



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
BIOLOGIA DE AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DO  
COMPLEXO *ANOPHELES ALBITARSIS* (DIPTERA, CULICIDAE,  
ANOPHELINAE) COLETADAS EM DOIS MUNICÍPIOS DA  
AMAZÔNIA BRASILEIRA, COM ANÁLISE DA  
SUSCETIBILIDADE NATURAL A PLASMÓDIOS HUMANOS.**

ANA DE NAZARÉ MARTINS DA SILVA

Belém – Pará

2010

ANA DE NAZARÉ MARTINS DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DO COMPLEXO  
*ANOPHELES ALBITARSIS* (DIPTERA, CULICIDAE,  
ANOPHELINAE) COLETADAS EM DOIS MUNICÍPIOS DA  
AMAZÔNIA BRASILEIRA, COM ANÁLISE DA  
SUSCETIBILIDADE NATURAL A PLASMÓDIOS HUMANOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

**Orientadora:** Dra. Marinete Marins Póvoa

**Co-orientadora:** Dra. Edna Aoba Yassui Ishikawa

Belém - Pará

2010

ANA DE NAZARÉ MARTINS DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DO COMPLEXO  
*ANOPHELES ALBITARSIS* (DIPTERA, CULICIDAE, ANOPHELINAE),  
COLETADAS EM DOIS MUNICÍPIOS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA, COM  
ANÁLISE DA SUSCETIBILIDADE NATURAL A PLASMÓDIOS HUMANOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

**Orientadora: Profa. Dra. Marinete Marins Póvoa** (Presidente)  
Instituto Evandro Chagas

**Co-orientadora: Profa. Dra. Edna Aoba Yassui Ishikawa**  
Universidade Federal do Pará

**Banca examinadora:**

**Prof. Dr. Edvaldo Carlos Brito Loureiro** (Membro)  
Instituto Evandro Chagas

**Profa. Dra. Jeannie Nascimento dos Santos**  
(Membro)  
Universidade Federal do Pará

**Profa. Dra. Mônica Cristina Moraes Silva** (Membro)  
Instituto Evandro Chagas

**Prof. Dr. Allan Kardeck Ribeiro Galardo** (Membro)  
Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do  
Estado do Amapá – IEPA

**Profa. Dra. Rosana Maria Feio Libonati** (suplente)  
Universidade Federal do Pará

Belém, 03 de dezembro de 2010

***“When it comes to anophelines, it may be said that their Creator had an inordinate fondness for sibling species”.***

(Krzywinski & Besansky, 2003. p.121).

Dedico este trabalho a minha mãe **Maria Dalva**, que com força e coragem assumiu sozinha a criação de suas cinco filhas.

A memória de meu amado pai **Edgar Firmino**.

## **AGRADECIMENTOS**

- Ao meu Senhor e meu Deus. Meu porto seguro nos momentos difíceis. Aquele que sonha meus sonhos;
- A minha orientadora, Dra. Marinete Póvoa pela formação científica. Sua força e determinação são espelhos para mim;
- A minha Co-orientadora Dra. Edna Ishikawa pela carinhosa atenção e paciência na execução dos testes de PCR em seu laboratório. Minha eterna gratidão;
- A Universidade Federal do Pará, em especial ao Núcleo de Medicina Tropical, onde tenho vínculo profissional;
- Ao Instituto Evandro Chagas pelo apoio institucional desde o mestrado. Minha instituição do coração;
- Aos técnicos e amigos do laboratório de Entomologia do IEC: Raimundo Lessa, Deocleciano Galiza, José Abud, Izis Sucupira, Edvaldo Santa Rosa, Nilzilene e Criciane;
- A Gisele Rachid, responsável pelo laboratório de biologia molecular de malária do IEC, pelo apoio e discussão durante a padronização da PCR;
- Ao Dr. Allan Galardo, pelo apoio em Macapá, disponibilizando o laboratório de entomologia do IEPA;
- Ao Sr. Alexandre proprietário da Fazenda Urucuri pela autorização dos trabalhos na Fazenda no município de Peixe Boi;
- A Sra. Waldenira de Jesus, bibliotecária do Núcleo de Medicina Tropical, pela confecção da ficha catalográfica;
- Ao meu esposo Salathiel Freitas pelo amor dedicado e suporte emocional;
- Ao amigo e conselheiro Dr. Habib Fraiha. Meu convívio com o senhor é presente de Deus;
- A Irmã agostiniana Antonia Eribe, pelas preciosas orações intercessórias fundamentais para minha jornada.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	9
<b>RESUMO</b>	11
<b>ABSTRAT</b>	12
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	13
1.1 MALÁRIA HUMANA	13
1.2 VETORES DE MALÁRIA HUMANA	15
<b>1.2.1 Ciclo biológico</b>	<b>15</b>
<b>1.2.2 Classificação taxonômica</b>	<b>16</b>
<b>1.2.3 Complexos de espécies crípticas</b>	<b>18</b>
<b>1.2.4 Metodologias utilizadas para o estudo de complexo de espécies</b>	20
1.2.4.1 Cruzamentos	20
1.2.4.2 Citogenética	23
1.2.4.3 Análises enzimáticas	25
1.2.4.4 Técnicas baseadas em análise de DNA	26
1.3 O COMPLEXO <i>ANOPHELES ALBITARSIS</i>	29
<b>1.3.1 Identificação morfológica</b>	<b>29</b>
<b>1.3.2 Espécies que compõem o complexo <i>An. albitarsis</i></b>	<b>31</b>
<b>1.3.3 Distribuição geográfica</b>	<b>33</b>
<b>1.3.4 Importância vetorial</b>	<b>35</b>
<b>1.4 OBJETIVOS</b>	<b>38</b>
1.4.1 Objetivo geral	38
1.4.2 Objetivos específicos	38
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	39
2.1 ÁREAS DE ESTUDO	39
2.1.1 Município de Macapá	39
2.1.2 Município de Peixe-Boi	42
2.2 COLETAS DE MOSQUITOS	44
2.3 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA	45
2.4 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PICADA POR HOMEM E POR HORA (IPHH)	45
2.5 ANÁLISE DOS OVÁRIOS E DETERINAÇÃO DA TAXA DE PARIDADE	45
2.6 ANÁLISE MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DO COMPLEXO <i>AN. ALBITARSIS</i>	46
2.6.1 Obtenção do DNA	46
2.6.2 Amplificação da seqüência do ITS2	45

2.7	PESQUISA DA PROTEÍNA CS POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) .....	52
2.8	ASPECTOS ÉTICOS .....	53
<b>3</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>54</b>
3.1	MUNICÍPIO DE MACAPÁ, AP.....	54
3.1.1	<b>Capturas .....</b>	<b>54</b>
3.1.2	<b>Anofelinos coletados .....</b>	<b>52</b>
3.1.3	<b>Análise dos ovários determinação da taxa de paridade.....</b>	<b>59</b>
3.1.4	<b>Análise molecular para a identificação das espécies do complexo <i>An. albitarsis</i> .....</b>	<b>58</b>
3.1.4.1	Iniciador AlbCD .....	61
3.1.4.2	Iniciador AlbC e F .....	63
3.1.4.3	Iniciador AlbB .....	65
3.1.4.4	Iniciador AlbA .....	66
3.1.5	<b>Pesquisa da proteína CS por ensaio imunoenzimático (ELISA) .....</b>	<b>66</b>
3.2	MUNICÍPIO DE PEIXE BOI, PA.....	67
3.2.1	<b>Capturas .....</b>	<b>67</b>
3.2.2	<b>Anofelinos coletados .....</b>	<b>68</b>
3.2.3	<b>Análise dos ovários e determinação da taxa de paridade ....</b>	<b>69</b>
3.2.4	<b>Pesquisa da proteína CS por ensaio imunoenzimático (ELISA) .....</b>	<b>70</b>
3.2.5	<b>Análise molecular para a identificação das espécies do complexo <i>An. albitarsis</i>. .....</b>	<b>70</b>
3.2.5.1	Iniciador AlbCD .....	70
3.2.5.2	Iniciador albB .....	71
3.2.6	<b>Pesquisa da proteína CS por ensaio imunoenzimático (ELISA) .....</b>	<b>72</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>73</b>
4.1	ANOFELINOS DE MACAPÁ, AP.....	73
4.2	ANOFELINOS DE PEIXE BOI, PA.....	81
4.3	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS <i>An. albitarsis s.l.</i> DE MACAPÁ, AP.....	84
4.4	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS <i>An. albitarsis s.l.</i> DE PEIXE-BOI, PA.....	88
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>89</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>91</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>121</b>



## LISTA DE FIGURAS

		Página
<b>Figura 1</b>	Procedimento utilizado para a realização de experimentos de hibridização (cruzamento em laboratório).	23
<b>Figura 2</b>	Estrutura do DNA ribossomal ITS	28
<b>Figura 3</b>	Aspectos morfológicos de <i>An. albitarsis s.l.</i>	30
<b>Figura 4</b>	Localização da Fazenda Kerginaldo, comunidade Lagoa dos índios, Macapá, Amapá.	41
<b>Figura 5</b>	Localização da Fazenda Urucuri, Peixe-Boi, Pará.	43
<b>Figura 6</b>	Esquema de identificação das espécies de complexo <i>albitarsis</i> , a partir de rDNA (ISTS-2).	50
<b>Figura 7</b>	Casos de malária, precipitação total e médias da umidade relativa do ar (URA) de Macapá no período de janeiro a dezembro de 2009.	54
<b>Figura 8</b>	Casos de malária, precipitação total e, médias da umidade relativa do ar (URA) de Macapá no período de janeiro a abril de 2010.	55
<b>Figura 9</b>	Anofelinos coletados na comunidade Lagoa dos índios Macapá, no período menos chuvoso (dias 21 e 23/9/09).	57
<b>Figura 10</b>	Anofelinos coletados na Comunidade Lagoa dos índios, Macapá, no período mais chuvoso (dias 01 e 3/2 e 5 e 7/4/10).	58
<b>Figura 11</b>	Índice de Picada homem hora – IPHH das espécies capturadas na Comunidade Lagoa dos índios, Macapá, nos períodos menos chuvoso (21 e 23/09) e mais chuvoso (01 e 3/2/10 e 05 e 07/04/10).	59
<b>Figura 12</b>	Microscopia de luz de ovários de fêmeas de <i>An. marajoara</i> coletadas na comunidade Lagoa dos Índios, Macapá.	60
<b>Figura 13</b>	Paridade de <i>An. marajoara</i> coletado na comunidade Lagoa dos Índios, Macapá, nos períodos menos chuvoso (dias 21 e 23/09 ) e mais chuvoso (dias 01 e 3/02 e 5 e 7/04/10).	61
<b>Figura 14</b>	Perfil de amplificação do fragmento do ITS2 pelo iniciador AlbCD em combinação com ITS2F e ITS2R, em gel de agarose a 1,5%.	62
<b>Figura 15</b>	Perfil de amplificação do fragmento do ITS2 pelo iniciador AlbCD em combinação com ITS2F e ITS2R, em gel de poliacrilamida.	63
<b>Figura 16</b>	Perfil de amplificação do fragmento do ITS2 pelo iniciador	64

	AlbC e AlbF em combinação com ITS2F e ITS2R, em gel de agarose a 1,5%.	
<b>Figura 17</b>	Perfil de amplificação do fragmento do ITS2 pelo iniciador AlbB em combinação com ITS2F e ITS2R, em gel de agarose a 1,5%.	65
<b>Figura 18</b>	Perfil de amplificação do fragmento do ITS2 pelo iniciador AlbA em combinação com ITS2F e ITS2R, em gel de agarose a 1,5%.	66
<b>Figura 19</b>	Precipitação total e, médias da umidade relativa do ar (URA) da estação de Tracuateua, Pará, no período de janeiro de 2009 a abril de 2010.	68
<b>Figura 20</b>	Perfil de amplificação do fragmento do ITS2 pelo iniciador AlbCD em combinação com ITS2F e ITS2R, em gel de agarose a 1,5%	70
<b>Figura 21</b>	Perfil de amplificação do fragmento do ITS2 pelo iniciador AlbB em combinação com ITS2F e ITS2R, em gel de agarose a 1,5%.	71
<b>Figura 22</b>	Perfil de amplificação do fragmento do ITS2 pelo iniciador AlbB em combinação com ITS2F e ITS2R, em gel de poliacrilamida.	72

## RESUMO

Anofelinos membros de complexos de espécies crípticas podem exibir diferenças comportamentais, de susceptibilidade a infecção malárica, e resistência a inseticidas. Assim, a identificação de espécies vetoras tem relevância epidemiológica, o que nem sempre é possível por critérios morfológicos. Métodos alternativos têm sido empregados para tal, como os que analisam regiões altamente conservadas do DNA ribossômico, variável entre as espécies, conhecidas como espaçadoras internas transcritas (ITS). Considera-se atualmente que o complexo *Anopheles albitarsis* seja composto por seis espécies: *An. albitarsis* s.s., *An. oryzalimnetes*, *An. albitarsis* F, *An. marajoara*, *An. deaneorum*, e *An. janconnae*. Destas, pelo menos as três últimas são incriminadas como vetores de malária na Amazônia brasileira. O objetivo deste estudo foi realizar identificação molecular de espécies do complexo *An. albitarsis*, por análise da seqüências do ITS2 do rDNA, com vistas a analisar sua importância na transmissão de malária nos municípios de Macapá, Amapá e Peixe-Boi, Pará, inclusive investigando pela primeira vez a ocorrência do *An. albitarsis* F nestas duas áreas epidemiologicamente distintas: a primeira com histórico de alto risco de transmissão de malária e a segunda não. O estudo foi realizado entre janeiro de 2009 e abril de 2010, e consistiu de capturas de anofelinos de 12 horas de duração (ecostofase) no peridomicílio. Todas as fêmeas coletadas foram morfológicamente identificadas e apenas os *An. albitarsis* s.l. tiveram cabeça e tórax separadas para análise da infecção natural por ELISA; ovários para análise de paridade e patas, asas e carcaça para identificação molecular. Em Macapá foram realizadas seis coletas, obtendo-se um total de 584 anofelinos, sendo 366 *An. albitarsis* s.l. (62,7%), 167 *An. darlingi* (28,6%), 33 *An. triannulatus* s.l. (5,6%), 15 *An. braziliensis* (2,6%) e 3 *An. nuneztovari* (0,5%). Pela PCR foi possível visualizar a banda específica de *An. marajoara* em 320 espécimes dos *An. albitarsis* s.l. testados. Do restante, 33 foram negativos e 13 amplificaram um fragmento de ~490 pb nos iniciadores empregados, não permitindo chegar ao diagnóstico específico. O *An. marajoara* apresentou características biológicas e comportamentais que ratificam sua importância epidemiológica na transmissão de malária em Macapá, tais como: ser a espécie mais prevalente, com maior proporção de fêmeas paridas (73,0%), e portanto com maiores chances de se infectarem com o plasmódio, ocorrer tanto na estação menos quanto na mais chuvosa, e apresentar atividade hematofágica durante toda a ecostofase, além disso, foi encontrado naturalmente infectado por *P. vivax* e *P. falciparum* (taxa de infecção natural de 3,1%). Em Peixe-Boi, foram capturados 43 anofelinos: *An. triannulatus* s.l. (20 espécimes, 46,5%), *An. albitarsis* s.l. (13: 30,2%), *An. darlingi* (8: 18,6%), e *An. nuneztovari* (2: 4,7%). Todos os *An. albitarsis* s.l. coletados foram identificados pela ITS2 como *An. oryzalimnetes*. Nenhum deles foi encontrado infectado pelos plasmódios testados, e a maioria das fêmeas era parida (84,6%). São necessários levantamentos entomológicos sistemáticos que analisem a importância deste anofelino na transmissão de malária na cidade. O *An. albitarsis* F não foi encontrado nas duas áreas estudadas. Nossos resultados contribuem para o entendimento da epidemiologia da malária na região Amazônica brasileira.

## ABSTRACT

Members of *Anopheles* cryptic species complexes may exhibit behavioral differences among them, the susceptibility to malaria infection, and resistance to insecticides, thus, the specific identification has epidemiological relevance, which is not always possible by morphological criteria. Alternative methods have been employed such as those that analyze highly conserved regions of ribosomal DNA, which varies among species, known as internal transcribed spacer (ITS). *Anopheles albitarsis* complex is currently composed of six species: *An. albitarsis* s.s., *An. oryzalimnetes*, *An. albitarsis* F, *An. marajoara*, *An. deaneorum* and *An. janconnae*. At least the last three are incriminated as malaria parasite vectors in the Brazilian Amazon. The aim of this study was to perform molecular identification of *An. albitarsis* complex species, for analysis of ITS2 rDNA sequences, in order to assess their importance in malaria transmission in the cities of Macapá, Amapá and Peixe-Boi, Para, including investigating the first time the occurrence of *An. Albitarsis* F in two epidemiologically distinct areas: the first with a history of high risk of malaria transmission and the second not (Peixe-Boi). All-night human landing catches of mosquitoes were carried out in the peridomestic environment, from January 2009 and April 2010. The females collected were morphologically identified and only *An. albitarsis* s.l. was dissected: head and thorax were separated for analysis of natural infection by ELISA; ovaries for parity analysis and the carcass, legs and wings for molecular identification. In Macapá were collected 584 mosquitoes: 366 *An. albitarsis* s.l. (62.7%), 167 *An. darlingi* (28.6%), 33 *An. triannulatus* s.l. (5.6%), 15 *An. braziliensis* (2.6%) and 3 *An. nuneztovari* (0.5%). It was possible to visualize the specific band *An. marajoara* in 320 specimens of *An. albitarsis* s.l. tested. Of the remainder, 33 were negative and 13 amplified a fragment of ~ 490pb, not allowing to reach the specific diagnosis. The *An. marajoara* specimens showed biological and behavioral characteristics that confirm their epidemiological importance in malaria transmission in Macapá, such as being the most prevalent species, with a higher proportion of parous females (73.0%), and therefore with the greatest chances of infected with *Plasmodium*, occur in both seasons (dry and wet), presenting biting activity in all hours worked, moreover, was found infected by *P. vivax* and *P. falciparum* (natural infection rate of 3.1%). In Peixe-Boi, were captured 43 anophelines: *An. triannulatus* s.l. (20 specimens, 46.5%), *An. albitarsis* s.l. (13, 30.2%) *An. darlingi* (8, 18.6%), and *An. nuneztovari* (2, 4.7%). All *An. albitarsis* s.l. collected were identified by ITS2 as *An. oryzalimnetes*. None was found infected by *Plasmodium*, and the vast majority was parous females (84.6%). Systematic entomological surveys are needed to analyse the importance of *An. oryzalimnetes* in malaria transmission in the city. The *An. albitarsis* F was not found in the two areas studied. Our results contribute to our understanding of the epidemiology of malaria in the Brazilian Amazon region.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 MALÁRIA HUMANA

A malária humana é causada por espécies de protozoários do gênero *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* (Bruce-Chwatt, 1988). Mais recentemente, casos da doença foram atribuídos também ao *P. knowlesi* (Cox-Singh & Singh, 2009).

Por divergências detectadas na seqüência nucleotídica do gene da proteína Circunsporozoita (CS) em isolados de *P.vivax*, reconhece-se três variantes desta espécie: a VK 210 (*P.vivax* clássico), a VK 247 (Mann *et al.*, 1995; Rosenberg *et al.*, 1989; Lim *et al.*, 2001) e a *P. vivax-like* (Qari *et al.*, 1993).

As espécies de plasmódio alternam seu ciclo de desenvolvimento entre o homem (hospedeiro vertebrado), onde se reproduzem assexuadamente por esquizogonia, e mosquitos do gênero *Anopheles*, em cujo organismo se realiza a reprodução sexuada do parasito por esporogonia (Vlachou *et al.*, 2006; Sinden, 2009).

A ocorrência de esplenomegalia, um sinal clínico da malária em múmias datadas de 3.000 anos, sugere que a relação desta doença com a humanidade é bastante antiga (Bruce-Chwatt, 1988). É considerada na atualidade uma das mais devastadoras protozooses que afetam o planeta, com impacto principal no Sub-Saara africano (Breman *et al.*, 2004; Hay *et al.*, 2009).

Consideram-se como fatores que favorecem a manutenção e o aumento da casuística: 1) **biológicos**: resistência dos plasmódios às drogas

antimaláricas e dos mosquitos aos inseticidas; 2) **sociais**: guerras e perturbações civis, migração e aumento da população; e 3) **ambientais**: mudanças no ambiente e no clima (Breman *et al.*, 2001; Greenwood & Mutabingwa, 2002; Paaijmans *et al.*, 2009).

No Brasil, a malária pode ser classificada como doença de baixa a média endemicidade e de distribuição heterogênea, pois é na Região Amazônica que ocorre a maioria dos registros, aproximadamente 99,5% da casuística nacional, com maior prevalência do *P. vivax* (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010). Em 2006, ocorreram 396.000 notificações por esta espécie, correspondendo a 73,4% do número total de casos da região (Situação epidemiológica da Malária no Brasil, ano de 2006. Disponível em: <<http://www.portal.saude.gov.br>>. Acesso em 26/08/2009).

São fatores que favorecem os altos índices da malária no Brasil, em particular na Amazônia: aumento da migração urbana e periurbana e a implantação de projetos de agricultura, mineração e hidroelétricos (Tadei *et al.*, 1998; Ferreira-Gonçalves & Alecrim, 2004; Castro *et al.*, 2006; Tauil, 2006). Considera-se ainda, a falta de conhecimento da ecologia e do comportamento dos mosquitos (Zimmerman, 1992), o desenvolvimento de resistência dos plasmódios aos antimaláricos (Couto *et al.*, 1995; Calvosa *et al.*, 2001; Vieira *et al.*, 2004; Anderson, 2009), e dos mosquitos aos inseticidas (Suarez *et al.*, 1990; Curtis, 2002).

## 1.2 VETORES DA MALÁRIA HUMANA

Os transmissores da malária humana são artrópodes da Classe Insecta, Ordem Diptera, Subordem Nematocera, Família Culicidae e Subfamília Anophelinae (Forattini, 1962).

### 1.2.1 Ciclo biológico

Os anofelinos são insetos holometábolos, por desenvolverem-se de ovo a adulto passando pelas fases de larva e de pupa (Forattini, 1962).

Seus ovos são ovais ou elípticos, possuem flutuadores, e têm simetria bilateral, sendo depositados isoladamente pelas fêmeas na superfície dos criadouros (Consoli & Oliveira, 1994).

As larvas são aquáticas, com aspecto "vermiforme", coloração variável e simetria bilateral. Possuem o corpo dividido em cabeça, tórax e abdômen, e durante seu desenvolvimento, que varia de 8 a 10 dias passam por quatro estádios ou mudas (larvas de 1<sup>o</sup> ao 4<sup>o</sup> estadio) (Forattini, 1962). O aparelho bucal das larvas é do tipo mastigador-raspador (Consoli & Oliveira, 1994).

A fase onde ocorre a metamorfose é chamada de pupa. Esta possui o corpo coberto por cerdas e dividido em cefalotórax (cabeça e tórax) e abdômen. É considerada larva de 4<sup>o</sup> estadio, mas sem aparelho bucal (não se alimenta). Respira pelas trombetas respiratórias, onde são encontrados os espiráculos (Consoli & Oliveira, 1994).

Do ambiente aquático emergem os indivíduos adultos (machos e fêmeas). Estes possuem o corpo coberto de escamas e cerdas, dividido em cabeça, tórax e abdômen. Na cabeça estão os principais órgãos dos sentidos:

olhos compostos, antenas (pilosas nos machos e plumosas nas fêmeas), palpos (longos em relação à probóscida), além do aparelho bucal tipo picador, ou pungitivo (probóscida, ou tromba), formada por 2 mandíbulas, 2 maxilas, hipofaringe (canal salivar) e labro (canal alimentar por onde passa o sangue puncionado). No tórax estão os apêndices de locomoção: pernas (2 anteriores, 2 médias e 2 posteriores) e duas asas funcionais (cobertas de escamas escuras e claras), além dos haltéres, ou balancins (asas vestigiais). Grande parte dos órgãos internos (aparelho digestivo, reprodutor e excretor) encontra-se no abdômen (Consoli & Oliveira, 1994).

As fêmeas de anofelinos além da ingestão de carboidratos (alimentação exclusiva do macho), necessitam das proteínas do sangue de animais para o desenvolvimento e maturação de seus ovos (Consoli & Oliveira, 1994). Espécies com preferência por sangue de animais (zoófilas) são encontradas com frequência no ambiente extradomiciliar (exófilas); enquanto as que preferem se alimentar em humanos (antropófilas) são capturadas habitualmente no peridomicílio (área próxima ao domicílio onde ocorre movimentação humana) e intradomicílio (endófilas) (Forattini, 1962).

### **1.2.2 Classificação taxonômica**

A classificação tradicional da Subfamília Anophelinae baseada em caracteres morfológicos considera este táxon constituído dos seguintes gêneros: *Anopheles*, *Chagasia* e *Bironella* (Harbach, 2004). De acordo com Sallum *et al.* (2000), análises morfológicas e moleculares, não distinguem este



último como um gênero, sendo considerado, pois um grupo monofilético dentro do Gênero *Anopheles*.

É no gênero *Anopheles*, de grande importância em saúde pública, que se encontram todos os vetores conhecidos da malária humana. São 444 espécies formalmente denominadas e distribuídas em sete subgêneros (Harbach, 1994; Harbach *et al.*, 2005): *Anopheles*, de distribuição cosmopolita; *Baimaia*, restrito ao sudeste da Ásia (Harbach *et al.*, 2005); *Cellia*, presente nas regiões Afrotropical, Oriental e Australiana; e aqueles encontrados somente na região Neotropical: *Stethomyia*, *Kerteszia*, *Nyssorhynchus* e *Lophopodomyia*.

