é um corante ácido indicado para detectar proteínas totais (Mazia et al., 1953). Os mesmos autores consideram a técnica simples, de bom contraste, com especificidade e boa aplicabilidade para a estimativa fotométrica de proteínas. Entretanto, há outros pesquisadores que consideram a técnica pouco específica e muito limitada, uma vez que o mercúrio pode promover ligações com íons de carga negativa, o que elimina a especificidade de detecção de proteínas (Pearse, 1961; Figueiredo et al., 2007).

Outro importante elemento de histoquímica é a reação ácido periódico-Schiff (PAS), que resulta na detecção de polissacarídeos gerais, glicogênio e glicoproteínas. A reação inicia com a transformação de radicais 1,2-glicol encontrado nos açúcares em aldeídos. Em seguida, o reagente de Schiff atua como um revelador dos aldeídos, que acabam corados pela fucsina e assumindo a cor púrpura ou magenta (Figueiredo et al., 2007; Junqueira & Carneiro, 2013).

O Quadro 02 apresenta o resumo destas substâncias com as respectivas

características:

Quadro 02: Comparação entre os diferentes corantes histoquímicos relacionados às substâncias detectadas, coloração final e autor.

Reagente	Substância detectada	Coloração final	Referências
Azul de toluidina-borax	Sulfatos, carboxilas e radicais fosfatados.	Azul, púrpura e ou vermelho	Pearse, 1961
Sulfato azul do Nilo	Lipídios	Tons de azul e ou vermelho proporcionais à quantidade da substância	Cain, 1947
Azul mercúrio de bromofenol	Proteínas totais	Tons de azul proporcionais à quantidade da substância	Mazia et al., 1953
PAS	Polissacarídeos gerais, glicogênio e glicoproteínas	Púrpura ou magenta	Pearse, 1961

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Preparação das amostras de *Aedes aegypti*

A colônia de *Ae. aegypti* utilizada neste trabalho estava estabelecida no Setor de Parasitologia da UFRGS, a partir de ovos da linhagem Rockefeller.

Para estabelecer a colônia, papéis filtros contendo os ovos foram completamente imersos em bacias brancas de plástico contendo água filtrada da rede pública de abastecimento, a fim de propiciar a eclosão larval e desenvolvimento das pupas (Figura 07). O armazenamento das bacias ocorreu em câmara biológica climatizada a uma temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $80 \pm 5\%$ e com fotofase de 12 horas (Silva, 1998). As larvas foram alimentadas três vezes por semana com pequenas porções de ração para filhotes de gato (Cat Show[®] - Purina[®]) finamente triturada. As pupas que se desenvolviam eram coletadas e encaminhadas às gaiolas para a emergência dos adultos, reiniciando seu ciclo.



Figura 07 – Bandeja contendo ovos para eclosão larvária.

As gaiolas utilizadas na criação de mosquitos eram feitas a partir de uma armação de madeira medindo 30x30x30cm (LxAxP), com um revestimento de vidro nas laterais e tela do tipo *voile* nos demais lados, possuindo uma manga de manipulação no lado anterior (Figura 08). No seu interior ficam os mosquitos adultos

e pupas, que se encontram em pequenos copos plásticos. Como fonte de nutrição dos alados foi ofertada uma solução de sacarose a 10%, a qual era renovada uma vez por semana. Para o desenvolvimento de ovos, as fêmeas realizaram hematofagia duas vezes por semana em um protótipo de alimentador, elaborado a partir de chapas de alumínio lavradas, envoltas por parafilme, de acordo com Carvalho et al. (2014). Nelas era oferecido sangue desfibrinado de carneiro, da marca Newprov (Figura 09). Para a oviposição era disponibilizado papel filtro, parcialmente submerso em água filtrada contida em um recipiente escuro.



Figura 08 – Gaiola de criação de mosquitos com manga de manipulação



Figura 09 – protótipo de alimentador instalado no teto da gaiola.

Assim como as larvas, os adultos eram mantidos em sala climatizada a uma temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $80 \pm 5 \%$ e com fotofase de 12 horas.

5.2 Histologia

Foram analisados um total de 30 larvas sadias retirados diretamente das bandejas em três momentos distintos, tentando assim identificar qualquer variação existente.

Previamente foram preparados microtubos contendo 1,5ml de solução fixadora, de forma a deixar as amostras completamente imersas em volume 20% maior que a peça. O fixador Bouin foi utilizado em vinte amostras destinadas às análises morfológicas e o fixador Formol-cálcio para dez amostras de histoquímica.

A coleta das larvas foi realizada com o auxílio de pipeta Pasteur, sendo selecionadas as larvas de 3º instar final a 4º inicial. As amostras foram colocadas em solução fixadora de passagem, a fim de evitar a diluição do fixador. Imediatamente eram recoletadas e transferidas para os microtubos previamente preparados.

5.2.1 Processamento

Todas amostras foram mantidas em solução fixadora durante 24 horas sob temperatura ambiente (Barth, 1953). Após a fixação, as amostras foram lavadas com álcool 70%, cada uma com duração mínima de 20 minutos, até que não houvesse resíduo de fixador sendo extraído do material (Figura 10).

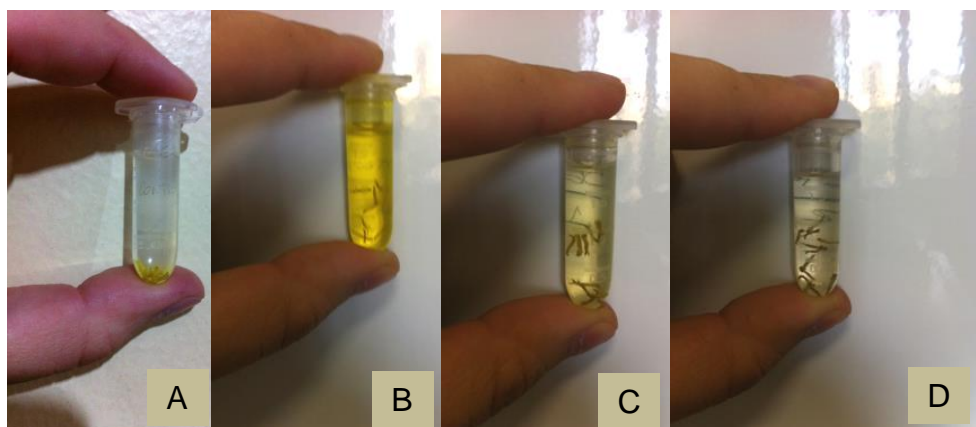


Figura 10 – Sequência de retirada de fixador do material. (A) Fixador Bouin saindo lentamente do material logo após a troca por álcool 70%. (B) Minutos após, o fixador já se encontra misturado ao álcool. (C) Após algumas trocas é possível perceber a diminuição da quantidade de fixador. (D) Álcool puro, sem fixador.

O processo de desidratação foi realizado com uma série de imersões graduais em álcool etílico, sendo: álcool 70% por 10 minutos; álcool 95% por 15 minutos; álcool absoluto por 20 minutos e novamente álcool absoluto por 30 minutos.

O processo de impregnação foi realizado em temperatura ambiente através de uma série de imersões em solução resinada (Leica Histo-resin – Embedding Kit) conforme Quadro 03 a seguir:

Quadro 03: Proporção das soluções de álcool absoluto e solução resinada utilizadas na etapa de impregnação das larvas com os respectivos tempos de exposição.

Álcool absoluto : solução resinada	Tempo de imersão
2:1	30 min.
1:1	30 min.
1:2	30 min.
Solução resinada pura	overnight
Solução resinada pura	Mínimo 2h

O material impregnado foi encaminhado para a etapa de inclusão ou emblocamento, que consiste em preparar blocos de resina sólida contendo o material. Para tanto, a inclusão foi realizada em moldes de polietileno de tamanho 6X8mm (Leica) e cada bloco continha duas larvas, posicionados longitudinalmente (Figura 11). Os moldes foram mantidos em estufa a 40°C por, no mínimo, 12h para total polimerização da resina.

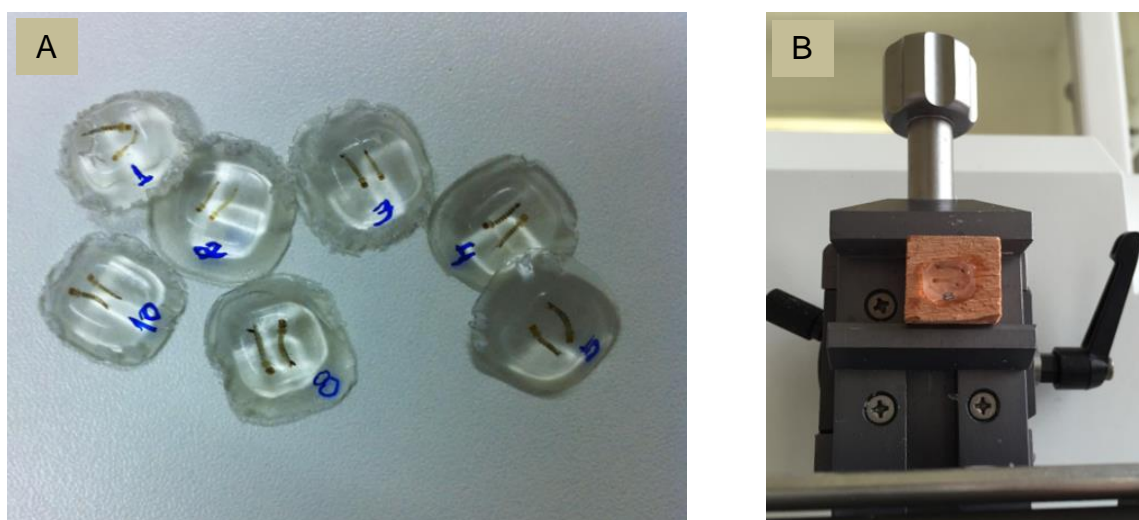


Figura 11 – Amostras incluídas em resina. (A) Blocos contendo as amostras

para corte. (B) Bloco fixado em cubo de madeira pronto para a microtomia.

5.2.2 Microtomia

Devido ao seu pequeno tamanho, os blocos eram fixados com cola forte instantânea em pequenos cubos de madeira, a fim de propiciar estabilidade no uso do micrótomo. Os blocos eram secos em estufa a 40°C e foram considerados prontos depois de ficarem completamente secos ao toque.

Foram realizados cortes longitudinais com 3µm de espessura, utilizando um micrótomo computadorizado semi-automático Precision YD335, com navalha descartável Histoblade em aço inox. Cada fragmento foi colocado sobre uma pequena gota de água destilada em lâminas previamente limpas com álcool 70%. Para cada bloco de resina, foram montadas de 10 a 15 lâminas devidamente identificadas, em que cada lâmina recebeu seis cortes sequenciais (Figura 12). As lâminas foram colocadas sobre uma chapa aquecida a 40-45°C para secagem da gota e, logo após, mantidas em estufa a 40°C por, no mínimo, 24 horas para a devida adesão. Posteriormente, foram encaminhadas à coloração, sendo Hematoxilina-Eosina (HE) para análises morfológicas e colorações especiais para as análises histoquímicas.

As etapas de processamento posteriores à fixação foram realizadas no Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), no município de Eldorado do Sul/RS, com o apoio de técnicos da área de histopatologia. Foram feitos alguns testes dos métodos a fim de ajustar e refinar a manipulação das larvas evitando danos às suas estruturas.

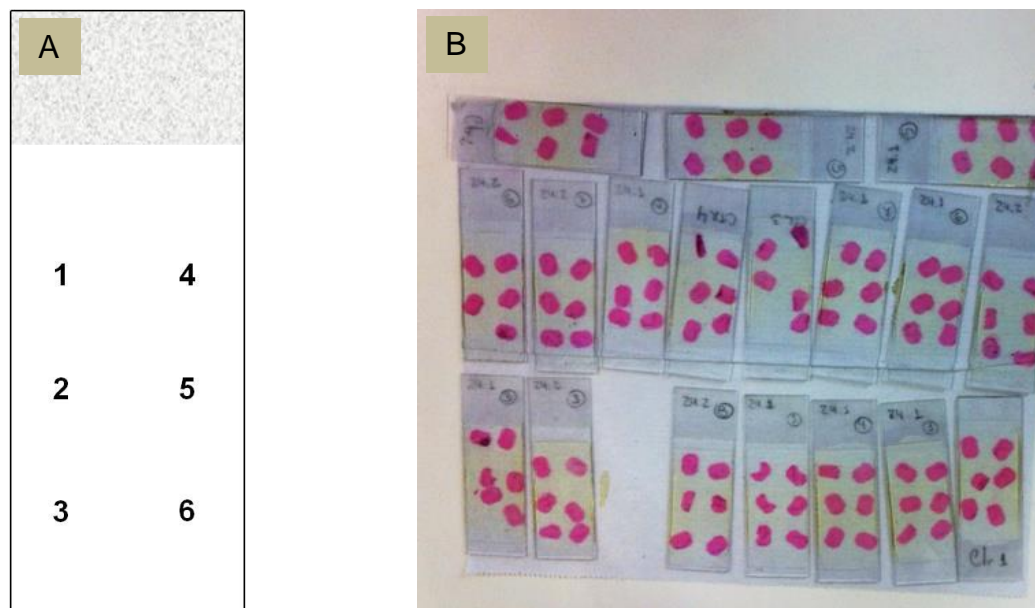


Figura 12 – Disposição dos cortes nas lâminas. (A) Esquema representando a numeração dos cortes em cada lâmina. (B) Lâminas contendo cortes histológicos corados com HE, prontos para as análises morfológicas.

