
ESTUDO ULTRA-ESTRUTURAL

DO EFEITO DA TOXICIDADE DO EXTRATO

DA *Magonia pubescens* (ST. HIL.) NO MESÊNTERO DE

LARVAS DE *Aedes aegypti* (L.) (DIPTERA: CULICIDAE)

Walquíria Arruda,¹ Gláucia Maria Cavasin¹ e Ionizete Garcia da Silva²

RESUMO

Os efeitos da toxicidade do extrato bruto etanólico (e.b.e.) da casca do caule da *Magonia pubescens* (St. Hil.) em células do mesêntero de larvas de terceiro estágio do mosquito *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) foram investigados por meio da microscopia eletrônica. Vários períodos de exposição ao e.b.e. foram analisados e diferentes graus de destruição foram observados de acordo com o aumento do tempo de exposição. As alterações morfológicas iniciaram-se após quatro horas de tratamento e incluíram a perda de cristas mitocondriais e o espessamento da matriz peritrófica. Com o aumento do período de exposição, evidenciaram-se novas alterações ultra-estruturais, destacando-se completa destruição de mitocôndrias, vacuolização citoplasmática, perda, redução ou rompimento das microvilosidades e alterações nucleares, o que mostrou a elevada toxicidade do e.b.e. e apontou perspectivas de seu uso no controle de larvas do *A. aegypti*.

DESCRITORES: Atividade larvicida. *Aedes aegypti*. *Magonia pubescens*. Ultra-estrutura.

INTRODUÇÃO

O dengue é hoje a arbovirose mais importante que afeta o homem e representa um sério problema de saúde pública no mundo, sendo o *Aedes aegypti* (L.) a espécie vetora mais competente na sua transmissão. Apesar dos esforços, ainda não existe uma vacina eficaz, disponível e aprovada para a prevenção do dengue (4, 7, 16, 23, 35). O controle dessa doença é concentrado na eliminação dos estádios larvais e de adultos do vetor e usualmente inclui a aplicação de inseticidas

1 Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO.

2 Laboratório de Biologia e Fisiologia de Insetos/Bioatividade de Plantas, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, UFG, Goiânia, GO.

Endereço para correspondência: Ionizete Garcia da Silva. Rua Delenda Rezende de Melo, esq. com 1ª Avenida, Setor Universitário, CEP 74605-50, Goiânia, Goiás, Brasil. E-mail: ionizete@iptsp.ufg.br

Recebido para publicação em: 25/4/2008. Revisto em: 13/9/2008. Aceito em: 15/9/2008.

e larvicidas químicos sintéticos (18, 24, 29, 36). O intenso e prolongado uso desses produtos químicos vem promovendo o surgimento de populações resistentes do mosquito, portanto esses produtos têm se tornado cada vez mais ineficazes (9, 19, 20, 21, 22, 27, 28). Além disso, tais produtos químicos podem causar sérios danos ao meio ambiente, tornando-se necessária a busca por métodos alternativos de controle do mosquito transmissor do dengue.

Uma das alternativas de controle do *A. aegypti* e outros insetos vetores é a utilização de produtos derivados de plantas (11, 13, 14, 15, 25, 26, 30, 32). Dentre os produtos botânicos estudados, destacam-se os extratos brutos etanólicos (e.b.e.) da casca do caule, semente e envoltório da semente da *Magonia pubescens* (St. Hil.), que apresentam atividade nas diferentes fases do desenvolvimento larval de *A. aegypti* (1, 34). Os efeitos do e.b.e. da casca do caule da *M. pubescens* nas células do mesêntero de larvas de *A. aegypti*, em microscopia de luz, foram relatados por Arruda et al. (2) e incluíram destruição total ou parcial das células, elevada vacuolização, aumento do espaço subperitrófico, hipertrofia e estratificação celular. Este trabalho relata os estudos realizados com microscopia eletrônica sobre os efeitos do e.b.e. da casca do caule da *M. pubescens*, demonstrando a sua ação nas células do mesêntero das larvas de *A. aegypti*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material animal e vegetal

Larvas de terceiro estágio do *A. aegypti* foram obtidas da criação de *A. aegypti* no Laboratório de Biologia e Fisiologia de Insetos e Xenodiagnóstico do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, climatizado em temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $80 \pm 5\%$ e fotofase aproximada de 12 horas (33). O e.b.e. da casca do caule da *M. pubescens* foi utilizado na sua concentração letal, equivalente a 230 mg do extrato/1000mL de água destilada (31).