No Brasil, espécies do subgênero *Nyssorhynchus* são consideradas importantes vetoras de malária humana:

- 1) *An. darlingi* Root, 1926, de grande susceptibilidade à infecção e ampla distribuição geográfica, considerado vetor primário de malária em muitas regiões da Amazônia (Rachou, 1958);
- 2) *An. aquasalis*, presente principalmente ao longo da zona costeira do país e regiões áridas do Nordeste, Pará e Amapá (Galvão *et al.* 1942; Deane, 1986; Póvoa *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2006, Fauna anofélica...; Silva *et al.*, 2006, Susceptibility of *An. aquasalis*...);
- 3) *An. albitarsis sensu lato (s.l.)* Lynch-Arribalzaga, 1878, com espécies de importância epidemiológica (Klein, Lima, Tada & Miller, 1991; Conn *et al.*, 2002);

4) *An. oswaldoi* s.l. Peryassú, 1922, importante vetor no estado do Acre (Branquinho *et al.*, 1996).

Outras espécies deste subgênero são encontradas naturalmente infectadas (detectadas por métodos de dissecação e/ou provas imunológicas), entretanto não apresentam importância epidemiológica comprovada: *An. braziliensis* Chagas, 1907; *An. nuneztovari* Galbaldon, 1940; *An. triannulatus* s.l. Neiva & Pinto, 1922; *An. strodei* Root, 1926; *An. evansae* Brethes, 1926 e *An. galvaoi* Causey, Deane & Deane, 1945 (Deane, 1986; Arruda *et al.*, 1986; Póvoa *et al.*, 2003).

Entre as espécies neotropicais transmissoras de malária, algumas têm ampla distribuição geográfica e importância epidemiológica primária em determinada região, por isso são classificadas como **vetores regionais**. Outras se comportam como bons vetores da doença em uma região mais restrita, e são chamadas de **vetores locais** (Rubio-Palis & Zimmerman, 1997).

### 1.2.3 Complexos de espécies crípticas

Dentre os muitos conceitos presentes na literatura, admite-se complexo de espécies crípticas como um conjunto de duas ou mais espécies indistinguíveis por critérios morfológicos (pelo menos superficialmente) e que são ou foram classificadas como um único táxon (Bickford *et al.*, 2007). Outros autores consideram que tais espécies devam apresentar ainda divergência evolutiva recente, sejam separáveis apenas a nível molecular, ocorram em simpatria e apresentem isolamento reprodutivo entre elas (Stebbins, 1950, apud Bickford, *et al.*, 2007.p.149).

A ocorrência de complexos é comum entre os artrópodes, inclusive nos de importância médica, como os anofelinos. Assim, o reconhecimento de suas espécies tem relevância epidemiológica, uma vez que podem exibir diferenças comportamentais, quanto à susceptibilidade à infecção e resposta às medidas de controle. No complexo *An. gambiae*, por exemplo, vetor primário de malária no continente africano, as espécies divergem quanto à resistência aos inseticidas (Casimiro *et al.*, 2006).

Os primeiros relatos de ocorrência de espécies crípticas entre mosquitos da subfamília Anophelinae datam das décadas de 1920 e 1930 (Collins & Paskewitz, 1996). Considera-se que atualmente pelo menos a metade de mosquitos desta subfamília constitui complexos de espécies, e devido às dificuldades de identificação morfológica, técnicas alternativas, como as que envolvem análise de DNA, têm se mostrado úteis para estudos taxonômicos, pois disponibilizam informações não somente para a separação das espécies como também para estudos de filogenia (Collins & Paskewitz, 1996; Beebe & Cooper, 2000; Norris, 2002). Bickford *et al.* (2007) ressaltam a importância de informações adicionais sobre os *taxa* analisados, tais como aspectos ecológicos, comportamentais e anatômicos.

Krzywinski & Besansky (2003) consideram que o método ideal para a identificação de espécies crípticas deve apresentar as seguintes características: ser uma técnica rápida, de baixo custo e de fácil implantação, aplicável aos vários estádios de desenvolvimento dos mosquitos e útil para ambos os sexos. Além disso, permitir a obtenção dos mesmos resultados em qualquer local onde forem empregados.

### **1.2.4 Metodologias utilizadas para o estudo de complexo de espécies**

A espécie é uma das unidades fundamentais da biologia, comparável em importância aos genes, células e organismos, daí a importância de sua delimitação. Mudanças morfológicas entretanto, nem sempre são observadas como consequência do processo de especiação (Queiroz, 2006). Assim, metodologias alternativas à morfologia tradicional são utilizadas, destacando-se os estudos de cruzamentos, as análises citogenéticas, os trabalhos enzimáticos e as técnicas de biologia molecular baseados em marcadores presentes no genoma dos indivíduos.

#### **1.2.4.1 Cruzamentos**

Originalmente, a definição de uma espécie era baseada exclusivamente na distinção de caracteres morfológicos ou fenéticos (conceito taxonômico) (Futuyma, 1992). Atualmente, não existe consenso na Biologia sobre o conceito de uma espécie, havendo, pois uma variedade deles, dentre os quais o evolutivo, o ecológico e o biológico (CBE). Apesar das dificuldades de aplicação em alguns grupos taxonômicos, biólogos que estudam os mecanismos de especiação se baseiam no referencial teórico do CBE (Wiens, 2004; Aleixo, 2007), segundo o qual uma espécie consiste em indivíduos de uma população natural, que expressam potencial de intercruzamento entre si e isolamento reprodutivo dos demais (Mayr, 1942).

Assim, em muitas espécies, em geral o cruzamento entre dois indivíduos origina uma prole de machos e fêmeas férteis. A perda da fertilidade entre eles pode levar a especiação incipiente, culminando no isolamento reprodutivo

parcial e até total de seus membros e, finalmente, progredir para a inviabilidade completa de seus híbridos (Forsdyke, 1999; 2000).

Em natureza, populações de híbridos têm sido identificadas oriundas de cruzamento de espécies do complexo *An. gambiae*, numa frequência estimada inferior a 0,1% (Coluzzi *et al.*, 1979; Touré *et al.*, 1998). Baixo número de inversões cromossômicas em *An. albitarsis s.l.* indicam também baixa taxa de hibridismo entre espécies deste complexo (Kreutzer *et al.* 1976), indicando que barreiras etológicas têm importância primária na manutenção de espécies reprodutivamente isoladas (Coluzzi & Kitzmiller, 1975).

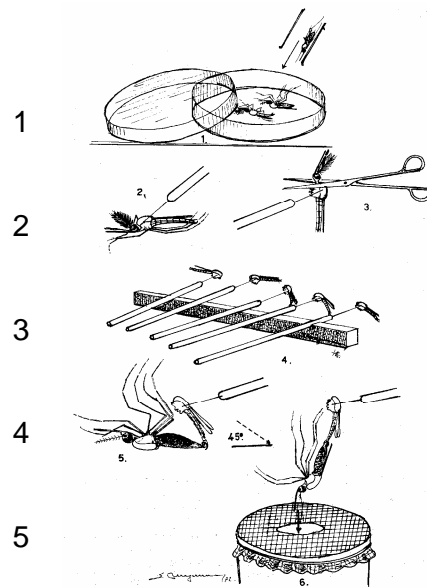
A especiação causada por isolamento pós-zigótico em muitos *taxa*, em particular a determinada pela esterilidade dos híbridos, obedece à regra de Haldane, segundo a qual, se um cruzamento interespecífico produzir híbridos estéreis ou inviáveis, estes serão quase sempre do sexo heterogamético (XY), sendo o homogamético (XX) em geral fértil (Haldane, 1922; Coyne & Orr 1997; Orr, 1997; Forsdyke, 2000).

Das muitas explicações para a regra de Haldane, duas são mais aceitas: a teoria da dominância e a teoria do *faster male* (Presgraves & Orr, 1998). A primeira, proposta em 1940 por Muller e formalizada em modelos matemáticos por Orr (1993), Orr & Turelli (1996), Turelli & Orr (1995, 2000), refere que a maioria dos genes responsáveis pela esterilidade e inviabilidade de híbridos é recessivo ligada ao cromossomo X. Assim, indivíduos XY, em hemizigose, seriam mais afetados pelos efeitos dos alelos que causam isolamento pós-zigótico, diferentemente daqueles XX que não expressariam seus efeitos em heterozigose. A segunda baseia-se em divergências quanto ao tempo de

evolução de genes localizados em *loci* diferentes relacionados à fertilidade, e que teriam evoluído anteriormente aos das fêmeas, o que explicaria a esterilidade preferencial de híbridos no sexo masculino. Esta hipótese tem sido apoiada por estudos realizados em drosófilas (Hollocher & Wu, 1996; Sawamura, 2000; Tao & Hartl, 2003), em mosquitos do gênero *Aedes* (Presgraves & Orr, 1998), e evidenciada em reprodução experimental de espécimes de *An. albitarsis* mantidos em colônia (Lima *et al.*, 2004).

Estudos envolvendo cruzamento com posterior hibridização para análise de anomalias, taxas de sobrevivência, proporção de machos e fêmeas, estrutura das gônadas e fertilidade têm sido empregados desde as primeiras décadas do século XX com o objetivo de demonstrar a existência de complexos de espécies e/ou separar espécies crípticas de anofelinos, conforme revisão de Coluzzi & Kitzmiller (1975). No Brasil, os únicos estudos realizados, confirmam o *status* específico de *An. albitarsis* B e *An. deaneorum* (Klein, Lima & Toda-Tang, 1991), e *An. albitarsis* s.s. e *An. deaneorum* (Lima *et al.*, 2004).

Experimentos de hibridização têm importantes limitações práticas na rotina: são incompatíveis em grande escala, muito trabalhosos e sua execução requer muito tempo (Coluzzi, 1984) (Figura 1).



**Figura 1.** Procedimento utilizado para a realização de experimentos de hibridização (cruzamento em laboratório): **1:** Machos são anestesiados; **2:** Estilete é introduzido no tórax e realizada a decapitação; **3:** Machos decaptados; **4:** Realizado contato da genitália do macho com a genitália da fêmea anestesiado; **5:** Após a cópula a fêmea é depositada em copo telado (Retirado de WHO, 1975, modificado).

#### 1.2. 4.2 Citogenética

A utilização da citogenética para fins taxonômicos de anofelinos teve início a partir dos trabalhos de Frizzi (1947) em complexos encontrados na Europa. Trabalhos posteriores demonstraram que a investigação de rearranjos no padrão de bandas de cromossomos politênicos é útil para a identificação de espécies crípticas (Coluzzi & Sabatini, 1967; 1968; 1969; Colluzi *et al.*, 1979; Green & Hunt, 1980; Mahon, 1983; Coluzzi *et al.*, 2002).

Preparações mitóticas de glândulas salivares de larvas de *An. albitarsis* s. l., coletadas no Brasil revelaram que esta espécie possui dois pares de cromossomos autossômicos (um submetacêntrico e outro metacêntrico) e um par sexual, homomórfico e acrocêntrico nas fêmeas (XX) e heteromórfico com aspecto puntiforme nos machos (Rafael *et al.*, 2005; 2006). Este cariótipo aparece notavelmente conservado e constante no gênero *Anopheles*, exceto por mudanças quantitativas e qualitativas na heterocromatina do Y e pelo menos na metade do X (Coluzzi, 1982).

De fato, estudos citogenéticos permanecem como ferramenta confiável para diferenciar as espécies do complexo *An. gambiae* (Coluzzi *et al.*, 1979; Coluzzi, 1985), assim como para distinguir as nove espécies do complexo *An. funestus* (Green & Hunt, 1980).

Espécies do subgênero *Nyssorhynchus* têm sido analisadas por cromossomo politênico de larvas (Kitzmilller *et al.*, 1973; Moncada-Perez & Conn, 1992; Conn *et al.*, 1993), inclusive *An. albitarsis* s.l. cujas inversões detectadas no cromossomo X com aproximadamente 98% de certeza, permitiram a separação de três populações citogenéticas distintas: a população B1 do Brasil, com uma inversão heterozigota no X e duas nos autossomas; a população B2, simpátrica com B1 no Brasil, com duas inversões no X e dez nos autossomas; e a população C da Colômbia e Venezuela, com três inversões no cromossomo 2 e três no cromossomo 3 (Kreutzer *et al.*, 1976).

No entanto, o estudo de cromossomos politênicos em anofelinos apresenta desvantagens para sua execução: é estadio específico e/ou sexo limitado; a interpretação do padrão de bandeamento requer tempo considerável



e expertise; nem todas as espécies apresentam cromossomo politênico com padrão de bandeamento discernível e com diferenças no padrão de bandeamento das espécies crípticas (Hunt *et al.*, 1998; Somboon *et al.*, 2001).

Apesar de suas limitações, este método ainda integra muitos trabalhos com complexo de espécies (Norris, 2002).

#### 1.2. 4.3 Análises enzimáticas

Análises enzimáticas refletem diferenças na mobilidade de isoenzimas em um campo elétrico, resultantes de divergências na composição ou seqüências dos aminoácidos que compõem as proteínas, produzidas por seqüências distintas de DNA. Se os padrões de bandas de dois indivíduos diferem, assume-se que estas diferenças reflitam variabilidade genética e que sejam herdáveis.

Desta forma a separação e reconhecimento de enzimas espécie-específica ou o padrão de mobilidade eletroforética, podem ser utilizados como marcadores moleculares em estudos de taxonomia e sistemática, e permitir a identificação de espécies crípticas (Foley & Bryan, 1993; Van Bortel *et al.*, 1999), e/ou a construção de chaves eletroforéticas (Mahon *et al.*, 1976; Narang *et al.*, 1989; Foley & Bryan, 1993).

No complexo *An. minimus*, a análise de isoenzimas é considerada “padrão ouro” para identificação das espécies membros (Green *et al.*, 1990; Van Bortel *et al.*, 1999).

Estudo realizado em onze *loci* enzimáticos de populações de *An. albitarsis s.l.* do Brasil e da Argentina, permitiu a separação dos espécimes em cinco grupos subdivididos em dois grupos (I e II). Tais resultados subsidiaram a distinção morfológica e a descrição de *An. deaneorum* (Rosa-Freitas *et al.*, 1990).

A degradação proteica que ocorre rapidamente após a morte do organismo constitui um problema para o emprego de enzimas em testes diagnósticos. Desta forma, os espécimes devem ser frescos ou mantidos congelados para posterior análise, uma exigência difícil de estabelecer em condições de campo, além de requerer uma quantidade maior de material, comparado com poucos nanogramas de DNA. Além disso, bons resultados não são obtidos para separação de espécies reprodutivamente isoladas há pouco tempo (Krzywinski & Besansky, 2003). Atualmente, esta técnica tem sido substituída por metodologias baseadas na análise de DNA (Norris, 2002).

#### 1.2. 4.4 Técnicas baseadas em análise do DNA

As limitações das técnicas utilizadas em taxonomia, conduziram à investigação de métodos que, com maior segurança e reprodutibilidade, permitissem a identificação das espécies, particularmente às crípticas. Desta forma, metodologias baseadas em DNA, tanto por técnicas de hibridização (que utilizam sequências espécie-específicas), quanto por amplificação de segmentos na Reação em Cadeia da Polimerase- PCR, facilitaram estudos taxonômicos, especialmente em complexos de espécies. Este tipo de metodologia apresenta inúmeras vantagens, tais como: o DNA pode ser

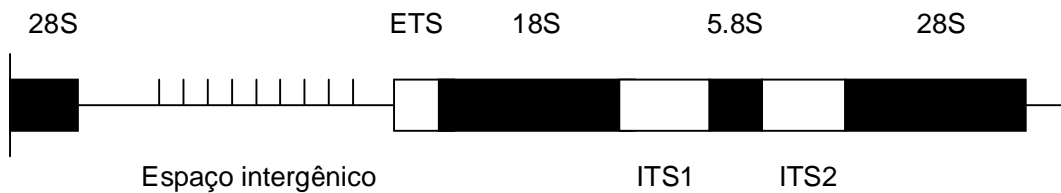
facilmente obtido de material fresco, seco ou preservado em álcool; não é limitado a um estadio ou sexo específico; e oferece inúmeros marcadores genéticos em regiões codificadoras e não codificadoras (Krzywinski & Besansky, 2003).

Desde então, o número de marcadores genéticos disponíveis para o estudo dos anofelinos tem aumentado consideravelmente e tem sido úteis para investigações em taxonomia molecular, sistemática evolutiva e genética de populações, dentre outras (Norris, 2002).

Tais marcadores podem ser utilizados em técnicas de abordagem indireta ou arbitrária, em áreas do genoma de que não se tenha nenhum conhecimento prévio, como por exemplo, o RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA*) que analisa polimorfismos de moléculas do DNA pela técnica de PCR, usando iniciadores (*primers*) curtos que amplificam segmentos aleatórios de DNA (Norris, 2002; Krzywinski & Besansky, 2003). Esta técnica foi útil para a identificação de quatro espécies membros do complexo *An. albiparvus* (Wilkerson, Gaffigan & Lima, 1995; Wilkerson, Parsons & Klein, 1995), porém, inconsistente para separação de espécies do complexo *An. minimus* (Kengne *et al.*, 2001).

Outros marcadores são utilizados em técnicas de abordagem direta, que analisam sequências de nucleotídeos geralmente presentes em regiões repetitivas de genes conservados do genoma, como as sequências do DNA ribossômico (rDNA), bastante empregados em estudos de filogenia, análise de populações e distinção de espécies crípticas (Pastewitz & Collins, 1997).

O rDNA dos eucariotos é constituído por uma família multigênica responsável pela síntese dos RNAs ribossomais e está organizado em unidades repetitivas em *tandem*. As unidades são separadas uma das outras por espaçadores intergênicos não codificadores, chamados IGS (*Intergenic non Transcribed Spacer*), e são formadas por sequências altamente conservadas codificadoras dos rRNAs: 18S, 5.8S e 28S (Pastewitz & Collins, 1997). A região 5.8S localiza-se entre duas regiões espaçadoras ITS (*Internal non coding Transcribed Spacer*): ITS1 e ITS2, que podem ser altamente variáveis no tamanho e na sequência de nucleotídeos, inclusive entre espécies intimamente relacionadas (Collins & Paskewitz, 1996; Marrelli *et al.*, 2006; Li & Wilkerson, 2007) (Figura 1).



**Fig. 2.** Estrutura do DNA ribossomal. **ITS:** Espaçador interno transcrito; **ETS:** espaçador externo transcrito (Fonte: Pastewitz & Collins, 1997, modificado).

As regiões ITS1 e ITS2 constituem ferramentas úteis para a identificação de espécies crípticas de anofelinos (Paskewitz & Collins, 1990; Walton *et al.*,

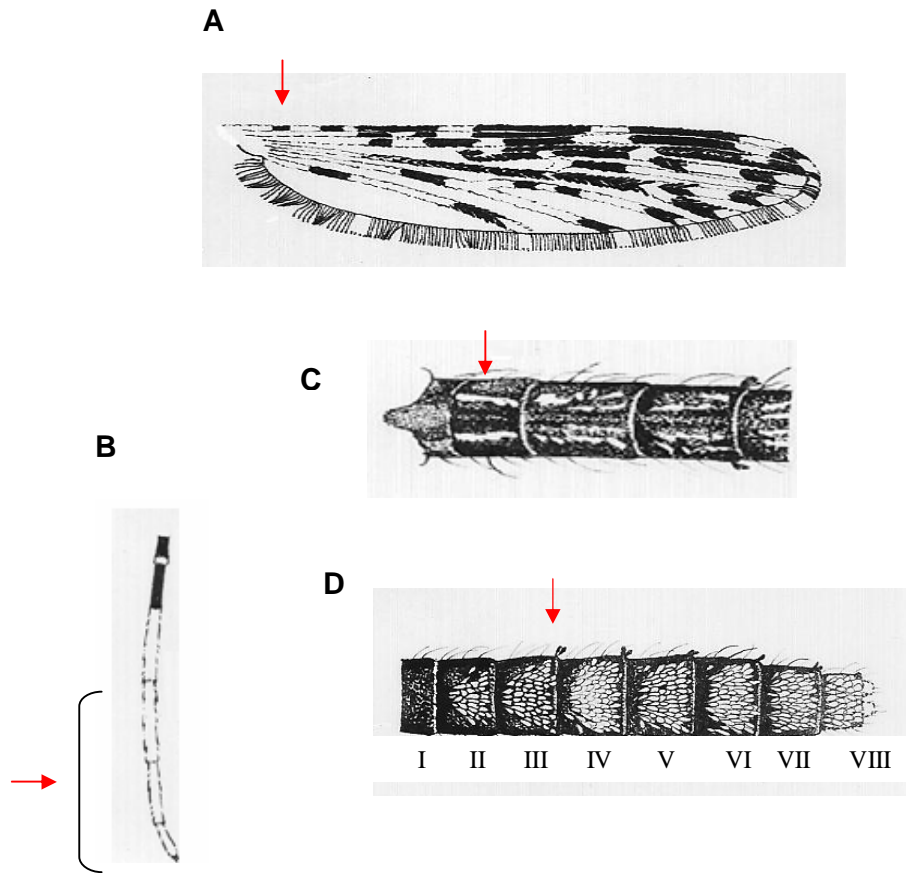
1999; Torres *et al.*, 2000; Wilkerson *et al.*, 2004; Li & Wilkerson, 2005; Alam *et al.*, 2007).

Outros marcadores, como genes para Citocromo Oxidase I (COI) e Citocromo Oxidase II (COII) do genoma mitocondrial, polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) (que analisa polimorfismos através de corte com enzima de restrição), e microssatélite também têm sido utilizados para solucionar problemas taxonômicos e evolutivos relacionados a espécies crípticas (Norris, 2002; Krzywinski & Besansky, 2003; Lehr *et al.*, 2005).

### 1.3 O COMPLEXO *ALBITARSIS*

#### 1.3.1 Identificação morfológica

A identificação morfológica de *An. albitarsis s.l.* segue a combinação dos seguintes caracteres: tarsos posteriores com os três últimos artículos tarsais inteiramente brancos; primeira mancha escura da veia costa (pré-umeral escura) menor que a mancha clara seguinte; tarso posterior I com anel claro apical; esternito abdominal I com duas linhas de escamas brancas; tergitos abdominais com tufos pósteros-laterais de escamas escuras a partir do segmento III; tergito VIII com escamas amareladas e brancas; manchas claras das veias anteriores da asa, particularmente da costa, formadas por escamas quase tão alvas quanto as dos tarsos posteriores (Deane *et al.*, 1946) (Figura 3).



**Fig. 3:** Aspectos morfológicos de *An. albitarsis* s.l. **A:** Asa mostrando a primeira mancha escura da veia costa (pré-umeral escura) menor que a mancha clara seguinte; **B:** Perna posterior com os três últimos tarsômeros inteiramente brancos; **C:** Esternito com fileiras de escamas brancas; **D:** Tergitos abdominais, com tufos pósteros-laterais de escamas pretas a partir do segmento III. (Fonte: Deane *et al.*, 1946).

Chaves baseadas em característica da genitália masculina, também são utilizadas para a identificação específica dos anofelinos (Causey *et al.*, 1947).

### 1.3.2 Espécies que compõem o complexo *An. albitarsis*

Inicialmente *An. (Nyssorhynchus) albitarsis* Lynch-Arribalzaga, 1878 foi descrito como uma única espécie. Por ser, entretanto, um anofelino de ampla distribuição geográfica (do norte da Guatemala até o norte da Argentina), polimórfico, exibir diferenças comportamentais (Rosa-Freitas *et al.*, 1990; Deane *et al.*, 1948), e citogenéticas (presença de inversões cromossômicas) (Kreutzer *et al.*, 1976; Kitzmiller, 1977), suspeita-se que constituía na verdade um complexo de espécies (Rosa-Freitas *et al.*, 1990; Wilkerson, Gaffigan & Lima, 1995; Wilkerson, Parsons & Klein, 1995; Li & Wilkerson, 2005).

Em seu trabalho de revisão taxonômica dos anofelinos, Linthicum (1988) considera a existência de duas espécies morfologicamente distintas, hoje reconhecidamente aceitas como membros do complexo *An. albitarsis*: *An. albitarsis* s.s. Lynch-Arribalzaga, 1878 e *An. marajoara*, esta última descrita a partir de espécimes coletados na ilha do Marajó, estado do Pará, por Galvão & Damasceno (1942).

Resultados de análises citogenéticas (Kreutzer *et al.*, 1976), enzimáticas e moleculares (Narang *et al.*, 1993; Wilkerson, Gaffigan & Lima, 1995; Wilkerson, Parsons & Klein, 1995; Li & Wilkerson, 2005) realizadas em espécimes de *An. albitarsis* s.l. revelam a existência de populações geneticamente distintas, levando à conclusão de não ser uma espécie monotípica (Conn & Mirabello, 2007).

A terceira espécie, separada das duas outras, por diferenças morfológicas e enzimáticas encontradas em formas adultas e larvárias foi

descrita em 1989 por Rosa-Freitas, a partir de espécimes de *An.albitarsis s.l.* coletados nos estados de Rondônia e Acre, recebendo a denominação de *An. deaneorum*. Resultados de análises filogenéticas revelam evidências de que este anofelino seja formado por um complexo de espécies crípticas (Bourke *et al.*, 2010).

Posteriormente, Wilkerson, Gaffigan & Lima (1995) e Wilkerson, Parsons & Klein (1995) separaram por RAPD-PCR as três espécies anteriormente descritas e demonstraram a ocorrência de uma quarta conhecida como *An. albitarsis* B, recentemente descrita por Motoki *et al.*, (2009) a partir de análise comparativa morfológica e morfométrica de indivíduos adultos, como *Anopheles oryzalimnetes* Wilkerson & Motoki, 2009.

Hoje considerada nova espécie desse complexo, o *An. albitarsis* E foi identificado após sequenciamento do gene citocromo oxidase I (COI), realizado por Lehr *et al.* (2005), a partir de exemplares coletados no Brasil e na Venezuela. Ressalta-se, que embora seqüências ITS2 não terem sido úteis para sua separação das demais espécies desse complexo (Li & Wilkerson, 2005; 2007), resultados de análises de DNA mitocondrial, Bayesianas e de microssatélites confirmaram seu *status* específico (Póvoa *et al.*, 2006; Conn & Mirabello, 2007), assim como também estudos morfológicas e morfométricas, permitindo a redescrição da espécie por Motoki *et al.* (2009), como *Anopheles janconnae* Wilkerson & Sallum, 2009.