5.2.3 Coloração e montagem das lâminas

Após a adesão, as amostras foram coradas com a técnica adaptada de Hematoxilina-Eosina. Como a historesina é hidrofílica, foi utilizada a Hematoxilina de Harris e a Eosina amarelada 1%, de forma a evitar corantes não aquosos. Para tanto, a exposição à hematoxilina foi de 15 minutos, seguido de uma lavagem rápida com água destilada para remover o excesso de corante. Logo após, passou-se para a eosina durante 5 minutos, seguido de duas lavagens rápidas com água destilada em copos béquer. Estas lâminas foram colocadas em placa aquecida a 40°C até sua completa secagem e, em seguida, foram colocadas em estufa 40°C por, no mínimo, 1 hora.

As lâminas foram montadas com uso de Entellan seguido da colocação das lamínulas.

5.3 Caracterização histoquímica

Os cortes foram submetidos às colorações histoquímicas com algumas adaptações para uso em resina, conforme segue:

- (1) PAS para caracterizar polissacarídeos gerais, glicogênio e glicoproteínas (Pearse, 1961);
- (2) Azul de bromofenol para proteínas totais (Mazia et al., 1953);
- (3) Azul de Nilo para lipídios (Cain, 1947);
- (4) Azul de toluidina-borax para sulfatos, carboxilas e radicais fosfatados (Pearse, 1961).

5.4 Análise das lâminas histológicas

As análises das lâminas foram feitas a partir de microscopia óptica utilizando os equipamentos disponíveis no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). As fotografias foram tiradas em microscópio Olympus BX41 com câmera acoplada e a inclusão de barra de escala foi realizada utilizando o software ImageJ versão 1.50f.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Histologia do intestino das larvas

O corpo da larva é dividido em 10 segmentos abdominais externamente visíveis. O intestino médio pode ser dividido em três regiões distintas: anterior, médio e posterior. Esta divisão é didática e serve apenas para facilitar a descrição histológica, visto que há diferenças morfológicas entre elas. A região anterior do mesêntero se inicia nos cecos gástricos e vai até o segmento abdominal I. Entre os segmentos II e III está a região média, ficando a posterior equivalente aos segmentos IV e V. Demais segmentos equivalem ao intestino posterior (Figura 13).

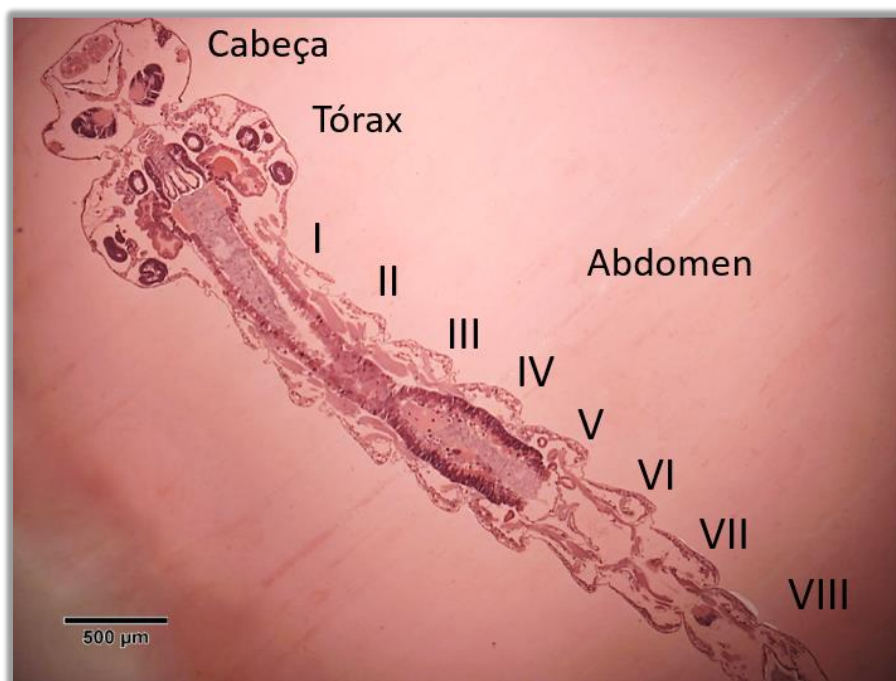


Figura 13 – Divisão do corpo da larva em segmentos abdominais. Cecos gástricos e segmento I equivalem ao mesêntero anterior; segmentos II e III ao médio, ficando os segmentos IV e V equivalentes ao intestino médio posterior. Demais segmentos equivalem ao intestino posterior. A: 40X. Coloração: HE.

Diversos fatores devem ser ressaltados quanto aos estudos histológicos das larvas. O ângulo dos cortes e a sua profundidade influenciaram diretamente a observação da morfohistologia do intestino das larvas. Os cortes sequenciais permitiram acompanhar a evolução das estruturas, uma vez que ficam mais claras e definidas à medida que chegam ao centro da larva.

É possível observar toda a morfologia do sistema digestivo, mas é raro que

se consiga toda a sequência na mesma lâmina histológica. A mínima torção larval no momento da fixação ou da inclusão é suficiente para que as estruturas se mostrem em diferentes profundidades de corte. Mesmo assim, é possível realizar análises de estruturas próximas com mais facilidade, como é o caso do intestino anterior. Desta região, o proventrículo se mostra bastante claro, de fácil observação (Figura 14).

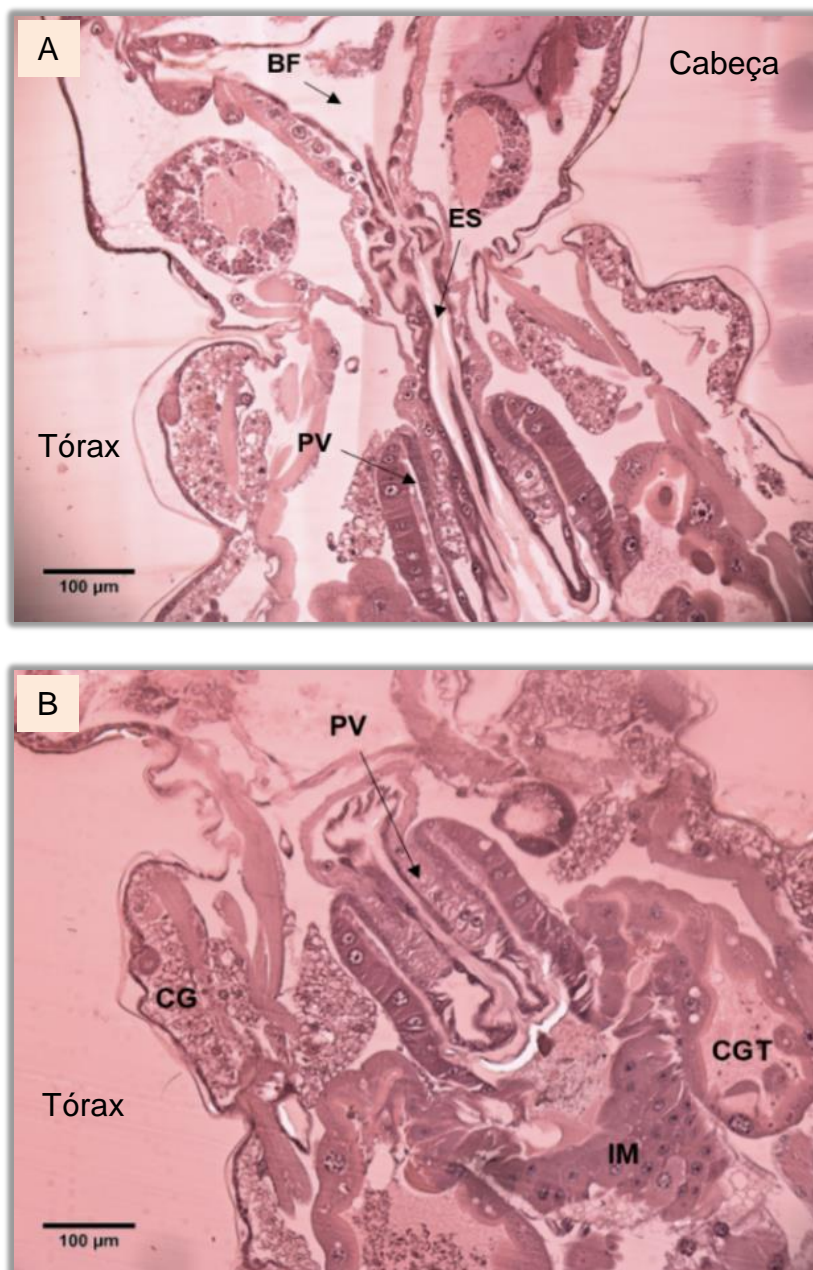


Figura 14 – Visão geral do intestino anterior da larva corada com HE. A: 200X. (A) Visão geral do intestino anterior. (B) Mesma região, com proventrículo centralizado. BF (bomba faringiana), CG (corpo gorduroso), CGT (cecos gástricos), ES (esôfago), IM (intestino médio), PV (proventrículo).

O uso de água destilada em todas as etapas do processamento, incluindo a limpeza da vidraria, se mostrou fundamental, visto que não há retirada da resina dos tecidos ficando o material completamente corado. As impurezas da água não destilada acabam por dificultar a análise dos tecidos.

Com relação ao intestino anterior, a estrutura de melhor visualização é o proventrículo, que se apresenta como uma invaginação do esôfago, circundado por uma camada de epitélio colunar a cúbico, semelhantes às células do intestino médio. Segundo Christophers (1960) estas células são responsáveis por secretar a membrana peritrófica, enquanto as demais estruturas acabam por moldá-la por compressão. Sendo assim, esta região se torna muito importante participando ativamente dos processos de defesa mecânica a entrada de patógenos por via oral.

Quando os cortes são superficiais possibilitam observar três cecos gástricos, sendo dois laterais e um central. Demais estruturas do intestino anterior e médio não ficam aparentes. Em cortes mais profundos apenas os cecos laterais ficam evidentes e entre eles é possível observar demais estruturas do intestino. As células dos cecos gástricos são grandes, levemente achatadas e com claras bordas em escova, contrariando Oliveira et al (2009) que descrevem células sem microvilosidades bem desenvolvidas (Figura 15).