Bioensaios

A solução preparada do e.b.e. foi distribuída em 20 recipientes de 25mL cada. Para o controle foram utilizados frascos contendo apenas água destilada. O experimento foi dividido em quatro grupos assim distribuídos: grupo 1 - larvas na solução do e.b.e. da *M. pubescens* com alimento; grupo 2 - larvas na solução do e.b.e. sem alimento; grupo 3 - controle com alimento; grupo 4 - controle sem alimento. Em cada frasco com solução do e.b.e. ou controle foram colocadas 6 larvas do mosquito, perfazendo um total de 240 larvas por experimento. O alimento utilizado foi ração para gato triturada (33). As larvas foram deixadas na solução do e.b.e. por diferentes períodos de exposição, sendo coletadas larvas com 13 horas

de tratamento para as análises em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e com 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 13 horas para as análises em microscopia eletrônica de transmissão (MET). As larvas foram dissecadas imediatamente após a sua retirada da solução do e.b.e. e tiveram seus tubos digestórios retirados e imediatamente fixados em 2% de paraformaldeído, 2% de glutaraldeído, 3% de sacarose em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 e, em seguida, processados para análises em MEV e MET.

Microscopia eletrônica de varredura

As amostras fixadas foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, desidratadas em série crescente de acetona (30% - 100%), secas ao ponto crítico (CPD 030 Baltec), cobertas com uma película de ouro (SCD 050 Baltec) e analisadas em microscópio de varredura.

Microscopia eletrônica de transmissão

As amostras fixadas foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, desidratadas em série crescente de acetona (30% - 100%), infiltradas e incluídas em resina *Spurr*. Os blocos preparados foram cortados em ultramicrótomos e os cortes ultrafinos contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados em microscópio eletrônico de transmissão.

RESULTADOS

Os estudos com MEV mostraram que a superfície celular do mesêntero de larvas controle de *A. aegypti* sofreu alteração com a ausência de alimento. As células do mesêntero de larvas controle alimentadas apresentaram-se íntegras, com forma poligonal e hexagonal e com algumas vesículas de secreção visualizadas como pequenas projeções esféricas em sua superfície (Figura 1A). Vistas lateralmente, estas células apareceram como uma projeção em forma esférica, recobrendo toda a parede intestinal. Diferentemente, a célula do mesêntero de larvas controle mantidas sem alimento mostrou superfície celular deformada, com aspecto “murcho”, mas com limites celulares definidos (Figura 1B).

Com o uso do e.b.e., as células do mesêntero de larvas alimentadas ou não, se mostraram completamente destruídas, sem visualização dos limites celulares, indicando a ação deletéria do e.b.e. No entanto, diferentes aspectos de destruição puderam ser observados nesses dois tratamentos. As células do mesêntero de larvas alimentadas estavam cheias de reentrâncias (Figura 1C), enquanto as de larvas não alimentadas tinham aspecto mais homogêneo e áreas mais lisas (Figura 1D).

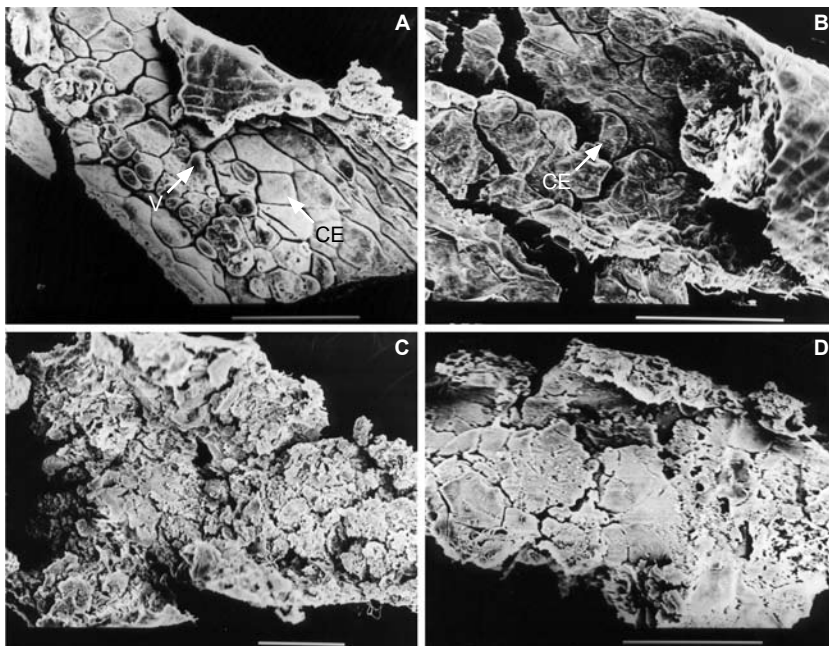


Figura 1. Eletromicrografia de varredura da parede interna do mesêntero de larvas de 3o estágio de *A. aegypti*. A: Larva controle alimentada. B: Larva controle não alimentada. C: Larva tratada por 13h com o e.b.e. da *M. pubescens*, com alimento. D: Larva tratada por 13h com o e.b.e. da *M. pubescens*, sem alimento. Bar=100 µm. CE: Células epiteliais. V: Vesícula secretora.