A sexta e última espécie críptica deste complexo ocorre de forma simpátrica com *An. marajoara* em uma área endêmica de malária da Colômbia. Foi identificada por Brochero *et al.* (2007), a partir de análise do DNA



ribossomal (rDNA ITS2) e sequenciamento do gene *White*, como *An. albitarsis* F.

Resume-se, então, que o complexo *An. albitarsis* é constituído pelas seguintes espécies: *An. albitarsis* s.s. (espécie A); *An. oryzalimnetes* (espécie B); *An. marajoara* (espécie C); *An. deaneorum* (espécie D), *An. janconnae* (espécie E) e a não formalmente descrita *An. albitarsis* F (espécie F) (Wilkerson, Gaffigan & Lima, 1995; Wilkerson, Parsons & Klein, 1995; Lehr *et al.*, 2005; Brochero *et al.*, 2007; Conn & Mirabello, 2007; Motoki *et al.*, 2009).

Vale ressaltar que entre os membros deste complexo, além das diferenças moleculares (Wilkerson, Gaffigan & Lima, 1995; Wilkerson, Parsons & Klein, 1995; Li & Wilkerson, 2005), também são observadas diferenças comportamentais (Galvão & Damasceno, 1944; Rosa-Freitas *et al.*, 1990); epidemiológicas (Galvão & Damasceno, 1944), citogenéticas (Kreutzer *et al.*, 1976) e bioquímicas (Rosa-Freitas *et al.*, 1990), bem como a existência de barreiras pós-copulatórias (machos híbridos estéreis) (Klein, Lima & Toda-Tang, 1991; Lima *et al.*, 2004).

### **1.3.3 Distribuição geográfica**

*An. albitarsis* s.l. é uma espécie de ampla distribuição na região neotropical, sendo encontrada nos países da América do Sul e Central, exceto na parte ocidental sul-americana. É muito comum no Brasil, onde apresenta ampla distribuição geográfica (Rosa-Freitas *et al.*, 1990; Consoli & Oliveira, 1994; Conn & Mirabello, 2007).

Informações de ocorrência das espécies deste complexo baseada em critérios morfológicos e marcadores moleculares (RAPD-PCR, rDNA e ITS2), encontram-se no Quadro 1.

**Quadro 1.** Relato da ocorrência das espécies do complexo *An. albitarsis s.l.*, por país.

<b>Espécie</b>	<b>País</b>	<b>Autores</b>
<b><i>An. albitarsis s.s</i></b>	Brasil, Paraguai e Argentina	Wilkerson, Gaffigan & Lima, (1995); Wilkerson, Parsons & Klein (1995).
<b><i>An. oryzalimnetes</i></b>	Brasil e Paraguai	Wilkerson, Gaffigan & Lima, (1995); Wilkerson, Parsons & Klein (1995).
<b><i>An. marajoara</i></b>	Brasil	Wilkerson, Gaffigan & Lima, (1995); Wilkerson, Parsons & Klein (1995).
	Colômbia e Paraguai	Li & Wilkerson (2005); Wilkerson, Gaffigan & Lima, (1995).
	Venezuela	Rubio-Pallis <i>et al.</i> (2003)
	Bolívia, Costa Rica e Trinidad e Tobago	Chadee & Wilkerson (2006)
<b><i>An. deaneorum</i></b>	Brasil e Argentina	Wilkerson, Gaffigan & Lima, (1995).
<b><i>An. janconnae</i></b>	Brasil e Venezuela	Lehr <i>et al.</i> (2005)
<b><i>An. albitarsis F</i></b>	Colômbia	Brochero <i>et al.</i> (2007)

Apesar de cinco das seis espécies deste complexo serem detectadas no Brasil, elas não apresentam um padrão homogêneo de distribuição. Assim, exemplares de ***An. albitarsis s.s.*** são encontrados nas regiões Sul (Paraná, Santa Catarina) e Sudeste do país (São Paulo); ***An. oryzalimnetes*** é identificado nas regiões Norte (Pará, Amapá e Rondônia), Nordeste (Bahia e Ceará) e Sudeste (São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo); ***An. marajoara*** nas regiões Norte (Amazonas, Pará, Amapá, Rondônia), Centro-Oeste (Mato

Grosso) e Sudeste (São Paulo); **An. deaneorum** região norte (Rondônia e Acre) e sul do país (Paraná,) e **An. janconnae** apenas na região Norte do país (Roraima) (Wilkerson, Gaffigan & Lima, 1995; Wilkerson, Parsons & Klein, 1995; Póvoa *et al.*, 2001; 2006; Conn *et al.*, 2002; Silva-Vasconcelos *et al.* 2002; Li & Wilkerson, 2005; Galardo *et al.*, 2007; Motoki *et al.*, 2009).

Relatos de identificação das espécies deste complexo no estado do Pará indicam que podem ser encontradas nos município de **Belém** (*An. oryzalimnetes*), **Capanema** (*An. marajoara* e *An. oryzalimnetes*), **Primavera** (*An. oryzalimnetes*), **Cachoeira do Arari** na ilha do Marajó (*An. marajoara*) (Wilkerson, Gaffigan & Lima, 1995; Wilkerson, Parsons & Klein, 1995) **Itaituba** (*An. marajoara* e *An. oryzalimnetes*) (Lehr *et al.*, 2005; Mckeon *et al.*, 2010) e **Timboteua** (*An. oryzalimnetes*) (Lehr *et al.*, 2005).

#### 1.3.4 Importância vetorial

A relação entre cada parasito e seu vetor é exclusiva. Na malária, por exemplo, a carga parasitária dos plasmódios difere entre os anofelinos, assim como difere também o grau de susceptibilidade de um mosquito às espécies de plasmódio (Sinden, 1991; Alavi *et al.*, 2003). Isto acontece porque a esporogonia resulta de uma interação molecular complexa que envolve a associação de fatores intrínsecos do mosquito, do plasmódio e até do hospedeiro vertebrado presentes na alimentação sanguínea. Esta associação de fatores permitirá ou não a reprodução, invasão e colonização do parasito

nos tecidos do mosquito e posterior transmissão a outro hospedeiro (Vaughan *et al.*, 1988; Ramsey *et al.*, 1994; Lensen *et al.*, 1997).

Variações na capacidade de transmissão da malária entre as espécies do complexo *An. albitarsis* têm sido observadas. Espécimes de *An. albitarsis* s.s. são encontrados na parte sul da América do Sul, em geral em regiões não endêmicas de malária, e parecem não exibir uma boa capacidade vetorial nessas áreas, exceto na Argentina, onde pode ser considerado no máximo um vetor local de *P. vivax* (Wilkerson, Gaffigan & Lima, 1995; Wilkerson, Parsons & Klein, 1995).

Com base em dados de captura entomológica e de resultados de infecção natural por espécies de plasmódios detectados pela técnica ELISA (Enzyme-linked immunoabsorbent Assay), *An. marajoara* tem sido incriminado como vetor local de malária no estado do Amapá. Tais resultados confirmam a importância regional desta espécie na Amazônia oriental brasileira (Conn *et al.*, 2002; Galardo *et al.*, 2007).

Em Rondônia, *An. deaneorum* é considerado um bom vetor local da doença, uma vez que invade os domicílios em busca de sangue humano. Por outro lado, *An. oryzalimnetes* parece não apresentar importância na transmissão de malária, uma vez que parece preferir o sangue de animais (Klein, Lima, Tada & Miller, 1991). Estudos adicionais demonstram ainda que esta última espécie raramente se infecta com *P. falciparum* (Wilkerson, Gaffigan & Lima, 1995; Wilkerson, Parsons & Klein, 1995) enquanto a primeira é altamente susceptível a *P. vivax* e *P. falciparum* (Klein, Lima & Tada, 1991; Klein, Lima, Tada & Miller, 1991).

Em Boa Vista, Roraima, dados de infecção natural, por ELISA, e do comportamento hematofágico de espécimes de *An. janconnae* são conclusivos quanto à importância regional desta espécie na epidemiologia da malária neste município, algumas vezes até substituindo *An. darlingi*, espécie de alta susceptibilidade ao plasmódio na Região amazônica (Conn *et al.*, 2002; Silva-Vasconcelos *et al.*, 2002; Póvoa *et al.*, 2006).

*An. albitarsis* F, espécie simpátrica de *An. marajoara* em uma área endêmica da Colômbia, é possivelmente um importante vetor local de plasmódio e dependendo de sua distribuição, pode vir a ser ainda associado à transmissão de malária na Colômbia e Venezuela (Brochero *et al.*, 2007).

## 1.4 OBJETIVOS

### 1.4.1 GERAL

Realizar identificação molecular de espécies do complexo *An. albitarsis*, com vistas a analisar sua importância na transmissão de malária nos municípios de Macapá, Estado do Amapá e Peixe-Boi, Estado do Pará.

### 1.4.2 ESPECÍFICOS

- Identificar por caracteres morfológicos os anofelinos coletados nas áreas de estudo;
- Identificar por análise da seqüências do ITS2 do rDNA espécies do complexo *An. albitarsis* presentes nesses municípios;
- Investigar a susceptibilidade natural dessa (s) espécie(s) aos plasmódios *P. falciparum*, e *P. vivax* (variantes genéticas VK210 e VK247);
- Determinar a taxa de paridade das fêmeas coletadas de acordo com o método de Detinova.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 ÁREAS DE ESTUDO**

#### **2.1.1 Município de Macapá**

A cidade de Macapá, capital do Estado do Amapá, está localizada na mesorregião do Sul do Amapá, microrregião de Macapá, numa altitude média de 18 metros acima do nível do mar. O município possui uma área de 6.563 Km<sup>2</sup> e, segundo estimativa do IBGE, em 2007 sua população era de 368.397 habitantes (IBGE, 2009).

De acordo com a classificação de Köppen, o clima da cidade é do tipo megatérmico Af (tropical úmido), com chuvas em todas as estações e temperatura média no mês mais frio acima de 18°C. A estação chuvosa ocorre de dezembro a maio, sendo março o mês mais chuvoso, com totais pluviométricos de aproximadamente 414 mm. No mês mais seco (outubro) a pluviosidade cai para 27 mm (Jesus *et al.*, 2000).

A umidade relativa do ar (URA) no município é sempre superior a 70% e, sendo uma cidade plana, circundada pelos rios, Amazonas e Maruanum e uma baía, tem grande quantidade de vapor de água na atmosfera, que diminui à medida que a temperatura do ar aumenta (Jesus *et al.*, 2000).

Em relação aos domínios florísticos, o Estado apresenta uma diversificação de ambientes naturais que, de modo simplificado, podem ser agrupados nas seguintes formações vegetais: manguezais, florestas de várzea, florestas de terra firme e florestas de transição em áreas de tensão ecológica, cerrados e campos inundáveis ou de várzea em áreas inundáveis (IEPA, 2008).

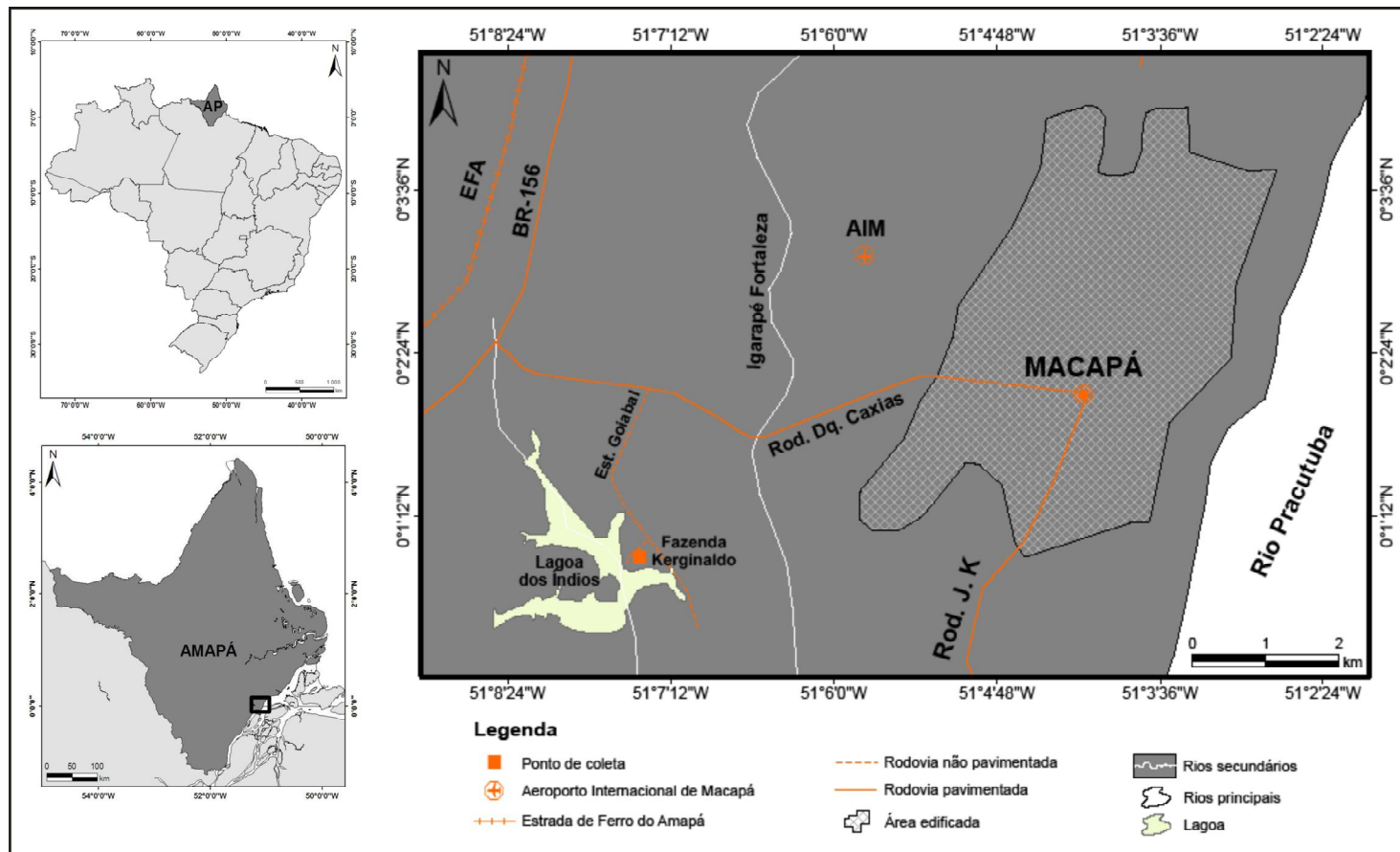
Na área urbana de Macapá são encontrados ambientes úmidos chamados de “ressacas” caracterizados pela ocorrência de inundações periódicas provocadas pelo regime das marés e a sazonalidade das chuvas e servindo como alimentadores de lençóis freáticos e reservatórios de água (Takiyama *et al.*, 2003).

No município são encontradas oito ressacas dentre elas a da Lagoa dos Índios (Aguiar & Silva, 2003) onde se localiza a comunidade Lagoa dos índios. Esta se situa ao longo da Rodovia Duque de Caxias, na Bacia do Igarapé Fortaleza, a oeste do núcleo urbano da cidade, próximo ao limite do município de Santana. Caracteriza-se por intensa ocupação urbana desordenada, ocorrido principalmente nas duas últimas décadas do século XX, sendo encontrados ali conjuntos habitacionais, prédios públicos, empresas comerciais, sítios e chácaras que formam alguns bairros sem condições de infra-estrutura (Bastos, 2006).

Nesta área de ressaca foram realizadas as capturas de anofelinos, no peridomicílio da localidade chamada Chácara Kerginaldo (00° 00' 53" latitude sul e 51° 7' 26" longitude oeste) (Figura 4).

Em 2009 foram registrados na cidade de Macapá 2.637 casos de malária (índice Parasitário Anual- IPA de 7,2), a maioria (2.168) causada pelo *P. vivax*. Os meses de fevereiro, agosto e dezembro foram os de maior número de notificações: 1545 casos (BRASIL, SIVEP/MALÁRIA 2010).





**Fig. 4.** Localização da Fazenda Kerginaldo, comunidade Lagoa dos Índios, Macapá, Amapá, local de realização das coletas de anofelinos.

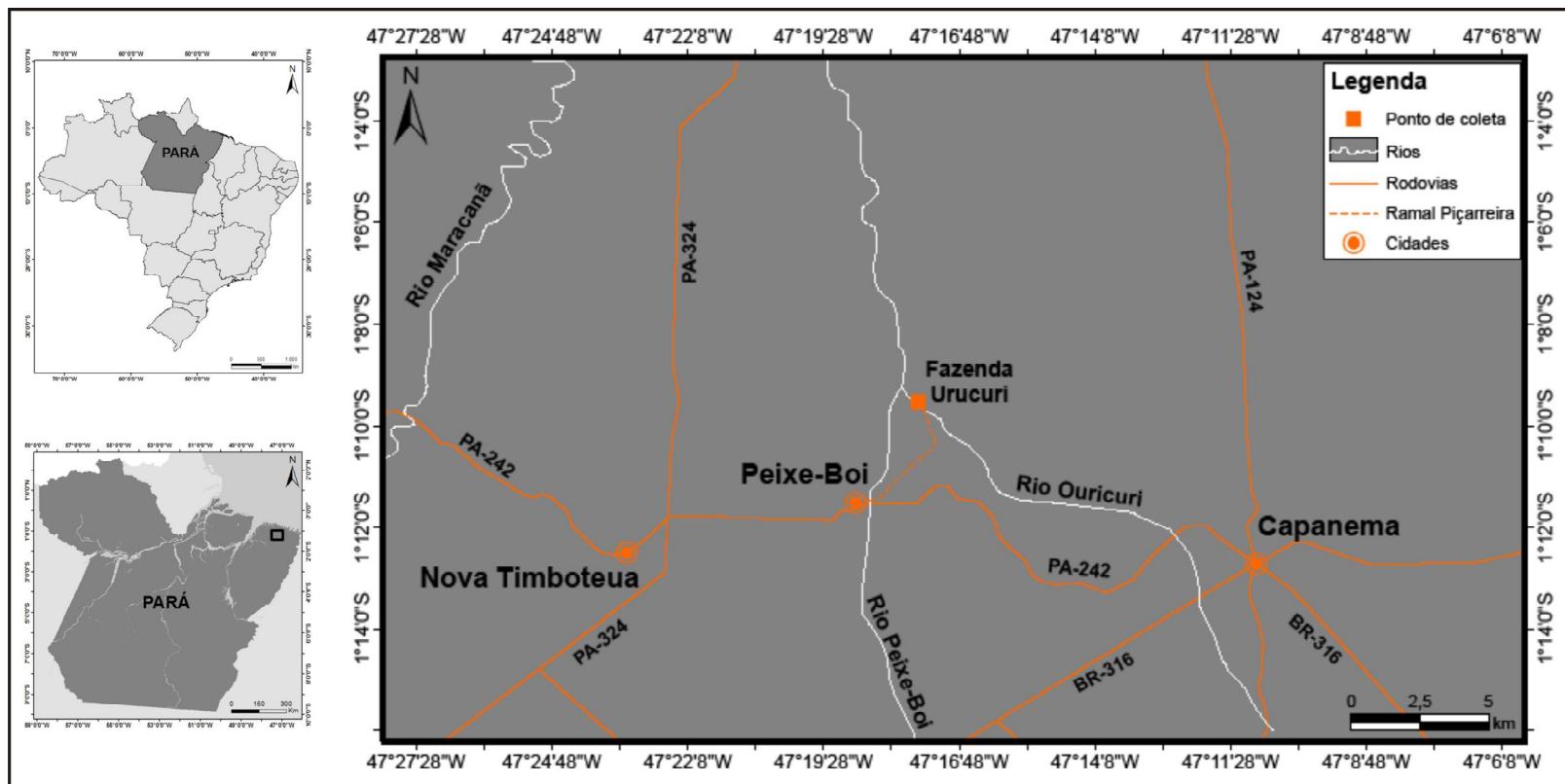
### **2.1.2 Município de Peixe Boi**

Peixe Boi pertence à Mesorregião do Nordeste Paraense, Microrregião Bragantina. Nesta cidade as capturas foram realizadas na Fazenda Urucuri localizada a 3.949 metros da estrada que liga Peixe-Boi a Capanema, cujo acesso se dá pelo Ramal da Piçarreira (1° 9' 32" S / 47° 17' 36" W) (Figura 5).

O município possui uma área de 451,34 km<sup>2</sup> e sua população em 2007 era de 7.679 habitantes. Limita-se ao Norte com o município de Santarém Novo, a leste com Primavera e Capanema, ao Sul com Bonito e a Oeste com Nova Timboteua. O principal rio da cidade é o Peixe-Boi, que nasce no município de Bonito indo desaguar no rio Maracanã (PARA, 2009).

A cobertura original da cidade consiste de floresta densa de terra firme, porém se encontra devastada pela implantação de cultivos migratórios, permanentes e pastagens, com predomínio atual de vegetação secundário ou capoeira. A topografia varia de 13 a 64 metros, sendo caracterizada por colinas suaves (PARÁ, 2009).

Segundo a classificação de Köppen, o clima da cidade é do tipo Am (tropical úmido de monção) e a temperatura média anual varia de 26 a 27° C. A umidade relativa anual é de 84%, podendo chegar em abril a 91%, caindo em setembro para 77%. Os meses de setembro, outubro e novembro são os mais secos com chuvas que não ultrapassam os 50 mm. O índice pluviométrico anual de 2.300 mm (PARÁ, 2009).



**Fig. 5.** Localização da Fazenda Urucuri, Peixe-Boi, Pará, local de realização da coleta dos anofelinos.

O IPA do município de Peixe-Boi no ano de 2009 foi 1, 2 (1 caso registro) e em 2010 nenhum (BRASIL, SIVEP/MALÁRIA, 2010).

## 2.2 COLETA DE MOSQUITOS

A metodologia utilizada seguiu as orientações contidas na Portaria 45/2007 e Nota Técnica 12/2007 da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, pela equipe de técnicos em entomologia do Laboratório de Entomologia de Malária do Instituto Evandro Chagas (IEC) cuja técnica é rotina em suas atividades.

Fêmeas adultas de *An. albitarsis* foram coletadas em capturas de doze horas, das 18:00 às 6:00 horas, com aspiradores de sucção (Aspirador de Castro) e atração humana protegida, no peridomicílio de cada uma das áreas selecionadas.

As capturas foram realizadas em pontos de capturas devidamente selecionados, considerando os seguintes critérios: abundância de espécimes do complexo *An. albitarsis*, facilidade de acesso, autorização dos proprietários e condições logísticas para a realização de trabalho noturno. Nesses locais, quatro técnicos de entomologia se revezavam em dupla a cada três horas. De hora em hora eram anotadas em ficha padronizada pelo Ministério da Saúde, informações sobre temperatura e umidade relativa do ar - URA. A cada coleta foram registrados ainda dados da presença de vento, chuvas, e a fase da lua.

Os exemplares coletados foram depositados em vasilhames telados (máximo de trinta), devidamente identificados por local e horário da captura,

onde então recebiam água mineral embebida em algodão até o transporte para o laboratório em caixas de isopor.

### 2.3 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA

No laboratório, e em condições básicas de biossegurança, os espécimes coletados foram levemente anestesiados com acetato de etila e identificados por caracteres morfológicos em lupa entomológica, conforme chave de Gorham *et al.* (1967) (modificada).

### 2.4 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PICADA POR HOMEM E POR HORA (IPHH)

Indicador entomológico que estabelece a densidade populacional por horas de coleta, foi calculado dividindo-se o número de mosquitos coletados (N) em cada área pelo número de capturadores (NC) e número de horas da coleta (NH).

$$IPHH = \frac{N}{NC \times NH}$$

### 2.5 ANÁLISE DOS OVÁRIOS E DETERMINAÇÃO DA TAXA DE PARIDADE

Foi realizada conforme Detinova (1962), cujas fêmeas nulíparas apresentam as extremidades das traquéolas ovarianas enoveladas, ao contrário das paridas ou oníparas cujas traquéolas se encontram distendidas.

A dissecação dos ovários foi realizada em 10% das fêmeas, por horário coleta. Cada fêmea anestesiada foi colocada com o ventre voltado para cima sobre uma lâmina de vidro limpa. Com a ponta de um estilete fino, seu

abdômen foi forçado firmemente para baixo, na região do 7º ou 8º segmento abdominal, e com um segundo estilete, feita a apreensão e tração do tórax. Isto permitiu a dissecação das vísceras e extração dos ovários, os quais foram analisados numa gota de solução salina, sobre lamínula, em microscópio de luz, e aumento de 400x .

A taxa de paridade foi calculada pela divisão do número de fêmeas paridas pelo total de dissecadas, multiplicada por 100.

## 2.6 ANÁLISE MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DO COMPLEXO *AN. ALBITARSIS*

### 2.6.1 Obtenção do DNA

De cada espécime coletado, procedeu-se a extração do DNA genômico dos exemplares, a partir do abdômen inteiro ou segmentado (fêmeas que tiveram seus ovários dissecados), pernas e asas de cada espécime, utilizando o Kit Wizard® Genomic DNA Purification - CAT A1125, PROMEGA. Essa metodologia foi baseada em Brochero *et al.* (2007) e Birungi & Munstermann (2002), com pequenas modificações.