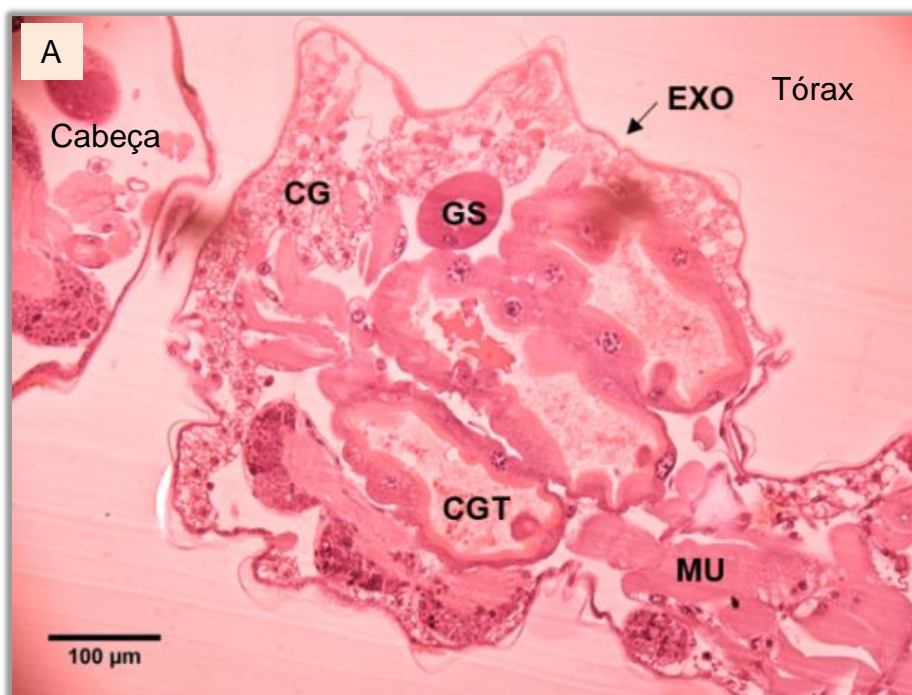




Figura 15 – Cortes evidenciando os cecos gástricos. Coloração: HE. (A) Corte superficial com três cecos gástricos aparentes, impossibilitando a observação de outras estruturas do intestino anterior ou médio. A: 200X. (B) Células epiteliais do ceco gástrico mostrando a borda em escova. A: 1000X. BE (borda em escova), CE (célula epitelial), EXO (exoesqueleto), CG (corpo gorduroso), CGT (cecos gástricos), GS (glândula salivar), ES (esôfago), IM (intestino médio), MU (músculo), N (núcleo).

A borda em escova é formada por microvilosidades que ajudam na absorção dos nutrientes e se apresenta acidófila, sendo corada pela eosina. Entretanto, as células epiteliais também atuam na secreção de substâncias.

O epitélio do intestino médio é composto de uma camada simples de células cúbicas a cilíndricas, uniforme, retangular e evidenciando a borda em escova. As células de regeneração aparecem na base do tecido de forma intercalada às células epiteliais e são, na maioria das vezes, de fácil visualização (Figura 16). Os núcleos são centrais e globulares e o citoplasma pode variar de liso a heterogêneo ou granular, com regiões basófilas (Figura 17).

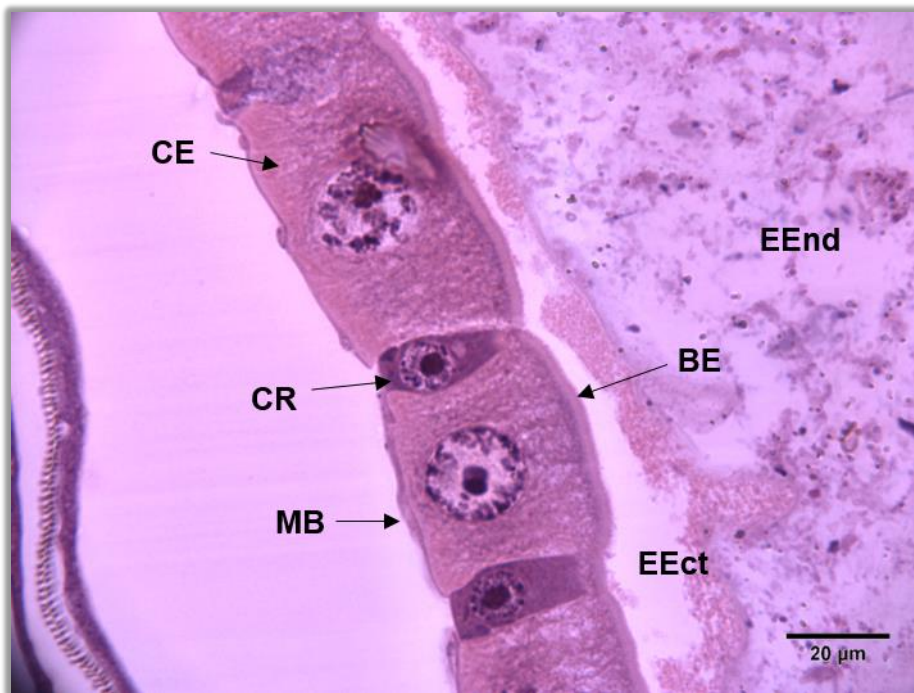


Figura 16 – Corte da região mediana do intestino médio, mostrando uma camada simples de células epiteliais cúbicas com células regenerativas intercaladas. A: 1000X, corado em HE. BE (borda em escova), CE (célula epitelial), CR (célula de regeneração), EEct (espaço ectoperitrófico), EEnd (espaço endoperitrófico), MB (membrana basal).

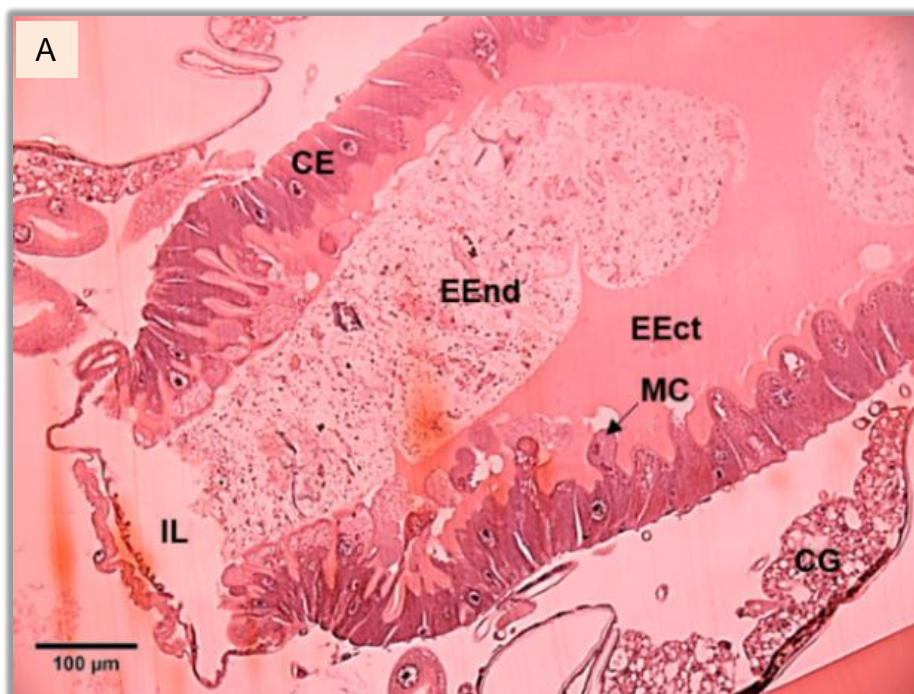


Figura 17 – Tecido epitelial mostrando células cúbicas a colunares, com núcleos centrais e citoplasma liso a heterogêneo. Coloração: HE. A: 1000X. BE (borda em escova), CR (célula de regeneração), EEct (espaço ectoperitrófico), EEnd (espaço endoperitrófico), MB (membrana basal).

Foi observada pequena variação na coloração do citoplasma celular, onde abaixo das vilosidades há tonalidades mais basófilas tornando-se mais acidófilas ao centro da célula. Esta variação denota atividade metabólica intensa. O nucléolo aparece bem marcado e o núcleo é sempre granular. Algumas células parecem apresentar estes grânulos mais periféricos.

Algumas larvas apresentaram maior número de células de regeneração e uma forma menos regular em todas as regiões do epitélio do intestino, muitas vezes com alta quantidade de vesículas que se lançam para o lúmen deixando-o cheio de material celular (Figura 18). A intensa atividade secretora é comum na porção posterior do intestino médio, entretanto em duas amostras esta atividade se mostrou intensa mesmo nas porções médias e anterior do intestino médio. Este padrão pode estar relacionado à proximidade de ecdise da amostra, o que é difícil identificar visualmente no momento da coleta.

Christophers (1960) e O'Brien (1966) já descreviam a diferença morfológica dos tecidos de acordo com a idade da larva, onde aquelas mais próximas à pupação apresentam um tecido epitelial menos homogêneo.



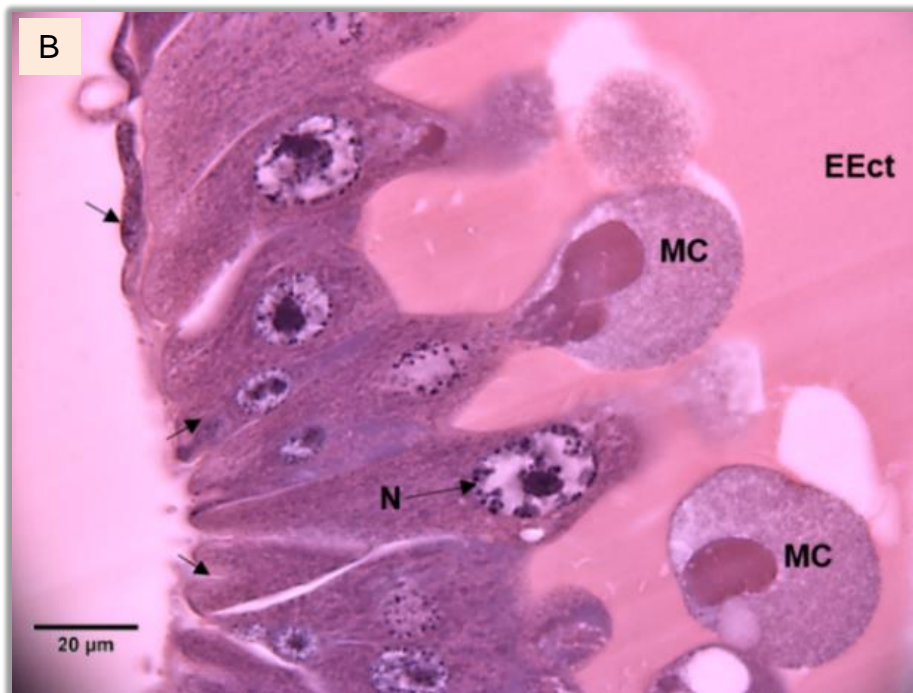


Figura 18 – Células epiteliais lançando secreção para o lúmen, na região do intestino médio posterior. Coloração: HE. (A) Aparência do tecido epitelial com alta atividade secretora, onde o tecido fica aparentemente menos padronizado. A: 200X (B) Detalhe das células epiteliais em atividade secretora apócrina. A: 1000X. CE (célula epitelial), CG (corpo gorduroso), EEct (espaço ectoperitrófico), EEnd (espaço endoperitrófico), IL (íleo), MC (material celular), N (núcleo), setas (células de regeneração).

A atividade secretora pode ser do tipo apócrina ou holócrina, mas sua diferenciação não é facilmente visível nos cortes. Entretanto, toda ação secretora causa alguma lesão celular, devendo ser observada com muita cautela.

Segundo Clements (1963) as células epiteliais não fazem mitose e sua substituição e crescimento do tecido é feito pela diferenciação de células embrionárias. Estas células são incapazes de desenvolver órgãos em adultos, diferentemente daqueles órgãos que possuem crescimento histológico por multiplicação celular, como o sistema nervoso e o corpo gorduroso. Desta forma, é necessário que a larva elimine os tecidos que não farão parte do imago.

A atividade secretora e consequente anatomia celular se refere às enzimas digestivas provenientes das próprias células epiteliais, visto que os mosquitos não possuem células especializadas para tal, como em outros insetos. Não foi identificado nenhum tipo de células caliciformes nas amostras, confirmando a descrição de Corena et al. (2002) durante estudos realizados sobre a anidrase carbônica no intestino médio de larvas de *Ae. aegypti*. Shahabuddin & Pimenta (1998) buscaram pela presença deste tipo celular, entretanto também afirmam sua ausência em mosquitos.

Os cortes tangenciais ou aqueles superficiais/profundos mostraram um tecido epitelial com aparência poligonal. Muitas vezes pode haver confusão na observação, pois o tecido em corte tangencial pode sugerir desorganização celular ou parecer estratificado se não for avaliada a sequência completa dos cortes (Figura 19).