Eletromicrografias de transmissão da região mediana do mesêntero de larvas controle identificaram a presença de células cilíndricas em diferentes estágios de atividade secretora (Figura 2A). Algumas dessas células apresentaram pequenas e esféricas vesículas de secreção na região citoplasmática médio-apical, enquanto outras mostraram, além dessas, grandes e esféricas vesículas que ocupavam parte do citoplasma. Células basais ou indiferenciadas, com aspecto alongado e núcleo com característica de intensa atividade, também foram visualizadas (Figura 2A). A presença de grande quantidade de mitocôndrias, aparentemente envolvendo em seu interior parte do citoplasma ou porções de vesículas secretoras, foram observadas tanto em células com alta atividade secretora quanto naquelas que apresentaram número reduzido de vesículas (Figura 2B). A parte apical das células apresentou microvilosidades pouco desenvolvidas e recobertas externamente por um material fino e granular, provavelmente representando o glicocálice (Figura 2C). O citoplasma na região apical das células cilíndricas revelou grande quantidade de retículo

endoplasmático rugoso (RER), mitocôndrias e vesículas de secreção com formato esférico e tamanhos variados. O núcleo esférico, apresentando áreas de eucromatina e heterocromatina e nucléolo distinto, foi localizado na região médio-basal (Figura 2B). A região basal da célula foi caracterizada pela presença de invaginações da membrana plasmática, formando o labirinto basal, no qual se observou grande quantidade de mitocôndrias com forma filamentososa e cristas evidentes (Figura 2D).

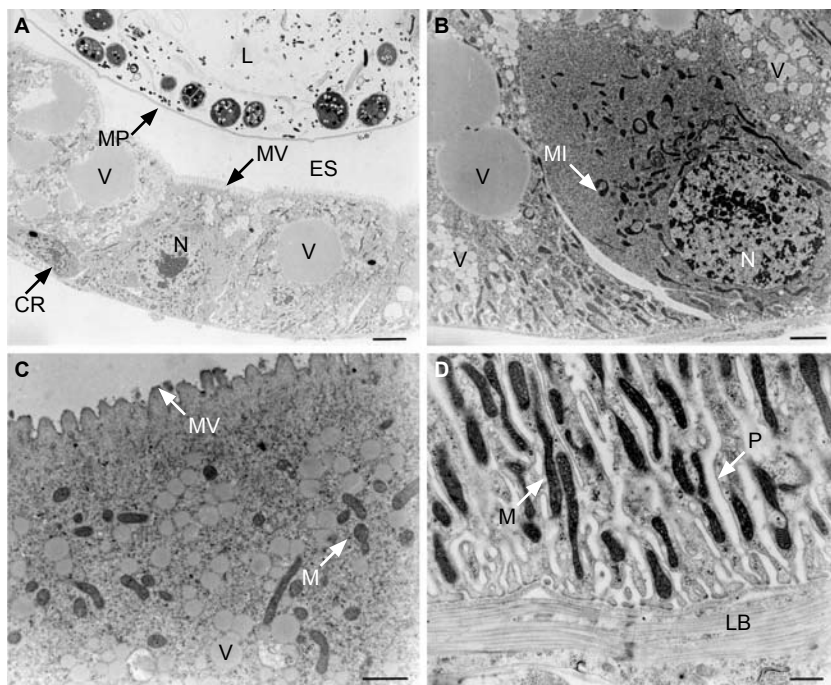


Figura 2. Ultra-estrutura das células epiteliais do mesêntero de larvas de *A. aegypti* controle. A e B: Aspecto geral. Bar=5 e 2 μm , respectivamente. C: Região apical. Bar=1 μm . D: Região basal. Bar=0.5 μm . MV: Microvilosidades. MP: Matriz peritrófica. ES: Espaço subperitrófico. V: Vesículas secretoras. N: Núcleo. M: Mitocôndria. MI: Mitocôndrias diferenciadas. LB: Lâmina basal. P: Pregas da membrana basal. L: Lúmen. CR: Células regenerativas.

As alterações iniciais na morfologia das células do mesêntero de larvas de *A. aegypti* tratadas foram observadas após quatro horas de tratamento com o e.b.e. Dentre essas alterações destacam-se: a) a destruição de mitocôndrias, caracterizada pela perda das cristas e alterações no conteúdo e na eletrondensidade; b) o espessamento da matriz peritrófica, que apresentou suas camadas deslocadas para longe do ápice celular, com conseqüente aumento do espaço subperitrófico (Figura 3A). Neste

tempo de tratamento, não houve sinais de destruição das microvilosidades nem do restante celular. Após seis e oito horas de tratamento, grande quantidade de vacúolos, de vários tamanhos, foi encontrada na região médio-basal de algumas células (Figura 3B). Também foi evidenciado maior ou menor grau de destruição do citoplasma, dependendo da célula observada. Esta destruição caracterizou-se pela presença de vários vacúolos, mitocôndrias destituídas de cristas e diminuição do tamanho das microvilosidades que, em alguns locais, estavam arrebitadas e liberando o conteúdo do citoplasma (Figura 3C). Neste tempo de tratamento, as células tinham aspecto bastante diferenciado, incluindo poucas invaginações da membrana na região basal, citoplasma completamente destruído, ausência de organelas e, principalmente, grande quantidade de RER observada no controle, presença de várias dobras da membrana celular nos locais de união entre as células epiteliais adjacentes e algumas invaginações da membrana na região basal (Figura 3D). Os núcleos celulares demonstraram aspecto bem distinto do núcleo controle, com cromatina completamente descondensada, evidenciando regiões mais eletrondensas e uma área reticulada também mais eletrondensa que, provavelmente, correspondia ao nucléolo (Figura 3E). A matriz peritrófica apresentou-se diferenciada e muito espessa, evidenciando várias camadas de diferentes eletrondensidades (Figura 3F). Grande quantidade de mitocôndrias rompidas e destituídas de cristas, vacúolos autofágicos de diversos tamanhos e poucas e curtas microvilosidades foram observadas nas células após dez horas de tratamento e, esporadicamente, nesse período, algumas microvilosidades invaginaram para o interior do citoplasma celular aumentando o espaço subperitrófico.

