

Análise de Parâmetros Biológicos envolvidos na Manutenção de Colônias de Anofelinos em Laboratório.

Hellen Mar de Oliveira PEREIRA¹; Wanderli Pedro TADEI²; Iléia BRANDÃO³

¹Bolsista PIBIC/CNPq/CTEPETRO/INPA; ²Orientador CPCS /INPA; ³Coorientadora.

1. INTRODUÇÃO

A malária é uma doença que ocorre, predominantemente, na região tropical do globo terrestre e causa problemas sociais e econômicos nas áreas em que é registrada. A malária também é conhecida por paludismo, sendo considerado um grave problema de Saúde Pública em mais de 100 países e aproximadamente 2,4 bilhões de pessoas (40% da população mundial) vivem em áreas de risco. Anualmente, sobretudo no continente africano, entre 300 a 500 milhões de pessoas são infectadas, dos quais cerca de um milhão a um milhão e meio morrem em consequência da doença (WHO, 2008).

No Brasil, a malária ocorre principalmente na região amazônica. Este fato decorre da grande extensão territorial da área, que favorece as distâncias entre os povoados, juntamente com o transporte fluvial lento expondo as pessoas ao vetor. As condições ambientais favorecem a procriação do vetor, o que intensifica o contato com o homem tornando difícil o controle da malária nessa região (Tadei *et al.*, 1993, 1998).

O homem adquire esta parasitose em decorrência da atividade hematofágica dos culicídeos pertencentes ao gênero *Anopheles* Meigen, 1818. Dentre as espécies de anofelinos de importância epidemiológica para o Brasil destaca-se o *Anopheles darlingi* Root, 1926, considerado o principal vetor da malária no país, devido a sua acentuada preferência para o repasto sanguíneo em humanos (Tadei *et al.*, 1998).

A criação de anofelinos em laboratório é importante para o desenvolvimento de pesquisa em malária já que grande parte dos trabalhos recentemente publicados requer maior conhecimento da interação vetor / parasito. Por outro lado, apesar de alguns autores (Buralli e Bergo 1988) terem se dedicado à criação de anofelinos em laboratório, certas espécies, aparentemente, são pouco exigentes quanto às condições de manutenção, e isso se deve ao seu desenvolvimento condicionado a um alto grau de especialização ecológica, biocenoses e reprodução (Coluzzi, 1964).

Neste trabalho está sendo analisada a interação de algumas espécies de anofelinos, bem como verificar se essas espécies possam gerar descendentes por muitas gerações em Laboratório, objetivando a manutenção de uma colônia permanente de anofelinos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Descrição da área de estudo

Os pontos de coletas de larvas e de pupas de *Anopheles* sp foram em criadouros situados em diferentes localidades da Zona Leste de Manaus (Ramal do Brasileirinho e Estrada do Puraquequara).

2.2 - Coletas

As coletas de larvas e pupas foram realizadas pela manhã nos horários entre 7:00 – 12:00h. As coletas foram realizadas com a metodologia de conchadas às margens dos criadouros naturais e artificiais. Com auxílio de um conta gotas todos os estádios larvais foram armazenados em tubos de plásticos do tipo Falcon de 50 mL e depois colocados em vasilhames plásticos para o transporte ao Laboratório de Malária e Dengue do INPA. Em seguida, o material foi trabalhado no insetário para a manutenção das larvas em cubas especiais e alimentadas até atingirem o estágio de pupa e a emergência dos alados.

2.3 - Manutenção de anofelinos em laboratório

No laboratório, diariamente, foram realizadas as contagens e a separação das larvas procedentes do campo e mantidas nas cubas para o desenvolvimento. Procedeu-se a devida alimentação das mesmas até atingirem o estágio adulto. Na alimentação utilizou-se ração Tetramin e Gold Fish (1:1) triturada até obter um pó muito fino. As bacias foram trabalhadas diariamente para se retirar o excesso de alimentos que se depositavam no fundo. Esta limpeza da água é importante para não haver a formação de bactérias que originam uma película sobre a água, afetando o desenvolvimento das larvas para atingirem o estágio adulto, pois dificulta a respiração das mesmas (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994; Gorham *et al.*, 1967).

Diariamente eram retiradas e contadas as pupas, sendo posteriormente colocadas em gaiolas plásticas contendo em sua base um pote de 200 ml com água e pupas recolhidas para eclosão dos adultos. Estes, à medida que emergiam, eram contados quanto à proporção de machos e fêmeas e posteriormente colocados em uma sala, onde foi realizada a manutenção dos adultos.