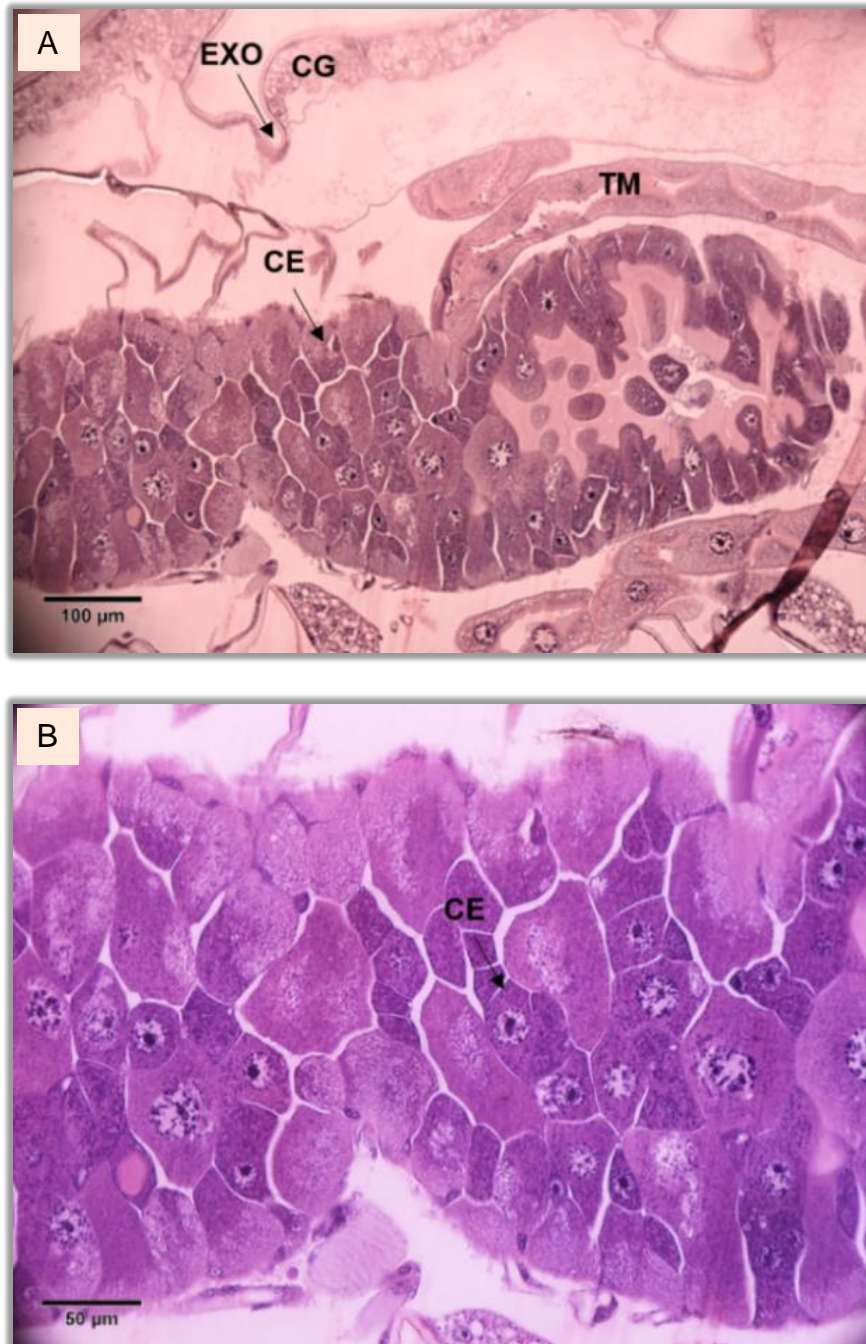


Figura 19 – corte tangencial na região de transição entre o intestino médio e intestino posterior, na inserção dos túbulos de Malpighi. Coloração: HE. (A) Aparência geral do tecido com corte tangenciado, mostrando claramente uma porção em corte superficial. A: 200X. (B) Detalhe das células mostrando uma aparência poligonal do tecido. A: 400X. CE (células epiteliais), CG (corpo gorduroso), EXO (exoesqueleto), TM (túbulos de Malpighi).

À medida que o tecido se aproxima do intestino posterior vai ocorrendo uma clara mudança histológica. Mesmo nas amostras que apresentaram padrão bem definido de tecido epitelial no intestino médio, entre os segmentos V e VI as células apresentaram atividade secretora mais intensa e, por consequência, as mesmas parecem não seguir um padrão morfológico.

A região de transição entre o mesêntero e proctodeu se mostrou contrastante, visto que há uma mudança abrupta do tecido epitelial (Figura 20). Nesta região estão a câmara pilórica (ou piloro), as inserções dos cinco túbulos de Malpighi e o início do íleo, que encaminhará o alimento até o cólon e finalmente ao ânus.

O proctodeu volta a apresentar uma camada simples de células epiteliais cúbicas a colunares e irregulares, mas esta região não é facilmente visualizada, pois a altura de corte parece ser diferente das demais regiões. Segundo Nation (2008) a união celular desta região é feita por desmossomos septados que conectam as bordas das células e servem como uma barreira para fluidos e moléculas que poderiam passar entre as células adjacentes.

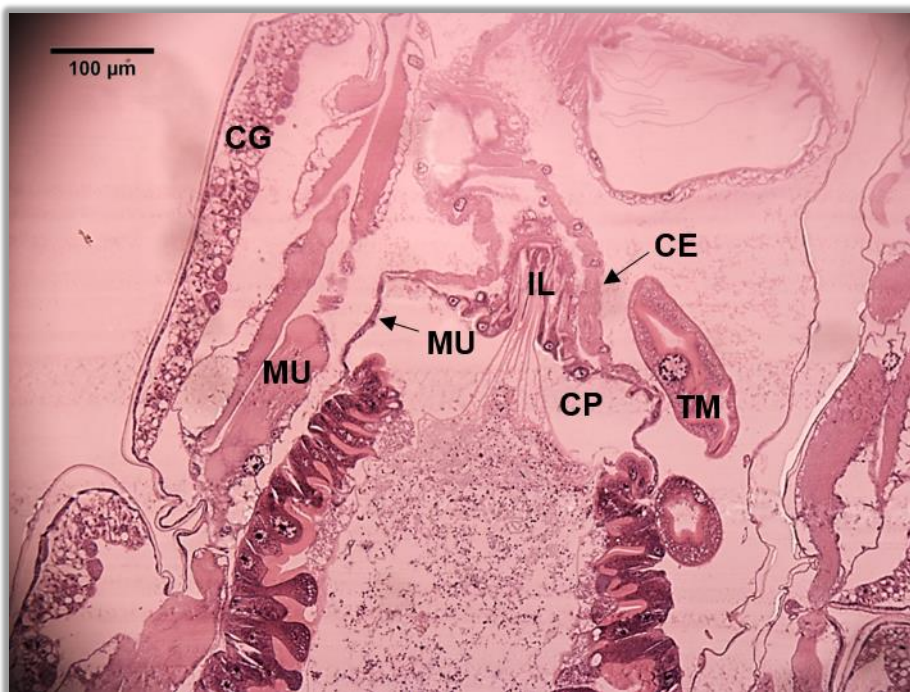


Figura 20 – transição entre mesêntero e proctodeu, onde o tecido epitelial passa por uma mudança abrupta de morfologia. A: 200X. Coloração: HE. CE (Célula epitelial), CG (corpo gorduroso), CP (câmara pilórica ou piloro), IL (íleo), MU (músculo), TM (túbulos de Malpighi).

A Figura 21 apresenta o tecido epitelial de diferentes amostras e a Figura 22 mostra diferentes alturas de corte de uma mesma larva, evidenciando a importância dos cortes sequenciais para definir a morfo-histologia do tecido epitelial.

6.2 Histoquímica do intestino médio de larvas

A caracterização histoquímica mostrou reação positiva para os testes de lipídios ácidos, proteínas totais, polissacarídeos e metacromasia azul/roxo, mas foi negativo para o vermelho da metacromasia e lipídios neutros.

As reações de PAS evidenciaram grânulos de polissacarídeos distribuídos em praticamente todos os tecidos. Chama-se a atenção a alta concentração destes grânulos nos tecidos musculares e corpo gorduroso, de forma a causar certo enegrecimento das regiões (Figuras 23, 24 e 25). As células epiteliais que se encontravam em processo de liberação secretiva apresentaram uma concentração maior destes grânulos nas suas zonas apicais.

Segundo Clements (1963), o principal órgão de armazenamento é o corpo gorduroso, cujo citoplasma armazena glóbulos de lipídios e proteínas no seu interior, assim como vacúolos de glicogênio na periferia da célula. O sarcoplasma muscular também é um tecido de reserva de glicogênio, que também pode ser encontrado nas células dos cecos gástricos, intestino médio posterior e sistema nervoso (Clements, 1963; Wiatt, 1967).

Wigglesworth (1942) também indica que as proteínas são armazenadas nos músculos e em células dos cecos gástricos. Gorduras são estocadas no corpo gorduroso mas podem ser encontradas nas células dos cecos gástricos e na metade anterior do intestino médio.

Desta forma, os grânulos evidenciados pela reação de PAS podem indicar a presença de glicogênio, que é um polissacarídeo de reserva energética.

As células do proventrículo foram coradas por todas as técnicas de histoquímica aplicadas, sendo o azul do Nilo o corante mais fracamente positivo. Na Figura 23 é possível comparar a reação forte para lipídios ocorrida no material alimentar do intestino médio, com a reação fraca nas células. Também é possível comparar com a reação junto ao corpo gorduroso, órgão de armazenamento lipídico.

As membranas do proventrículo foram evidenciadas pelo corante azul de bromofenol e pelo PAS, que também mostrou reservas de glicogênio na estrutura. Na base das células da cárdia aparece um espessamento quitinoso e o azul do Nilo

mostra que na mesma região pode haver maior concentração lipídica.

A Membrana peritrófica ao longo do intestino médio foi evidenciada apenas pela coloração de PAS, provavelmente devido à sua natureza quitinosa. Edwards & Jacobs-Lorena (2000) indicam que esta estrutura é composta por quitina, glicosaminoglicanos e proteínas, entretanto a coloração de azul bromofenol marcou fracamente sua presença (Figura 24).

A quitina é o polissacarídeo estrutural dos insetos, podendo ser encontrado no exoesqueleto e na membrana peritrófica em grande quantidade (Chapman, 1998; Edwards & Jacobs-Lorena, 2000).

As células epiteliais do intestino mostraram muitos grânulos de glicogênio e parece haver alternância entre células ricas e pobres dos grânulos.

A secreção mostrou composição rica em proteínas e polissacarídeos, contendo menor quantidade de lipídeos. O espaço ectoperitrófico apresentou conteúdo proteico livre, mas não foi possível determinar se sua origem é epitelial ou proveniente do espaço endoperitrófico.

A borda em escova e a membrana basal ficaram evidentes nas reações de PAS, enquanto o azul de bromofenol marcou apenas as microvilosidades. O azul do Nilo não indicou origem lipídica nestas estruturas (Figuras 25, 26 e 27).

O corante azul de toluidina não apresentou metacromasia vermelha em nenhuma estrutura, mas foi possível observar variação de cor entre as estruturas internas e o tegumento. As estruturas foram coradas em tons de roxo ou violeta, enquanto o exoesqueleto permaneceu em tons de azul claro (Figura 27). O tegumento da larva, ou cutícula, é composta de algumas proteínas e possui uma cobertura externa não quitinosa, chamada epicutícula (Chapman, 1998).

Este estudo possibilitou um melhor entendimento sobre diferenças celulares que ocorrem em todo o trajeto intestinal de uma larva sadia de *Ae. aegypti*. Baseando-se neste estudo, será possível fazer comparações entre estas larvas e aquelas testadas com diferentes tipos de produtos químicos ou biológicos com vistas ao controle larvário desses mosquitos.