Em um tubo tipo *eppendorf* de 1,5 mililitros (ml) foram adicionados 50 microlitros (µl) da solução de lise e realizado o resfriamento em um recipiente com gelo. Após a adição do espécime, foi procedida a trituração utilizando uma ponteira estéril e adicionado mais 50 µl da solução de lise resfriada. O macerado obtido foi então homogeneizado por 10 segundos usando um homogeneizador de pequeno porte e incubado a 65°C por 15-30 minutos. Após

a incubação, foram adicionados 3 µl de Solução de *RNase* ao lisado, procedido a homogeneização da amostra por inversão do tubo 2 a 5 vezes e a solução foi incubado durante 15-30 min a 37°C. Decorrido este tempo, a amostra foi esfriada por cinco minutos a temperatura ambiente (TA). A essa solução, foram adicionados 200 µl da solução de precipitação de proteínas agitando-a vigorosamente em alta velocidade por 20 segundos. Procedeu-se nova refrigeração em gelo por 5 minutos e centrifugação durante 4 minutos em 13.000 -16.000xgravidade (g). O sobrenadante contendo o DNA foi cuidadosamente removido e transferido para um tubo de eppendorf de 1,5 ml contendo 100 µl de isopropanol, à TA, e homogeneizado por inversão até que o DNA formasse uma massa visível. Após nova centrifugação (1 minuto a 13.000-16.000 x g à TA), o precipitado contendo o DNA pode ser visível. O sobrenadante foi então descartado e adicionados ao tubo 100 µl de etanol 70%, a TA. Procedeu-se então uma inversão suave do tubo para permitir a lavagem do DNA e centrifugação durante 1 minuto a 13.000-16.000x g à TA. O etanol foi então cuidadosamente aspirado, e o tubo invertido sobre um papel absorvente limpo por 10-15 minutos. Foi adicionado ao tubo 25 µl de solução de reidratação de DNA e nova incubação a 65°C durante 1 hora. Periodicamente, a solução era homogeneizada.

O DNA extraído foi armazenado em temperatura de 2-8 °C ou a - 20°C até uso.

### **2.6.2 Amplificação da seqüência do ITS2**

A amplificação da seqüência do ITS2 de *An. albitarsis s.l.* por PCR foi baseada na metodologia descrita por Li & Wilkerson (2005) cujos

iniciadores (*primers*) permitem a identificação das seguintes espécies: *An. albitarsis* s.s. (espécie A), *An. oryzalimnetes* (espécie B) e *An. marajoara* (espécie C). Para a identificação do *An. albitarsis* F (espécie F) foram empregados iniciadores específicos, desenvolvidos por Brochero *et al.* (2007) (Quadro 2). O esquema de identificação das espécies foi empregado conforme detalhado na Figura 6.

Os iniciadores específicos foram usados em conjunto com outros iniciadores universais abaixo discriminados, flanqueadores da região ITS2, que correspondem à sequência conservada dos genes ribossomais 5.8S e 28S do complexo *An. quadrimaculatus*, baseando-se no método de Cornel *et al.* (1996), cujo produto de ~490 pb funcionou como controle positivo: ITS2F: 5'-TGTGAACTGCAGGACACATGAA-3' (Forward- F) e - ITS2R: 5'-ATGCTTAAATTTAGGGGGTAGTC-3' (Reverso- R).

Os produtos da PCR foram amplificados no termociclador Mastercycler® (Eppendorf) em uma reação de 25 µl usando tampão de PCR e Ampli Taq DNA polimerase (Invitrogen). A concentração final foi: 10 mM Tris-HCl, pH 8.3; 50 mM KCl; 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>; 1mg/ml BSA; 0,25 mM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP. As concentrações dos iniciadores universais e espécie-específicos estão mostrados no Quadro 2, e utilizado 0,2 a 4,0 ng do DNA molde (1/100 do DNA do mosquito adulto inteiro) /reação; e 1,25 U de Amplitaq por reação.

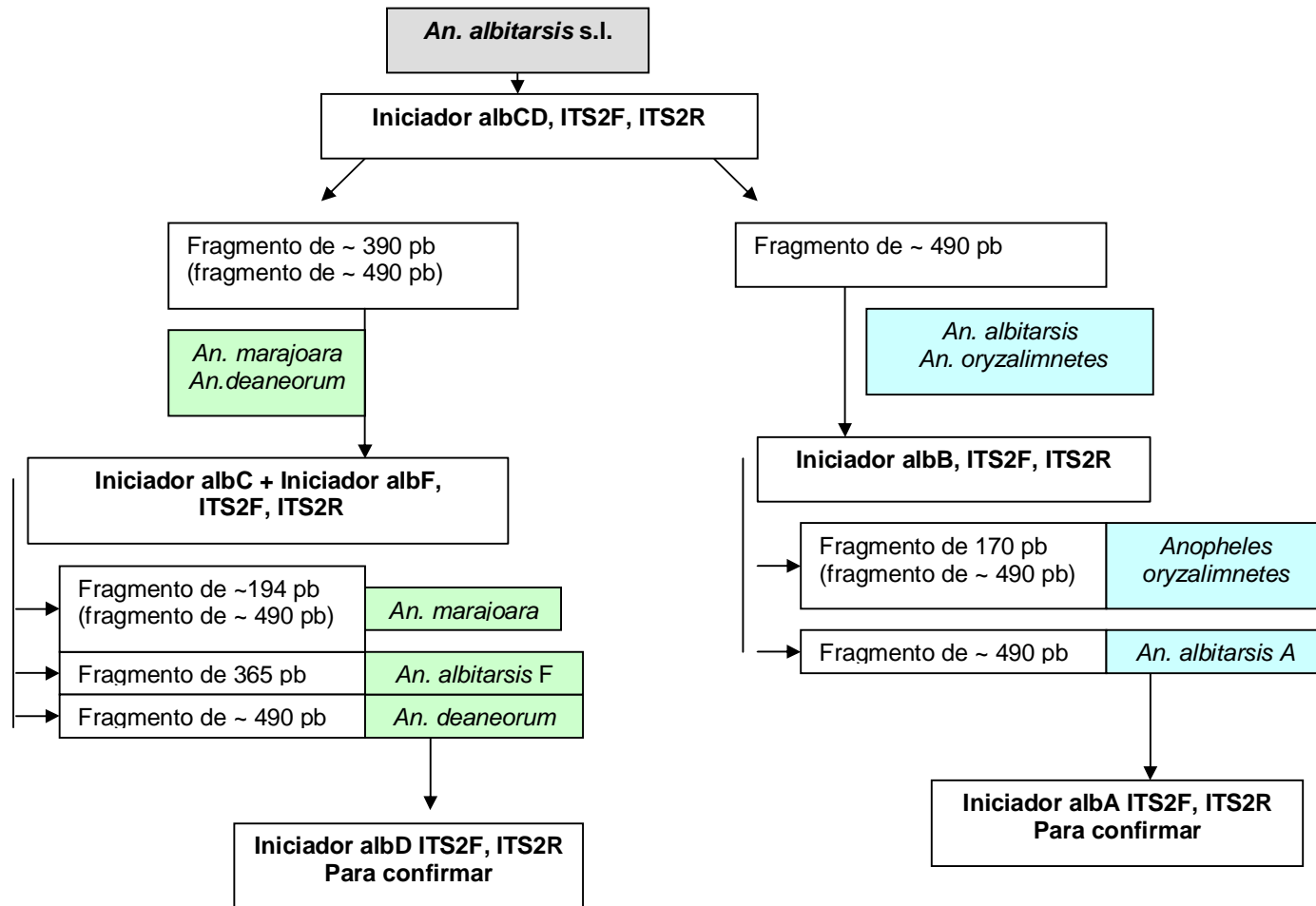
Foram utilizados ainda os parâmetros recomendados por Li & Wilkerson (2005) e Brochero *et al.* (2007), para fins de amplificação da região: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95° C por 30 segundos e temperatura de ligação por 30



**Quadro 2.** Iniciadores específicos, temperatura de anelamento, fragmentos produzidos e concentrações de iniciadores utilizados para a identificação das espécies do complexo *An. albitarsis* (segundo Li & Wilkerson, 2005 e Brochero *et al.*, 2007).

INICIADOR/ ESPÉCIE	SEQUÊNCIA (5'- 3')	INICIADORES ESPECÍFICOS (pmol/25µL)	TA (°C)	pb	ITS2F (pmol/25µL)	ITS2R (pmol/25µL)
<b>albCD</b> ( <i>An.albitarsis</i> C e D)	AACTAGCGAGACCGTCGACC	10	56	~390	5	10
<b>albB</b> ( <i>An.albitarsis</i> B)	TTCCTCAAACCAGCTTGAGCA	10	60,5	~170	5	10
<b>albD</b> ( <i>An.albitarsis</i> D)	GAACCAACTAGCGAGACCGC	10	56	~390	5	10
<b>albC</b> ( <i>An.albitarsis</i> C)	CACAGTCCTTCAATGCTTGATT	10	62,5	194	10	5
<b>albF</b> ( <i>An.albitarsis</i> F)	TGGCTTTGAGGAAGGTGGTATATC	10	62,5	194	10	5
<b>albA</b> ( <i>An.albitarsis</i> A)	AGACCGTCGAGAGGCGGT	10	56	~390	5	10

**albA:** *Anopheles albitarsis* s.s.; **albB:** *An. oryzalimnetes*; **albC:** *An. marajoara*; **albD:** *An. deaneorum*; **albF:** *An. albitarsis* F  
**pmol**= picomol  
**pb** = Pares de bases;  
**TA**= Temperatura de anelamento



**Figura 6.** Esquema de identificação das espécies de complexo albitarsis, rDNA (ITS-2) (Li & Wilkerson, 2005, modificado).

segundos, e alongamento a 72° C por 1 minuto, e extensão final a 72° C por 10 minutos (Quadro 2). Os fragmentos obtidos foram fracionados em gel de agarose a 1,5% em solução tampão TAE, utilizando a solução indicadora “blue-juice”. A eletroforese foi efetuada a aproximadamente 4V/cm, por 1 hora . O DNA foi corado com brometo de etídio (concentração final de 0,5 µg/ml) e os fragmentos amplificados visualizados e fotografados em transluminador de ultravioleta.

A eletroforese de fragmento de DNA amplificados de algumas amostras, foram fracionados em eletroforese vertical em gel de poliacrilamida (Acrilamida 30% e bisacrilamida 0,8%) em concentração de 10%. Para isso, foi utilizada uma alíquota de 3 a 5µl do produto amplificado e 6,5 µl de solução corante indicadora. A eletroforese foi então realizada em tampão TBE e processada por cerca de 24 horas a 35V/cm. Os géis foram fixados em solução etanol/ácido acético (10% e 5%, respectivamente) por 10 a 15 minutos e corados com solução de nitrato de prata a 20% por cerca de 15 minutos e posteriormente revelados em uma solução reveladora de NaOH (0,75 M de NaOH e 37% Formol) por 15 minutos ou até a revelação das bandas e posteriormente fotografados em máquina fotográfica digital.

Como padrão de peso molecular foi utilizado o marcador da Invitrogen® e NEOBIO® de 100 pb.

## 2.7 PESQUISA DA PROTEÍNA CS POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

A detecção da infectividade natural das fêmeas de anofelinos coletadas nas áreas de estudo foi investigada para as seguintes espécies: *P. falciparum* e *P. vivax* e suas variantes genéticas (VK247 e VK210), empregando o método de ELISA descrito por Wirtz *et al.* (1985) e Wirtz *et al.* (1987).

O antígeno utilizado foi preparado com a cabeça e o tórax dos mosquitos macerados individualmente em 50 µl de tampão bloqueador (BB) com Nonidet-NP-40 e adicionados posteriormente 200 µl de tampão BB. Alíquotas de 50µl desse antígeno foram utilizadas para cada teste.

As microplacas de 96 cavidades de fundo quadrado (Nunc-Imuno plate MaxiSorp) foram sensibilizadas com 50 µl de Anticorpos monoclonais (MoAbs) específicos (Quadro 3) e incubadas a TA por cerca de 12 horas.

**Quadro 3.** Material utilizado no teste ELISA para determinação da infecção natural.

<b>Material</b>	<b><i>P. vivax</i> VK 210</b>	<b><i>P. vivax</i> VK247</b>	<b><i>P. falciparum</i></b>	<b><i>P. malariae</i></b>
Anticorpo de captura	Pv-NSV3	Pv-247-1G12	Pf-2 a 10-725-49	Pm-93-10
Conjugado	PvNSV3*	Pv-247-G12*	Pf *	Pm-93-10*
Controle positivo	Pv-210	VK 247	Pf	Pm

\* Marcados com Peroxidase

Após incubação o conteúdo de cada poço foi aspirado, adicionado-lhes 50µl do tampão BB e seguindo-se nova incubação à TA por 1 hora. Após aspirado o conteúdo dos poços, foram adicionados 50µl do antígeno, além dos controles positivos e negativos nos seus respectivos poços. Seguiu-se então, outra incubação de 2 horas à TA, e duas lavagens com tampão fostato salina (PBS) -Tween-20 a 0,05%. Foram adicionados, então, 50µl/poço dos conjugados (MoAbs específicos

marcados com peroxidase), seguindo-se nova incubação por 1 hora à TA. Três novas lavagens com 200µl de PBS-Tween foram efetuadas e, depois adicionados 50µl/poço da solução do substrato (ABTS + água oxigenada a 3% v/v), e nova incubação por 30 minutos, ao abrigo da luz. Após esta etapa a leitura foi feita num filtro de 405-414 nanômetros (nm) em leitor de ELISA (Titertex Multiskan Plus-MK II).

Os controles negativos utilizados foram mosquitos machos, e os positivos, obtidos de fabricante (Kiekegaard & Perry Laboratories - USA). O ponto de corte foi calculado multiplicando-se duas vezes a média dos controles negativos.

## 2.8 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto em epígrafe é um subprojeto do projeto intitulado “Vetores de malária no Brasil: genética e ecologia” devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa do IEC, protocolo 079/2003 (Anexo 1) e autorizado junto ao Instituto Brasileiro do Meio ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, número 19933-1, de 21/07/2009 (Anexo 2).

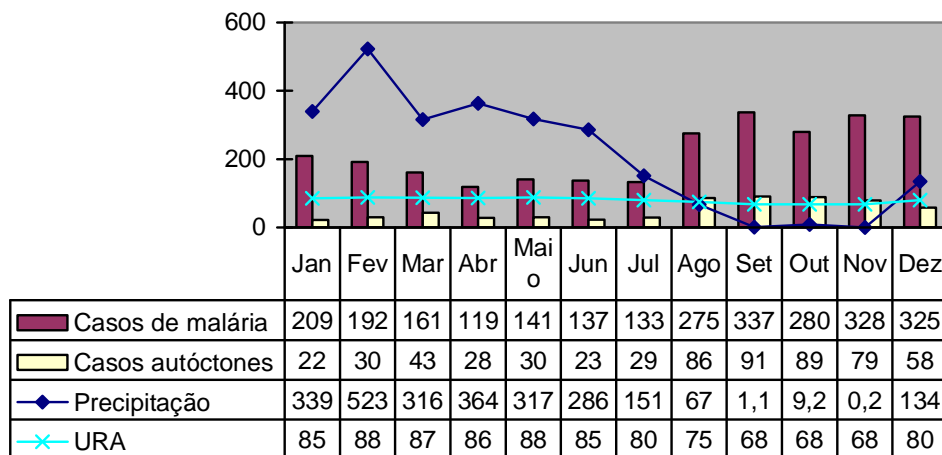
### 3 RESULTADOS

#### 3.1 MUNICÍPIO DE MACAPÁ, AP

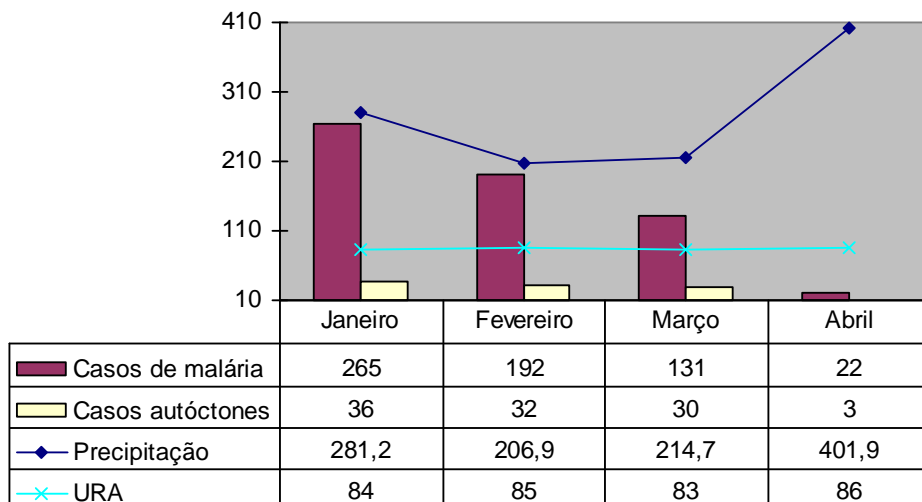
##### 3.1.1 Capturas

Foram realizadas seis capturas de 12 horas na Chácara Kerginaldo, comunidade Lagoa dos Índios, Macapá, duas no período menos chuvoso: 21 e 23/09/09, e, quatro na estação mais chuvosa : 01 e 03/02 e 05 e 07/04/10.

A temperatura e URA da localidade, mensurada durante as coletas variou de 27,7° C a 29,7°C e de 83,3% a 100%, respectivamente. Informações meteorológicas (Instituto Nacional de Meteorologia - INMET, 2010) e número de casos de malária, por mês, referentes ao período de estudo no município (janeiro de 2009 a abril 2010), constam nas Figs. 7 e 8.



**Fig. 7.** Casos de malária, precipitação total e, médias da umidade relativa do ar de Macapá, AP, no período de janeiro a dezembro de 2009. Notar o aumento de número de casos da doença, inclusive os autóctones, a partir de agosto, coincidindo com a diminuição da precipitação total (Fonte: INMET, 2010 e SIVEP-MALÁRIA, 2010).



**Fig. 8.** Casos de malária, precipitação total e médias da umidade relativa do ar de Macapá, AP, no período de janeiro a abril de 2010. Notar o decréscimo do número de casos da doença, inclusive os autóctones, coincidindo com o aumento da precipitação total (Fonte: INMET, 2010 e SIVEP-MALÁRIA, 2010).

### 3.1.2 Anofelinos coletados

Foram capturados 584 anofelinos. *An. albitarsis s.l.*, foi a espécie mais prevalente com 366 espécimes (62,7%), seguida do *An. darlingi* com 167 (28,6%), *An. triannulatus s.l.* com 33 (5,6%), *An. braziliensis* com 15 (2,6%) e *An. nuneztovari* com 3 (0,5%) (Tabela 1).

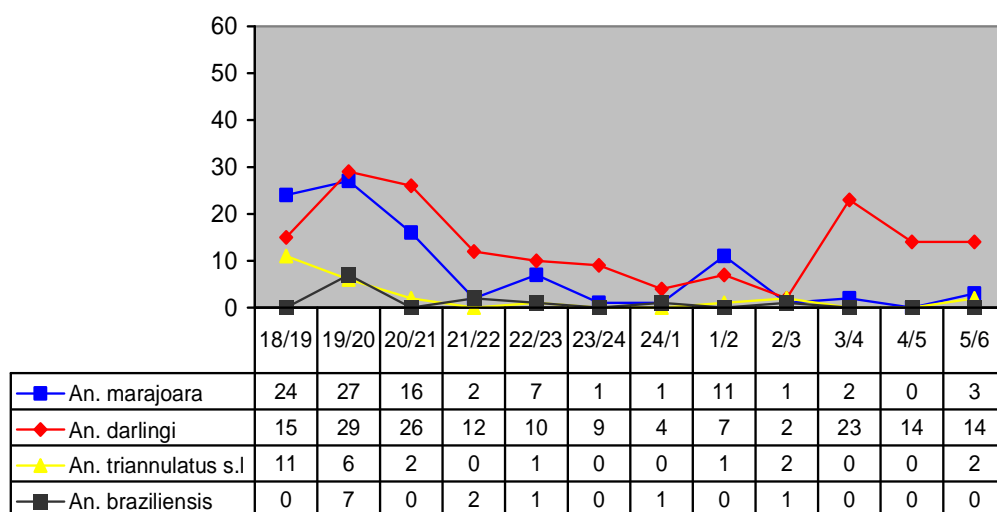
**Tabela 1.** Anofelinos coletados na Comunidade Lagoa dos índios, Macapá, em captura de 12 horas, no peridomicílio, nos dias 21 e 23/09/09, 01 e 03/02/10 e 5 e 7/04/10.

Espécies	Horário												Total
	18/19	19/20	20/21	21/22	22/23	23/24	24/1	1/2	2/3	3/4	4/5	5/6	
<b>Coleta dias 21 e 23/09/09</b>													
<i>An. albitarsis s.l</i>	24	27	16	2	7	1	1	11	1	2	0	3	95
<i>An. darlingi</i>	15	29	26	12	10	9	4	7	2	23	14	14	165
<i>An. triannulatus s.l</i>	11	6	2	0	1	0	0	1	2	0	0	2	8
<i>An. braziliensis</i>	0	7	0	2	1	0	1	0	1	0	0	0	12
<b>Total 1ª excursão</b>	<b>50</b>	<b>69</b>	<b>44</b>	<b>16</b>	<b>19</b>	<b>10</b>	<b>6</b>	<b>19</b>	<b>6</b>	<b>25</b>	<b>14</b>	<b>19</b>	<b>297</b>
<b>Coleta dias 01 e 3/02/10</b>													
<i>An. albitarsis s.l</i>	2	26	10	4	17	21	29	11	7	4	24	5	160
<i>An. darlingi</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>An. triannulatus s.l</i>	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	1	5
<i>An. braziliensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3
<i>An. nuneztovari</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3
<b>Total 2ª excursão</b>	<b>2</b>	<b>26</b>	<b>12</b>	<b>8</b>	<b>17</b>	<b>21</b>	<b>30</b>	<b>11</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>25</b>	<b>6</b>	<b>172</b>
<b>Coleta dias 05 e 7/04/10</b>													
<i>An. albitarsis s.l</i>	4	29	9	10	5	9	9	5	4	10	14	3	111
<i>An. darlingi</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>n. triannulatus s.l</i>	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
<b>Total 3ª excursão</b>	<b>6</b>	<b>29</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>5</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>10</b>	<b>14</b>	<b>3</b>	<b>115</b>
<b>Total geral</b>	<b>58</b>	<b>124</b>	<b>66</b>	<b>35</b>	<b>41</b>	<b>40</b>	<b>45</b>	<b>35</b>	<b>17</b>	<b>42</b>	<b>53</b>	<b>28</b>	<b>584</b>

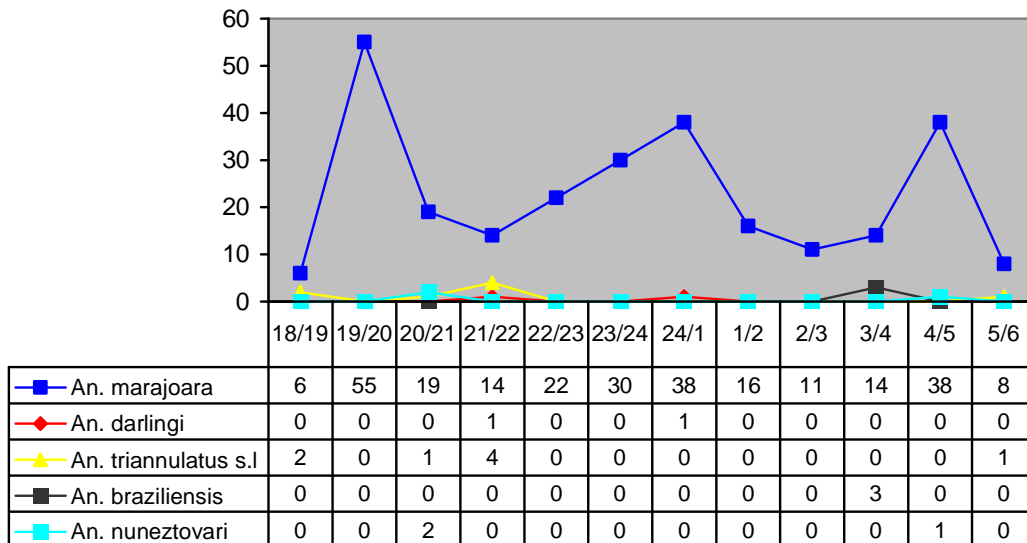
Mesmo com o número menor de coletas realizadas na estação menos chuvosa, a densidade anofélica foi superior daquela obtida na estação mais chuvosa (297 e 287 respectivamente).



O *An. darlingi* foi mais prevalente (165 espécimes) que o *An. albitarsis* (95 espécimes) no período após as chuvas e praticamente não foi coletado na estação mais chuvosa (2 exemplares) quando então a densidade desta última aumentou (271 espécimes) (Figs.9 e 10).

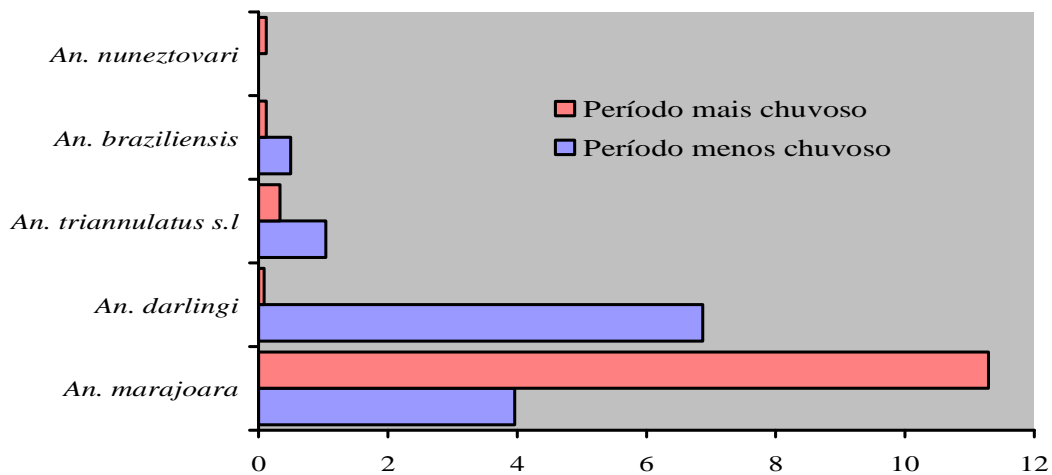


**Fig. 9.** Anofelinos coletados na comunidade Lagoa dos índios, Macapá, AP, por horário, no período menos chuvoso (dias 21 e 23/9/09). Observar que *An. darlingi* além ser a espécie mais prevalente foi a única coletada em todas as 12 horas de coleta, inclusive no horário das 5:00 às 6:00 horas.



