

DIVERSIDADE E SAZONALIDADE DE *ANOPHELES SP.*
(DIPTERA: CULICIDAE) COM ÊNFASE NA PREVALÊNCIA
DE MALÁRIA EM RORAIMA

FÁBIO SAITO M. BARROS

DIVERSIDADE E SAZONALIDADE DE *ANOPHELES SP.*
(DIPTERA: CULICIDAE) COM ÊNFASE NA PREVALÊNCIA
DE MALÁRIA EM RORAIMA

*Dissertação apresentada ao Mestrado
em Biologia Animal do Departamento de
Zoologia, Centro de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Pernambuco, como
parte dos requisitos para obtenção do grau de
mestre.*

Orientador: Simão Dias Vasconcelos

Co-orientadora: Mércia Eliane Arruda

Recife
2005

FÁBIO SAITO M. BARROS

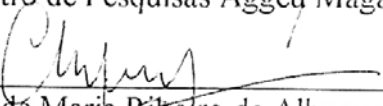
DIVERSIDADE E SAZONALIDADE DE *ANOPHELES SP.*
(DIPTERA: CULICIDAE) COM ÊNFASE NA PREVALÊNCIA DE
MALÁRIA EM RORAIMA

Dissertação defendida em 24/02/2005:

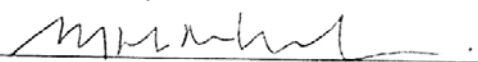
Titulares:



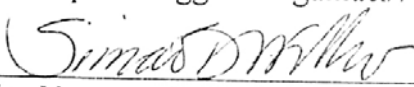
Cláudia Maria Fontes de Oliveira
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / FIOCRUZ



Cleide Maria Ribeiro de Albuquerque
Departamento de Zoologia, UFPE



Maria Helena Neves Silva Filha
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / FIOCRUZ



Simão Dias Vasconcelos (orientador)
Departamento de Zoologia, UFPE

— *Mas e mundo depois da mata?*

— *Depois...? Mas a mata é o mundo.*

Garimpeiro anônimo, a 25 dias de viagem do povoado mais próximo.

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado aos moradores de áreas fronteiriças da Amazônia. São milhares de índios, agricultores e garimpeiros. Nomes e faces desconhecidas, isolados da sociedade, geográfica e economicamente. Unidos na mesma luta pela sobrevivência.

AGRADECIMENTOS

À excelente equipe de campo com quem tive o prazer de dividir inúmeras horas de trabalho: (em ordem alfabética) Alex Rone Fonseca de Almeida, Almir Antônio Fontão Cunha, Carlos Alberto Muniz da Silva, Davi Ribas Galvão, Gerson Francisco Nogueira, Luiz Oswaldo Silva, Paulo Atlântico Amorim, Pedro Rufino Silva, Valdenor Alves Macedo e, em especial, a Ducinéia A. Barros, pela compreensão e ajuda em todas as atividades desenvolvidas.

Às amigas Nilma, Su e Maria, pela ajuda, apoio e companheirismo no mais longo dos anos.

A José F. Luitgards-Moura, pela acolhida em seu laboratório, seu apoio incondicional em todas as necessidades logísticas e sua amizade.

A Ricardo Lourenço de Oliveira e Tereza Fernandes S. Nascimento pela carinhosa acolhida em seu laboratório e seu exemplo de profissionalismo, solicitude e amizade.

Aos meus pais, meu irmão e Ju, pelo apoio, carinho e zelo imensos.

À coordenação do Mestrado em Biologia Animal, Maria Eduarda Larrazábal e Ana Elisabete pela manutenção de um curso de excelente qualidade.

À Nildimar Honório pela colaboração incondicional e apoio nos momentos mais difíceis.

À Mércia Arruda, por ter me iniciado no estudo de vetores e constante ajuda e amizade em todos os momentos.

A Ulisses Confalonieri pela ajuda na elaboração do projeto, apoio e compreensão com todas as questões financeiras.

A Simão Vasconcelos pela ajuda e presteza em todas as revisões, seu apoio e profissionalismo.

A Cláudia M. F. Oliveira, Cleide M. R. de Albuquerque e Maria Helena pela simpatia e compreensão nas correções.

Ao Inter-American Institute for Global Change Research, pelo financiamento das pesquisas de campo.

Aos índios Waiká e o pajé Luizinho por terem me apontado o caminho e o sentido da vida.