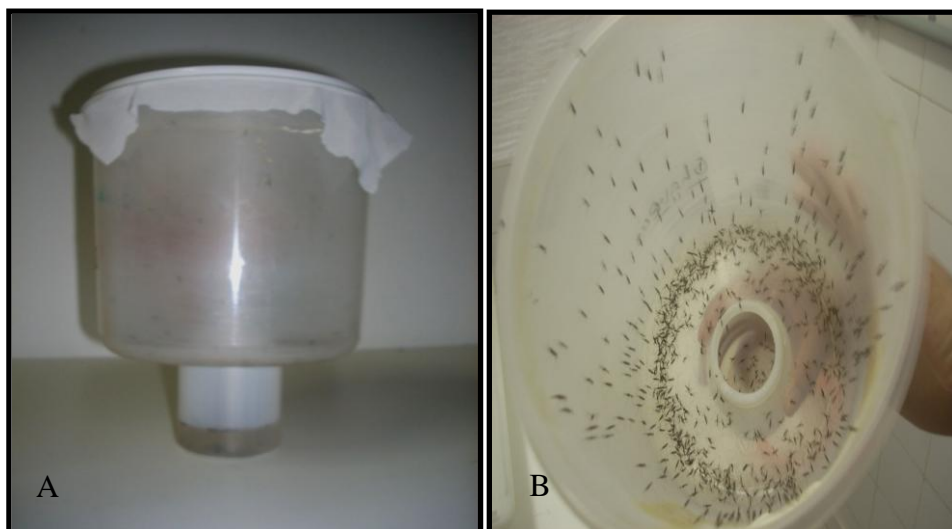


Figura 1. Gaiolas plásticas utilizadas para a eclosão dos adultos. (A) Gaiola plástica (B) Adulto vista aérea.

2.4 - Sala Teste de Manutenção dos adultos para obtenção de cópulas e desovas

Os adultos foram acondicionados em uma sala teste medindo 3 m x 3 m, vedada hermeticamente com portas duplas de pano e zíper de metal para evitar a passagem de possíveis predadores de mosquitos. No interior da sala teste foi colocada uma mesa de madeira onde foram colocadas bacias plásticas com água revestidas na borda com papel de filtro simulando um criadouro para a oviposição. Também foi colocado um pano escuro para atividade de repouso dos mosquitos. Adicionalmente foram colocados em recipiente de vidro tipo becker de 1000 ml contendo água, e esses foram mantidos sobre papel cartão preto para dar impressão de profundidade e nas bordas eram colocados papel filtro para a oviposição das fêmeas.

Durante 24h de emergência, a alimentação dos adultos machos e fêmeas foi ofertado uma solução açucarada 10% enquanto estavam nas gaiolas menores. Quando os mesmos foram transferidos para gaiolas teste a água açucarada foi substituída por Mel a base de glucose de milho marca Karo 20% durante 48h. Após terminada tempo de alimentação açucarada retirou-se o açúcar e esperou-se 6h e em seguida foi oferecido o repasto sanguíneo para as fêmeas. O sangue oferecido foi de camundongo (*Mus musculus*) recém nascido.

Todo procedimento em gaiolas pequenas e teste foi mantido em condições de temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de 80% e fotoperíodo de aproximadamente 12D:12N.

2.5 - Inseminação artificial em *Anopheles* spp

As fêmeas de mosquitos, não fertilizadas e previamente alimentadas com sangue de pato (*Anas platyrhyncho*) foram utilizadas na indução de cópula. Essa técnica tem por objetivo manter colônias em laboratório de espécies eurígamas.

A cópula foi obtida por manipulação da fêmea, observada em microscópio-estereoscópio (lupa), Para isso, o macho foi decapitado e fixado pelo tórax usando um estilete entomológico (Figura 2). Subsequentemente, a fêmea foi presa pela face lateral do tórax, com auxílio de uma pinça de relojoeiro e imobilizada com éter. A manipulação da fêmea consistia em tocar sua terminália na genitália do macho, a um ângulo de 45° com a finalidade de que ocorra a inseminação (Figura 3).

Terminada a cópula as fêmeas foram transferidas para copos parafinados de 500mL e mantidas no insetário sob temperatura controlada com uma variação entre $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa em torno de 80%.

Após 72 horas de inseminação, ocorreu a postura dos ovos os quais foram colocados em copos de plásticos para eclosão.

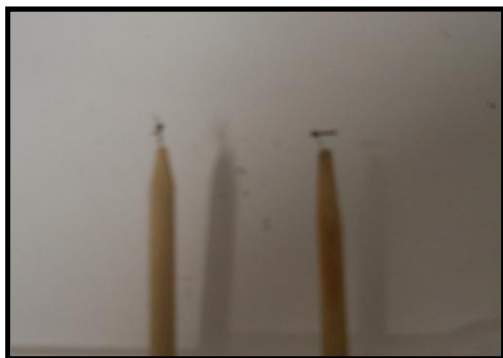


Figura 2. Realização da inseminação artificial. Macho de *Anopheles* decapitado.