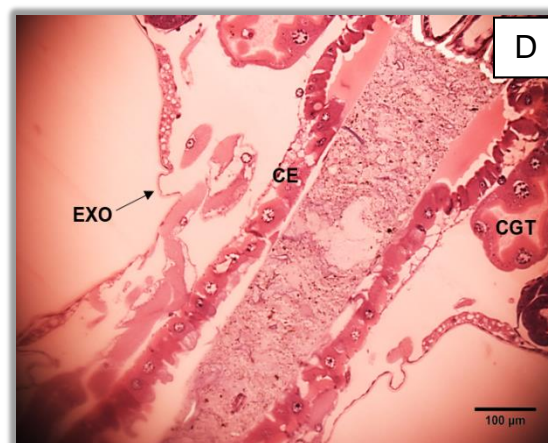
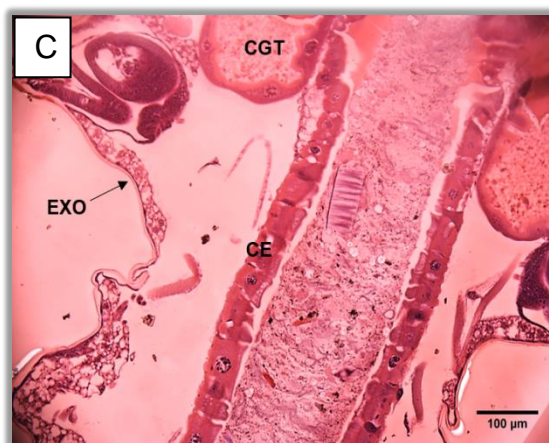
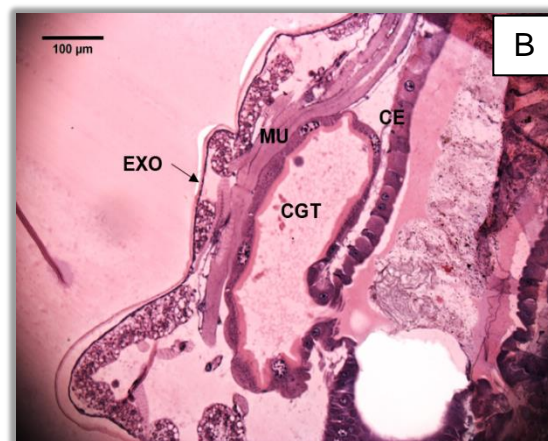


Figura 21 – O tecido epitelial das larvas segue o padrão de se apresentar simples, com células cúbicas e moderada acidofilia. Entretanto não é homogêneo quanto ao aspecto, podendo ou não apresentar células em atividade secretora. A: 200X. Coloração: HE. (A) Tecido epitelial parece estar mais homogêneo em uma das laterais. (B) Tecido bastante homogêneo e ligação clara entre o ceco gástrico e o espaço ectoperitrófico. (C) Tecido com atividade secretora clara em ambos lados. (D) Células mostrando muitos vacúolos e falhas. EXO (exoesqueleto), CGT (ceco gástrico), CE (célula epitelial), MU (músculo).

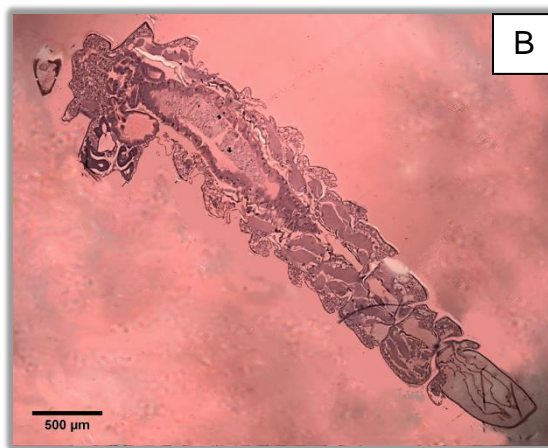


Figura 22 – Evolução de corte de uma mesma amostra, mostrando as diversas formas dos tecidos, principalmente epitelial, de acordo com a profundidade do corte. A: 40X. Coloração: HE. Em todas as imagens a cabeça está voltada para a esquerda, seguida do tórax e abdômen à direita. (A) corte mais superficial evidenciando muito tecido muscular e uma área pequena do intestino médio dos segmentos I a IV com lúmen aparente e segmento V com tangência. (B) corte evidenciando o intestino médio dos segmentos I a IV com lúmen aparente e segmento V com menor tangência que a anterior. (C) corte evidenciando o intestino médio dos segmentos I a V, com tangência próximo ao segmento VI. (D) Idem anterior, mas com menor próximo ao segmento VI. (E) O tecido epitelial já está aparente até o segmento VII, com pequena tangência final. (F) Todo o intestino médio aparente.

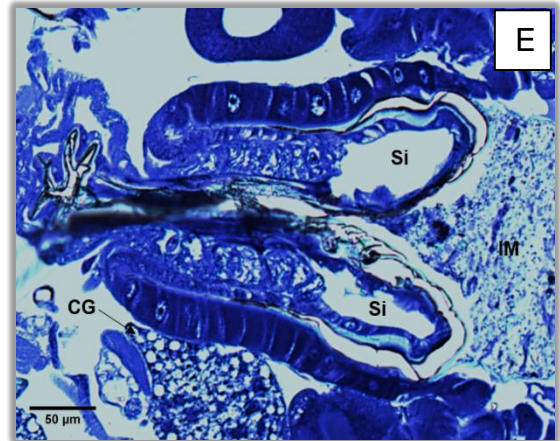
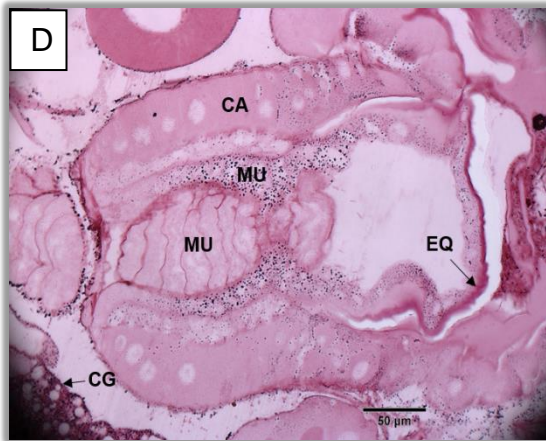
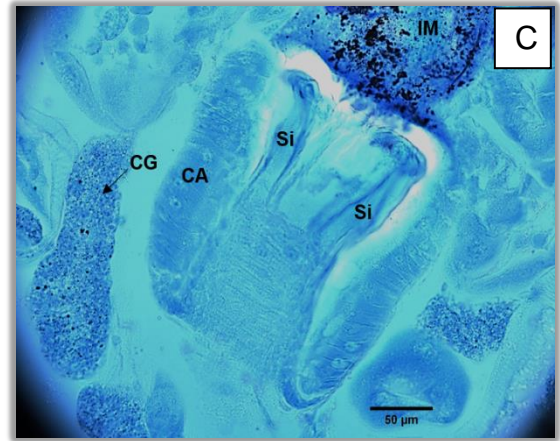
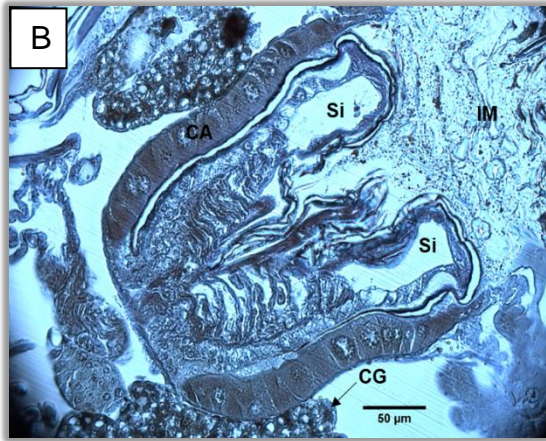


Figura 23 – Histoquímica do proventrículo. A: 400X. (A) Morfologia do proventrículo corado em HE, mostrando claramente suas estruturas. No centro pode ser identificado o final do esôfago e sua invaginação para formar a estrutura. Além da invaginação também possui um tecido epitelial denominado cárdia, tecidos musculares ao centro e sinus, por onde circula hemolinfa. (B) Proventrículo corado com azul bromofenol, mostrando a natureza proteica da estrutura. (C) Coloração azul do Nilo, evidenciando a natureza lipídica mais intensa no corpo gorduroso e no alimento encontrado no lúmen do intestino médio. (D) Coloração de PAS que evidencia os polissacarídeos das camadas quitinosas e de membrana. Nota-se um espessamento quitinoso na base dos sinus e o músculo lateral apresenta bastante acúmulo de glicogênio. (E) Coloração azul de toluidina, sem presença de metacromasia. CA (cárdia), CG (corpo gorduroso), EQ (espessamento quitinoso), IM (intestino médio), MU (músculo), Si (sinus).

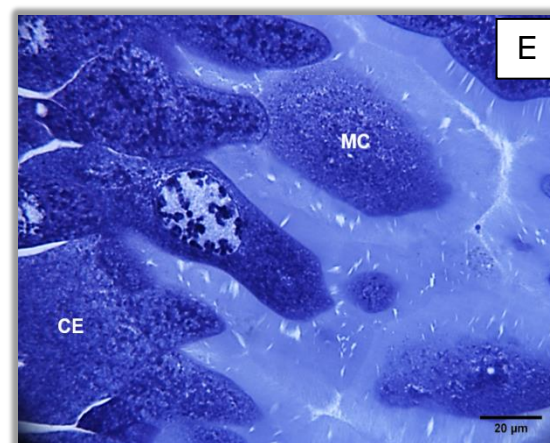
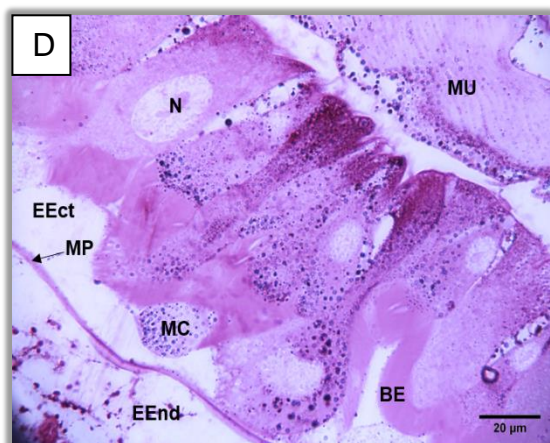
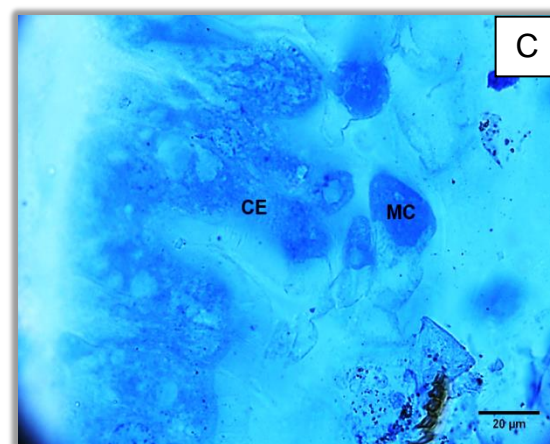
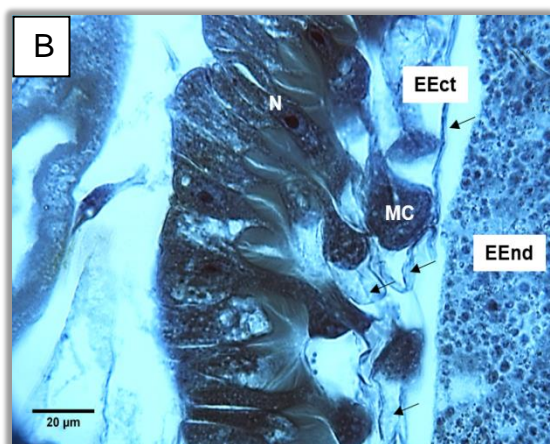
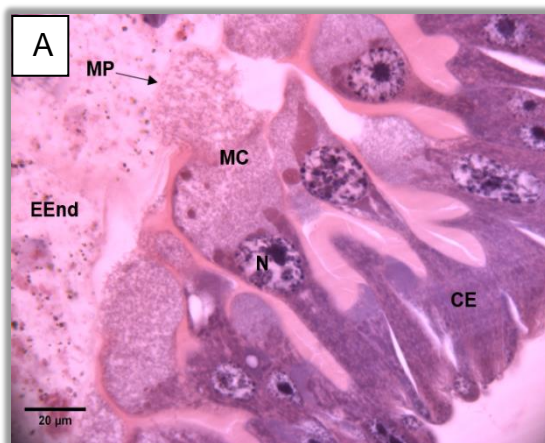


Figura 24 – Histoquímica das células epiteliais do intestino médio posterior, mostrando material celular secretado. A: 1000X. (A) Coloração HE evidenciando secreção apócrina. (B) Coloração azul bromofenol evidenciando a natureza proteica da secreção, provavelmente pela natureza enzimática dos produtos digestivos. (C) Coloração azul do Nilo revela a presença de lipídios ácidos em todas as estruturas das células, não tendo marcado a presença de lipídios neutros. (D) Coloração PAS evidenciando acúmulo de polissacarídeos, provavelmente glicogênio. (E) Coloração azul de toluidina não marcou metacromasia. BE (borda em escova), CE (Célula epitelial), EEnd (espaço endoperitrófico), EEct (espaço ectoperitrófico), MC (material celular), MP (membrana peritrófica), MU (músculo), N (núcleo), setas (substâncias proteicas).