A Djavan Lima, Jeremias, Sr. Chico, Antônio M. Filho, Olival Lopes de Alencar e inúmeros outros colonos vivendo em área de fronteira agrícola, que me ensinaram o que representa a malária e como é a vida no duro isolamento da selva.

DIVERSIDADE E SAZONALIDADE DE *ANOPHELES SP.* (DIPTERA: CULICIDAE) COM ÊNFASE NA PREVALÊNCIA DE MALÁRIA EM RORAIMA

RESUMO

A malária representa grave problema mundial de saúde pública. Estima-se sua incidência em 400 milhões de casos anuais principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Este projeto avaliou aspectos eco-epidemiológicos da malária em Roraima, onde há grande diversidade de ecossistemas naturais. Inicialmente é descrita a carta anofélica do estado, com 12 espécies identificadas e dos ecossistemas ocupados por elas. Em dois ecossistemas, floresta e savana, foram realizados testes imunológicos para determinar a prevalência de infecção em mosquitos adultos para identificar vetores locais. Uma área de estudo situa-se num projeto de assentamento na floresta tropical de alta transmissão de malária. A segunda encontra-se na beira da mata ciliar característica dos cursos hídricos da savana. Durante um ano, coletamos larvas e adultos de anofelinos, determinando e caracterizando criadouros potenciais; analisamos variações na densidade dos mosquitos, e estudamos a variação sazonal da idade das populações de mosquitos, duração do ciclo gonotrófico, capacidade de dispersão e horário de picada. Também calculamos curvas de sobrevivência e analisamos técnicas de determinação etária das espécies. Foi analisada a variação da distribuição das larvas ao longo do ano e sua resposta ao desmatamento. A prevalência de infecção em mosquitos adultos implicou *An. albitarsis* s.l., além de *An. darlingi*, como transmissor. As taxas de sobrevivência se correlacionaram bem com os registros da literatura, mesmo sendo estes discrepantes. Houve aumento da longevidade durante a estação seca na floresta, correlacionado com aumento da malária, e queda durante a época de chuvas. Houve diferenças na duração do ciclo gonotrófico de *An. darlingi* encontrado na floresta em comparação com o da savana. Formas imaturas de *An. darlingi* se agregaram próximo a residências, mas o desmatamento exerceu papel negativo sobre seus criadouros. Construções de reservas hídricas proporcionaram redutos para *An. darlingi*, permitindo sua sobrevivência durante a seca e transmissão de malária durante todo o ano, mas apenas nos seus arredores, devido à limitada dispersão da espécie em condições naturais. Observaram-se picos de densidade de *An. darlingi* e *An. albitarsis* s.l. no fim da estação seca, na floresta, e durante as chuvas, na savana. *An. albitarsis* s.l. na savana também apresentou aumento de densidade correlacionado com as chuvas. Esses dados foram correlacionados com os de densidade larvária e de paridade para criar um modelo de transmissão de malária distinto para dois locais com diferentes tipos de drenagem hídrica. Finalmente, descrevemos a ocorrência de um parasito de mosquitos sem relato prévio na América Latina, presumivelmente com efeitos deletérios sobre o desenvolvimento ovariano de fêmeas de *An. darlingi*.