**Fig. 10.** Anofelinos coletados na Comunidade Lagoa dos Índios, Macapá, no período mais chuvoso (dias 01 e 3/2 e 5 e 7/4/10). Observar que *An. marajoara* além ser a espécie mais prevalente foi a única coletada em todas as 12 horas de coleta, inclusive no horário das 5:00 às 6:00 horas. Apenas dois espécimes de *An. darlingi* foram capturadas nesta estação.

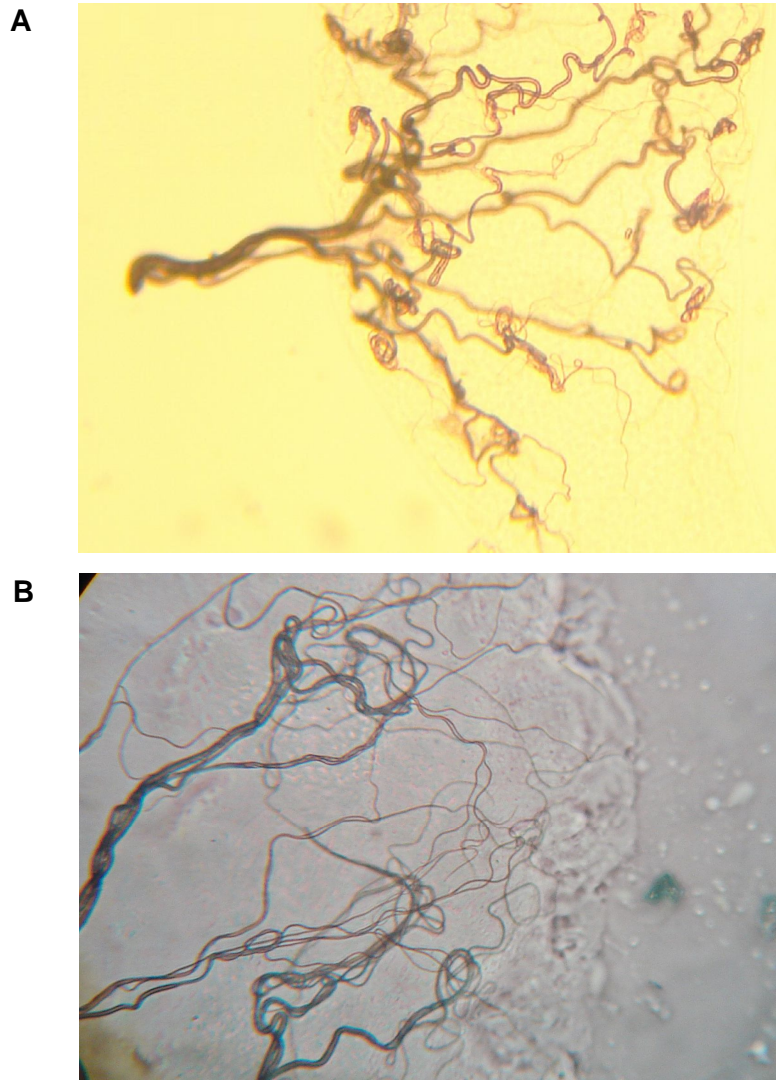
O IPHH foi variável entre as duas estações do ano para as duas espécies mais prevalentes na área. Assim para o *An. albitarsis s.l.*, este índice foi calculado em 3,96 e 11,29, respectivamente para a estação menos e mais chuvosa, enquanto para o *An. darlingi* em 6,87 e 0,083 (Fig. 11).



**Fig. 11.** Índice de Picada homem hora (IPHH) das espécies capturadas na Comunidade Lagoa dos índios, Macapá, AP, nos períodos menos chuvoso (21 e 23/09) e mais chuvoso (01 e 3/2/10 e 05 e 07/04/10). Observar que o IPHH das espécies muda com regime das chuvas da região.

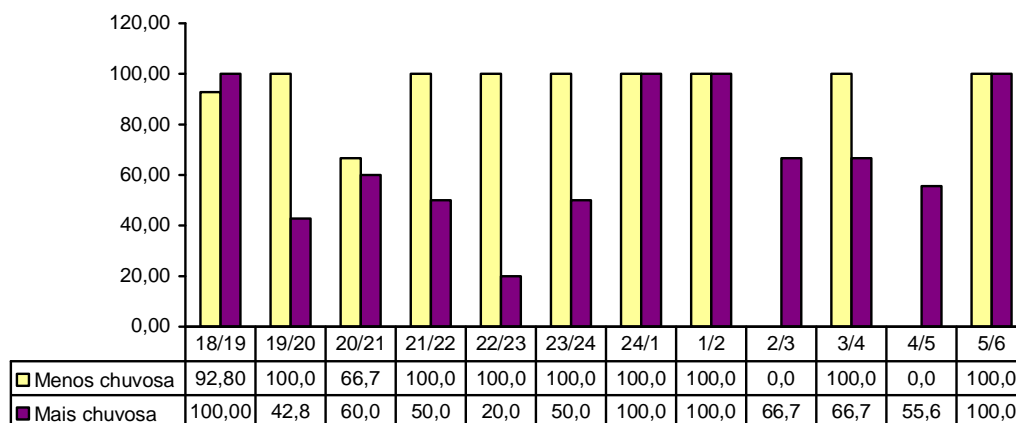
### 3.1.3 Análise dos ovários e determinação da taxa de paridade

Dos 366 *An. albitarsis s.l.* coletados, foram dissecados e analisados apenas os ovários de 89 fêmeas desta espécie, com fins a determinação da taxa de paridade. Destes, 24 (27,0 %) foram identificados como de fêmeas nulíparas e 65 (73,0 %) de paridas (Fig. 12).



**Fig. 12.** Microscopia de luz de ovários de fêmeas de *An. marajoara* coletadas na comunidade Lagoa dos Índios, Macapá, AP. Observar as extremidades das traquéolas ovarianas enoveladas em fêmeas nulíparas (**A**) e distendidas em fêmeas paridas (**B**) (aumento 400x).

Fêmeas paridas de *An. marajoara* foram coletadas em quase todos os horários trabalhados (exceto 2:00 h às 3:00 e de 4:00 às 5:00 h). A taxa de paridade variou de 0,0 a 100 na estação menos chuvosa e de 42,8 a 100,00 na mais chuvosa da região (Fig. 13).



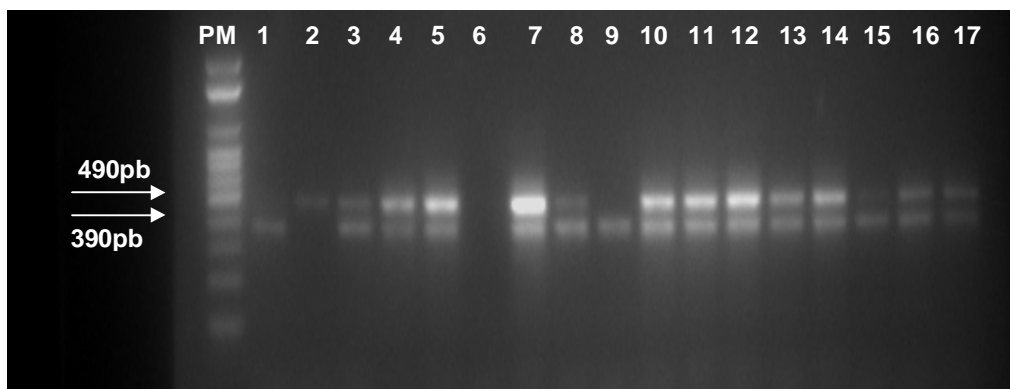
**Fig. 13.** Paridade de *An. marajoara* coletado na comunidade Lagoa dos Índios, Macapá, AP, por horário, nos períodos menos chuvoso (dias 21 e 23/09) e mais chuvoso (dias 01 e 3/02 e 5 e 7/04/10). Observar que fêmeas paridas são coletadas em quase todos os horários de coleta (exceto 2:00 às 3:00 e de 4:00 às 5:00 h).

### 3.1.4 Análise molecular para a identificação das espécies do complexo *An. albitarsis*

#### 3.1.4.1 Iniciador AlbCD

Este iniciador foi utilizado em 366 espécimes, sendo que não houve uniformidade no padrão de bandas observado no gel de agarose. Assim, em 36

amostras visualizamos apenas uma banda de ~390 pb, enquanto que nas demais (257), havia além desta uma banda de ~490 pb. A presença da banda de ~390pb nos 293 exemplares, sugeria a identificação de *An. marajoara* e/ou *An. deaneorum* (Fig. 14).



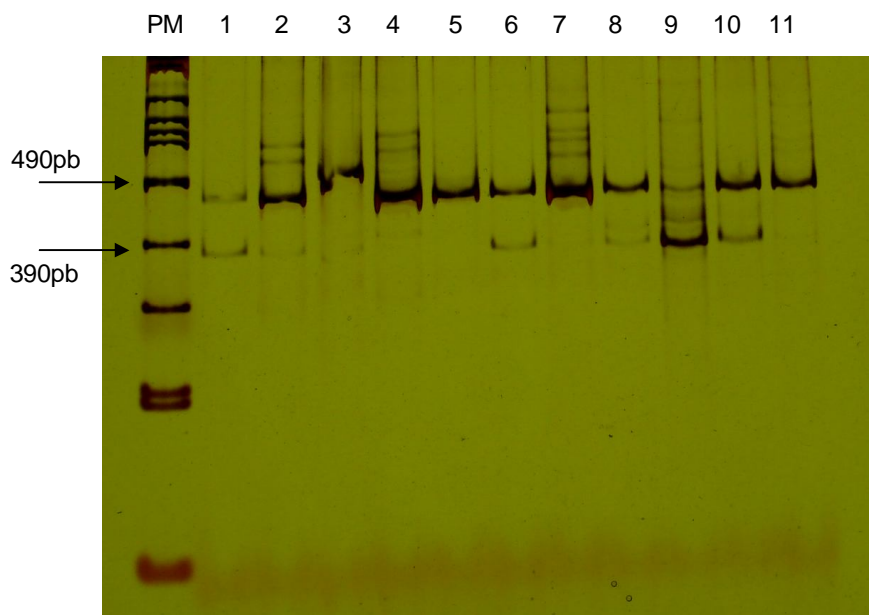
**Fig. 14.** Perfil de amplificação do fragmento do ITS2 pelo iniciador AlbCD em combinação com ITS2F e ITS2R, em gel de agarose a 1,5%.; 1 a 17 *An. albitarsis* s.l. Observar amplificação de uma única banda de ~490 pb da amostra 2 e de uma de ~390 pb da amostra 9. Amostra 6 considerada negativa. PM – Ladder 100pb (NEOBIO)

Em 40 espécimes, entretanto havia somente uma banda de ~490pb. A presença desta única banda excluía a possibilidade de identificação de *An. marajoara* e/ou *An. deaneorum* nesta amostragem (Fig. 13).

Com o objetivo de confirmar a presença da banda única de ~490 pb nesses 40 mosquitos, realizamos nova amplificação do DNA extraído em 14 desses

espécimes mas com visualização em gel de poliacrilamida. Em oito amostras, apareceu então a banda adicional de ~390 pb específica de *An. marajoara* (Fig. 15).

Trinta e três amostras testadas não revelaram amplificação de nenhuma banda, sendo consideradas negativas.

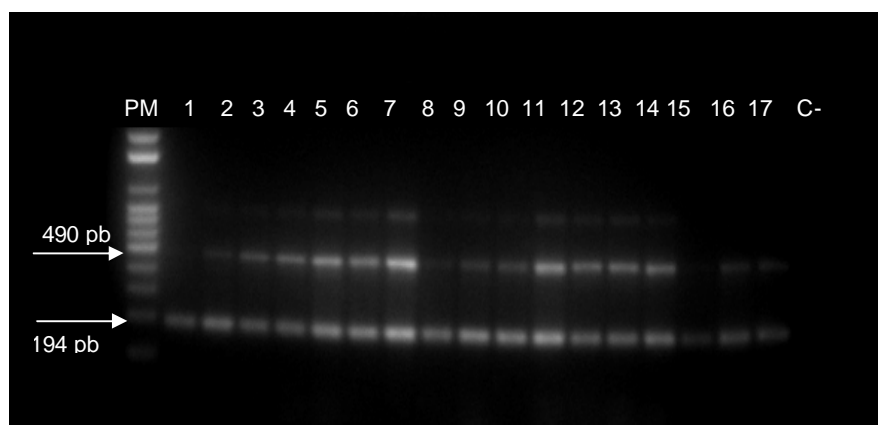


**Fig. 15.** Perfil de amplificação do fragmento do ITS2 pelo iniciador AlbCD em combinação com ITS2F e ITS2R, em gel de poliacrilamida. 1 a 11 *An. albitarsis s.l.* Notar a amplificação de apenas um fragmento de ~490pb na amostra 5. PM – Ladder 100pb (NEOBIO).

#### 3.1.4.2 Iniciador AlbC e F

Este iniciador foi utilizado para confirmar a identificação dos *An. marajoara*, *An. deaneorum* e *An. albitarsis* F naqueles espécimes que apresentaram a banda de ~390pb (isolada ou em conjunto com a de ~490 pb) no iniciador AlbCD.

No gel de agarose foi possível visualizar também diferentes padrões de bandas nos mosquitos testados para estes iniciadores em combinação com o ITS2F e ITS2R (Fig. 16).



**Fig. 16.** Perfil de amplificação do fragmento do ITS2 pelo iniciador AlbC e AlbF em combinação com ITS2F e ITS2R, em gel de agarose a 1,5%. 1 a 17 *An. albitarsis* s.l., C- Controle negativo. Notar amplificação do fragmento de ~194pb, específico de *An. marajoara*. PM – Ladder 100pb (NEOBIO).

Em razão da visualização da banda sugestiva de *An. marajoara*, em parte das amostras reveladas pelo gel de poliacrilamida (de um total de 40 que apresentaram apenas a banda de ~490 pb no gel de agarose pelo iniciador AlbCD), optamos por

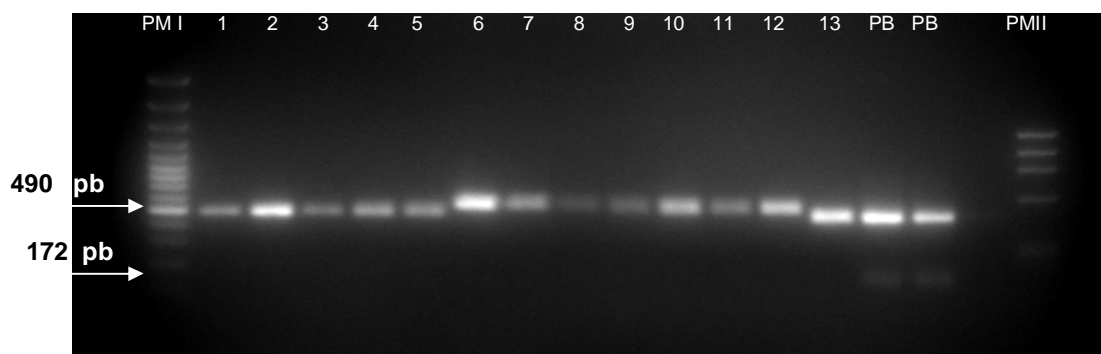


testa-las também por este iniciador. Assim, em apenas 27 amostras foi possível visualizar a banda de ~194 pb específica para *An. marajoara*.

Em resumo: das 333 amostras testadas, 153 apresentaram banda específica do *An. marajoara* (~194 pb); 52 apresentaram banda dupla de (~490 pb e ~194 pb), 115 apresentaram bandas múltiplas além da de ~194 pb e ~490 pb e 13 apenas uma banda de ~490 pb.

#### 5.1.4.3 Iniciador AlbB

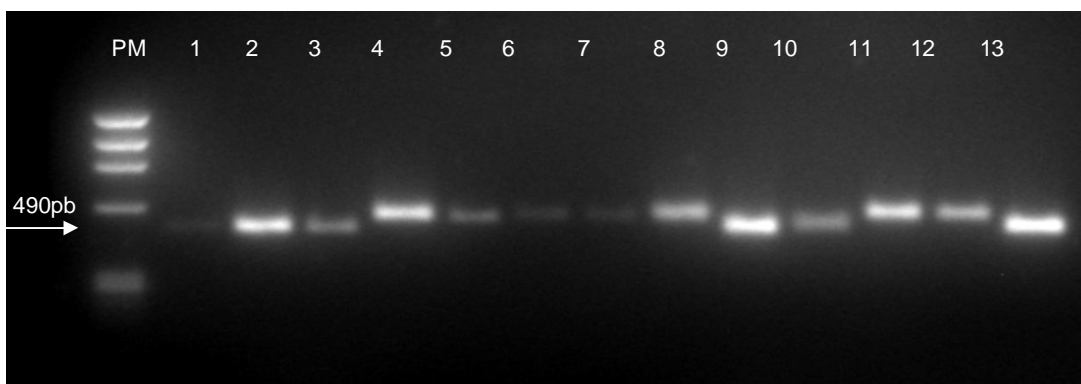
Foram testados os 13 espécimes não identificados pelo iniciador AlbC e AlbF como *An. marajoara*. Todos exibiram apenas um fragmento amplificado de ~490 pb no gel de agarose (Fig. 17).



**Fig. 17.** Perfil de amplificação do fragmento do ITS2 pelo iniciador AlbB em combinação com ITS2F e ITS2R, em gel de agarose a 1,5%. 1 a 13 *An. albitarsis s.l.* PB- mosquitos de Peixe- Boi. Observar ausência de fragmento de 172pb nas amostras de Macapá. PMI – Ladder 100pb (MBI-Fermentas); PMII – Ladder (Hae III).

#### 3.1.4.4 Iniciador AlbA

Com a finalidade de confirmar a identificação de *An. albitarsis* A, testou-se os 13 espécimes positivos que apresentaram a banda de ~490 pb tanto no iniciador AlbCD quanto no AlbB. Visualizou-se também apenas a banda de ~490 pb (Fig. 18).



**Fig. 18.** Perfil de amplificação do fragmento do ITS2 pelo iniciador AlbA em combinação com ITS2F e ITS2R, em gel de agarose a 1,5%. 1 a 13 *An. albitarsis* s.l. Notar amplificação apenas de fragmentos de ~490pb em todas as amostras. PM – Ladder (Hae III).

#### 3.1.5 Pesquisa da proteína CS por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Todos os 366 *An. albitarsis* s.l coletados foram analisados individualmente pelo teste ELISA. Destes, 11 espécimes estavam positivos para plasmódios humanos testados. Como um espécime positivo para o *P. falciparum* não foi

identificado como *An. marajoara*, calculamos uma taxa de infecção natural para a espécie em 3,1%.

Dos *An. marajoara* testados, 7 foram positivos para *P.vivax* 210, 1 para *P.vivax* 247 e 2 para *P.falciparum* (Tabela 2).

**Tabela 2.** Espécimes de *An. marajoara* coletados na Comunidade Lagoa dos Índios, Macapá, AP, positivas no teste ELISA para espécies/variantes de plasmódios humanos, com resultado da análise dos ovários, por data e horário de coleta.

<b>Espécie identificada PCR</b>	<b>Data da coleta</b>	<b>Horário</b>	<b>Infecção por Plasmódio/variante</b>	<b>Ovário</b>
<b>Período menos chuvoso</b>				
<i>An.marajoara</i>	21/9/09	18/19 h	<i>P.vivax</i> 210	Parida
Negativo	21/9/09	19/20 h	<i>P.falciparum</i>	NR
<i>An.marajoara</i>	23/9/09	20/21h	<i>P.falciparum</i>	Parida
<b>Período mais chuvoso</b>				
<i>An.marajoara</i>	1/2/10	19/20 h	<i>P.vivax</i> 210	NR
<i>An.marajoara</i>	1/2/10	19/20 h	<i>P.vivax</i> 210	NR
<i>An.marajoara</i>	1/2/10	19/20 h	<i>P.vivax</i> 210	NR
<i>An.marajoara</i>	1/2/10	20/21h	<i>P.vivax</i> 210	NR
<i>An.marajoara</i>	1/2/10	20/21h	<i>P.vivax</i> 210	NR
<i>An.marajoara</i>	3/2/10	3/4h	<i>P.falciparum</i>	Parida
<i>An.marajoara</i>	5/4/10	22/23h	<i>P.vivax</i> 247	NR
<i>An.marajoara</i>	5/4/10	5/6 h	<i>P.vivax</i> 210	Parida

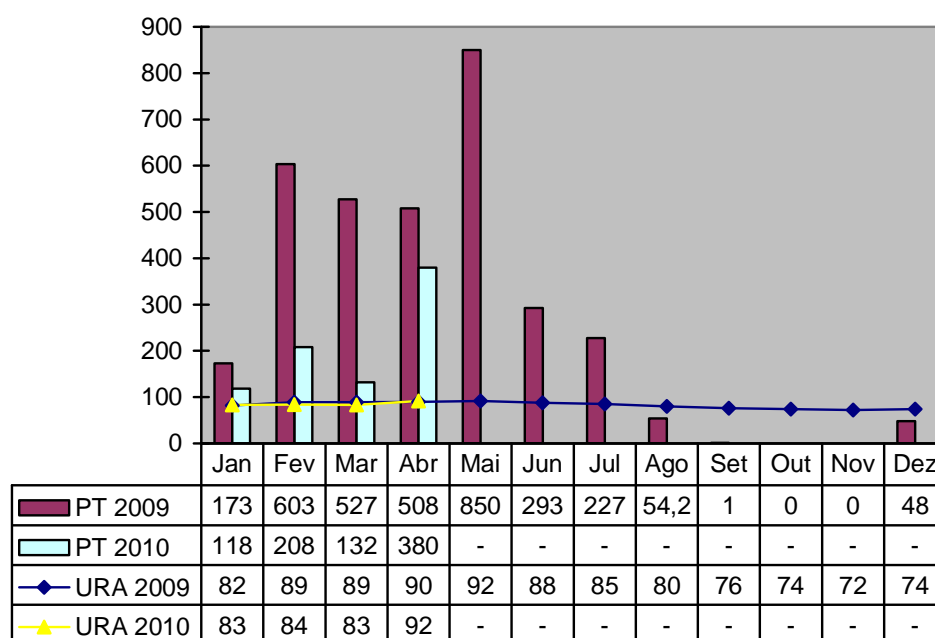
NR= Não realizado

### 3.2 MUNICÍPIO DE PEIXE BOI, PA.

#### 3.2.1 Capturas

Foram realizadas duas capturas de 12 horas na Fazenda Urucuri, Peixe-Boi, PA. A temperatura ambiental mensurada durante as coletas variou de 25° a 28° C, e a URA de 78% a 94%.

Informações meteorológicas (INMET, 2010) e número de casos de malária, por mês, referentes ao período de estudo no município (janeiro de 2009 a abril 2010), constam na Fig. 19.



**Fig. 19.** Precipitação total e, médias da umidade relativa do ar da estação de Tracuateua, Pará, no período de janeiro de 2009 a abril de 2010. Observar que a partir do mês de agosto diminuiu a precipitação na região no ano de 2009 (Fonte: INMET, 2010 e SIVEP-MALÁRIA, 2010).

### 3.2.2 Anofelinos coletados

Foi capturado um total de 43 anofelinos pertencentes a quatro espécies. *An. triannulatus s.l* foi a espécie mais prevalente com 20 espécimes coletados (46,5 %), seguida do *An. albitarsis s.l.* com 13 (30,2 %), do *An. darlingi* com 8 (18,6 %), e do *An. nuneztovari* com 2 (4,7 %) (Tabela 4).

Mesmo com o baixo número de coletas realizadas no local, observa-se maior densidade anofélica na estação mais chuvosa do ano.

**Tabela 4.** Anofelinos coletados na Fazenda Urucuri, Peixe-Boi, no dia 26/06/09, e 22/03/10, por horário.

Espécies	Horário											Total	
	18/19	19/20	20/21	21/22	22/23	23/24	24/1	1/2	2/3	3/4	4/5		5/6
<b>Coleta dia 26/06/09</b>													
<i>An. albitarsis s.l</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	<b>3</b>
<b>Total 1ª excursão</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
<b>Coleta dia 22/03/10</b>													
<i>An. albitarsis s.l</i>	1	0	2	5	0	0	0	2	0	0	0	0	<b>10</b>
<i>An. darlingi</i>	0	1	1	6	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>8</b>
<i>An. triannulatus s.l</i>	0	3	0	14	2	0	0	0	1	0	0	0	<b>20</b>
<i>An. nuneztovari</i>	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>2</b>
<b>Total 2ª excursão</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>27</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>40</b>
<b>Total geral</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>27</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>43</b>

O IPHH do *An. albitarsis* B variou de 0,0 a 0,08 na coleta realizada no dia 26/06/09 e de 0,00 a 0,2 na captura do dia 22/03/10.

### 3.2.3 Análise dos ovários e determinação da taxa de paridade

Foram dissecados os ovários de todas as 13 fêmeas de *An. albitarsis s.l.* coletadas na Fazenda Urucuri, Peixe-Boi. Destes, 2 (15,4%) eram de fêmeas nulíparas e 11 (84,6%) de paridas. A taxa de paridade coletada para as fêmeas coletadas foi de 33,33% para a primeira excursão e 100% para a segunda excursão.

### 3.2.4 Pesquisa da proteína CS por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Todos os 13 *An. albitarsis s.l.* coletados foram analisados individualmente pelo teste ELISA, sendo todos negativos para as espécies/variantes de plasmódio testadas (*P. vivax* 210, *P. vivax* 247 e *P. falciparum*).