Como era esperado, os aspectos mais evidentes de destruição celular foram observados com 12 e 13 horas de tratamento. O grau de vacuolização da célula foi bastante intenso e desse modo o citoplasma passou a ficar quase completamente preenchido por vacúolos. Os processos de invaginação da membrana basal, que formam o labirinto basal, eram mais escassos e os limites celulares não foram evidenciados (Figura 4A). As mitocôndrias manifestaram diferentes graus de destruição, algumas até destituídas de cristas. A superfície apical da célula mostrou-se praticamente sem microvilosidades e as poucas que existiam tinham aspecto curto e irregular. Alguns locais da célula estavam desprovidos dessas microvilosidades e da membrana celular apical, liberando o conteúdo citoplasmático (Figura 4B). As células apresentaram pouca quantidade de RER e grande quantidade de ribossomos livres no citoplasma. O núcleo de algumas células, com forma esférica, cromatina frouxa e nucléolo evidente, estava com sua membrana rompida, liberando seu conteúdo para o citoplasma (Figura 4C). Grupos de estruturas semelhantes a pequenas vesículas eletrondensas foram localizados em algumas células (Figuras 4C e 4D). Esses eventos nunca foram observados em outros tempos de tratamento. Ainda com 13 horas de tratamento, as células epiteliais do mesêntero não mostraram mais uma superfície apical delimitada, estavam destituídas de microvilosidades e da membrana celular, extravasando o conteúdo citoplasmático para a região próxima à matriz peritrófica (Figura 4E). Nessas células, extensas regiões se mostraram completamente desprovidas de conteúdo

citoplasmático. Observou-se a presença de grandes e numerosos vacúolos, além de várias mitocôndrias em diferentes estágios de destruição, ausência de cristas, escassez de RER e presença de poucas vesículas secretoras. No núcleo de algumas células, o envelope nuclear tinha grupos de pequenos grânulos esféricos e mais eletrondensos, semelhantes a poros, localizados em torno do envoltório nuclear (Figura 4F).