Figura 3. Realização da inseminação artificial. Encontro da terminália do macho com a extremidade abdominal da fêmea.

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas trinta excursões em 7 localidades na Estrada do Puraquequara- onde apresentavam criadouros de anofelinos. Foram capturadas um total de 12.144 larvas sendo 3.773 L1, 1.3.087 L2, 2.372 L3 e 2.912 L4 e 2.905 Pupa. Dessas emergiram um total de 969 machos e 1.036 fêmeas. Durante a manutenção dos mosquitos coletado em campo, registrou-se uma mortalidade alta das larvas nos diferentes estádios. Isto dificultou o experimento na sala teste.

Mesmo assim, os dois mil e cinco mosquitos foram liberados na sala teste para permitir a cópula e posterior observação de desovas. Após a liberação foram realizadas observações do comportamento das fêmeas e machos no final da tarde e início do crepúsculo. As três observações realizadas não evidenciaram o movimento em enxame dos mosquitos que precede a cópula na natureza.

Tabela 1. Números de imaturos e adultos. Anofelinos mantidos no insetário para formação de colônia.

Fases / Leituras	Imaturo				Total	Pupa	Adulto	
	L1	L2	L3	L4			Fêmea	Macho
1	629	883	337	526	2375	578	227	172
2	1159	397	411	1022	2989	711	228	263
3	190	0	122	158	470	103	29	42
4	1666	1704	1405	1020	5795	1397	503	461
5	129	103	97	186	515	116	49	31
	3773	3087	2372	2912	12144	2905	1036	969

Em seqüência às atividades, foram realizadas ações objetivando obter a inseminação artificial por meio da cópula induzida. Estas foram realizadas com auxílio de um microscópio-esterocópio, Foram realizadas até o momento 20 inseminações e obtidas 2 oviposições. Destas não foi verificada a presença do embrião nos ovos. Portanto, ainda não foi possível com cópula induzida obter-se ovos férteis.

4 - Conclusões

As atividades desenvolvidas até o momento permitiram aprimorar a metodologia de manutenção das larvas procedentes da natureza, obtendo uma maior emergência de alados.

Os dados para se obter cópulas na sala teste não mostraram o enxameamento dos mosquitos no final da tarde e nenhuma desova foi obtida a partir das fêmeas que permaneceram na sala teste.

Em relação à cópula induzida para se obter a inseminação artificial, foi possível realizar 20 cópulas induzidas, em que foi efetiva a junção de machos e fêmeas. Destas, duas fêmeas realizaram a oviposição, porém os ovos não eclodiram. A análise da espermateca das fêmeas não mostrou a presença de espermatozoides.

As atividades estão sendo continuadas objetivando ampliar o número de indução de cópulas para se observar a eclosão dos ovos.

5. REFERÊNCIAS

Buralli G. M; Bergo E. S. 1988. Manutenção de colônia de *Anopheles darlingi* Root, 1926, em laboratório. *Rev. Inst. Med. Trop.* 30(3) 157-164.

Coluzzi, M. 1964. Maintenance of laboratory Colonies of *Anopheles* mosquitoes. *Bull. Wld. Hith. Org.* 31: 441-443.

Consoli, R.A.G.B.; Lourenço-de-Oliveira, R. 1994. *Principais mosquitos de Importância sanitária no Brasil*. Fundação Oswaldo Cruz, Editora FIOCRUZ – Rio de Janeiro, RJ, Brasil. 225pp.

Tadei, W. P.; Santos, J. M. M.; Scarpassa, V. M.; Rodrigues, I. B. 1993. Incidência, distribuição e aspectos ecológicos de espécies de *Anopheles* (Diptera: Culicidae), em regiões naturais e sob impacto ambiental da Amazônia Brasileira. *In: Bases científicas para estratégias de preservação e desenvolvimento da Amazônia.*, Ferreira, E.J.G.; Santos, G.M.; Leão, E.L.M.; Oliveira, L. A. Vol. 2. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus. Amazonas p. 167-196.

Tadei, W. P.; Thatcher, B.D.; Santos, J.M.M.; Scarpassa, V.M.; Rodrigues, J.B.; Rafael, M.S. 1998. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop. Méd. Hyg.*, 59(2): 325-335.

WHO – World Health Organization. 2008. *World Malaria Report 2008*.WHO/HTM/GMP/2008.1 190p.