

Estudo sistemático-taxonômico de populações de *Anopheles nuneztovari* Gabaldón, 1940 (Díptera, Culicidae) do município de Manaus

Hismaylton paz da SILVA¹; Wanderli Pedro TADEI²; Carlos Alberto Praia LIMA³

¹Bolsista PIBIC/FAPEAM/INPA; ²Orientador CPCS /INPA; ³CO-ORIENTADOR CPCS/INPA

1. INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa causada por espécies do gênero *Plasmodium* e transmitida ao homem pela picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*. Constitui-se em uma parasitose provocada por protozoários do gênero *Plasmodium*, os quais possuem ciclos complexos de multiplicação, sexuada no mosquito e assexuada no homem, envolvendo neste um ciclo tecidual e um eritrocitário. Existem cerca de 120 espécies descritas, porém apenas 4 infectam o homem: *Plasmodium vivax* (Grassi e Feleti), *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897) *Plasmodium malariae* (Laveran, 1881) e *Plasmodium ovale* (Stephens, 1822), sendo este último restrito à África.

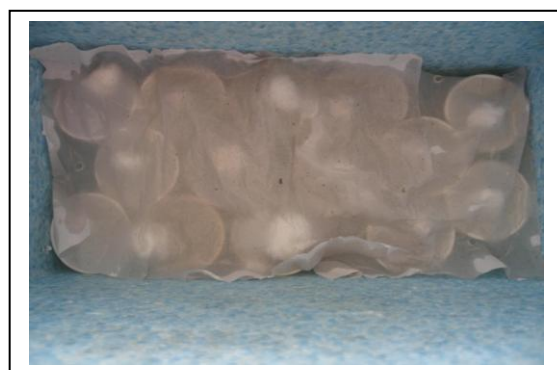
No Brasil são registradas 54 espécies de *Anopheles* e 33 delas ocorrem na Amazônia brasileira. Vários complexos de espécies foram descritos no gênero *Anopheles* e este aspecto dificulta a identificação daquelas realmente envolvidas na transmissão do plasmódio (Kitzmilller *et al.*, 1967; Tadei, 1980; Narang *et al.*, 1989; Wilkerson *et al.*, 1993, 1995; Rosa-Freitas, 1989; Tadei *et al.*, 1998; Tadei e Thatcher, 2000).

Na Amazônia brasileira, *Anopheles nuneztovari* s.l. foi registrada com infecção por *Plasmodium* spp no estado do Pará (Arruda *et al.*, 1986, Póvoa *et al.*, 2001) e no Amapá (Galardo *et al.*, 2007). No Amazonas, a espécie foi registrada por Tadei e Thatcher (2000) infectada por *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*.

Analisar amostras de populações de *Anopheles nuneztovari* s.l. procedentes da área do Puraquequara, Zona Leste, objetivando distinguir os taxa desta espécie.

2.1 ÁREAS DE COLETA

Nesta etapa do projeto, as coletas de espécimes estão sendo realizadas apenas na Zona Leste de Manaus. Como primeira atividade, para análise das genitálias, as coletas estão sendo feitas diretamente nos criadouros naturais de anofelinos e em tanques de piscicultura. As larvas, após as coletas, foram transportadas para o laboratório de Malária e Dengue do INPA, em vasilhames maiores, conforme Figura 1. A coleta de alados será realizada nesta próxima etapa do projeto, para obtenção de desovas e manutenção em laboratório, até a emergência dos alados, quando os machos serão separados e processados para a análise das genitálias.



No laboratório de málaría e dengue do Inpa, os mosquitos foram transferidos para copos de plásticos de 50 mL, o fundo de cada copo cotinha um circulo de papel de filtro umedecido para que

os mosquitos fizessem a postura dos ovos, os copos foram cobertos com filó preso por uma liga látex, o filó possuía um orifício fechado com algodão no qual os mosquitos foram introduzidos.

Finalmente os copos foram cobertos com papel toalha umedecido para manter constantes a temperatura e a umidade no interior da caixa de isopor onde os espécimes foram acondicionados.



Figura 1. Recipiente de transporte das larvas dos criadouros para o laboratório de Malária e Dengue.



Figura 2. Bandejas com larvas coletadas de criadouros separadas por estádios em bandejas no INPA.

No Laboratório de malária e Dengue do INPA, as larvas foram transferidas para bandejas de plástico contendo água para completarem o seu desenvolvimento até a emergência dos alados (Figura 2). Nas bandejas as larvas foram alimentadas com ração de peixe triturada em graal (de porcelana), na proporção de 50% de NutriPremium (NutriconPet) e 50% de Golden Fish - crescimento (Alcon).