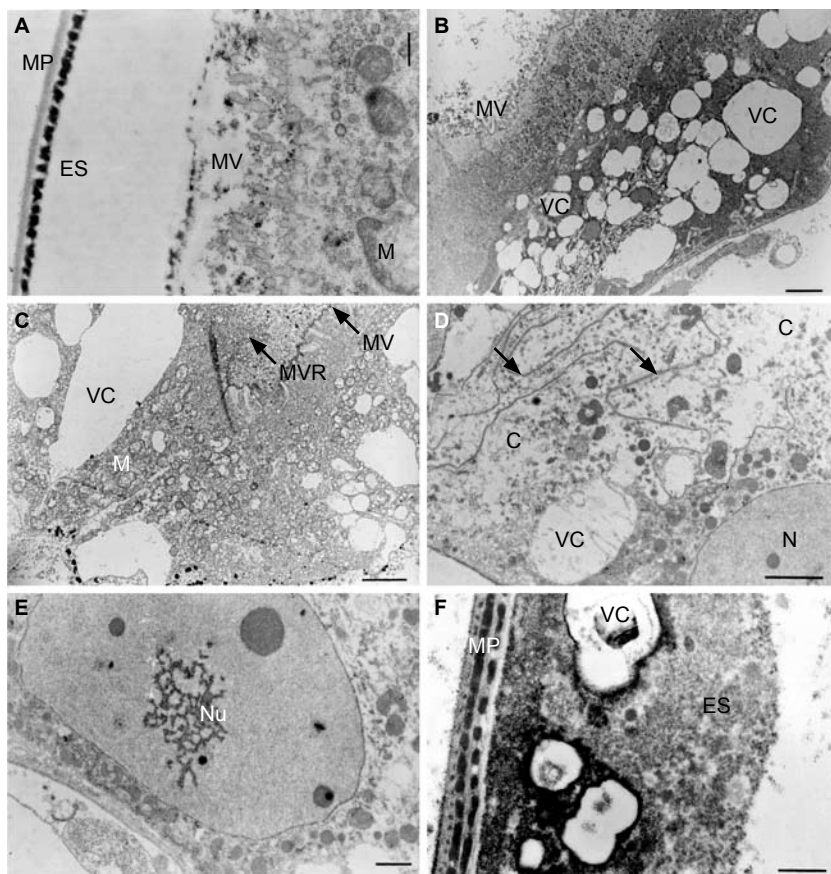


Figura 3. Eletromicrografias das células epiteliais do mesêntero de larvas de 3o estágio de *A. aegypti* tratadas com o e.b.e. da *M. pubescens*. A: 4h de tratamento. Bar=0,5 μ m. B, C: 6h de tratamento. Bar=2 μ m. D, E, F: Células diferenciadas encontradas com 6h de tratamento. Bar=2,1 e 0,5 μ m respectivamente. MV: Microvilosidades. VC: Vacúolos. MVR: Microvilosidades rompidas. M: Mitocôndrias. N: Núcleo. C: Citoplasma. MP: Matriz peritrófica. ES: Espaço subperitrófico. Nu: Nucléolo. Setas curtas: Membranas celulares.

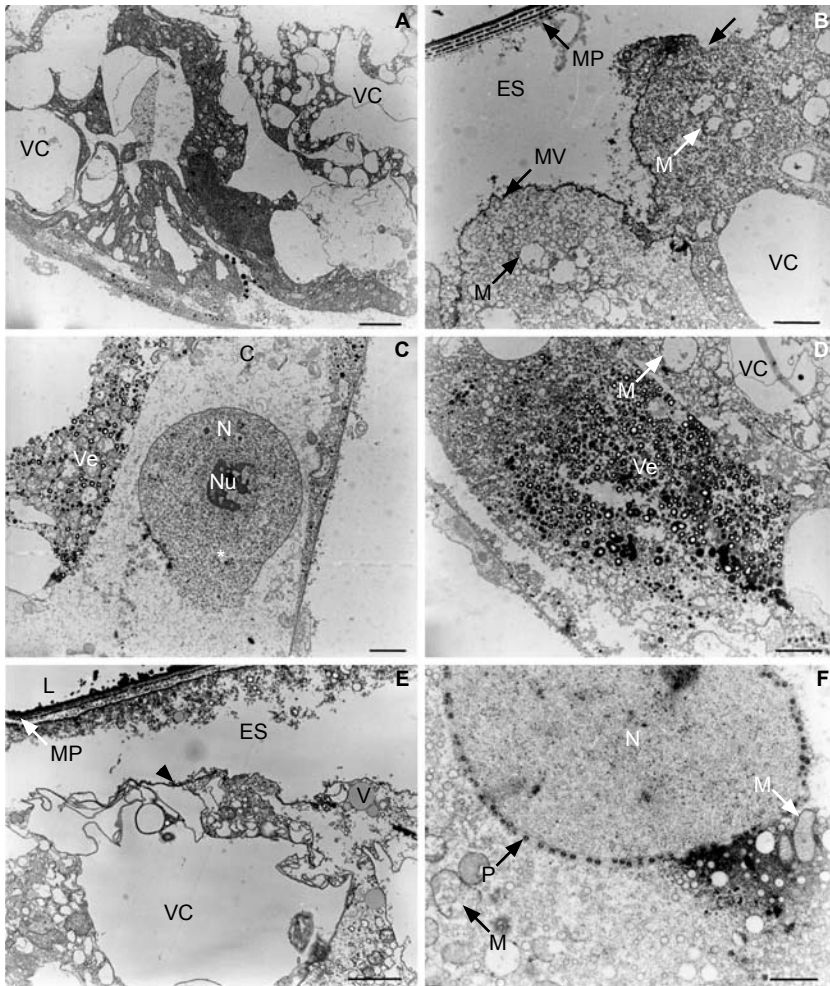


Figura 4. Eletromicrografias das células epiteliais do mesêntero de larvas de 30 estágio de *A. aegypti* tratadas com o e.b.e. da *M. pubescens*. A, B, C e D com 12h de tratamento. E e F: com 13h de tratamento. A: Região basal. Bar=5 μ m. B e E: Região apical. Bar=2 μ m. C e F: Aspecto do núcleo. Bar=1 μ m. D: Aspecto das vesículas. Bar=2 μ m. VC: Vacúolo. MV: Microvilosidades. M: Mitocôndrias. MP: Matriz peritrófica. ES: Espaço subperitrófico. C: Citoplasma. N: Núcleo. Nu: Nucléolo. Ve: Vesículas eletrondensas. V: Vesículas de secreção. L: Lúmen. P: Poros. Asterisco: Rompimento da membrana nuclear. Seta longa: Rompimento da membrana celular. Seta curta: Ausência de microvilosidades.

DISCUSSÃO

A ultra-estrutura normal das células do mesêntero de larvas de *A. aegypti* controle coincidiu com as observações apresentadas por Cocke et al. (8) e Charles (6). Foram encontradas células que exibiam grandes vesículas secretoras, o que, provavelmente, indica uma intensa atividade e evidencia os diferentes estágios de maturação e/ou atividade de síntese dos produtos de secreção. A presença de mitocôndrias com aspectos diferenciados envolvendo parte do citoplasma ou vesículas de secreção pode indicar o elevado grau de atividade das mitocôndrias e intensa atividade metabólica das células.