Palavras chave: estrutura etária – plasmodium – densidade – capacidade vetorial

DIVERSITY AND SEASONALITY OF *ANOPHELES SP.* (DIPTERA: CULICIDAE) WITH EMPHASIS ON MALARIA PREVALENCE IN RORAIMA

ABSTRACT

Malaria remains one of the most important infectious diseases in the world. It is estimated that 400 million cases occur every year, especially in tropical and subtropical regions. In this project we have studied entomological and epidemiological aspects of transmission in the State of Roraima, in Northern Amazon, Brazil. The region presents a diversity of ecosystems. Initially the distribution of the Anopheline species in the area are described. We report immunologic vector incrimination tests for these species. Further studies were performed in two areas during one year. One site is an agricultural settlement in the tropical forest. The other area borders a gallery forest in the savanna. Seasonal density and geographical fluctuations in larvae and adult mosquitoes were analyzed. We determined and characterized breeding sites for local vectors, their dispersion capabilities, hourly biting activity, age structure and survival curves. Different methods for age determination were compared. The impact of deforestation on larval densities was evaluated. The finding of infected *An. albitarsis* s.l. suggest it is an important vector, besides *An. darlingi*. Survival rates were well correlated to the ones reported in the literature and seasonal fluctuation explained the previously described variation. Longevity increased during the dry season in the forest, which was correlated to increases in number of malaria cases. The duration of the gonotrophic cycle of *An. darlingi* was longer in the forest than in the savanna. Larvae of this species were clustered near human houses, but deforestation had a negative effect on the prevalence of its larvae. Construction of artificial dams provided breeding sites for *An. darlingi*, permitting year-long malaria transmission. However, limited dispersion of adults under natural conditions impeded propagation of cases away from the breeding areas. Adult densities of *An. darlingi* showed a peak at the end of the dry season in the forest, while peaks were observed during the rainy season in the savanna. *Anopheles albitarsis* s.l. densities in the savanna were also correlated with increased raining. Survival rates and larval and adult densities were correlated to provide an ample model of malaria transmission. Malaria transmission capacities would follow diverging trends according to the drainage system of the area. Finally, we describe the occurrence of a mosquito parasite, without previous records for Latin America, that could cause pathological effects on female ovarian development in *An. darlingi*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Mapa do estado de Roraima, Brasil, com os locais de coleta das amostras indicados pelos números. Correspondem às localidades listadas na Tabela 2.1.	23
Figura 2.2: Flutuação mensal das taxas de infecção plasmodial em <i>An. darlingi</i> (linha contínua) e <i>An. albitarsis</i> s.l. (linha pontilhada) em áreas de Boa Vista – RR durante 24 meses. (Dados: Vasconcelos et al., 2002.).....	27
Figura 3.1: Mapa do Estado de Roraima com indicação dos locais de estudo.....	32
Figura 3.2: Croqui dos criadouros positivos para <i>An. darlingi</i> (“x”) descritos durante as estações chuvosas (acima) e seca (abaixo), ao longo da estrada da Vicinal 19, em Rorainópolis - RR. Barragens e açudes são indicados por “□”. A maior parte destes são coleções hídricas para a criação de peixes. O Igarapé Azul é indicado por linhas tortuosas (“ ”). Cada casos de malária (“●”), ocorrido de agosto de 2002 a julho 2004 é representado, em cada uma das estações. Escala aproximada de 1:100.000.	38
Figura 3.3: Gráfico representativo das flutuações observadas nos níveis de água do Igarapé Azul (linha contínua) em Rorainópolis - RR, relacionadas às variações pluviométricas (barras verticais) durante oito meses de avaliação (dezembro de 2003 a julho de 2004).	39
Figura 3.4: Croqui da área do Igarapé Azul (“ ”), na Vicinal 19, Rorainópolis – RR. Estão indicados os locais onde foram encontradas cada larva de <i>An. darlingi</i> (“●”) e de outros Anophelinae (“○”) ao longo de um ano de coletas. As casas habitadas estão assinaladas, assim como a estrada do assentamento. Escala aproximada de 1:10.000.	40
Figura 3.5: Logaritmo do número de larvas (n+1) coletadas em 60 amostras de dois criadouros da Vicinal 19, Rorainópolis. A vegetação circundante de um local foi desmatada em março (linha contínua) (seta). O outro local (linha pontilhada) representa uma área controle que, embora próxima, não sofreu alteração da cobertura vegetal.	41
Figura 3.6: Casos de malária na Vicinal 19 de Rorainópolis – RR, de janeiro de 2002 a julho de 2004. Os períodos compreendidos entre outubro/novembro e abril/maio correspondem às estações secas. (Fonte: registros das equipes de microscopia em Rorainópolis.).....	41
Figura 4.1: Curvas de sobrevivência para dados agregados de <i>An. darlingi</i> (linha contínua e círculos) e <i>An. albitarsis</i> s.l. (linha pontilhada e quadrados) capturados na floresta e savana, respectivamente, no início e meio da estação chuvosa (maio - julho, 2004). As linhas representam o ajustamento por mínimos quadrados dos dados para as funções $y = b \cdot e^{a \cdot x}$	56
Figura 5.1: Representação gráfica dos estágio de desenvolvimento ovariolar, relacionado ao estado de paridade, encontrado em 1345 <i>An. darlingi</i> e 1003 <i>An. albitarsis</i> s.l. provenientes de Rorainopolis e Boa Vista, respectivamente, coletados entre novembro de 2003 e julho de 2004.	67
Figura 5.2: Representação gráfica dos estágios de desenvolvimento ovariolar em 20 fêmeas de <i>An. darlingi</i> e 28 fêmeas de <i>An. albitarsis</i> s.l., capturadas em dois dias antes do uso de Cipermetrina em uma residência localizada em Boa Vista.....	68
Figura 5.3: Representação gráfica dos estágios de desenvolvimento ovariolar em 21 fêmeas de <i>An. darlingi</i> e 32 fêmeas de <i>An. albitarsis</i> s.l., capturadas após o uso de Cipermetrina em uma residência localizada em Boa Vista.....	68