2.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS: ANÁLISE DAS GENITÁLIAS

Após a emergência dos alados, os machos foram selecionados para análise da genitália, a qual foi separada do abdome na altura do 7º segmento. No preparo do material da genitália, seguiu-se a técnica proposta por Forattini (1962). Após a separação da genitália, esta foi colocada em hidróxido de potássio a 20% para clarificação, durante o período entre 24 a 48 horas. Em seguida ocorreu a desidratação do material em uma série de álcool etílico de concentrações distintas: a 70%, 95% e absoluto, permanecendo por 20 minutos em cada concentração. Logo após, o material foi diafanizado em eugenol por 15 minutos e, na continuidade, as partes constituintes da genitália foram montadas entre lâmina e lamínula.

Na montagem das lâminas utilizou-se Entellan da MERCK, em substituição ao Bálsamo do Canadá.

2.3 PREPARO E MONTAGEM DE EXÚVIAS DE FORMAS IMATURAS DE MOSQUITOS.

Para que as exúvias, das formas imaturas, possam ser montadas, deve-se dispor de instrumentos especiais. (Micro agulhas de dissecação e Estiletes).

2.4 PREPARO DAS EXÚVIAS (LARVAS E PUPAS)

- I. Exúvias, quando coletadas, são preservadas em álcool 80%. Os próximos passos servem para remover água do espécimen. A água é incompatível com meios de montagem permanente.
- II. Na montagem a mais difícil tarefa, é manter o de identificação da espécimen
- III. As transferências das peles devem ser feitas com o auxílio de pipetas com a ponta larga ou estiletes apropriados.
- IV. Placas de porcelana tipo "quarella" são os recipientes mais adequados à preparação das exúvias.
- V. Com o auxílio de pipetas, retirou-se as exúvias do frasco de preparação (porcelana), transferido-as lâmina de preparação
- VI. Retirar todo álcool 80% com a pipeta de Pasteur. Colocar álcool 90%. Deixar por 10 minutos.
- VII. Retirar o álcool 90% e colocar o 95%. Deixar por 10 minutos .
- VIII. Retirar o álcool 95%. E colocar álcool etílico absoluto(100%). Deixar por 10 minutos.
- IX. Retirar o álcool etílico absoluto. Deixar por 2 horas
- X. As lâminas que foram utilizadas nas montagens foram limpas, com álcool absoluto antes de começar as montagens, e o número dos espécimes devem ser colocados com lápis de diamante no ângulo esquerdo.

2.5 MONTAGEM DAS EXÚVIAS DE LARVAS.

A exúvia larval deve ser montada com superfície dorsal pra cima, e a cabeça mais distante do montador. As partes buscais foram montadas para baixo. A pele deve ficar estirada, se enrolar, ela deve ser adequadamente posicionada sobre a lâmina por meio de delicados toques com os micro estilete.

Isto deve ser feito antes de se posicionar as cerdas. Todas as cerdas laterais devem ser esticadas de modo a formarem o ângulo de 90° (quando possível) com corpo, ficando com os ramos esticados. O 8º seguimento deve ser mantido em vista dorsal para que esteja visível. As brânquias devem ser arranjadas de modo a se tornarem visíveis. Os ramos das cerdas da escova ventral foram estirados tanto quanto possível.

2.6 EXÚVIAS DE PUPAS

A pele da pupa deve ser colocada à direita da pele da larva. Com a pele em posição lateral, foi separado o abdome juntamente com o metanoto, do cefalotórax. O abdome deve ser montado com o lado dorsal para cima e as cerdas flutuadoras devem ser arranjadas de modo a formarem ângulo reto com a linha longitudinal. O cefalotórax rompido durante a emergência, está conectado no lado dorsal, por curta seção no extremo posterior da cumeeira dorsal mediana, e entre as caixas das pernas. Para montar o cefalotórax, estas conexões devem ser quebradas. Uma vez feito isso, o cefalotórax é separado de modo que estava interno na pele agora encontra-se deitado contra a lâmina. Nesta posição, a área ventral será medial e a cumeeira dorsal para cima do restante da pele se já não estiver nesta posição. As trompas devem ser dirigidas lateralmente. Neste retirado com pequenos rolinhos de papel.

Pequena quantidade de entellan, foi aplicado sobre o espécime, e deixar para secar por toda a noite. As lâminas foram mantidas cobertas para prevenir acúmulo de poeira no meio de montagem.

3. Resultados e Discussão

Nos primeiros meses do estágio, as atividades foram de manutenção de anofelinos e outros culicídeos em laboratório para treinamento. Também foram desenvolvidas atividades de manutenção de colônia de *Aedes aegypti*. Após o domínio das técnicas de manutenção das larvas, iniciaram-se as coletas em campo para a manutenção das larvas e posterior uso dos alados para o preparo das lâminas das genitálias dos machos, foram coletados 186 mosquitos do gênero de *Anopheles nuneztovari*.

Do material coletado, foram congelados 30 exemplares de anofelinos que mostraram ser de *Anopheles nuneztovari* s.l. . Durante o processo de preparação das genitálias foram perdidos 13 exemplares, sendo preparadas 17 lâminas, as quais mostraram qualidade para análise. Destas, 11 lâminas tiveram que ser separadas, pois mostraram terminália de *Anopheles triannulatus*.