Os efeitos tóxicos do e.b.e. da *M. pubescens* nas células do mesêntero de larvas de *A. aegypti*, observados por microscopia eletrônica de transmissão, incluíram extensas alterações citoplasmáticas e nucleares, com diferentes níveis de destruição de mitocôndrias, inclusive ausência de cristas, intensa vacuolização citoplasmática, diferença nas características estruturais da membrana peritrófica e mudanças na estrutura das microvilosidades. Diversos autores, estudando os efeitos tóxicos de compostos químicos ou toxinas de agentes biológicos, verificaram que tais compostos causam várias alterações nas células do mesêntero de larvas de *A. aegypti* ou de outros mosquitos, incluindo ausência de cristas mitocondriais, alteração da borda de microvilos, presença de vacúolos autofágicos, presença de material granular no espaço subperitrófico, ruptura de algumas membranas celulares, separação das células e da membrana basal e presença de grandes vacúolos celulares (6, 8, 10, 12, 17, 31). A ação de cristais do *Bacillus thuringiensis israelensis* nas células do mesêntero de larvas de *A. aegypti* revelou efeitos como: interrupção do epitélio e alterações celulares com aumento dos espaços intra e intercelulares na região basal da célula, desintegração do RER com formação de estruturas esféricas, desaparecimento das cristas mitocondriais, hipertrofia celular (com aparecimento de células em forma de balão) e desaparecimento das microvilosidades (5).

Desta forma, o uso de substâncias tóxicas como larvicidas, independentemente da sua origem, causa danos irreparáveis em nível celular no epitélio do tubo digestório, indicando ser este o local de absorção desses compostos e que, independentemente do tipo de substância utilizada, as alterações destrutivas são muito semelhantes. Portanto, o achado sugere que essas mudanças constituem uma resposta comum à intoxicação celular.

As tentativas para seguir os danos ultra-estruturais causados pelo e.b.e. nas células e organelas do mesêntero de *A. aegypti* foram realizadas por meio de observações comparativas de larvas tratadas em diferentes tempos de exposição, simultaneamente com larvas controle. As principais e primeiras organelas afetadas foram as mitocôndrias, que muitas vezes se mostraram hipertrofiadas e destituídas de cristas. De fato, em células do mesêntero de larvas de *A. aegypti* e *Culex quinquefasciatus* intoxicadas por bacilos, foram evidenciados os mesmos aspectos morfológicos nestas organelas, indicando que substâncias tóxicas às

células do mesêntero inicialmente destroem as mitocôndrias, sítios ativos de energia para as células (5, 6, 10, 12). Esse processo de destruição é seguido pela formação de pequenos vacúolos os quais vão aumentando em número, o que, muitas vezes, promove a formação de enormes vacúolos que ocupam grande porção do citoplasma. Desta forma, a vacuolização das células indica que estas se encontram em estado de lise, possivelmente provocado pelas substâncias tóxicas encontradas no e.b.e. A desintegração do RER, com formação de pequenas vesículas, e a destruição da camada de microvilosidades, visualizadas como conseqüência da toxicidade do e.b.e., também foram evidenciadas como sintomas de infecção de *Culex pipiens* pelo *Bacillus sphaericus* (6). Esses resultados indicam que, mesmo que a substância tóxica seja de origem microbiana ou botânica, os efeitos da toxicidade dos compostos sobre as células do mesêntero das larvas de mosquitos são semelhantes, variando basicamente em intensidade.

Em períodos maiores de exposição ao e.b.e., as células do mesêntero apresentaram pequenas estruturas esféricas e mais eletrondensas localizadas no envelope nuclear. Essas estruturas pareciam ser poros nucleares bastante evidenciados, que poderiam ter aparecido como uma reação à intoxicação pela solução do e.b.e. A presença de poros nucleares foi observada como pequenas zonas mais escuras (eletrondensas) localizadas em intervalos ao longo do envelope nuclear de células do intestino de adultos fêmeas de *A. aegypti* e larvas de outros insetos (3). Da mesma forma, células do mesêntero de *A. aegypti* expostas a compostos reguladores de crescimento apresentaram intensa vacuolização entre as duas membranas do envelope nuclear (8) e as mesmas células infectadas com o *B. thuringiensis* apresentaram mudanças no núcleo, como a formação e presença de vesículas (12). Em nossos experimentos, as estruturas observadas na membrana nuclear se assemelharam mais com poros nucleares do que com vacúolos, visto que tais estruturas nem sempre se apresentaram com forma esférica e se exibiram como regiões mais eletrondensas. Provavelmente, a presença desses poros seja um fenômeno provocado em resposta ao extenso uso do e.b.e. e sua conseqüente toxicidade, considerando que tais poros somente foram evidenciados nas células após 12 horas de tratamento. Da mesma maneira, a presença de alguns núcleos em estado de lise aponta para a crescente intoxicação das células pelo e.b.e., visto que o processo de destruição é iniciado no citoplasma e há uma progressão até o núcleo celular. Ainda, a presença de estruturas semelhantes a pequenas vesículas e/ou grânulos eletrondensos, encontradas no citoplasma de células com elevado tempo de exposição, pode sugerir o acúmulo do e.b.e. nas células do mesêntero. Essas vesículas e grânulos só foram evidenciados em células submetidas a elevado tempo de exposição ao e.b.e., podendo ser um indício de que o extrato, além de ser absorvido pelas células epiteliais, também pode ser acumulado em grânulos e/ou pequenas vesículas citoplasmáticas, e isto poderia ser um fator a mais de indução da destruição celular.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem as professoras Dra. Sônia Nair Bão e Dra. Carminda da Cruz Landim, pelo grande auxílio e abertura dos laboratórios de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília e UNESP/Rio Claro. Ao CNPq, OPAS e FUNAPE, pelo apoio financeiro.