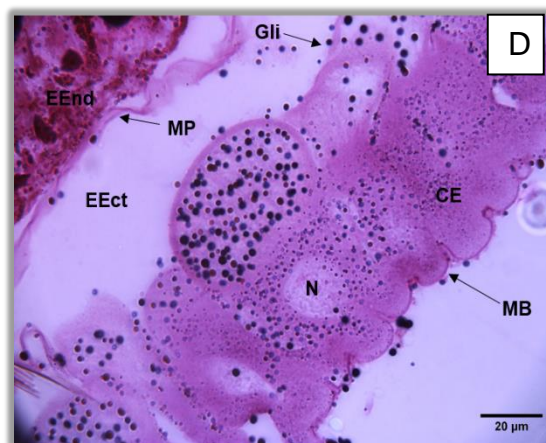
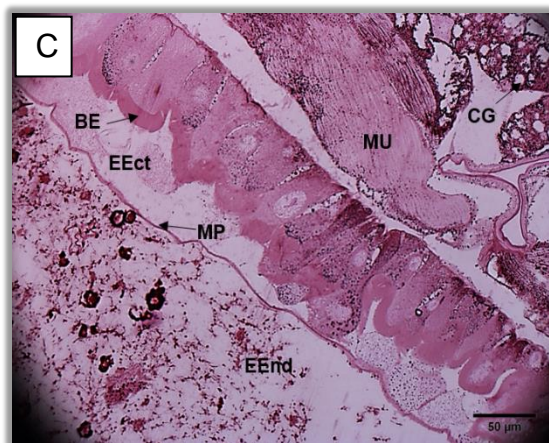
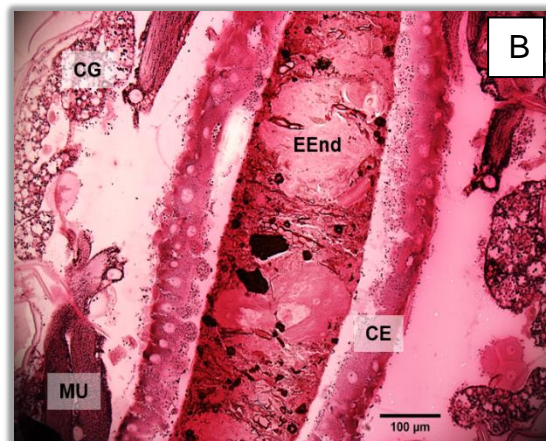
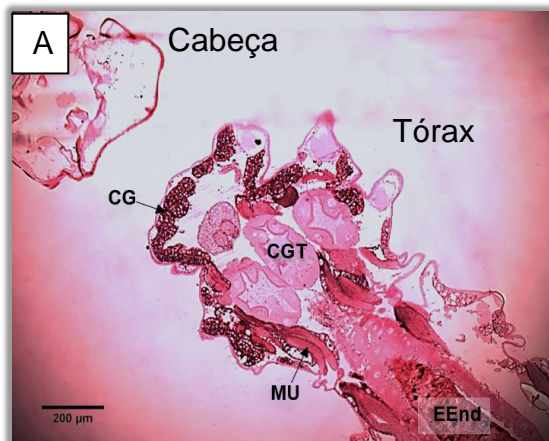


Figura 25 – Intestino médio PAS positivo. (A) Visão geral da região do intestino médio anterior, mostrando o corpo gorduroso e os músculos altamente positivos para o PAS, com regiões enegrecidas pela presença provável de glicogênio. A: 100X. (B) Porção do intestino médio médio evidenciando os grânulos de glicogênio em algumas estruturas. A: 200X. (C) Porção do intestino médio posterior. A: 400X. (D) Detalhe das células epiteliais do intestino médio médio, com grânulos de polissacarídeos bem evidente. A: 1000X. BE (borda em escova), CE (célula epitelial), CG (corpo gorduroso), CGT (ceco gástrico), Eect (Espaço ectoperitrófico), Eend (Espaço endoperitrófico), Gli (grânulos de glicogênio), MB (membrana basal), MP (membrana peritrófica), MU (músculo), N (núcleo).

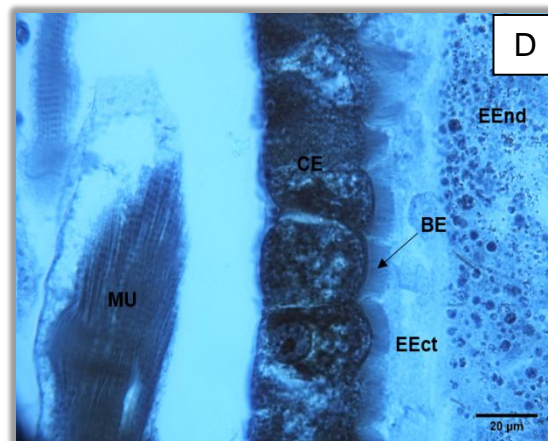
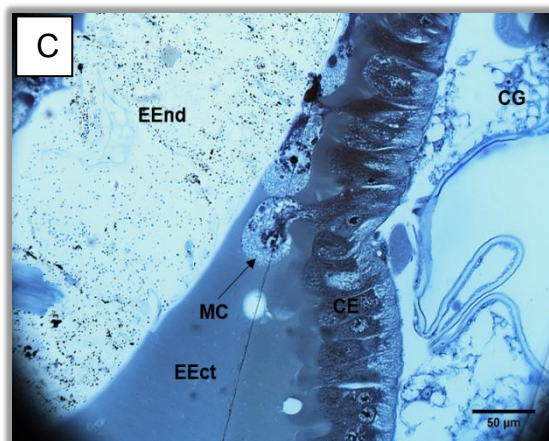
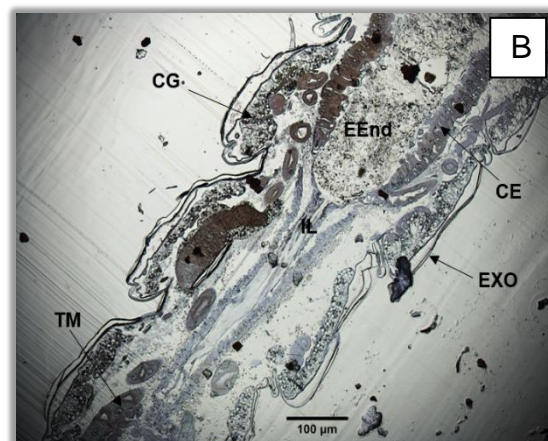
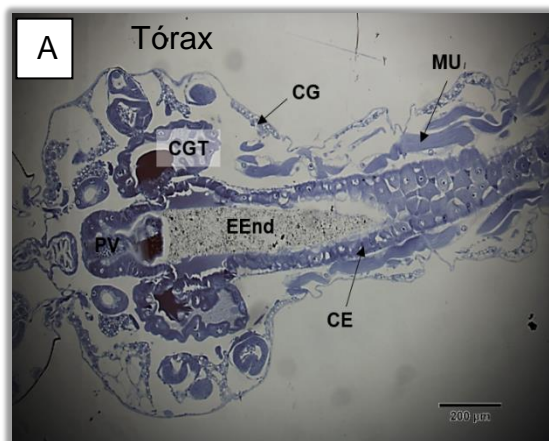


Figura 26 – Intestino médio e posterior corados com azul de bromofenol. (A) Intestino médio anterior e médio médio mostrando a presença de proteínas em todas as células. O conteúdo endoperitrófico se mostrou com baixos níveis proteicos. A: 100X. (B) Final do intestino médio posterior e início do intestino posterior, bem marcados pelas proteínas presentes nas células epiteliais. A: 200X. (C) Intestino médio posterior evidenciando a secreção holócrina com pequenas quantidades de proteínas totais para o meio ectoperitrófico. A: 400X. (D) Células epiteliais do intestino médio mostrando riqueza proteica. A: 1000X. BE (borda em escova), CE (célula epitelial), CG (corpo gorduroso), CGT (ceco gástrico), Eect (Espaço ectoperitrófico), Eend (Espaço endoperitrófico), MC (material celular), PV (proventrículo), MU (músculo), TM (túbulos de Malpighi).

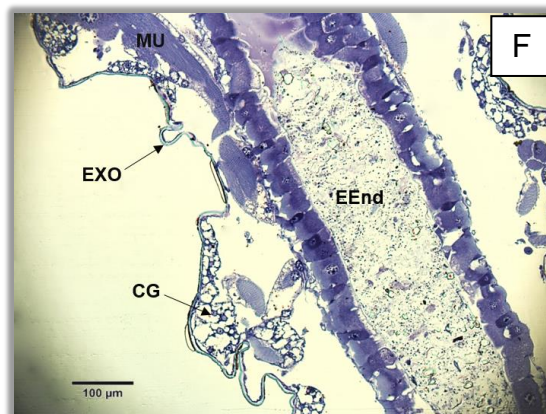
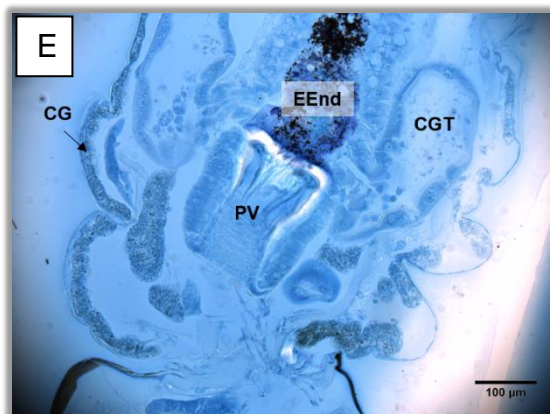
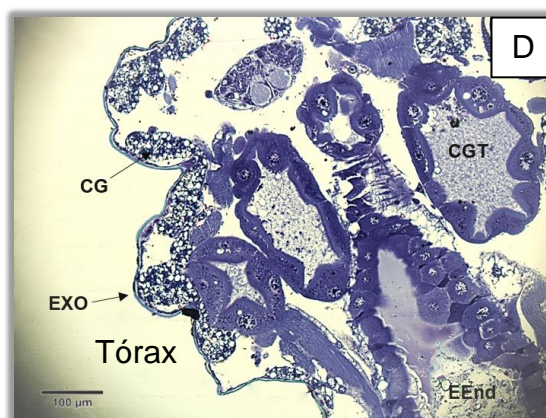
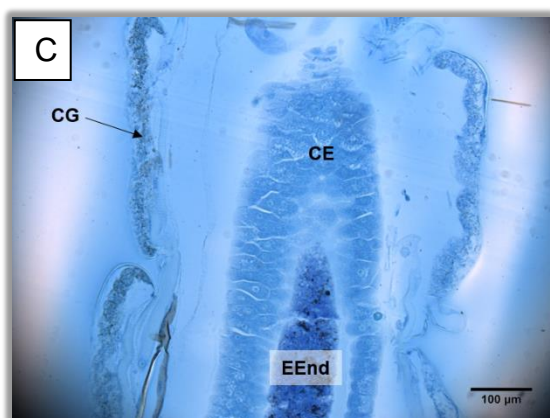
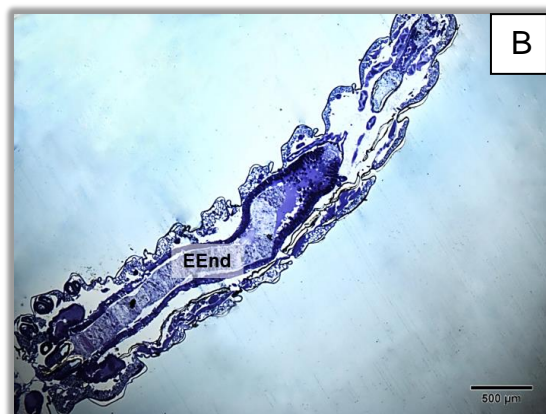
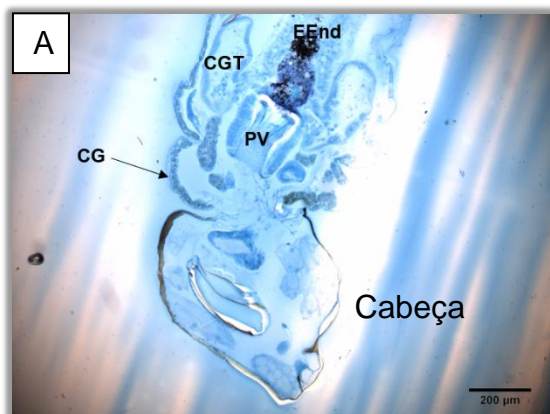


Figura 27 – Histoquímica do sistema digestório de larvas de *Aedes aegypti*. (A) Intestino anterior e médio corados com azul do Nilo, evidenciando lipídios no corpo gorduroso e no alimento que se encontra no espaço endoperitrófico. A: 100X. (B) Larva corada com azul de toluidina. A: 40X. (C) e (E) Amostras coradas com azul do Nilo. A: 200X. (D) e (F) Intestinos anterior médio anterior corados com azul de toluidina. A: 200X. CE (célula epitelial), CG (corpo gorduroso), CGT (ceco gástrico), Eend (espaço endoperitrófico), EXO (exoesqueleto), PV (proventrículo).