Do material separado, 5 lâminas mostraram qualidade ótima para análise sendo possível visualizar o edeago e o claspete ventral. A figura 3 mostra o aspecto geral da morfologia externa da genitália masculina de *Anopheles nuneztovari* s.l., após a retirada do edeago, em vista ventral. Na figura 4 está representada uma lâmina mostrando o aspecto geral de um dos gonostilo da parte externa da genitália masculina de *Anopheles nuneztovari* s.l. , após retirada do edeago e o claspete ventral, em vista ventral.

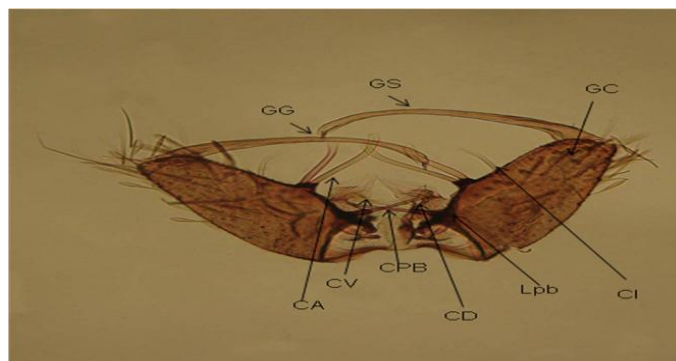


Figura 3. Aspecto geral da morfologia externa da genitália masculina De *Anopheles nuneztovari* s.l. , após retirado do Edeago, em vista ventral. GG:Garra do Gonostilo ;Gs: Gonostilo ;Gc: Gonocoxito; CI: Espinho Interno;Lpb:Lobo Parabasal;CD:Claspete Dorsal; CPb: Cerda Parabasal CV: Claspete Ventral.;CA: Cerdas Assessórias.

4. Conclusão

Os dados permitem verificar que pela análise morfológica há evidência de que provavelmente coexistem em Manaus duas espécies. Porém, para uma afirmação mais definitiva, é necessário ampliar as amostragens, considerando o material que pode ser obtido a partir das coletas de alados e desovas individuais. A partir da amostragem representativa será possível inferir, com mais precisão, áreas de ocorrência das espécies no âmbito da área peri-urbana de Manaus, considerando os bairros individualmente

5. Referências

- Arruda, M.; Carvalho, M. B.; Nussenzweig, R.S.; Maracic, M.; Ferreira, A.W.; Cochrane, A.H. 1986. Potential vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in the Northern Brazil identified by immunoassay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35 (5): 873-881.
- Kitzmiller, J.B.; Kreutzer, R.D.; Tallafero, E. 1973. Chromosomal differences in populations of *Anopheles nuneztovari*. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 48: 435-445.
- Tadei, W.P. 1980. Diferenças cromossômicas entre espécies e populações de *Anopheles*. *Acta Amazônica.* 10(2): 369-377.
- Narang, S.K.; Toniolo, S.R.; Seawright, J.A.; Kaiser, P.E. 1989. Genetic differentiation among sibling species A, B and C of the *Anopheles quadrimaculatus* complex (Diptera: Culicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 82 (4): 508-515.
- Wilkerson, R.C., Parsons, T.J., Albright, D.G., Klein, T.A., Braun, M.J. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera: Culicidae: *Anopheles*). *Insect Mol. Biol.* 1: 205-211.
- Wilkerson, R.C., Parsons, T.J., Klein, T.A., Gaffigan, T.V., Bergo, E. & Consolim, J. 1995. Diagnosis by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction of four cryptic species related to *Anopheles albitarsis* from Paraguay, Argentina and Brazil. *J. Med. Entomol.* 32: 697-704.
- Rosa-Freitas, M.G. 1989. *Anopheles (Nyssorhynchus) deaneorum*, a new species in the *albitarsis* complex (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 84 (4): 535-543.
- Tadei, W.P.; Dutary-Thatcher, B.; Santos, J.M.M.; Scarpassa, V.M.; Rodrigues, I.B.; Rafael, M.S. 1998. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59: 325-335.
- Tadei, W.P.; Dutary-Thatcher, B. 2000. Malaria vectors in Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 42 (2): 87-94.
- Póvoa, M.M.; Wirtz, R.A.; Lacerda, R.N.L.; Miles, M.A.; Warhust, D. 2001. Malaria vectors in the Municipality of Serra do Navio, State of Amapá, Amazon Region, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 96(6): 179-184.
- Galardo, A.K.R.; Arruda, M.; D'Almeida, A.R.C.; Wirtz, R.; Lounibos, L.P.; Zimmerman, R.H.; 2007. Malaria vector incrimination in three rural riverine villages in the Brazilian Amazon. *Am. J. Trop. Hyg.*, 76(3): 461-469
- Forattini, Oswaldo Paulo. *Culicidologia Médica*. São Paulo 2002. v.2 p. 255-276.