### 3.2.5 Análise molecular para a identificação das espécies do complexo *An. albitarsis*.

#### 3.2.5.1 Iniciador AlbCD

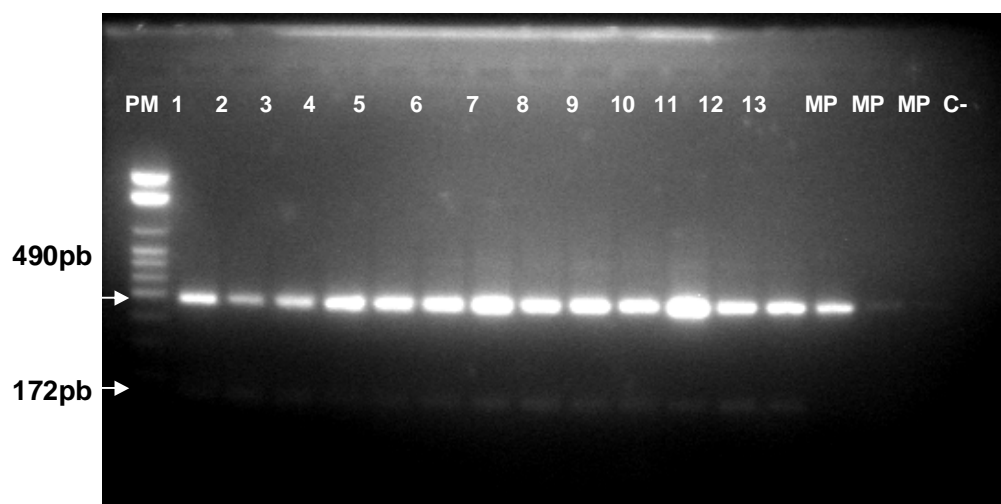
Todos 13 *An. albitarsis s.l.* testados individualmente para este iniciador apresentaram uma banda única de ~490 pb, sendo portando sugestiva de *An. albitarsis s.s* (espécie A) ou *An. oryzalimnetes* (espécie B) (Fig. 20).



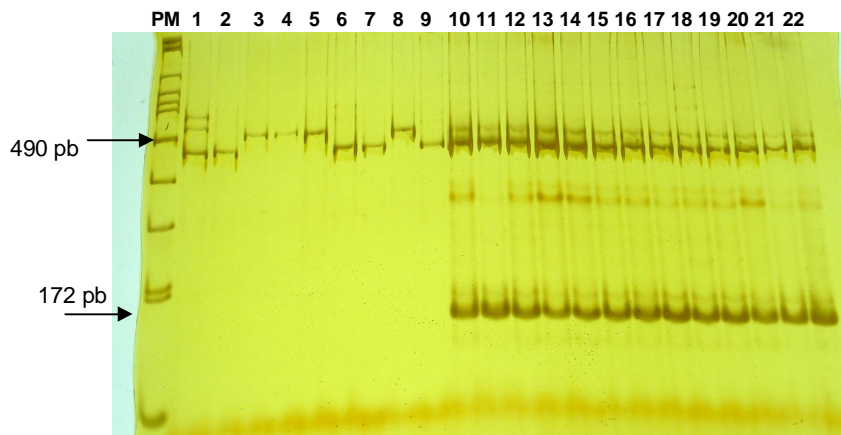
**Fig. 20.** Perfil de amplificação do fragmento do ITS2 pelo iniciador AlbCD em combinação com ITS2F e ITS2R, em gel de agarose a 1,5%. 1 a 8 *An. albitarsis s.l.*, C- = controle negativo. Notar amplificação de fragmentos de ~490pb. PM – Ladder 100pb (NEOBIO).

### 3.2.5.2 Iniciador albB

Os 13 mosquitos testados amplificaram uma banda de ~490 pb e outra de ~172 pb, o que caracteriza o *An. oryzalimnetes*. Estes resultados foram também confirmados pelo gel de poliacrilamida (Fig. 21 e 22).



**Fig. 21.** Perfil de amplificação do fragmento do ITS2 pelo iniciador AlbB em combinação com ITS2F e ITS2R, em gel de agarose a 1,5%. Notar amplificação de fragmento de 172 pb, específico de *An. oryzalimnetes*; PM – Ladder 100pb (NEOBIO); 1 a 13 *An. oryzalimnetes*; MP: mosquitos de Macapá; C- Controle negativo.



**Fig. 22.** Perfil de amplificação do fragmento ITS2 pelo iniciador AlbB em combinação com ITS2F e ITS2R, em gel de poliacrilamida. Notar amplificação de fragmento de 172 pb, específico de *An. oryza limnetes*; PM – Ladder 100pb (NEOBIO); 10 a 22 *An. oryza limnetes*.

### 3.2.6 Pesquisa da proteína CS por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Todos os 13 *An. albicans* coletados foram analisados individualmente pelo teste, sendo todos negativo para as espécies de plasmódio testadas.



## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 ANOFELINOS DE MACAPÁ

Os resultados de seis coletas de anofelinos com atração humana realizada por 12 horas consecutivas, demonstraram que na Comunidade Lagoas dos índios em Macapá, AP, ocorrem cinco espécies de anofelinos: *An. marajoara*, *An. darlingi*, *An. braziliensis*, *An. triannulatus* e *An. nuneztovari*. A similaridade entre essa composição faunística e àquela obtida por Segura (1998) e Galardo (2010), exceto pelo achado de *An. peryassui* por esse último autor, revela que nos últimos 15 anos houve pouca ou nenhuma mudança na fauna anofélica da área.

Outros anofelinos têm sido identificados no município, tanto por caracteres morfológicos (Galardo *et al.*, 2009, Bergo *et al.*, 2007) quanto por moleculares (Mackeon *et al.*, 2010). Análises de DNA mitocondrial e região ITS2 de espécimes do complexo *An. albitarsis* realizadas por Mackeon *et al.* (2010), permitiram pela primeira vez detectar a ocorrência do *An. oryzalimnetes* em Macapá.

Em nosso trabalho, a densidade de mosquitos variou segundo a estação do ano. Assim, em setembro de 2009, mês cuja precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar foram uma das mais baixas registradas no ano (1,1 mm e 68, respectivamente), a proporção de mosquitos coletados foi ligeiramente superior (50,8%) a calculada para a estação mais chuvosa da região.

Galardo (2010) e Segura (1998), também detectaram diferenças na densidade dos anofelinos em relação ao regime de chuvas, mas observaram maior prevalência das espécies na época mais chuvosa da região.

Segundo Forattini (1987), variações na densidade de mosquitos relacionadas a precipitação pluviométrica são esperadas, uma vez que a chuva, o vento e a topografia do terreno, constituem fatores de natureza exógena que influenciam diretamente na população dos culicídeos. Segundo ainda este autor, a densidade de mosquitos de uma região tende a aumentar nas épocas de maior precipitação pluviométrica.

Deste modo, nossos resultados podem ter sido influenciados pelas poucas coletas realizadas no local, e pelo baixo tamanho amostral (584 espécimes), quando comparados aos levantamentos periódicos e maior número de mosquitos capturados por Segura (1998) e Galardo (2010) e (9.102 e 4.601 anofelinos, respectivamente).

Por outro lado, nossos dados se assemelham a um estudo conduzido na Serra do Navio, Estado do Amapá por Póvoa *et al.* (2001), cujas coletas resultaram em 3.053 espécimes, com maior densidade anofélica (77,2%) também no período de menor precipitação pluviométrica.

A pluviosidade da região influenciou ainda a relação de espécies capturadas em cada estação do ano, destacando-se a variação sazonal observada para as mais prevalentes da área. Assim, maior proporção de espécimes do *An. marajoara*, foi detectada na estação mais chuvosa (94,4%), e menor na menos chuvosa (32%). A relação entre aumento do regime de chuvas e densidade populacional, deste anofelino, foi também observada por Segura (1998) e Galardo (2010). Essa influência positiva da precipitação pluviométrica sobre a população de *An. marajoara* pode ser explicada pelos hábitos ecléticos deste anofelino, que sem preferência por criadouros, se aproveita da abundância das chuvas e conseqüente ampliação de

sítios de procriação de mosquitos, para se desenvolver numa grande variedade de coleções hídricas temporárias ou definitivas, naturais ou artificiais, expostas à luz ou sombreadas (Consoli & Oliveira, 1994).

Observamos também que o aumento da pluviosidade diminuiu a população do *An. darlingi*. Desta forma, No período mais seco da região (setembro) a proporção desta espécie em relação às demais foi de 55,5%, caindo para 0,7% nos meses mais chuvosos. Esta redução populacional é concordante às observações do comportamento desta espécie no Brasil, realizadas por Charlwood (1996), demonstrando que a redução da mortalidade de larvas e pupas se dá na estação de baixa precipitação pluviométrica.

Foi no início do período menos chuvoso em Macapá, AP, que coincidiu a alta do *An. darlingi* com o aumento dos registros de casos de malária no ano de 2009. Nossa análise foi baseada em duas coletas realizadas nesse período (setembro). Todavia, acreditamos que seja consistente, uma vez que concordam com os obtidos em monitoramento mensal da fauna anofélica realizada por Galardo *et al.* (2009) em três comunidades do Estado do Amapá, entre 2003 e 2005, e que revelam forte correlação positiva entre a abundância desta espécie, escassez de chuvas e incremento dos casos de malária nesses locais. Galardo *et al.* (2009) sugerem que o conhecimento desse tipo de associação é de grande importância para implantação de medidas de controle da malária, principalmente em áreas endêmicas onde a transmissão está associada a presença dos *An. darlingi* e *An. marajoara*.

A baixa densidade do *An. darlingi* na estação mais chuvosa (2 exemplares coletados), não diminui sua importância epidemiológica nesse período, uma vez que,

de acordo com Deane (1948), na região amazônica esta espécie é vetora primária de malária, altamente susceptível aos plasmódios humanos, sendo capaz de transmiti-los dentro e fora das casas mesmo quando sua densidade está baixa.

Análise das Informações de notificações de malária em Macapá, AP, entre janeiro de 2009 e abril de 2010, incluindo os 709 casos autóctones, revelam ocorrência ininterrupta da doença no período de nosso estudo (BRASIL, SIVEP-MALÁRIA 2010). Possivelmente, grande parte desses casos tenha sido transmitida pelos *An. darlingi* e *An. marajoara*, ambas as espécies já encontradas naturalmente infectadas na localidade estudada por (Segura (1998) e Galardo (2010) e em outras áreas do Estado por Segura (1998) e Póvoa *et al.* (2001). Estes anofelinos, mesmo exibindo variação sazonal, foram os mais prevalentes em todas as capturas por nós realizadas na localidade estudada, representando juntas 91,3% da fauna anofélica local.

Vale ressaltar que, os demais anofelinos capturados na área também já foram encontrados naturalmente infectados no nosso país, conforme registros de Burkot *et al.* (1984), Arruda *et al.* (1986), Deane (1986) e Tadei & Thatcher (2000).

Os resultados do teste ELISA para detecção de infecção do *An. marajoara*, representam elemento a mais para ratificar a importância desta espécie na epidemiologia local da malária, pois detectamos 10 espécimes infectados por *P. vivax* ou por *P. falciparum* (além de um *An. albitarsis s.l.* não identificado pela ITS2) em cinco das seis capturas realizadas na comunidade Lagoa dos Índios.

Curiosamente, apesar dos achados de infecção natural para o *An. marajoara*, no período de nosso trabalho, somente em 2009 houve registro de casos de malária nesta localidade (3 casos): 1 caso em cada mês, janeiro, fevereiro e abril (BRASIL, SIVEP/MALÁRIA 2010).

Segundo Coura *et al.* (2006), no Brasil, ainda não há consenso sobre o conceito de malária assintomática, cujo perfil epidemiológico é de baixa endemicidade. Todavia, não podemos descartar a possibilidade de sua ocorrência na comunidade estudada, pois estudos conduzidos por Camargo *et al.* (1999), Alves *et al.* (2002), Suarez-Mutis *et al.* (2007) e Hinke (2009), em outras áreas da Amazônia brasileira detectaram a presença de portadores do parasito da malária inclusive como potenciais reservatórios de *P. vivax*, diagnosticados pela PCR capazes inclusive de infectar experimentalmente espécimes de *An. darlingi* (Alves *et al.*, 2005).

Além disso, observamos que os moradores e trabalhadores da região estavam frequentemente expostos a picada dos mosquitos, e pareciam não se preocupar com o risco de transmissão da malária. Assim, não utilizaram medidas de proteção individual como repelentes, se reuniam frequentemente à noite para conversar foras das casas. Medidas de proteção coletiva, também não foram observadas, pois nas casas não havia telas em portas e janelas, e muitos dormiam em redes sem mosquiteiros amarradas em locais abertos como pátios e varandas.

Outro fator de risco importante a ser considerado na epidemiologia local da malária diz respeito à atividade hematofágica de anofelinos durante a escotofase. Nossos dados demonstram que as espécies procuraram por repasto sanguíneo em

todos os horários da noite, tanto no período mais seco quanto no mais chuvoso da região, dados estes concordantes aos de Segura (1998) e Galardo (2010).

Ao analisarmos isoladamente as duas espécies mais prevalentes da localidade, únicas a apresentarem atividade hematofágica durante toda a noite, constatamos que exibem picos de densidade diferenciados segundo o período de maior e menor abundância de chuvas. O *An. marajoara* apresentou um pico importante no início da noite (19:00h às 20:00h), e dois secundários. Estes últimos das 22:00h às 23:00h e de 1:00h às 2 horas da manhã no período menos chuvoso e das 24:00h à 1:00h e das 4:00h às 5:00 horas da manhã no mais chuvoso. Galardo (2010) observou que o horário de maior atividade desta espécie no peridomicílio ocorreu até às 20 horas, não exibindo picos secundários para realização de repasto sanguíneo.

Em relação ao *An. darlingi*, detectamos maior atividade apenas para o período menos chuvoso, nos primeiros horários da noite (19 às 20) e de 1 às 2 e 3 às 4 horas da manhã. Na época mais chuvosa, coletamos apenas dois espécimes deste anofelino em dois horários (21 às 22 e 24 à 1 hora da manhã). Os dados de Galardo (2010) não revelam um horário definido de maior atividade hematofágica para esta espécie.

Segundo Tadei & Thatcher (2000), entre os anofelinos, a procura pelo repasto sanguíneo pode ser influenciada pelo local onde os mosquitos ocorrem (área urbana ou rural), pela sua densidade em relação aos outros culicídeos, pela estação do ano (seca ou chuvosa), pela distância de floretas e moradias e ainda pela presença de outros hospedeiros na região, fatores esses, comuns a mesma área trabalhada por

nós e Galardo (2010). Assim, estudos periódicos no local podem esclarecer melhor a biologia e comportamento dos vetores da área.

Ressaltamos que levantamentos entomológicos preliminares à implantação de medidas de controle da malária em determinada região, são essenciais, uma vez que segundo Tadei & Thatcher (2000), ao longo do tempo os anofelinos podem alterar seus hábitos e se adaptar a mudanças ambientais.

Desta forma, estudos da dinâmica populacional de vetores de malária e de parâmetros entomológicos como a longevidade, são particularmente interessantes para a análise da capacidade vetorial (Kakitani & Forattini, 2000). Assim, quanto maior a sobrevivência de uma espécie, maior será a probabilidade de vir a se infectar e de transmitir o plasmódio (Fernandez & Forattini, 2003).

Apesar de não termos avaliado a idade fisiológica das fêmeas, nossos dados revelam uma população mais velha de *An. marajoara* circulando na Comunidade Lagoa dos Índios, pois no período estudado 73% dos espécimes dissecados eram fêmeas paridas. Jensen *et al.* (1998) relatam que elevada taxa de paridade sugere maior longevidade da população.

Quando analisamos separadamente os períodos de menor ou maior precipitação pluviométrica, a proporção de fêmeas paridas permanece superior em ambas as estações, alcançando no período mais seco, um valor de 90%, período este que coincide com o aumento da densidade populacional do *An. darlingi*, espécie esta, de acordo com Deane (1948) com alta capacidade vetorial, e capaz de manter a doença de forma endêmica na região Amazônica.

Além disso, no período chuvoso a proporção de nulíparas foi maior (35,6%) do que no período menos chuvoso (10%), dado que corrobora com o aumento da densidade populacional do *An. marajoara* observado na época de maior abundância de chuvas. De acordo com Bona (2008), proporções elevadas de nulíparas podem ser explicadas pela contínua emergência de adultos dos criadouros de mosquitos ou por alta taxa de mortalidade de fêmeas paridas. Apesar de não termos acompanhado a dinâmica da população desta espécie, não acreditamos na influência deste último fator, pois a população de paridas se manteve alta nos meses de maior precipitação pluviométrica.

Concluimos, portanto, que as seguintes características biológicas dos *An. darlingi* e *An. marajoara* descritas, como: presença das espécies nas seis coletas realizadas, (inclusive nas estações menos e mais chuvosa da região); atividade hematofágica nas 12 horas da ecotofase; maior prevalência do que os outros anofelinos presentes na localidade, e infecção natural de espécimes de *An. marajoara*, ratificam a importância desses anofelinos como vetores de malária no município de Macapá, AP, particularmente na comunidade Lagoa dos Índios.

#### 4.2 ANOFELINOS DE PEIXE BOI, PA

Nossos resultados revelam que na Fazenda Urucuri, Peixe Boi, PA, ocorrem quatro espécies de anofelinos, em ordem de maior prevalência no período estudado: *An. triannulatus* s.l., *An. oryzalimnetes*, *An. darlingi* e *An. nuneztovari*.



Uma amostragem pequena de anofelinos (43 espécimes), obtida em apenas uma localidade, não nos parece ser representativa do município. Somado a isto, resultados de estudos ali conduzidos discordam dos nossos, quanto ao número de espécies coletadas: Deane (1947) relata a ocorrência de três anofelinos (*An. albitarsis s.l.*, *An. braziliensis* e *An. nuneztovari*), Xavier & Mattos (1975) de apenas dois (*An. albitarsis* e *An. nuneztovari*), e mais recentemente Santos *et al.* (2007) identificaram sete espécies no município (*An. darlingi*, *An. albitarsis s.l.*, *An. aquasalis*, *An. nuneztovari*, *An. triannulatus s.l.*, *An. oswaldoi s.l.* e *An. argyritarsis*).

Vale salientar que, variação temporal na fauna de anofélica tem sido registrada em locais como em Belém por Póvoa *et al.* (2003) e Silva *et al.* (2006, Fauna anofélica da cidade...) e influenciada dentre outros fatores, pela expansão urbana e consequente destruição de criadouros, levando a manutenção desses mosquitos nas poucas áreas de mata da cidade. Neste cenário, Peixe-Boi, PA, segundo Donato *et al.* (2010), representa uma das últimas áreas da região Bragantina com importantes fragmentos florestais bastante vulnerável a expansão das atividades agropecuárias, portanto levantamentos periódicos e em vários locais da cidade, podem revelar com mais precisão as espécies componentes da fauna anofélica do município.

Segundo Santos *et al.* (2007), a densidade de anofelinos é alta no município e se mantém assim durante todo o ano. Obtivemos, entretanto, um número muito baixo de mosquitos nas coletas de 12 horas realizadas na localidade, principalmente na primeira excursão em junho de 2009 (apenas 3 espécimes). Análise dos dados de precipitação pluviométrica obtidos da estação meteorológica mais próxima

(Tracuateua, PA) indica que tanto as chuvas quanto a umidade relativa do ar foram relativamente altas no período de estudo não tendo influenciado, a nosso ver, nessa baixa densidade populacional encontrada. Descartamos também a interferência de ações de controle vetorial na população de anofelinos da cidade, pois Peixe-Boi, PA, segundo Santos *et al.* (2007) é considerada área de baixo risco de transmissão de malária, inexistindo ali atividades de combate a seus transmissores.

Service (1980) admite que condições meteorológicas como temperatura, e vento possam exercer influência sobre a densidade, ecologia e comportamento dos mosquitos. Desta forma, capturas periódicas no local com monitoramento desses e outros fatores podem, segundo Tadei & Thacher (2000), trazer informações sobre a flutuação da população de anofelinos da área.

Os resultados do ELISA demonstram que nenhum *An. oryzalimnetes* coletado na localidade trabalhada estava infectado com as espécies testadas de plasmódio. Li & Wilkerson (2007) destacam que a capacidade vetorial deste anofelino ainda não está devidamente esclarecida.

Nossa pequena amostragem não nos possibilita concluir que o *An. oryzalimnetes* seja capaz de se infectar com o plasmódio. Resultados de testes de infectividade natural (ELISA) realizados pelo Laboratório de Entomologia de Malária do Instituto Evandro Chagas, não demonstram infecção natural para este anofelino (Povoa, comunicação pessoal). Informações do BRASIL, SIVEP- MALÁRIA (2010) revelam também que no período de 2003 a 2010, a casuística da doença tendeu ao declínio durante os anos avaliados, com a ocorrência de um surto importante em

2003 (220 casos, 210 autóctones), inclusive com notificações na localidade estudada.

Vale salientar, que há circulação do plasmódio na mesorregião do Nordeste paraense. Oliveira-Filho & Martinelli (2009) destacam que entre 1998 e 2006, nove municípios apresentaram IPA  $\geq 50$  (alto risco de transmissão da doença): Augusto Corrêa, Aurora do Pará, Ipixuna do Pará, Nova Esperança do Piriá, Tailândia, Tracuateua, Viseu, Cachoeira do Piriá e Santarém Novo). Este último distante apenas 37 Quilômetros de Peixe-Boi.

Nossos dados sobre a ocorrência de anofelinos em Peixe-Boi, PA, inclusive do *An. darlingi*, espécie segundo Deane (1986), de alta susceptibilidade a infecção malárica, somados ao encontro de grande proporção de fêmeas de *An. albitarsis* B velhas (paridas) (84,6 %), e portanto com melhores chances de infecção e transmissão do plasmódio, além da possibilidade de migração humana de outras cidades onde ocorre transmissão de malária, atraídas principalmente pelos rios e igarapés da cidade, são fatores a serem considerados no estabelecimento de medidas de vigilância epidemiológica da doença no município de Peixe-Boi, PA.

#### 4.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR do *An. albitarsis* s.l DE MACAPÁ, AP.

De acordo com Merritt *et al.* (2005), estudos de identificação taxonômica de espécies crípticas são mais do que atividades acadêmicas quando suas espécies se comportam como vetores de doenças em humanos.

Por análises morfométricas, Motoki *et al.* (2009), separaram as cinco espécies do complexo *An. albitarsis* (com exceção do *An. albitarsis* F). Mas a identificação morfológica em chaves dicotômicas nem sempre é possível, principalmente quando as espécies ocorrem de forma simpátrica. Por exemplo, segundo Forattini (2002), na fase larvária, os *An. marajoara* e *An. albitarsis* s.s são idênticos, e se distinguem do *An. deaneorum* pelo aspecto distalmente penado da cerda 3-C. Já na fase adulta, as duas primeiras espécies continuam morfológicamente semelhantes, porém no *An. deaneorum* os tufos póstero-laterais de escamas surgem a partir do IV ou V segmento abdominal.

Assim, de acordo com Forattini (2002), a análise da genitália masculina, seria uma possibilidade de distinção entre os *An. marajoara* e *An. albitarsis* s.s., pois apenas a primeira espécie apresenta o claspete ventral com ápice truncado e contorno trapezoidal. Esta estrutura, entretanto é igual nos *An. albitarsis* s.s e *An. deaneorum*, cujo ápice é arredondado conferindo aspecto triangular ou cônico.

Wilkerson, Gaffigan & Lima (1995) salientam que a identificação específica, representa informação chave em estudos que avaliem o papel de anofelinos de determinada região, em transmitir malária. Desta forma, a biologia molecular pode ser uma ferramenta adicional a estudos de fauna anofélica de determinada região, em especial onde ocorrem complexos de espécies crípticas, como o *An. albitarsis* s.l., em áreas endêmicas de malária.

Nossos resultados confirmam que o rDNA - ITS2 é útil para a identificação de espécies do complexo *An. albitarsis*, marcador este empregado também em outros trabalhos taxonômicos, como os de Li & Wilkerson (2005), Brochero *et al.* (2007) e

Neves (2008). Os iniciadores desenhados por Li & Wilkerson (2005) e Brochero *et al.* (2007), baseados nesta região do genoma, foram utilizados na mesma ordem sugerida por esses autores em anofelinos encontrados nos municípios de Macapá, AP, e Peixe-Boi, PA, duas cidades com perfis epidemiológicos diferentes de transmissão de malária. Uma vez identificadas as espécies, calculamos a taxa de infecção natural a plasmódios humanos, e analisamos o perfil vetorial destes anofelinos nas localidades estudadas.

O primeiro iniciador a ser testado, designado como AlbCD, em combinação com os ITS2 F e ITS2 R, permitiu a amplificação de um fragmento específico para *An. marajoara* e *An. deaneorum* de ~390pb, ou um de ~490pb para o *amplicom* inteiro de ITS2 sugestivo de *An. albitarsis* A ou *An. albitarsis* B.

Dos 366 mosquitos analisados, em 333 foi possível visualizar estes fragmentos em gel de agarose. De acordo com Li & Wilkerson (2005) ausência de bandas indica falta ou degradação do DNA nas amostras. Acreditamos na possibilidade de perda de partes (pernas, carcaça, asas) desses 33 mosquitos considerados negativos, durante o processo de maceração (fase de extração), mas descartamos a possibilidade de degradação do DNA, uma vez que todos os mosquitos foram conservados da mesma maneira: mantidos em álcool a 90% e posteriormente congelados em freezer a -20°C.

O padrão diferenciado de bandas observado, em gel de agarose, nas 293 amostras sugestivas de *An. marajora* ou *An. deaneorum* (banda única de ~390pb ou dupla de ~390pb e ~490pb), é esperado, conforme relatam Li & Wilkerson (2005),

tendo em vista a competição dos três iniciadores na reação e/ou a baixa quantidade de DNA extraído dos espécimes.