Figura 5.4: Representação gráfica da média de picadas por mosquitos/homem/hora em 12 h de coleta peridomiciliar. <i>Anopheles darlingi</i> (linhas contínuas) foram provenientes de Rorainópolis (A) e Boa Vista (B). Os dados de Rorainópolis referem-se apenas à estação seca. <i>Anopheles albitarsis</i> s.l. (linha pontilhada) foram capturados em Boa Vista. Nesta área, não houve variação sazonal.....	70
Figura 6.1: Umidade (linha pontilhada) e temperatura (linha contínua) médias na área de pequeno rio (esquerda) e grande rio (direita) durante os períodos de coleta (Figura 6.1a). A Figura 6.1b demonstra os dados de pluviometria (barras) e nível dos rios (linhas). Este último representa o Igarapé Azul (esquerda) e o Rio Branco (direita). Alguns dados pluviométricos de Rorainópolis estão ausentes. O Log(n+1) das médias de adultos de <i>An. darlingi</i> (linha contínua) e <i>An. albitarsis</i> s.l. (linha pontilhada) são demonstrados na Figura 6.1c. As linhas verticais indicam os intervalos de confiança de 95%.	82
Figura 6.2: Variações nas capacidades vectoriais de <i>An. darlingi</i> (linha contínua) e <i>An. albitarsis</i> s.l. (linha pontilhada) capturados nas áreas e pequeno e grande rios, respectivamente. Os intervalos de confiança de 95% são demonstrados e refletem variações nas densidades médias dos vetores.	84
Figura 6.3: Casos de malária na Vicinal 19 de Rorainópolis (linha contínua), a área de pequeno rio, e em Boa Vista (linha pontilhada), de julho de 2003 a julho de 2004. O <i>P. vivax</i> foi responsável por quase a totalidade dos casos. (Fonte: registros das equipes de microscopia em Rorainópolis.).....	84
Figura 6.4: Um modelo para o entendimento da sazonalidade da malária em duas áreas com sistemas de drenagem distintos. A área de pequeno rio é esquematizada à esquerda. A de grande rio à direita. A explicação é dada no texto.	87
Figura 7.1. Protozoário ciliado tetrahimenídeo, corado com azul de metileno. 5.000x.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Distribuição das espécies de anofelinos no estado de Roraima, Brasil, como resultado de estudos de campo no período de 1999-2003. Os números entre parênteses correspondem aos locais amostrados na Figura 2.1. O tipo de vegetação predominante em cada local de coleta foi classificado como: savana (S); floresta (F) ou floresta de montanhas (MF).....	28
Tabela 3.1: Variáveis contínuas dos criadouros da Vicinal 19 de acordo com a presença ou ausência de formas imaturas de <i>An. darlingi</i> no período de agosto de 2003 a julho de 2004	36
Tabela 3.2: Associação das características categóricas dos criadouros da Vicinal 19 pela presença de formas imaturas de <i>An. darlingi</i> no período de agosto de 2003 a julho de 2004	37
Tabela 4.1: Aparência da porção terminal dos ovariolos de <i>An. darlingi</i> e <i>An. albitarsis</i> s.l. dissecados em áreas de savana e floresta do Estado de Roraima	54
Tabela 4.2: Número de dilatações nas porções ovariolares terminais de fêmeas de <i>An. darlingi</i> e <i>An. albitarsis</i> s.l. coletadas em Rorainópolis e Boa Vista - RR, coletados em maio a julho de 2004	55
Tabela 4.3: Duração dos ciclos gonotróficos e taxas de sobrevivência de <i>Anopheles darlingi</i> e <i>Anopheles albitarsis</i> s.l. de floresta e savana, coletados de novembro de 2003 a julho de 2004	56
Tabela 5.1: Estado de paridade e desenvolvimento ovariolar de <i>An. darlingi</i> (de Rorainópolis) e <i>An. albitarsis</i> s.l. (de Boa Vista) de acordo com o horário de picada em maio a julho de 2004	69
Tabela 5.2: Estado de paridade e desenvolvimento ovariolar de <i>An. albitarsis</i> s.l. de Boa Vista de acordo com o tempo levado para dissecação, em novembro de 2003 e janeiro de 2004	71
Tabela 6.1: Resultados do Vectest TM para os mosquitos capturados em agosto de 2003 a julho de 2004	80
Tabela 6.2: Densidade de picada médias ($m\alpha$) para <i>An. darlingi</i> e <i>An. albitarsis</i> s.l. e taxas de sobrevivência (p), calculadas pela taxa de paridade de Davidson. As durações dos ciclos esporogônicos (n) em cada período também são descritas e foram iguais em ambas as localidades estudadas	83
Tabela 7.1. Percentual de <i>Anopheles darlingi</i> infectados por Tetrahimenídeos, coletados no Estado de Roraima, Brasil, entre Novembro 2003 e Julho 2004	92
Tabela 7.2. Infecção por Tetrahimenídeo em larvas de mosquitos coletadas no Estado de Roraima, Brasil, entre Novembro 2003 e Julho 2004	93