7. CONCLUSÃO

As técnicas de processamento e corte aplicadas foram satisfatórias evidenciando características importantes para a avaliação morfológica e histoquímica dos tecidos. Desta forma, é possível aplica-las para analisar danos histológicos de qualquer natureza, inclusive aqueles decorrentes do uso de larvicidas, tanto químicos quanto biológicos.

Apesar do maior custo na aquisição da historesina e navalhas, quando comparado a outros materiais utilizados no processamento histológico como a parafina, o método se mostrou vantajoso por apresentar pouca perda de material, não utilizar produtos tóxicos e nem exigir variações térmicas durante o processamento. Entretanto, salienta-se a exigência do controle de umidade atmosférica que, quando alta durante a microtomia, acaba por enrugando os cortes inviabilizando seu uso. Além disto, blocos muito tempo fora de estufa ficam macios e dificultam a microtomia.

Com relação ao esforço laboratorial relacionado às amostras utilizadas, estima-se que foram gastos em torno de 30 horas para preparo do material, incluindo desidratação e todas as etapas de processamento, além de 60 horas para microtomia e 20 horas para coloração. Estas estimativas não incluem testes ou amostras descartadas.

Os tecidos do sistema digestório sofrem mudanças morfológicas ao longo do corpo da larva. Por este motivo, a indicação do segmento analisado é importante para que sejam comparados tecidos com as mesmas características.

Da mesma forma, avaliações nas mudanças histológicas sempre devem considerar a sequência dos cortes em alturas diferentes. Assim, é possível acompanhar as estruturas e eliminar dúvidas quanto a aspectos morfológicos e histoquímicos, eliminando falhas e interferências decorrentes dos métodos aplicados em todas as fases do processamento do material. Seis cortes de uma mesma larva são suficientes para as análises, desde que contemplem profundidades diferentes.

Quanto aos intestinos anterior, médio e posterior, fica evidenciado que é extremamente difícil realizar a observação de todas as estruturas no mesmo corte. Mais um fator que reforça a necessidade de apresentar diferentes alturas de corte nas pesquisas.

As larvas de 4º instar não são recomendadas para testes de danos, pois este estágio passa por alterações normais do epitélio devido à proximidade de

empupação. Larvas de 3º instar são indicadas por possuírem tamanho suficiente para sua manipulação durante o processamento, além de sua atividade fisiológica e estabilidade histológica.

As colorações mais significantes foram o PAS e o azul de bromofenol, pois mostraram com clareza a natureza proteica e polissarídica das estruturas internas das larvas.

Para a indicação de lipídios o corante Azul do Nilo não apresentou clareza suficiente para assegurar uma análise correta das naturezas lipídicas das estruturas. Além disso, a técnica exige controle de temperatura do corante, o que dificulta a aplicação da técnica. Podem ser testados outros corantes, como o Sudan black, e comparados os resultados para avaliar possíveis interferências da aplicação dos métodos.

As técnicas histoquímicas aplicadas não foram suficientes para determinar se as substâncias estavam sendo secretadas ou absorvidas, tampouco definir especificidades bioquímicas. É necessário aprofundar o conhecimento acerca destas substâncias a fim de testar se o padrão histoquímico poderia ser utilizado na avaliação de alterações decorrentes de larvicidas.

Este trabalho possibilitou analisar de forma mais crítica diversas pesquisas realizadas com o uso de larvicidas alternativos e suas consequências nos tecidos das larvas. Com os resultados obtidos, surge a necessidade de novas pesquisas na área da histologia, incluindo outros ângulos de corte, uso de amostras selvagens e aplicação de outros corantes.

Com foco nas pesquisas de larvicidas para controle do *Ae. aegypti*, surge também a necessidade de bibliografias que apresentem melhor os aspectos dos tecidos sadios e suas variações, não apenas do sistema digestório, mas de todos os órgãos. Desta forma, poderiam ser realizados, por exemplo, estudos mais aprofundados de rotas microbiológicas no interior de larvas e adultos.

8. REFERÊNCIAS

- Abed RA, Cavasin GM, da Silva HHG, Geris R, da Silva IG. 2007. Alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) causadas pela atividade larvicida do óleo-resina da planta medicinal *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae). *Revista de Patologia Tropical*. 36(1):75-86.
- Alves SN, Serrão JE, Mocelin G, Melo AL. 2004. Ivermectin effects on the life cycle and larval fat body of *Culex quinquefasciatus*. *Braz. Arch. Biol. Tech*. 47(3):433–499.
- Arruda W, Oliveira GMC, Silva IG. 2003. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 36(1):17-25.
- Bailey CH, Gordon R. 1973. Histopathology of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae parasitized by *Reesimermis nielsenii* (Nematoda: Mermithidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 22(3):435-441.
- Barreto CF, Cavasin GM, Silva HHG, Silva IG. 2006. Estudo das alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* (DIPTERA, CULICIDAE) submetidas ao extrato bruto etanólico de *Sapindus saponaria* Lin (SAPINDACEAE). *Revista de Patologia Tropical*. 35(1):37-57.
- Barth R. 1953. Métodos de trabalho na anatomia e histologia de insetos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 51:95-139.
- Blair CD, Adelman ZN, Olson KE. 2000. Molecular strategies for interrupting arthropod-borne virus transmission by mosquitoes. *Clin Microbiol Rev*. 13(4):651-661.
- Braga IA, Valle D. 2007. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. *Epidemiol. Serv. Saúde*. 16(4):295-302.
- Braga IA, Valle D. 2007a. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 16(2):113-118.
- Bravo A, Gill SS, Soberón M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4):423-435.
- Brasil, Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde. 2001. **Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas**. Brasília. 3. ed.
- Brasil, Ministério da Saúde. 2010. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: guia de bolso**. Brasília: Ministério da Saúde. 8 ed. 444 p.

- Brasil, Ministério da Saúde. 2015a. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/zika>>, acessado em 17/12/2015.
- Brasil, Ministério da Saúde. 2015b. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/21019-ministerio-da-saude-divulga-novos-dados-de-microcefalia>>, acessado em 18/12/2015.
- Brasil, Ministério da Saúde. 2016. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2015. Boletim Epidemiológico 47(3):10p. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/15/svs2016-be003-dengue-se52.pdf>>, acessado em 28/01/2016.
- Brasil, Ministério da Saúde. 2016a. Protocolo de vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia relacionada à infecção pelo vírus zika. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/dezembro/09/Microcefalia--Protocolo-de-vigil--ncia-e-resposta---vers--o-1----09dez2015-8h.pdf>>, acessado em 19/02/2016.
- Cain AJ. 1947. The Use of Nile Blue in the Examination of Lipoids. *Quarter. J. Microsc. Sci.* 88:383-392.
- Cardoso CW, Paploski IAD, Kikuti M, Rodrigues MS, Silva MMO, Campos GS, Sardi SI, Kitron U, Reis MG, Ribeiro GS. 2015. Outbreak of acute exanthematous illness associated with Zika, chikungunya, and dengue viruses, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 21(12): 2274-2276.
- Cardoso JC, Corseuil E, Barata JMS. 2005. Culicinae (Diptera, Culicidae) ocorrentes no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev. Bras. entomol.* 49(2):275-287.
- Carvalho DO, Nimmo D, Naish N, McKemey AR, Gray P, Wilke ABB, Marrelli MT, Virginio JF, Alpey L, Capurro ML. 2014. Mass Production of Genetically Modified *Aedes aegypti* for Field Releases in Brazil. *Journal of Visualized Experiments* 83(e3579): 1-10.
- Cavados CFG, Majerowicz S, Chaves JQ, Araújo-Coutinho CJPC, Rabinovitch L. 2004. Histopathological and Ultrastructural Effects of δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* Serovar *israelensis* in the Midgut of *Simulium pertinax* Larvae (Diptera, Simuliidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 99(5):493-498.
- Chapman RF. 1998. **The Insects: Structure and Function.** New York: Cambridge University Press, 4th edition.
- Christophers SR. 1960. ***Aedes aegypti*. The yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure.** London: Cambridge University Press. 738 pp.

- Clements AN. 1963. **The Physiology of Mosquitoes**. London: Pergamon Press.
- Clements AN. 2012. **The Biology of Mosquitoes**. Cambridge: Cambridge University Press.
- Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. 1998. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ.
- Corena MP, Seron TJ, Lehman HK, Ochrietor JD, Kohn A, Tu C, Linser PJ. 2002. Carbonic anhydrase in the midgut of larval *Aedes aegypti*: cloning, localization and inhibition. *The Journal of Experimental Biology* 205:591–602.
- Cruz LL, Sperb AF, Bercini M. 2010. Vigilância Entomológica da Dengue no Rio Grande do Sul. *Boletim Epidemiológico*. 12(3-4):5-8.
- Edwards MJ, Jacobs-Lorena M. 2000. Permeability and disruption of the peritrophic matrix and caecal membrane from *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* mosquito larvae. *Journal of Insect Physiology*. 46(9):1313–1320.
- Eiras AE. 2005. **Culicidae**. In: Neves DP (Ed). *Parasitologia Humana*. Rio de Janeiro: Atheneu, 11^a edition: 355-367.
- Ferreira KV, Rocha KC, Caputto LZ, Fonseca ALA, Fonseca FLAF. 2011. Histórico da febre amarela no Brasil e a importância da vacinação anti-amarela. *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde*. 36(1):40-47.
- Figueiredo LTM. 2000. The Brazilian flaviviruses. *Microbes Infect*. 2(13):1643-1649.
- Figueiredo LTM. 2007. Emergent arboviruses in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 40(2):224-229.
- Figueiredo ACS, Barroso JMG, Pedro LMG, Ascensão L. 2007. *Histoquímica e citoquímica em plantas: princípios e protocolos*. Lisboa: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Centro de Biotecnologia Vegetal:
- FIOCRUZ – Instituto Oswaldo Cruz. 2014. Dengue vírus e vetor. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/oportunista.html>, acessado em 26/09/2014.
- FIOCRUZ - Instituto Oswaldo Cruz. 2015. Zika pode estar associada ao aumento de casos da Síndrome de Guillain-Barré. Disponível em: <<http://portal.fiocruz.br/pt-br/content/zika-pode-estar-associada-ao-aumento-no-numero-de-casos-da-sindrome-de-guillain-barre>>, acessado em 28/12/2015.
- FIOCRUZ - Instituto Oswaldo Cruz. 2016. Fiocruz inicia estudo com mosquitos que podem reduzir a transmissão da dengue. Disponível em: <[http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=2178&query=simple&search%5Fby%5Fauthorname=all&search%5Fby%5Ffield=tax&search%](http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=2178&query=simple&search%5Fby%5Fauthorname=all&search%5Fby%5Ffield=tax&search%5F)

5Fby%5Fkeywords=any&search%5Fby%5Fpriority=all&search%5Fby%5Fsection=all&search%5Fby%5Fstate=all&search%5Ftext%5Foptions=all&sid=32&site=fio&text=wolbachia>, acessado em 24/02/2016.