Nossos resultados não confirmaram a identificação morfológica de 13 espécimes de *An. albitarsis s.l.* coletados na área de estudo. Segundo Li & Wilkerson (2005), a banda completa da região ITS2 pode se produzir também pela amplificação desta região em outros mosquitos do Subgênero *Nyssorhynchus*. Vale destacar, que o *An. braziliensis* na fase adulta, apresenta características morfológicas muito próximas do *An. albitarsis s.l.*, com ambas as espécies apresentando fileiras de escamas brancas no I esternito abdominal. No complexo *An. albitarsis* entretanto, o II tergito abdominal não apresenta tufos póstero - laterais de escamas escuras, estrutura esta presente no *An. braziliensis* (Consoli & Oliveira, 1994). Portanto, espécimes desse último anofelino, também presente na localidade, poderiam ter sido identificados como *An. albitarsis s.l.* É interessante observar que quando analisamos o produto da amplificação do iniciador AlbB desses 13 exemplares, verificamos que as bandas possuem tamanhos diferentes. Assim, como a variação da ITS2 é baixa dentro de uma única espécie, estas diferenças poderiam representar variações interespecíficas desta região observadas em outros *Nyssorinchus* por Marrelli *et al.* (2006).

Trabalhos de sequenciamento da região estudada com posterior comparação com seqüências conhecidas de outros *Nyssorinchus* poderão esclarecer a origem dessas 13 amostras não identificadas pela amplificação dos iniciadores aqui testados.

Lembramos ainda, que linhagens do *An. marajoara* tem sido identificadas por Mckeon *et al.* (2010), inclusive no estado do Amapá, baseadas em diferenças encontradas no genoma mitocondrial desta espécie (seqüenciamento do gene COI e da região ITS2), sugerindo especiação recente deste anofelino na Amazônia brasileira. Os autores propõem inclusive a existência de uma nova espécie deste complexo

Tadei & Thacher (2000), destacam que a grande diversidade de habitats nos variados ecossistemas da Amazônia, dificulta fazer generalizações sobre a distribuição geográfica das espécies. Nosso trabalho, primeira investigação do *An. albitarsis* F na Região amazônica brasileira, revela contudo, que esta espécie do complexo *An. albitarsis* não é encontrada no Brasil, confirmando sua ocorrência até o momento apenas no norte da Colômbia feita por Brochero *et al.* (2007).

Concluimos, portanto que nossos resultados concordam com estudos realizados utilizando outras metodologias de identificação específica do *An. albitarsis* s.l: RAPD-PCR (Segura, 1998) e dissecação de genitália masculina (Galardo, 2010), demonstrando ser o *An. marajoara* a única espécie do complexo *An. albitarsis* s.l. presente em Macapá, mas discordam dos resultado de Mckeon *et al* (2010) que identificaram também o *An. oryzalimnetes* na cidade.

#### 4.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS *An. albitarsis* s.l DE PEIXE BOI, PA.

Nosso trabalho relata pela primeira vez a identificação molecular específica de mosquitos do complexo *An. albitarsis* presentes nesta localidade, cujos iniciadores

utilizados, resultaram na amplificação de um fragmento de 172pb, específico de *An. oryzalimnetes*.

A pequena amostragem de anofelinos coletados numa única localidade do município, não nos permite afirmar se o *An. oryzalimnetes* representa o único membro do complexo *An. albitarsis* presente em Peixe Boi, PA, uma vez que esta espécie pode ocorrer em simpatria, como se observa no sul do Brasil associado ao *An. albitarsis* s.s. (Conn & Mirabello, 2007) e em Macapá com o *An. marajoara* (Mckeon *et al.*, 2010).

Assim, nossos resultados contribuem para o entendimento da epidemiologia da malária na região Amazônica brasileira, e sugere a realização de estudos entomológicos e moleculares mais abrangentes que analisem a distribuição e o papel na transmissão da doença, das espécies do complexo *An. albitarsis* nas áreas onde ocorrem.



## 5 CONCLUSÕES

- Por critérios morfológicos foram identificadas as seguintes espécies de anofelinos em Macapá: *An. albitarsis s.l.*, *An. darlingi*, *An. triannulatus s.l.*, *An. braziliensis* e *An. nuneztovari* e em Peixe-Boi *An. triannulatus s.l.*, *An. albitarsis s.l.*, *An. darlingi* e *An. nuneztovari*;
- Identificação molecular baseada na análise do ITS2, de espécimes de *An. albitarsis s.l.* coletados na comunidade Lagoa dos índios em Macapá, mostrou que o *An. marajoara* é a única espécie deste complexo que ocorre na localidade;
- Treze espécimes de *An. albitarsis s.l.* de Macapá, não foram identificados a nível específico pelos iniciadores utilizados.
- Todos os *An. albitarsis s.l.* coletados na Fazenda Urucuri em Peixe-Boi, foram identificados pela região ITS 2 como *An. oryzalimnetes*;
- O *An. marajoara* apresenta características biológicas e comportamentais que ratificam sua importância epidemiológica na transmissão de malária em Macapá, tais como: espécie mais prevalente, ocorrência tanto na estação menos quanto na mais chuvosa, maior densidade populacional na época de maior precipitação pluviométrica da região e atividade hematofágica durante toda a ecostofase;
- Espécimes de *An. marajoara* foram encontrados naturalmente infectados em Macapá tanto pelo *P. falciparum* quanto pelo *P. vivax* (VK210 e VK247), (taxa de infecção natural de 3,1%), elemento a mais que comprova sua importância como vetor de malária nesta cidade;

- Nenhum espécime de *An. oryzalimnetes* coletado em Peixe-Boi foi encontrado naturalmente infectado pelos plasmódios testados;
- A baixa quantidade de espécimes de *An. oryzalimnetes* coletados na Fazenda Urucuri em Peixe-Boi não nos permite concluir sobre a importância desta espécie na transmissão local de malária;
- Maior proporção de *An. marajoara* coletados em Macapá na Comunidade Lagos dos Índios era de fêmeas paridas, com a taxa de paridade variando de 0,0 a 100 na estação menos chuvosa e de 42,8 a 100,00 na mais chuvosa da região;
- Maior proporção de *An. oryzalimnetes* coletados na Fazenda Urucuri em Peixe-Boi, PA, era de fêmeas paridas, com a taxa de paridade calculada em 33,33% para a primeira excursão e em 100% para a segunda excursão;
- O *An. albitarsis* F não foi identificado nas duas áreas estudadas.
- São necessários estudos entomológicos e moleculares mais abrangentes, que analisem a distribuição e o papel na transmissão de malária, das espécies do complexo *An. albitarsis* nas áreas onde ocorrem.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, J.S., SILVA, L.M.S. Caracterização e Avaliação das Condições de Vida das Populações Residentes nas Ressacas Urbanas dos Municípios de Macapá e Santana. pp. 165-236. In: TAKIYAMA, L.R., SILVA, A.Q. (orgs.). **Diagnóstico das Ressacas do Estado do Amapá: Bacias do Igarapé da Fortaleza e Rio Curiaú**, Macapá-AP, CPAQ/IEPA e DGEO/SEMA, 2003, p.165-230.
- ALAM, M.T, DAS, M.K., DEV, V., ANSARI, M.A., SHARMA, Y.D. Identification of two cryptic species in the *Anopheles (Cellia) annularis* complex using ribosomal DNA PCR-RFLP. **Parasitology Research**, **100**: 943-948, 2007.
- ALAVI, Y., ARAI, M., MENDOZA, J., TUFET-BAYONA, M., SINHA, R., FOWLER, K., BILLKER, O., FRANKE-FAYARD, B., JANSE, C.J., WATERS, A., SINDEN, R.E. The dynamics of interactions between Plasmodium and the mosquito: a study of the infectivity of *Plasmodium berghei* and *Plasmodium gallinaceum*, and their transmission by *Anopheles stephensi*, *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. **International Journal for Parasitology**, **33**: 933-943, 2003.
- ALEIXO, A. conceitos de espécie e o eterno conflito entre continuidade e operacionalidade: uma proposta de normatização de critérios para o reconhecimento de espécies pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. **Revista Brasileira de Ornitologia** **15** (2): 297-310, 2007.
- ALVES, F.P., DURLACHER, R.R., MENEZES, M.J., KRIEGER, H., SILVA, L.H.P., CAMARGO, E.P. High prevalence of Asymptomatic *Plasmodium vivax* and

*Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **66(6)**: 641-648, 2002.

ALVES, F.P., GIL, L.H., MARRELLI, M.T., RIBOLLA, P.E., CAMARGO, E.P., DA SILVA, L.H. Asymptomatic carriers of *Plasmodium* spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. **Journal of Medical Entomology**, **42 (5)**:777-779, 2005.

ANDERSON, T. Mapping the Spread of Malaria Drug Resistance. **PLoS Medicine**, **6 (4)**:1-2, 2009.

ARRUDA, M.E., CARVALHO, M.B., NUSSENZWEIG, R.S., MARACIC, M., FERREIRA, A.W., COCHRANE, A.H. Potential vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in northern Brazil identified by immunoassay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **35**: 873-881, 1986.

BASTOS, C.M.C.B. **Conflitos ambientais urbanos em áreas de ressaca: Um Estudo da Comunidade Negra da Lagoa dos Índios em Macapá/AP.** Dissertação (Mestrado em desenvolvimento Sustentável) – Brasília, Universidade de Brasília, 2006. 176p.

BEEBE, N.W., COOPER, R.D. Systematics of malaria vectors with particular reference to the *Anopheles punctulatus* group. **International Journal for Parasitology**, **30**: 1-17, 2000.

BERGO, E.S., SOUTO, R.N.P., GALARDO, A.K.R., NAGAKI, S.S., CALADO, D.C., SALLUM, M.A.M. Systematic notes on *Anopheles* Meigen (Diptera: Culicidae) species in the state of Amapá, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **102 (3)**: 373-376, 2007.

BICKFORD, D., LOHMAN, D.J., SODHI, N.S., NG, P.K.L., MEIER, R., WINKER, K., INGRAM, K.K., DAS, I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, **22 (3)**: 148-155, 2007.

BIRUNGI, J., MUNSTERMANN, L.E. Genetic Structure of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Populations Based on Mitochondrial ND5 Sequences: Evidence for an Independent Invasion into Brazil and United States. **Annals of the Entomological Society of America**, **95 (1)**: 125-132, 2002.

BONA, A.C.D. **Culicidae (diptera) em floresta ombrófila densa de terras baixas e análise da idade fisiológica, sobrevivência diária e duração do ciclo gonotrófico da população de *Anopheles (kerteszia) cruzii* dyar & knab, 1908.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 2008. 78p.

BOURKE, B.P., FOSTER, P.G., BERGO, E.S., CALADO, D.C., SALLUM, M.A.M. Phylogenetic relationships among species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera, Culicidae) based on nuclear and mitochondrial gene sequences. **Acta Tropica**, **114 (2)**: 88-96, 2010.

BRANQUINHO, M.S., ARAÚJO, M.S., NATAL, D., MARRELLI, M.T., ROCHA, R.M., TAVEIRA, F.A., KLOETZEL, J.K. *Anopheles oswaldoi* a potential malaria vector in Acre, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **90**: 233, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, SIVEP. **Resumo epidemiológico:** Sivep-Malária. Disponível em: <[http://portalweb04.saude.gov.br/sivep\\_malaria/](http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/)>. Acesso em: outubro 2010.

BREMAN, J.G., EGAN, A., KEUSCH, G.T. The intolerable burden of malaria: a new look at the numbers. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **64** (Suppl. 1-2): 4-7, 2001.

BREMAN, J.G., ALILIO, M.S., MILLS, A. Conquering the intolerable burden of malaria: what's new, what's needed: a summary. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **71** (Suppl. 2): 1-15, 2004.

BROCHERO, H.H., LI, C., WILKERSON, R.C. A newly recognized species in the *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* complex (Diptera: Culicidae) from Puerto Carreno, Colombia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **76** (6):1113-1117, 2007.

BRUCE-CHWATT, L. J. History of malaria from prehistory to eradication. *In*: **Malaria: Principles and Practice of Malariology. Vol.1**, Wernsdorfer WH, McGregor I. Edinburgh, Churchill living-stone, 1988, p.2-59.

BURKOT, T.R., ZAVALA, F., GWADZ, R.W., COLLINS, F.H., NUSSENZWEIG, R.S., ROBERTS, D.R. Identification of malaria-infected mosquitoes by a two side enzyme-linked immunosorbent assay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **33**: 227-231,1984.

CALVOSA, V.S., ADAGU, I.S., PÓVOA M.M. *Plasmodium falciparum*: emerging mefloquine resistance in vitro in Pará State, North Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **95**: 330-331, 2001.

CAMARGO, E.P., ALVES, F., PEREIRA DA SILVA, L.H. Symptomless *Plasmodium vivax* infections in native Amazonians. **Lancet**, **353**: 1414-1415, 1999.

CASIMIRO, S., COLEMAN, M., HEMINGWAY, J., SHARP, B. Insecticide resistance in *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae* from Mozambique. **Journal of Medical Entomology**, **43** (2):276-282, 2006.

CASTRO, M.C., MONTE-MOR, R.L., SAWYER, D.O., SINGER, B.H. Malaria risk on the Amazon frontier. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, **103**: 2452-2457, 2006.

CAUSEY, O. R., DEANE, L. M., DEANE, M. P. Chave ilustrada para a identificação de 34 espécies de anofelinos das regiões nordestina e amazônica do Brasil pelos caracteres da genitália masculina. **Revista do Serviço Especial de Saúde Pública**, **1** (2): 337-354,1947.

- CHADEE, D.D., WILKERSON, R.C. Ecology of the malaria vector, *Anopheles (Nyssorhynchus) marajoara* Galvão and Damasceno in Trinidad, west indies. **Journal of the American Mosquito Control Association**, **22** (1): 22-28, 2006.
- CHARLWOOD, J. D. Biological variation in *Anopheles darlingi* Root. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, **91**: 391-398, 1996.
- COLLINS, F.H., PASKEWITZ, S.M. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. **Insect Molecular Biology**, **5** (1): 1-9, 1996.
- COLUZZI, M. Spatial distribution of chromosomal inversions and speciation in anopheline mosquitoes. In: Barigozzi, C. ed. **Mechanisms of speciation**. New York, Alan R. Liss, 1982. p. 143-153.
- COLUZZI, M. Heterogeneities of the malaria vectorial system in tropical Africa and their significance in malaria epidemiology and control. **Bulletin of the World Health Organization**, **62** (suppl) 15: 107-113, 1984.
- COLUZZI, M. Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. **Bolletino di Zoologia**, **52**: 45-63, 1985.
- COLUZZI, M., SABATINI, A. Cytogenetic observations on species A and B of the *Anopheles gambiae* complex. **Parassitologia**, **9**: 73-88, 1967.
- COLUZZI, M., SABATINI, A. Cytogenetic observations on species C of the *Anopheles gambiae* complex. **Parassitologia**, **10**:155-165, 1968.



- COLUZZI, M., SABATINI, A. Cytogenetic observations on the salt water species, *Anopheles merus* and *Anopheles melas*, of the *gambiae* complex. **Parassitologia**, **11**: 177–187, 1969.
- COLUZZI, M., KITZMILLER, J.B. Anopheline mosquitoes. *In*: **Handbook of Genetics**, Vol. 3 (ed: RC) Plenum Publishing Corporation, New York, 1975, pp. 285-309.
- COLUZZI, M., SABATINI, A., PETRARCA, V., DI DECO, M.A. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **73**: 483-497, 1979.
- COLUZZI, M., SABATINI, A., DELLA TORRE, A., DI DECO, M.A., PETRARCA, V. A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. **Science**, **298**: 1415 -1418, 2002.
- CONN, J., RANGEL, P.Y., SEAWRIGHT, J.A. A new cytotype of *Anopheles nuneztovari* from western Venezuela and Colombia. **Journal of the American Mosquito Control Association**, **9**: 294-301, 1993.
- CONN, J.E., WILKERSON, R.C., SEGURA, M.N., SOUZA, R.T., SCHLICHTING, C.D., WIRTZ, R.A., POVOA, M.M. Emergence of a new neotropical malaria vector facilitated by human migration and changes in land use. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **66**: 18-22, 2002.

- CONN, J.E., MIRABELLO, L. Population genetics and biogeography of neotropical vector species. **Heredity**, **99**: 245-256, 2007.
- CONSOLI, R.A.G.B., OLIVEIRA, R.L. **Principais Mosquitos de Importância. Sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994. 224p.
- CORNEL, A.J., PORTER, C.H., COLLINS, F.H. Polymerase chain reaction species diagnostic assay for *Anopheles quadrimaculatus* cryptic species (Diptera: Culicidae) based on ribosomal DNA ITS2 sequences. **Journal of Medical Entomology**, **33**: 109-116, 1996.
- COURA, J.R., MUTIS, S.M., ANDRADE, S.L. A new challenge for malaria control in Brazil, asymptomatic *Plasmodium* infection – a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **101 (3)**: 229-237, 2006.
- COUTO, A.A., CALVOSA, V.S., SANTOS, M.A., SOUZA, J.M. The evolution over time of the resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs in 2 areas of the Brazilian Amazonia with distinct socioeconomic and geographic characteristics. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **28**: 357-365, 1995.
- COX-SINGH, J., SINGH, B. Knowlesi malaria: newly emergent and of public health importance? **Trends in Parasitology**, **24 (9)**: 406-410, 2009.
- COYNE, J.A., ORR, H.A. Patterns of speciation in *Drosophila* revisited. **Evolution**, **51**: 295-301, 1997.

CURTIS, C.F. Should the use of DDT be revived for malaria vector control?

**Biomedica, 22:** 455-461, 2002.

DEANE, L.M. Observações sobre a Malária na Amazônia brasileira. **Revista do**

**Serviço Especial de Saúde Pública, 1 (1):** 3-60, 1947.

DEANE, L.M. Malaria vectors in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 81,**

**(suppl.2):** 5-14,1986.

DEANE, L.M., CAUSEY, O.R., DEANE, M.P. An illustrated key by adult female

characteristics for identification of thirty-five species of Anophelini from Northeast

and Amazon regions of Brazil, with note on the malaria vectors (Diptera:

Culicidae). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 18:** 1-18,

1946.

DEANE, L. M., CAUSEY, O. R., DEANE, M. P. Notas sôbre a distribuição e a

biologia dos anofelinos das regiões nordestina e amazônica do Brasil. **Revista do**

**Serviço Especial de Saúde Pública, 1 (4):** 827-965, 1948.

DETINOVA, T.S. Age-grouping methods in Diptera of medical importance with

special reference to some vectors of malaria. **World Health Organization.**

**Monograph series** - Genebra, Switzerland n.47, 1962. 216p.

DONATO, C.T., LAMEIRA, W.J., ALMEIDA, A.S., VIEIRA, I.C.G. **Análise espacial**

**dos fragmentos de mata ciliar no município de Peixe-Boi, Pará.** Anais do III

Simpósio Brasileiro de Ciências Geodésicas e Tecnologias da Geoinformação,

Recife - PE, 2010. p.1-3

- FERNANDEZ, Z., FORATTINI, O.P. Survival of *Aedes albopictus* in Brazil: physiological age and reproductive history. **Revista de Saúde Pública** **37**: 285-91, 2003.
- FERREIRA-GONCALVES, M. J., ALECRIM, W. D. Non-planned urbanization as a contributing factor for malaria incidence in Manaus-Amazonas, Brazil. **Revista de Salud Publica**, **6**: 156-166, 2004.
- FOLEY, D.H., BRYAN, J.H. Electrophoretic keys to identify members of the *Anopheles punctulatus* complex of vector mosquitoes in Papua New Guinea. **Medical and Veterinary Entomology**, **7** (1): 49-53, 1993.
- FORATTINI, O.P. - **Entomologia médica**. Parte geral, Diptera, Anophelini. v. 1, São Paulo, Faculdade de Saúde Pública da USP, 1962. 662p.
- FORATTINI, O.P. Comportamento exófilo de *Anopheles darlingi* Root, em região meridional do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, **21** (4): 291-304, 1987
- FORATTINI, O.P. **Culicidologia Médica**. São Paulo: EDUSP, 2002. 865p.
- FORSDYKE, D. R. Two levels of information in DNA: relationship of Romanes' "intrinsic" variability of the reproductive system, and Bateson's "residue" to the species-dependent component of the base composition, (C+G)%. **Journal of Theoretical Biology**, **201**: 47-61, 1999.

FORSDYKE, D.R. Haldane's rule: hybrid sterility affects the heterogametic sex first because sexual differentiation is on the path to species differentiation. **Journal of Theoretical Biology**, **204**: 443-452, 2000.

FRIZZI, G. Salivary gland chromosomes of Anopheles. **Nature**, **160**: 226-227, 1947.

FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva**. 2 ed: Sociedade Brasileira de Genética. 1992. 646p.

GALARDO, A.K.R. **A importância dos *Anopheles darlingi* e *Anopheles marajoara* Galvão e Damasceno, 1942 na transmissão de malária no município de Macapá/AP, Brasil**. Tese (Doutorado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) – Belém, Universidade Federal do Pará, 2010. 147p.

GALARDO, A.K.R., ARRUDA, M., D'ALMEIDA COUTO, A.A.R., WIRTZ, R., LOUNIBOS, L.P., ZIMMERMAN, R.H. Malaria vector incrimination in three rural riverine villages in the Brazilian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **76**: 461-469, 2007.

GALARDO, A.K.R., ZIMMERMAN, R.H., LOUNIBOS, L.P., YOUNG, L.J., GALARDO, C.D., ARRUDA, M., D'ALMEIDA COUTO, A.A.R. Seasonal abundance of anopheline mosquitoes and their association with rainfall and malaria along the Matapí, River, Amapá, Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, **23**: 335-349, 2009.

- GALVÃO, A.L.A., DAMASCENO, R. G. Sobre um novo anofelino da Ilha de Marajó, *Anopheles (Nys.) marajoara* n. sp. **Folia Clinica et Biológica (São Paulo)**, **14**: 60-66, 1942.
- GALVÃO, A.L.A., DAMASCENO, R.G., MARQUES, A.P. Algumas observações sôbre a biologia dos anofelinos de importância epidemiológica em Belém do Pará. **Arquivos de Higiene e Saúde Pública**, **12**: 51-110, 1942.
- GALVÃO, A.L.A., DAMASCENO, R.G. Observações sobre os anofelinos do complexo *Albitarsis* (Diptera, Culicidae). **Annais da Faculdade de Medicina**, **20**: 73-87, 1944.
- GORHAM, J.R., STOJANOVICH, C.J., SCOTT HG. **Clave Ilustrada para los Mosquitos Anofelinos de Sudamerica Oriental**. National Communicable Disease Center, 1967. 62 p.
- GREEN, C.A., HUNT, R.H. Interpretation of variation in ovarian polytene chromosomes of *Anopheles funestus* Giles, *An. parensis* and *An. aruni*. **Genetics**, **51**: 187-195, 1980.
- GREEN, C. A., GASS, R. F., MUNSTERMANN, L. E. Population-genetic evidence for two species in *Anopheles minimus* in Thailand. **Medical and Veterinary Entomology**, **4**: 25-34, 1990.
- GREENWOOD, B., MUTABINGWA, T. Malaria in 2002. **Nature**, **415**: 670-672, 2002.

HALDANE, J.B.S. Sex-ratio and unisexual sterility in hybrid animals. **Journal of Genetic, 12:** 101-109, 1922.

HARBACH, R.E. Review of the internal classification of the genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): the foundation for comparative systematics and phylogenetic research. **Bulletin of Entomological Research, 84:** 331-342, 1994.

HARBACH, R.E. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. **Bulletin of Entomological Research, 94:** 537-553, 2004.

HARBACH, R.E., RATTANARITHIKUL, R., HARRISON, B.A. *Baimaia*, a new subgenus for *Anopheles kyondawensis* Abraham, a unique crabhole-breeding anopheline in Southeastern Asia. **Proceedings of the Entomological Society of Washington, 107:** 750-761, 2005.

HAY, S.I., GUERRA, C.A., GETHING, P.W., PATIL, A.P. , TATEM, A.J., NOOR, A.M., KABARIA, C.W., MANH, B.H., ELYAZAR, I.R.F., BROOKER, S., SMITH, D.L., MOYEED, R.A., SNOW, R.W. A World Malaria Map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2007. **Proceedings of the Nacional Academy of Science of the United States of America, 6 (3):** 286-302, 2009.

HINKE, T.Z. **Perfil nosológico da população ribeirinha do baixo Rio Machado em Rondônia/ Amazônia oriental Brasil.** Tese de doutorado (Instituto de Ciências Biomédica da Universidade do Estado de São Paulo), 2009. 150p.

HOLLOCHER, H., WU, C.-I. The genetics of reproductive isolation in the *Drosophila simulans* clade: X vs. autosomal effects and male vs. female effects. **Genetics**, **143**: 1243-1255, 1996.

HUNT, R.H., COETZEE, M., FETTENE, M. The *Anopheles gambiae* complex: a new species from Ethiopia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **92**: 231-235, 1998.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério do Planejamento Orçamento e Gestão. **Cidades**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acesso em: 15 set. 2009.

IEPA. Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Amapá - **Macrodiagnóstico do Estado do Amapá: primeira aproximação do ZEE/Equipe Técnica do ZEE**. 3 ed.revisada e ampliada, 2008.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia . Disponível em: <<http://inmet.gov.br>> Acesso em: 21/09/10.

JENSEN, T., DRITZ, D.A., FRITZ, G.N., WASHINO, R.K., REEVES, W.C. Lake Vera revisited: Parity and survival rates of *Anopheles punctipennis* at the site of a malaria outbreak in the Sierra Nevada foothills of California. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **59**: 591-594, 1998.

JESUS, E.S., GONÇALVES, P.H.L., OLIVEIRA, M.C.F. A **variabilidade dos elementos meteorológicos associados ao fenômeno El Niño na cidade de**



**Macapá-AP.** In: Congresso Brasileiro de Meteorologia, XI, 2000, Rio de Janeiro. CD de Anais, Rio de Janeiro, 2000.

KAKITANI, I., FORATTINI, O.P. Paridade e desenvolvimento ovariano de *Anopheles albitarsis* l.s. em área de agroecossistema irrigado. **Revista de Saúde Pública**, **34 (1)**: 33-38, 2000.

KENGNE, P., TRUNG, H.D., BAIMAI, V., COOSEMANS, M., MANGUIN, S. A multiplex PCR-based method derived from random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for the identification of species of the *Anopheles minimus* group in Southeast Asia. **Insect Molecular Biology**, **10**: 427-435, 2001.