ABREVIATURAS

<i>An.</i>	Anopheles
ANOVA	análise de variância
α	percentagem de mosquitos que ataca o homem
°C	temperatura em graus Celsius
CS	circumsporozoítica
CV	capacidade vetorial
D	índice de diversidade de Margalef
DP	desvio padrão
e	base do logaritmo neperiano
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ensaio imunoenzimático)
F	coeficiente de Fisher
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
gl	graus de liberdade
h	hora(s)
HBI	human blood index (índice de mosquitos com sangue humano)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	intervalo de confiança
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
m	metro(s)
<i>M</i>	média geral da densidade de picadas durante vários dias de coleta
<i>ma</i>	densidade de mosquitos picando o homem
<i>N</i>	número de indivíduos/número de casos
<i>n</i>	tempo de maturação do parasito no mosquito
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
<i>p</i>	taxa de sobrevivência diária
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
r	coeficiente de correlação de Pearson
S	número de espécies
RR	Roraima
s.l.	sensu lato
<i>t</i>	duração do ciclo gonotrófico
V	densidade média de fêmeas paridas em uma noite
WHO	World Health Organization
<i>x</i>	a duração do ciclo gonotrófico em dias
χ^2	teste de chi-quadrado
<i>y</i>	número de fêmeas capturadas

SUMÁRIO

Capítulo I: Apresentação 14

1. INTRODUÇÃO..... 14
2. OBJETIVOS..... 16
3. APRESENTAÇÃO DO TRABALHO 17

Capítulo II: Ocorrência de Espécies Anofélicas em Áreas Malarígenas do Estado de Roraima, Brasil 18

1. INTRODUÇÃO..... 18
2. MATERIAIS E MÉTODOS 18
3. RESULTADOS 21
4. DISCUSSÃO..... 23

Capítulo III: Criadouros de *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) em uma Área de Assentamento Agrícola na Amazônia: Variação Sazonal e sua Relação com a Atividade Antrópica..... 30

1. INTRODUÇÃO..... 30
2. MATERIAIS E MÉTODOS 32
3. RESULTADOS 36
4. DISCUSSÃO..... 41

Capítulo IV: Variações Sazonais da Estrutura Etária de Populações de Anofelinos Vetores da Malária na Amazônia 48

1. INTRODUÇÃO..... 48
2. MATERIAIS E MÉTODOS 49
3. RESULTADOS 53
4. DISCUSSÃO..... 57

Capítulo V: Observações sobre a Estrutura Etária de Populações de Mosquitos Anofelinos no Norte da Amazônia..... 63

1. INTRODUÇÃO..... 63

2. MATERIAIS E MÉTODOS	63
3. RESULTADOS	66
4. DISCUSSÃO	71

**Capítulo VI: Variação Sazonal dos Vetores da Malária: um Modelo
para Áreas com Padrões de Drenagem Distintos na Amazônia..... 76**

1. INTRODUÇÃO.....	76
2. MATERIAIS E MÉTODOS	77
3. RESULTADOS	80
4. DISCUSSÃO.....	85

**Capítulo VII: Infecção por Tetrahimenídeos em Populações de
Mosquitos de uma Região Endêmica para Malária..... 90**

1. INTRODUÇÃO.....	90
2. MATERIAIS E MÉTODOS	90
3. RESULTADOS	91
4. DISCUSSÃO.....	93

Capítulo VIII: Conclusões 96

9. Referências 99

CAPÍTULO I: APRESENTAÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Agente etiológico e epidemiologia da malária

A malária é um dos mais sérios e complexos problemas de saúde enfrentados pela humanidade. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2002), aproximadamente 400 milhões de pessoas em todo o mundo são infectadas pela doença e entre 1 a 1.5 milhões morrem todos os anos.