- Forattini OP. 2002. **Aedes (Stegomyia)**. In: Forattini OP. Culicidologia Médica. São Paulo: EDUSP, vol. 2, Cap. 14: 453-491.
- Franz AWE, Kantor AM, Passarelli AL, Clem RJ. 2015. Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses* 7:3741-3767.
- Gaffigan TV, Wilkerson RC, Pecor JE, Stoffer JÁ, Anderson T. 2016. Systematic Catalog of Culicidae Disponível em: <<http://www.mosquitocatalog.org/>>, acessado em 29/04/2016.
- Gomes AC. 1998. Medidas dos níveis de infestação urbana para *Aedes (stegomyia) aegypti* e *Aedes (Stegomyia) albopictus* em programa de Vigilância Entomológica. *Iesus*. 8(3):49-57.
- Gomes AC, de Souza JMP, Bergamaschi DP, dos Santos JL, Andrade VR, Leite OF, Rangel O, de Souza SS, Guimarães NS, de Lima VL. 2005. Anthropophilic activity of *Aedes aegypti* and of *Aedes albopictus* in area under control and surveillance. *Rev Saude Publica*. 39(2):206-210.
- Hayes EB. 2009. Zika Virus Outside Africa. *Emerging Infectious Diseases*. 15(9): 1347-1350.
- INPE – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. 2016. Condições da última semana - Fenômeno El Niño atua com forte intensidade no Oceano Pacífico Equatorial. Disponível em: <<http://enos.cptec.inpe.br/>>, acessado em 25/01/2016.
- Jones JC. 1960. The anatomy and rhythmical activities of the alimentary canal of *Anopheles* larvae. *Ann. Ent. Soe. Amer*. 53(4):459-474.
- Junqueira LC, Carneiro J. 2013. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 12^a Edição.
- Klowden MJ. 2013. **Physiological Systems in Insects**. San Diego: Elsevier Academic Press, 3rd edition. 696 p.
- Kraemer MUG, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQN, Shearer FM, Barker CM, Moore CG, Carvalho RG, Coelho GE, Bortel WV, Hendrickx G, Schaffner F, Elyazar IRF, Teng HJ, Brady OJ, Messina JP, Pigott DM, Scott TW, Smith DL, Wint GRW, Golding N, Hay SI. 2015. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *ELife* 4 (e08347): 18p.
- Lehane M. 2005. **The biology of blood-sucking in insects**. Cambridge University Press, 2nd edition.

- Leite ACCF, Kato MJ, Soares ROA, Guimarães AE, Santos-Mallet JR, Cabral MMO. 2012. Grandisin caused morphological changes larval and toxicity on *Aedes aegypti*. Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn. 22(3):517-521.
- Leroy EM, Nkoghe D, Ollomo B, Nze-Nkogue C, Becquart P, Grard G, Pourrut X, Charrel R, Moureau G, Ndjoyi-Mbiguino A, De-Lamballerie X. 2009. Concurrent Chikungunya and Dengue virus infections during simultaneous outbreaks, Gabon 2007. Emerg Infect Dis. 15(4):591-593.
- Li MI, Wong PSJ, Ng LC, Tan CH. 2012. Oral Susceptibility of Singapore *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus) to Zika Virus. PLOS. 6(8):e1792.
- Lozovei AL. 2005. **Culicídeos (Mosquitos)**. In: Marcondes CB (Ed.). Entomologia Médica e Veterinária. São Paulo: Atheneu.
- Mazia D, Brewer PA, Alfert M. 1953. The Cytochemical Staining and Measurement of Protein with Mercuric Bromphenol Blue. Biological Bulletin 104(1):57-67.
- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2009. Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília/DF. 157 pp.
- Narciso JOA, Soares ROA, Mallet JRS, Guimarães AE, Chaves MCO, Barbosa Filho JM, Maleck M. 2014. Burchellin: study of bioactivity against *Aedes aegypti*. Parasites & Vectors. 7(172):1-10.
- Nation JL. 2008. **Insect physiology and biochemistry**. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis, 2nd edition. 544 p.
- Neves DP. 2005. Diptera. In: Neves DP (Eds). **Parasitologia Humana**. Rio de Janeiro: Atheneu, 11^a Edition: 343-344.
- Normile D. 2013. Tropical medicine. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. Science. 342(6157):415.
- O'brian JF. 1966. Origin and Structural Function of the Basal Cells of the Larval Midgut in the Mosquito, *Aedes aegypti* Linnaeus. Journal of the New York Entomological Society. 74(1):59-63.
- Oliveira CD, Tadei WP, Abdalla FC. 2009. Occurrence of Apocrine Secretion in the Larval Gut Epithelial Cells of *Aedes aegypti* L., *Anopheles albitarsis* Lynch-Arribáizaga and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae): a Defense Strategy Against Infection by *Bacillus sphaericus* Neide? Neotropical Entomology. 38(5):624-631.
- OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. 2013. Epidemiological Alert - Chikungunya Fever. Disponível em <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=23805&Itemid=>, acessado em 03/05/2014.

- OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. 2015. Dengue Control. Disponível em: <<http://www.who.int/denguecontrol/en/>>, acessado em 26/12/2015.
- OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. 2015b. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/>>, acessado em 26/12/2015.
- OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs266/en/>>, acessado em 25/01/2016.
- OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. 2016a. Chikungunya. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/>>, acessado em 19/02/2016.
- OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. 2016b. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>, acessado em 04/02/2016.
- OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. 2016c. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/>>, acessado em 01/05/2016.
- Owuama Cl. 2001. Entomopathogenic symbiotic bactéria, *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* of nematodes. World Journal of Microbiology and Biotechnology 17(5):505-515.
- Oxitec. 2016. Disponível em: <<http://br.oxitec.com/dengue/>>, acessado em 05/03/2016.
- PAHO/CDC. 2011. **Preparedness and Response for Chikungunya Virus: Introduction in the Americas**. Washington, D.C.
- PAHO/WHO. 2015a. ¿Cuándo se detectó el virus Zika por primera vez? Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=109/58&Itemid=41464&lang=en>, acessado em 17/12/2015.
- PAHO/WHO. 2015b. Country and territories with confirmed cases of Zika virus (autochthonous transmission in Americas, 2015). Disponível em: <http://www.paho.org/hq/images/stories/AD/HSD/IR/Viral_Diseases/Zika-Virus/2015-cha-autoch-human-cases-zika-virus-ew-49.jpg>, acessado em 17/12/2015.
- PAHO/WHO. 2016. Chikungunya: Statistic Data. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=5927&Itemid=40931&lang=en>, acessado em 04/02/2016.
- Pape T, Bickel D, Meier R. 2009. **Diptera Diversity: status, challenges and tools**. Brill Academic Publishers: Leiden, Boston.

- Pearse AGE. 1961. **Histochemistry: Theoretical and Applied**. London: J & A Churchill, 2nd edition.
- Pialoux G, Gauzere BA, Jaureguiberry S, Strobel M. 2007. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *Lancet Infect Dis*. 7(5):319–327.
- Powers AM, Logue CH. 2007. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *Journal of General Virology*. 88:2363–2377.
- Reinert JF, Harbach RE, Kitching IJ. 2004. Phylogeny and classification of Aedini (Diptera: Culicidae), based on morphological characters of all life stages. *Zoological Journal of the Linnean Society* 142:289–368.
- Reinert JF. 2009. List of abbreviations for currently valid generic-level taxa in family Culicidae (Diptera). *European Mosquito Bulletin* 27:68-76.
- Ribeiro LMS. 2010. Histopatologia do mesêntero de populações resistente e suscetível de *Plutella Xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) frente a formulações comerciais à base de *Bacillus Thuringiensis* Berliner. In: Ribeiro LMS. 2010. Respostas imunológicas e mecânicas em população suscetível e resistente *Plutella Xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) frente a formulações comerciais à base de *Bacillus Thuringiensis* Berliner. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- Robinson MC. 1955. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical Features. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 49(1):28–32.
- Ross MH, Romrell LJ. 1993. **Histologia: texto e atlas**. São Paulo: Panamericada, 2ª ed.
- Ross RW. 1956. The Newala epidemic. III. The virus; isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *J Hyg*. Vol. 54(2):177-191.
- Rueda LM. 2004. Pictorial Keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with dengue virus transmission. *Zootaxa* 589:1-60.
- Shahabuddin M, Pimenta PFP. 1998. *Plasmodium gallinaceum* preferentially invades vesicular ATPase-expressing cells in *Aedes aegypti* midgut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:3385-3389.
- SES/RS – Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul. 2011. Situação Epidemiológica da Dengue. Disponível em: <http://www1.saude.rs.gov.br/dados/1322135167895Dengue%20Situa%E7%E3o%20Epidemiol%F3gica%20no%20RS%20-%20Marilina%20Bercini.pdf>, acessado em 04/02/2016.

SES/RS – Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul. 2012. Situação Epidemiológica da Dengue no Rio Grande do Sul – 2012. Disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br/upload/1358526617_Casos%20confirmados%20de%20Dengue%20no%20RS,2012%20%20revisado%20Marilina-1.pdf>, acessado em 04/02/2016.

SES/RS – Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul. 2013. Boletim Informativo do PEVAa – Programa Estadual de Vigilância do *Aedes aegypti*. Maio e Junho de 2013. Disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br/upload/1371065838_Boletim%20no%201%20do%20PEVAa%20-%20MAIO%20JUNHO%202013.pdf>, acessado em 04/02/2016.

SES/RS – Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul. 2016. Disponível em: <www.saude.rs.gov.br>, acessado em 30/01/2016.

SES/RS – Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul. 2016a. Informativo Epidemiológico Dengue, Chikungunya e Zika Vírus - Semana Epidemiológica 04 (24/01 a 30/01). Disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br/upload/1454084752_informativo%20epidemiológico%20dengue%20-%2028_01_16.pdf>, acessado em 30/01/2016.

SES/RS – Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul. 2016b. Disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br/upload/1449773694_CENARIOS%20NACIONAL%20E%20ESTADUAL%20MARILINA%20BERCINI.pdf>, acessado em 04/02/2016.

Sridharan G, Shankar AA. 2012. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. J Oral Maxillofac Pathol. 16(2):251–255.

Silva HHG, Silva IG, Lira KS. 1998. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. Rev. Pat. Trop. 27(1):53-63.

Silva VC, Pinheiro NL, Scherer PO, Falcao SS, Ribeiro VR, Mendes RMM, Chagas R, Cardozo-de-Almeida M, dos Santos-Mallet JR. 2008. Histology and ultrastructure of *Aedes albopictus* larval midgut infected with *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. Microsc Res Tech. 71(9):663-668.

Staples JE, Breiman RF, Powers AM. 2009. Chikungunya Fever: An Epidemiological Review of a Re-Emerging Infectious Disease. Emerging Infections. 49(6):942-948.

Stevens A. 1975. Introduction. In: Bancroft JD. **Histochemical Techniques**. London and Boston: Butterworths, 2nd edition.

Tellan RL, Wijffels G, Willadsen P. 1999. Peritrophic matrix proteins. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 29(2):87-101.

- Valotto CFB, Cavasin G, da Silva HHG, Geris R, da Silva IG. 2010. Alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) causadas pelo tanino catéquico isolado da planta do cerrado *Magonia pubescens* (Sapindaceae). *Revista de Patologia Tropical*. 39(4):309-321.
- Valotto CFB, da Silva HHG, Cavasin G, Geris R, Filho ER, da Silva IG. 2011. Alterações ultraestruturais em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao diterpeno labdano, isolado de *Copaifera reticulata* (Leguminosae), e à uma fração rica em taninos de *Magonia pubescens* (Sapindaceae). *Rev Soc Bras Med Trop*. 44(2):194-200.
- Vasconcelos PFC. 2003. Febre Amarela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36(2):275-293.
- Weaver SC, Reisen WK. 2010. Present and Future Arboviral Threats. *Antiviral Res*. 85(2):328-345.
- Wigglesworth VB. 1942. The storage of protein, fat, glycogen and uric acid in the fat body and other tissues of mosquito larvae. *Exp. Biol*. 19:56-77.
- Wiatt GR. 1967. The Biochemistry of Sugars and Polysaccharides in Insects. *Advances in Insect Physiology* 4:287-360.
- Young B, Weath JW. 2000. **Wheather - Histologia Funcional: texto e atlas em cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4ªed.

9. APÊNDICES

Protocolo do Azul de Toluidina-Borax 1%

1. Lavar a lâmina em tampão correspondente ao pH do corante por 2 minutos
2. Corar a Lâmina com Azul de Toluidina-borax 1%, no mesmo pH por 30 minutos
3. Desprezar o corante
4. Examinar a fresco, sem lamínula

Protocolo PAS

1. Passar em ácido periódico 0,4% por 30 min.
2. Lavar rapidamente em água destilada
3. Deixar no reativo de Schiff por 1h no escuro (usar câmara)
4. Lavar direta 3 vezes em água sulfurosa (3 min cada banho)
5. Lavagem em água corrente durante 30 min.
6. Hematoxilina por 10 min. A 40°C (não é obrigatório, pois é somente o contra-corante)
7. Secar em estufa 40°
8. Montar

Protocolo do Azul de Bromofenol

1. Corar por cerca de 2:30h
2. Lavar em ácido acético 0,5% 10min
3. Lavar em água destilada por 15 min
4. Verificar coloração e retornar para água se necessário até obter coloração azulada

Protocolo do Azul do Nilo

1. Corar uma lâmina com Azul do Nilo a 1% a 60°C por 5 minutos
2. Lavar rapidamente em água destilada
3. Diferenciar em ácido acético 1% a 60°C por 30 segundos
4. Secar e montar