ABSTRACT

Ultrastructural Studies of *Magonia pubescens* (St. Hil.) Extract Toxicity in the Midgut of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) Larvae

The toxicity effects of the crude ethanol extract (c.e.e.), from the peel of the stem of *Magonia pubescens* (St. Hil.), in the mesentery cells of larvae of the *Aedes aegypti* mosquito at the 3rd stage (L.) (Diptera: Culicidae), were investigated with electronic microscopy. Several periods of exposure to c.e.e. were analyzed and different destruction degrees were observed in agreement with increasing of time of exposure. The morphologic alterations began after 4h of treatment and they included the loss of mitochondrial cristae and the thickening of the peritrophic matrix. As the period of exposure increased, new ultrastructural alterations were evidenced, standing out the complete mitochondria destruction, the increase in the number of vacuoles, the loss, reduction or breakage of the microvilli and some nuclear alterations, proving the high toxicity of c.e.e. and effectiveness in the control of larvae of the *A. aegypti*.

KEY WORDS: Larvicidal activity, *Aedes aegypti*, *Magonia pubescens*.
Ultrastructure.

REFERÊNCIAS

1. Arruda W, Oliveira GMC, Silva IG. Alterações morfológicas observadas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1972) submetidas à ação do extrato bruto etanólico da casca do caule da *Magonia pubescens*. *Entomol Vec* 10: 47-60, 2003a.
2. Arruda W, Oliveira GMC, Silva IG. Toxicidade do extrato bruto etanólico da casca do caule da *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 17-25, 2003b.
3. Bertram DS, Bird RG. Studies on mosquito-borne viruses in their vectors: I. the normal fine structure of the midgut epithelium of the adult female *Aedes aegypti* (L.) and the functional significance of its modification following a blood meal. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 55: 404-423, 1961.
4. Cardoso MJ. Dengue vaccine design: issues and challenges. *Br Med Bull* 54: 395-405, 1998.
5. Charles JF, De Barjac H. Action of crystals of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on the midgut of *Aedes aegypti* L. larvae, studied by electron microscopy. *Ann Microbiol* 134A: 197-218, 1983.
6. Charles JF. Ultrastructural midgut events in culicidae larvae fed with *Bacillus sphaericus* 2297 spoke/crystal complex. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 138: 471-484, 1987.
7. Chaturvedi UC, Shrivastava R, Nagar R. Dengue vaccines: Problems & Prospects. *Indian J Med Res* 121: 639-652, 2005.
8. Cocke J, Bridges AC, Mayer RT, Olson JK. Morphological effects of insect growth regulating compounds on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Life Sci* 24: 817-832, 1979.