KITZMILLER, J.B. Chromosomal differences among species of *Anopheles* mosquitoes. **Mosquito Systematics Journal**, **9**: 112-122, 1977.

KITZMILLER, J.B., KREUTZER, R.D., TALLAFERRO, E. Chromosomal differences in populations of *Anopheles nuneztovari*. **Bulletin of the World Health Organization**, **48**: 435-455, 1973.

KLEIN, T.A., LIMA, J.B.P., TADA, M.S. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes to *Plasmodium falciparum* in Rondonia, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **44**: 598-603, 1991.

KLEIN, T.A., LIMA, J.B., TADA, M.S., MILLER, R. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes in Rondonia, Brazil to infection by *Plasmodium vivax*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **45**: 463-70, 1991.

KLEIN, T.A., LIMA, J.B.P., TODA-TANG, A. Hybridization evidence supporting separate species status for *Anopheles albitarsis* and *Anopheles deaneorum* (Diptera: Culicidae) in Brazil. **Journal of the American Mosquito Control Association**, **7**: 301-303, 1991.

KREUTZER, R. D., KITZMILLER, J. B., RABBANI, M. G. Cytogenetically distinguishable sympatric and allopatric populations of the mosquito *Anopheles albitarsis*. **Acta Amazonica**, **6**: 473-481, 1976.

KRZYWINSKI, J., BESANSKY, N.J. Molecular Systematics of *Anopheles*: from subgenera to subpopulations. **Annual Review of Entomology**, **48**: 111-139, 2003.

LEHR, M.A., KILPATRICK, C.W., WILKERSON, R.C., CONN, J.E. Cryptic species in the *Anopheles albitarsis* (Diptera: Culicidae) complex: incongruence between RAPD-PCR identification and analysis of mtDNA *COI* sequences. **Annals of the Entomological Society of America**, **98**: 908-917, 2005.

LENSEN, A.H., BOLMER-VAN DE VEGTE, M., VAN GEMERT, G.J., ELING, W.M., SAUERWEIN, R.W. Leukocytes in a *Plasmodium falciparum*-infected blood meal reduce transmission of malaria to *Anopheles* mosquitoes. **Infection and Immunity**, **65**: 3834-3837, 1997.

LI, C., WILKERSON, R.C. Identification of *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* complex species (Diptera: Culicidae) using rDNA internal transcribed spacer 2-

based polymerase chain reaction primers. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **100** (5): 495-500, 2005.

LI, C., WILKERSON, R.C. Intragenomic rDNA ITS2 Variation in the Neotropical *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* Complex (Diptera: Culicidae). **Journal of Heredity**, **98** (1): 51-59, 2007.

LIMA, J.B.P., VALLE, D., PEIXOTO, A.A. Analysis of reproductive isolation between sibling species *Anopheles albitarsis* sensu stricto and *Anopheles deaneorum*, two malaria vectors belonging to the *Albitarsis* complex (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, **41**: 888-893, 2004.

LIM, C. S., KIM, Y. K., LEE, K. N., KIM, S. H., HOFFMAN, K. J., SONG, K-J., SONG, J. H. The analysis of circumsporozoite-protein gene sequences from South Korean isolates of *Plasmodium vivax*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, **95** (3): 229-235, 2001.

LINTHICUM, K.J. A revision of the *Argyritarsis* Section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles* (Diptera: Culicidae). **Mosquito Systematics**, **20**: 98-271, 1988.

MAHON, R. J. Identification of the three sibling species of *Anopheles farauti* Laveran by the banding pattern of their polytene chromosomes. **Journal of the Australian Entomological Society**, **22**: 31-34, 1983.

- MAHON, R.J., GREEN, C.A., HUNT, R.H. Diagnostic allozymes for routine identification of adults of the *Anopheles gambiae* complex (Diptera: Culicidae). **Bulletin of Entomology Research**, **68**: 85-96, 1976.
- MANN, V. H., GOOD, M. F., SAUL, A. Diversity in the circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*: does it matter? **Parasitology Today**, **11 (1)**: 33-36, 1995.
- MARRELLI, M. T., SALLUM, M.A.M., MARINOTTI, O. The second internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA as a tool for Latin American anopheline taxonomy - A critical review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **101(8)**: 817-832, 2006.
- MAYR, E. **Systematics and the origin of species**. New York: Columbia University Press, 1942
- MCKEON, S.N., LEHR, M.A., WILKERSON, R.C., RUIZ, J.F., SALLUM, M.A., LIMA, J.B.P., POVOA, M.M., CONN, J.E. Lineage divergence detected in the malaria vector *Anopheles marajoara* (Diptera: Culicidae) in Amazonian Brazil. **Malaria Journal**, **9 (1)**:271-283, 2010.
- MERRITT, T.J.S., YOUNG, C.R., VOGT, R.G., WILKERSON, R.C., QUATTRO, J.M. Intron retention identifies a malaria vector within the *Anopheles (Nyssorhynchus) albitaris* complex (Diptera: Culicidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, **35**:719 -724, 2005.
- MONCADA-PÉREZ, A., CONN, J. The larval polytene chromosomes of *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) from Venezuela. **Genome**, **35**: 327-331, 1992.

MOTOKI, M.T., WILKERSON, R.C., SALLUM, M.A.M. The *Anopheles albitarsis* complex with the recognition of *Anopheles oryzalimnetes* Wilkerson and Motoki, n. sp. and *Anopheles janconnae* Wilkerson and Sallum, n. sp. (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **104 (6)**: 823-850, 2009.

NARANG, S.K., KAISER, P.E., SEAWRIGHT, J.A. Dichotomus electrophoretic taxonomic key for identification of sibling species A, B and C of the *Anopheles quadrimaculatus* complex (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, **26**: 94-99, 1989.

NARANG, S. K., KLEIN, T. A., PERERA, O. P., LIMA, J. B., TANG, A. T. Genetic evidence for the existence of cryptic species in the *Anopheles albitarsis* complex in Brasil: allozymes and mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms. **Biochemical Genetics**, **31**: (1-2): 97-112, 1993.

NEVES, A. **Estudos moleculares de *Anopheles albitarsis* e *Anopheles triannulatus* (Díptera: Culicidae) capturados em criadouro na planície de inundação do Mato Grosso do Sul, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Curitiba, Universidade de São Paulo, 2008. 92p.

NORRIS, D.E. Genetic markers for study of the anopheline vectors of human malaria. **International Journal for Parasitology**, **32**: 1607-1615, 2002.

OLIVEIRA-FILHO, A.B., MARTINELLI, J.M. Casos notificados de malária no Estado do Pará, Amazônia Brasileira, de 1998 a 2006. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, **18 (3)**: 277-284, 2009.

- OLIVEIRA-FERREIRA, J., LACERDA, M.V.G., BRASIL, P., LADISLAU, J.L.B.,  
TAUIL, P.L., DANIEL-RIBEIRO, C.T. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria  
Journal, 9**: 115-129, 2010.
- ORR, H. A. Haldane's rule has multiple genetic causes. **Nature, 361**: 532-533, 1993.
- ORR, H.A. Haldane's rule. **Annual Review of Ecological Systems, 28**: 195-218,  
1997.
- ORR, H.A., TURELLI, M. Dominance and Haldane's rule. **Genetics, 143**: 613-616,  
1996.
- PAAIJMANS, K.P., READ, A.F., THOMAS, M.B. Understanding the link between  
malaria risk and climate. **Proceedings of the National Academy of Science of  
the United States of America, 106** (33): 13844-13849, 2009.
- PARÁ, Governo do Estado do. Secretaria de Estado de Planejamento, Orçamento e  
Finanças. **Estatística Municipal, Peixe-Boi, 2008**. Disponível em:  
<http://sepof.pa.gov.br/estatística/> Acesso em: 11 set. 2009.
- PASKEWITZ, S.M., COLLINS, F.H. Use of the polymerase chain reaction to identify  
mosquito species of the *Anopheles gambiae* complex. **Medical and Veterinary  
Entomology, 4**: 367-373, 1990.
- PASTEWITZ, S.M., COLLINS, F.H. PCR amplification of insect ribosomal DNA. *In*:  
CRAPTON, J.M., BEARD, C.B., LOUIS, C (eds.). **The molecular biology of**

**insect disease vectors. A methods manual.** London, Chapman & Hall, p. 374-383, 1997.

PÓVOA, M.M., WIRTZ, R.A., LACERDA, R.N.L., MILES, M.A., WARHURST, D. Malaria Vectors in the Municipality of Serra do Navio, State of Amapá, Amazon Region, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **96** (2): 179-184, 2001.

PÓVOA, M.M., CONN, J.E., SCHLICHTING, C.D., AMARAL, J.C.O.F., SEGURA, M.N.O., SILVA, A.N.M., SANTOS, C.C.B., LACERDA, R.N.L., DE SOUZA, R.T.L., GALIZA, D., SANTA ROSA, E.P., WIRTZ, R.A. Malaria vectors, epidemiology and the re-emergence of *Anopheles darlingi* in Belém, Pará, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, **40**: 379-386, 2003.

PÓVOA, M.M., DE SOUZA, R.T., LACERDA, R.N., ROSA, E.S., GALIZA, D., DE SOUZA, J.R., WIRTZ, R.A., SCHLICHTING, C.D., CONN, J.E. The importance of *Anopheles albitarsis* E and *An. darlingi* in human malaria transmission in Boa Vista, state of Roraima, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **101** (2): 163-168, 2006.

PRESGRAVES, D.C., ORR, H.A. Haldane's Rule in Taxa Lacking a Hemizygous X. **Science**, **282**: 952-954, 1998.

QARI, S. H., SHI, Y. P., GOLDMAN, I. F. Identification of *Plasmodium vivax* like human malaria parasite. **The Lancet**, **341 (8848)**: 780-783, 1993.

QUEIROZ, K. Species Concepts and Species Delimitation. **Systematic Biology**, **56** (6): 879-886, 2006.

RACHOU, R.G. Anofelinos do Brasil. Comportamento das espécies vetoras de malária. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, **10**: 145-181, 1958.

RAFAEL, M.S., SANTOS-JUNIOR, I.P., TADEI, W.P., SALLUM, M.A., FORATTINI, O.P. Karyotype of Brazilian *Anopheles albitarsis sensu lato* (Diptera: Culicidae). **Genetics and Molecular Research** **4**: 684-690, 2005.

RAFAEL, M.S., SANTOS-JUNIOR, I.P., TADEI, W.P., CARVALHO, K.A., RECCO-PIMENTE, S.M., SALLUM, M.A., FORATTINI, O.P. Cytogenetic study of *Anopheles albitarsis* (Diptera: Culicidae) by C-banding and in situ hybridization. **Hereditas**, **143**: 62-67, 2006.

RAMSEY, J.M., SALINAS, E.M. RODRIGUEZ, H., BEAUDOIN, R.L. Effects of transmission-blocking immunity on *Plasmodium vivax* infections in *Anopheles albimanus* populations. **The Journal of Parasitology**, **80**: 88-92, 1994.

ROSA-FREITAS, M.G. *Anopheles (Nyssorhynchus) deaneorum*: a new species in the albitarsis complex (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **84** (4): 535-43, 1989.

ROSA-FREITAS, M.G, DEANE, L.M., MOMEN, H.A. Morphological, isoenzymatic and behavioural study of ten populations of *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis*



- Lynch-Arribalzaga, 1878 (Diptera: Culicidae) including from the type-locality Baradero, Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **85**: 275-289, 1990.
- ROSENBERG, R., WIRTZ, R. A., LANAR, D.E. Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Science**, **2459 (4921)**: 973-976, 1989.
- RUBIO-PALIS, Y., ZIMMERMAN, R.H. Ecoregional classification of malaria vectors in the Neotropics. **Journal of Medical Entomology**, **34**: 499-510, 1997.
- RUBIO-PALIS, Y., WILKERSON, R., GUZMAN, H. Morphological characters of adult *Anopheles (nyssorhynchus) marajoara* in venezuela. **Journal of the American Mosquito Control Association**, **19 (2)**: 107-114, 2003.
- SALLUM, M.A.M., SCHULTZ, T.R., WILKERSON, R.C. Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on morphological characters. **Annals of the Entomological Society of America**, **93**: 745-775, 2000.
- SANTOS, R.C., FAYAL, A.S., AGUIAR, A.E.F., VIEIRA, D.B.R., POVOA, M.M. Avaliação do efeito residual de piretróides sobre anofelinos da Amazônia brasileira. **Revista de Saúde Pública**, **41(2)**: 276-83, 2007.
- SAWAMURA, K. Genetics of hybrid inviability and sterility in *Drosophila*: the *Drosophila melanogaster*-*Drosophila simulans* case. **Plant Species Biology**, **15**: 237-247, 2000.

SEGURA, M.N.O. **Estudo do *Anopheles (Nys) darlingi* Root, 1926 e *Anopheles (Nys) albitarsis* Arribáizaga, 1876 (Díptera:Culicidae) como vetores de malária humana numa mesma área de transmissão, e caracterização de espécies do complexo albitarsis.** Dissertação (Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) – Belém, Universidade Federal do Pará, 1998. 128p.

SERVICE, M.W. Effects of wind on the behaviour and distribution of mosquitoes and blackflies. **International Journal of Biometeorology**, **24**: 347-53, 1980.

SILVA, A.N.M., FRAIHA-NETO, H., SANTOS, C.C.B., SEGURA, M.N.O., AMARAL, J.C.O.F., GORAYEB, I.S., LACERDA, R.N., SUCUPIRA, I.M., PIMENTEL, L.N., CONN, J.E., POVOA, M.P. Fauna anofélica da cidade de Belém, Pará, Brasil: dados atuais e retrospectivos. **Cadernos de Saúde Pública**, **22** (8): 1575-1585, 2006.

SILVA, A.N.M., SANTOS, C.C.B., LACERDA, R.N., MACHADO, R.L.D., POVOA, M.P. Susceptibility of *Anopheles aquasalis* and *An. darlingi* to *Plasmodium vivax* VK210 and VK247. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **10**: 547-550, 2006.

SILVA-VASCONCELOS, A., KATO, M.Y., MOURAO, E.N., SOUZA, R.T., LACERDA, R.N., SIBAJEV, A., TSOURIS, P., PÓVOA, M.M., MOMEN, H., ROSA-FREITAS, M.G. Biting indices, host-seeking activity and natural infection rates of anopheline species in Boa Vista, Roraima, Brazil from 1996 to 1998. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **97**: 151-161, 2002.

- SINDEN, R. E. Asexual blood stages of malaria modulate gametocyte infectivity to the mosquito vector – possible implications for control strategies. **Parasitology**, **103**:191-196, 1991.
- SINDEN, R. E. Malaria, sexual development and transmission: retrospect and prospect. **Parasitology**, **7**: 1-8, 2009.
- SOMBOON, P., WALTON, C., SHARPE, R.G., HIGA, Y., TUNO, N. Evidence for a new sibling species of *Anopheles minimus* from the Ryukyu Archipelago, Japan. **Journal of the American Mosquito Control Association**, **17**: 98-113, 2001.
- SUAREZ, M.F., QUIÑONES, M.L., PALACIOS, J.D., CARRILLO, A. First record of DDT resistance in *Anopheles darlingi*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, **6**: 72-74, 1990.
- SUÁREZ-MUTIS, M.C; CUERVO, P; LEORATTI, F.M.S; MORAES-AVILA, S.L; FERREIRA, A.W; FERNANDES, O; COURA, J.R. Cross sectional study reveals a high percentage of asymptomatic *Plasmodium vivax* infection in the Amazon Rio Negro area, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, **49 (3)**:159-164, 2007.
- TADEI, W.P., THATCHER, B.T., SANTOS, J.M.M., SCARPASSA, V.M., RODRIGUES, I.B., RAFAEL, M.S. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **59**: 325-335, 1998.

TADEI, W.P., THATCHER, B.D. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: Anopheles of the subgenus *Nyssorhynchus*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **42 (2)**:87-94, 2000.

TAKIYAMA, L.R., SILVA, A.Q., COSTA, W.J.P., NASCIMENTO, H.S. Qualidade das Águas das Ressacas das Bacias do Igarapé da Fortaleza e do Rio Curiaú. In: TAKIYAMA, L.R., SILVA, A.Q. (orgs.). **Diagnóstico das Ressacas do Estado do Amapá: Bacias do Igarapé da Fortaleza e Rio Curiaú**, Macapá-AP, CPAQ/IEPA e DGEO/SEMA, 2003, p.81-104.

TAUIL, P.L. Perspectives of vector borne diseases control in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **39**: 275-277, 2006.

TAO, Y., HARTL, D. L. Genetic dissection of hybrid incompatibilities between *Drosophila simulans* and *D. mauritiana*. III. Heterogeneous accumulation of hybrid incompatibilities, degree of dominance, and implications for Haldane's rule. **Evolution**, **57**: 2580-2598, 2003.

TORRES, E.P., FOLEY, D.H., SAUL, A. Ribosomal DNA sequence markers differentiate two species of the *Anopheles maculatus* (Diptera: Culicidae) complex in the Philippines. **Journal of Medical Entomology**, **37**: 933-937, 2000.

TOURÉ, Y.T., DOLO, G., PETRARCA, V., TRAORÉ, S.F., BOUARÉ, M., DAO, A., CARNAHAN, J., TAYLOR, C.E. . Mark-release-recapture experiments with *Anopheles gambiae s.l.* in Banambani Village, Mali, to determine population size and structure. **Medical and Veterinary Entomology**, **12 (1)**:74-83, 1998.

TURELLI, M., ORR, H.A. The dominance theory of Haldane's rule. **Genetics**, **140**: 389-402, 1995.

TURELLI, M., ORR, H.A. Dominance, epistasis, and the genetics of postzygotic isolation. **Genetics**, **154**:1663-1679, 2000.

VAN BORTEL, W., TRUNG, H.D., MANH, N.D., ROELANTS, P., VERLE, P., COOSEMANS, M. Identification of two species within the *Anopheles minimus* complex in northern Vietnam and their behavioural divergences. **Tropical Medicine and International Health**, **4**: 257-265, 1999.

VAUGHAN, J.A., ROSARIO, V., LELAND, P., ADJEPONG, A., LIGHT, J., WOOLLETT, G.R., HOLLINGDALE, M.R., AZAD, A.F. *Plasmodium falciparum*: Ingested anti-sporozoite antibodies affect sporogony in *Anopheles stephensi* mosquitoes. **Experimental Parasitology**, **66** (2): 171-182, 1988.

VLACHOU, D., SCHLEGELMILCH, T., RUNN, E., MENDES, A., KAFATOS, F.C. The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. **Current Opinion in Genetics & Development**, **16** (4): 384-391, 2006.

VIEIRA, P.P., FERREIRA, M.U., ALECRIM, M.G., ALECRIM, W.D., SILVA, L.H., SIHUINCHA, M.M., JOY D.A., M.U.J., S.U, X.Z., ZALIS, M.G. *pfcr* polymorphism and the spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* populations across the Amazon Basin. **The Journal of Infectious Diseases**, **15**: 417-424, 2004.

WALTON, C., HANDLEY, J.M., KUVANGKADILOK, C., COLLINS, F.H., HARBACH, R.E., BAIMAI, V., BUTLIN, R.K. Identification of five species of the *Anopheles dirus* complex from Thailand, using allele-specific polymerase chain reaction. **Medical and Veterinary Entomology**, **13**: 24-32, 1999.

WHO. World Health Organization. **Manual on practical entomology in malaria**. Part II. Methods and technique. Geneva: WHO Offset Publication, 1975.

WIENS, J.J. What Is Speciation and How Should We Study It? **The American Naturalist**, **163**: 914–923, 2004.

WILKERSON, R.C., GAFFIGAN, T.V., LIMA, J. B. Identification of species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **90**: 721-732, 1995.

WILKERSON, R.C., PARSONS, T.J., KLEIN, T.A. Diagnosis by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction of four cryptic species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina, and Brazil. **Journal of Medical Entomology**, **32**: 697-704, 1995.

WILKERSON, R.C., REINERT, J.F., LI, C. Ribosomal DNA ITS2 sequences differentiate six species in the *Anopheles crucians* complex (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, **41**(3): 392-401, 2004.

WIRTZ, R.A., BURKOT, T.R., ANDRE, R.G., ROSENBERG, R., COLLINS, W.E., ROBERTS, D.R. Identification of *Plasmodium vivax* sporozoites in mosquitoes

using an enzyme-linked immunosorbent assay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **34**: 1048-1054, 1985.

WIRTZ, R.A., ZAVALA, F., CHAROENVIT, Y., CAMPBELL, G.H., BURKOT, T.R., SCHNEIDER, I., ESSER, K.M., BEAUDOIN, R.L., ANDRE, R.G. Testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development. **Bulletin of the World Health Organization**, **65**: 39-45, 1987.

XAVIER, S.H., MATTOS, S.S. Geographical Distribution of Culicinae in Brazil. III. State of Pará (Diptera, Culicidae). **Mosquito Systematics**, **77 (3)**: 234-268, 1975.

ZIMMERMAN, R.H. Ecology of malaria vectors in the Americas and future direction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **87**, (Suppl. III): 371-383, 1992.

## **ANEXOS**



## Anexo 1

### Protocolo de aprovação do CEP/IEC

Belém, 15 de setembro de 2003.

**Protocolo CEP/IEC - Nº 079/2003**

#### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Protocolo: “Vetores de malária no Brasil: genética e ecologia”

Pesquisador Responsável: MARINETE MARINS PÓVOA-IEC/SVS

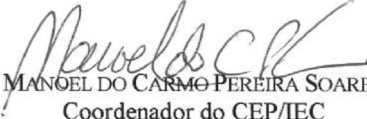
Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, em sua reunião ordinária de 11/09/2003, cientificamos que o referido projeto de pesquisa foi considerado **APROVADO**.

Recomenda-se ao coordenador que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto, inclusive, as fichas preenchidas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Este CEP se incumbirá dos procedimentos de acompanhamento preconizados pela Resolução 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde/MS.

**Os Relatórios parciais deverão ser enviados anualmente, para acompanhamento neste Comitê e posterior encaminhamento a CONEP/MS.**

Relatório Final - deverá ser elaborado um consolidado, incluindo os resultados finais, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da pesquisa.

  
MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES  
Coordenador do CEP/IEC

## Anexo 2 Autorização IBAMA



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
**Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA**  
**Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio**  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número:</b> 19933-1	<b>Data da Emissão:</b> 21/07/2009 11:53	<b>Data de Validade:</b> 21/07/2010
<b>Dados do titular</b>		
Registro no Ibama: 1798168	Nome: MARINETE MARINS PÓVOA	CPF: 118.790.092-34
Título do Projeto: Biologia dos vetores de malária no Brasil: Genética e Ecologia		
Nome da Instituição: Instituto Evandro Chagas		CNPJ: 00.394.544/0025-52

#### Observações, ressalvas e condicionantes

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte <a href="http://www.ibama.gov.br/sisbio">www.ibama.gov.br/sisbio</a> - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição <i>in situ</i> .
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e do uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

#### Outras ressalvas

1	Os pesquisadores estrangeiros John Freddy Ruiz López, Janet Evelyn Conn, MARTA MORENO LEIRANA e Sascha Naomi McKeon estão relacionados ao processo CNPq - Expedição Científica (n.142686/2009-3) e dependem de Portaria emitida pelo CNPq/MCT.
---	--

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Izís Monica Carvalho Sucupira	Pesquisadora	629.428.082-68	2543080 SEGUP-PA	Brasileira
2	John Freddy Ruiz López	Estudante de doutorado	-	-	Estrangeira
3	José Mário Veloso Peres	Técnico	228.925.402-91	1524205 SSP-PA	Brasileira
4	Raimundo Nonato da Luz Lacerda	Técnico	024.449.502-59	2469476 SSP-PA	Brasileira
5	Maria Anice Mureb Salfum	Pesquisadora	006.071.388-74	5863126 SSP-SP-SP	Brasileira
6	José Maria de Souza Nascimento.	Técnico	055.868.442-49	1368111 SSP-PA-PA	Brasileira
7	Janet Evelyn Conn	Pesquisadora Titular	-	-	Estrangeira
8	Edvaldo Paixão Santa Rosa	Técnico	094.520.872-34	2708402 SSP-PA	Brasileira
9	Raimundo Tadeu Lessa de Souza	Técnico	051.243.602-91	98092 SSP-PA	Brasileira
10	Deocleciano Galiza Primo	Técnico	033.350.972-20	5497289 SSP-PA	Brasileira
11	MARTA MORENO LEIRANA	Estudante de doutorado	-	-	Estrangeira
12	Sascha Naomi McKeon	Estudante de doutorado	-	-	Estrangeira
13	José Bento Pereira Lima	Pesquisador e Consultor	033.737.202-06	674157 SSP-DF	Brasileira
14	José Elson Abud de Araújo	Técnico	090.069.902-72	1190531 SSP-PA	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet ([www.ibama.gov.br/sisbio](http://www.ibama.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 73916147**



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
**Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA**  
**Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio**  
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 19933-1	Data da Emissão: 21/07/2009 11:53	Data de Validade: 21/07/2010
-----------------	-----------------------------------	------------------------------

#### Dados do titular

Registro no Ibama: 1798168	Nome: MARINETE MARINS PÓVOA	CPF: 118.790.092-34
Título do Projeto: Biologia dos vetores de malária no Brasil: Genética e Ecologia		
Nome da Instituição : Instituto Evandro Chagas		CNPJ: 00.394.544/0025-52

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CAPANEMA	PA	Área residencial	Fora de UC
2	PEIXE-BOI	PA	Fazenda	Fora de UC
3	ITAITUBA	PA	Área residencial	Fora de UC
4	MACAPÁ	AP	áreas residenciais	Fora de UC
5	BOA VISTA	RR	áreas residenciais da Br-174	Fora de UC
6	MANAUS	AM	áreas residenciais - Br 174	Fora de UC

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Anopheles (*Qtde: 4000)

\* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

#### Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Captura manual, Armadilha luminosa
---	---	------------------------------------

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Instituto Evandro Chagas	pesquisa científica

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet ([www.ibama.gov.br/sisbio](http://www.ibama.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 73916147**



Página 2/3