9. Cunha MP, Lima JBP, Brogdon WG, Moya GE, Valle D. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 441-444, 2005.
10. Davidson EW. Ultrastructure of midgut events in the pathogenesis of *Bacillus sphaericus* strain SSII-1 infection of *Culex pipiens quinquefasciatus* larvae. *Can J Microbiol* 25: 178-184, 1979.
11. Dharmshaktu NS, Prabhakaran PK, Menon PK. Laboratory study on the mosquito larvicidal properties of leaf and seed extract of the plant *Agave americana*. *J Trop Med Hyg* 90: 79-82, 1987.
12. Flores JG, Lamorena MB. Ultrastructure study of *Bacillus thuringiensis* - treated *Aedes aegypti* larvae. *Acta Manilana* 39: 25-29, 1991.
13. Furtado RF, Lima MGA, Neto MA, Bezerra JNS, Silva MG. Atividade Larvicida de Óleos Essenciais Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Neotrop Entomol* 34: 843-847, 2005.
14. Geris R, Silva IG, Silva HH, Barison A, Rodrigues-Filho E, Ferreira AG. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* Ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 50: 25-28, 2008.
15. Green MM, Singer JM, Sutherland DJ, Hibben CR. Larvicidal activity of *Tagetes minuta* (Marigold) toward *Aedes aegypti*. *J Am Mosq Control Assoc* 7: 282-286, 1991.
16. Kanesa-athan N, Sun W, Kim-Ahn G, Van Albert S, Putnak JR, King A, Raengsakulrach B, Christ-Schmidt H, Gilson K, Zahradnik JM, Vaughn DW, Innis BL, Saluzzo JF, Hoke CH Jr. Safety and immunogenicity of attenuated dengue virus vaccines (Aventis Pasteur) in human volunteers. *Vaccine* 19: 3179-3188, 2001.
17. Lacey LA, Federici BA. Pathogenesis and midgut histopathology of *Bacillus thuringiensis* in *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae). *J Invertebr Pathol* 33: 171-182, 1979.
18. Lloyd LS, Winch P, Ortega-Canto J, Kendall C. The design of a community - based health education intervention for the control of *Aedes aegypti*. *A J Trop Med Hyg* 50: 401-411, 1994.
19. Luna JED, Martins MF, Anjos AF, Kuwabara EF, Navarro-Silva A. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. *Rev Saude Públ* 38: 842-843, 2004.
20. Marcoris MLG, Andrighetti MTM, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Bracco JE. Resistance of *Aedes aegypti* from the State of São Paulo, Brazil, to Organophosphates Insecticides. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 703-708, 2003.
21. Marcoris MLG, Camargo MF, Silva IG, Takaku L, Andrighetti MT. Modificação da suscetibilidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* ao Temephos. *Rev Patol Trop* 24: 31-40, 1995.
22. Matsumura F, Brown AWA. Studies on organophosphorus-tolerance in *Aedes aegypti*. *Mosquito News* 23: 26-31, 1963.
23. Melo NV. Controle de endemias: dengue e febre amarela. *Rev Soc Bras Med Trop* 27: 740-744, 1994.
24. Nobre A, Antezana D, Tauil PL. Febre amarela e dengue no Brasil: epidemiologia e controle. *Rev Soc Bras Med Trop* 27: 59-66, 1994.
25. Pizarro APB, Filho AMO, Parente JP, Melo MTV, Santos CE, Lima PR. O aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquitos. *Rev Soc Bras Med Trop* 32: 23-29, 1999.
26. Pohlit AM, Quignard ELJ, Nunomura SM, Tadei WP, Hidalgo AF, Pinto ACS, Santos EVM, Morais SKR, Saraiva RCG, Ming LC, Alecrim AM, Ferraz AB, Pedrosa ACS, Diniz EV, Finney EK, Gomes EO, Dias HB, Souza KS, Oliveira LCP, Don LC, Queiroz MMA, Henrique MC, Santos M, Lacerda Júnior OS, Pinto PS, Silva SG, Graça YR. Screening of plants found in the State of Amazonas, Brazil for larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae. *Acta Amaz* 34: 97-105, 2004.
27. Rathor HR, Wood RJ. Effect of selection for dichlorodiphenyltrichloethane (DDT) resistance on the uptake and breakdown of DDT in *Aedes aegypti* L. *Can J Genet Cytol* 27: 23-28, 1985.
28. Rawlins SC, Wan JOH. Resistance in some Caribbean populations of *Aedes aegypti* to several insecticides. *J Am Mosq Control Assoc* 11: 59-65, 1995.
29. Schoof HF. Insecticides for use against *Aedes aegypti*. *Bull Wild Hlth Org* 36: 618-622, 1967.
30. Schwartz AM, Paskewitz SM, Orth AP, Tesch MJ, Toong YC, Goodman WG. The lethal effects of *Cyperus iria* on *Aedes aegypti*. *J Am Mosq Control Assoc* 14: 78-82, 1998.

31. Sharma VP, Rai KS. Histopathological and developmental effects of the chemosterilant apholate, on the mosquito *Aedes aegypti*. *Mosquito News* 29: 9-14, 1969.
32. Silva HH, Geris R, Rodrigues Filho E, Rocha C, da Silva IG. Larvicidal activity of oil-resin fractions from the Brazilian medicinal plant *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae-Caesalpinoideae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 264-267, 2007.
33. Silva HHG, Silva IG, Lira KS. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), em laboratório. *Rev Patol Trop* 27: 53-63, 1998.
34. Silva IG, Santos AH, Ferri PH, Alves RBN, Melo RL, Peixoto L, Silva HHG, Elias CN, Isac E, Lira KS, Camargo MF. Ação larvicida de extrato bruto etanólico de *Magonia pubescens* St. Hil. (tingüi do cerrado) sobre o *Aedes aegypti* (Lin) em laboratório. *Rev Patol Trop* 25: 51-59, 1996.
35. Simasathien S, Thomas SJ, Watanaveeradej V, Nisalak A, Barberousse C, Innis BL, Sun W, Putnak JR, Eckels KH, Hutagalung Y, Gibbons RV, Zhang C, De La Barrera R, Jarman RG, Chawachalasai W, Mammen MP Jr. Safety and immunogenicity of a tetravalent live-attenuated dengue vaccine in flavivirus naive children. *Am J Trop Med Hyg* 78: 426-433, 2008.
36. Stephenson JR. The problem with dengue. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99: 643-646, 2005.