A malária é uma doença parasitária sistêmica, provocada por protozoários do gênero *Plasmodium*. A transmissão é realizada por mosquitos do gênero *Anopheles*, como observado desde o fim do século XIX, por Ronald Ross. Há cerca de 120 espécies de plasmódios, incluindo parasitos de primatas, morcegos, roedores, aves, répteis e outros mamíferos. Quatro espécies infectam o homem naturalmente: *Plasmodium falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax* e *P. ovale*, sendo a última restrita a África Tropical, Nova Guiné, Filipinas e Vietnã.

Atualmente, a doença encontra-se confinada a áreas tropicais pobres da África, Ásia e América Latina, onde o controle da doença é agravado pela ausência de estruturas de saúde adequadas e as más condições sócio-econômicas. A situação tem agravado nos últimos anos com o aumento da resistência às drogas normalmente usadas no combate ao parasita que provoca a doença (Forattini, 2002).

Na América Latina, o maior número de casos ocorre no Brasil, com 50,7% do total de registros, correspondente a cerca de 500 mil casos/ano (WHO, 1997; BRASIL, 2001). No Brasil, a malária representa um grave problema de saúde pública, já que 60% do território nacional possui condições de transmissão. Em 2001, foram registrados 388 mil casos na Amazônia Legal¹, responsável por 99,7% do total de casos no Brasil (BRASIL, 2002). Os estados mais atingidos eram o Pará e Roraima.

Na região amazônica, muitos fatores afetam a dinâmica de doenças infecciosas, tais como fatores socioeconômicos (migrações, habitação, densidade populacional, renda); ambientais (hidrologia, clima, topografia, vegetação); biológicos (ciclo de vida dos vetores e os agentes patológicos, imunidade da população) e médico-sanitários (efetividade do sistema de saúde). A malária é a doença endêmica mais comum, com cerca de 600.000 casos diagnosticados todos os anos na Região Amazônica até 1999

¹ Divisão política que engloba os estados do Amazonas, Pará, Acre, Roraima, Rondônia, Amapá, Mato Grosso, Tocantins e Maranhão, além de parte do Maranhão. (Ministério da Saúde, 2000; Ministério da Saúde, 2001)

(MS/FUNASA, 2002). Os fatores ambientais mais importantes na transmissão da malária são climáticos e meteorológicos, como temperatura, precipitação, e umidade relativa; hidrológicos, como o escoamento de superfície, interceptação de precipitação, evapotranspiração, e vazão fluvial; e ecológicos (como fisionomia vegetal, presença de solos com drenagem deficiente; alterações da cobertura da terra).

O Estado de Roraima, com 225.000 km² de superfície, apresenta a menor densidade demográfica dos estados brasileiros (1,5 habitante/km²). Dentro da Região Amazônica, Roraima possui o maior número de casos de malária por habitante, apesar de em seu território ocorrerem apenas 5% dos registros do Brasil. Em 2000, foram registrados cerca de 110 casos por 1.000 habitantes. Nesse período o número de casos de malária aumentou significativamente, passando de 10.000 casos anuais no início da década de 70 para mais de 35.000 casos no final dos anos 90 (Barata, 1995). Em 2002, Roraima apresentou 5.924 casos de malária, sendo 1.297 provocados por *P. falciparum*, o que corresponde a 21,9% do total. Já em 2003, o número de casos diminuiu para 3.895, sendo 807 causados por *P. falciparum*, (20,7% do total). Constatase uma redução de 34,3% no número de casos no período de 2002 a 2003. Segundo a distribuição de casos de malária por estados da Amazônia Legal, Roraima foi responsável por 2,4% dos casos em 2002 (BRASIL, 2002).

Roraima apresenta uma grande variedade de ecossistemas naturais, relevo e regimes climáticos. Estes fatores contribuem para formar um quadro epidemiológico complexo e extremamente dinâmico (Chaves & Rodrigues, 2000). Esses fatores tornam o estado um local de particular interesse para estudos sobre a malária e seus transmissores.

1.2. Modo de transmissão

A malária é transmitida ao homem pela picada de mosquitos do gênero *Anopheles*. Existem cerca de 430 espécies de anofelinos, e 60 são vetores em condições naturais, das quais 30 têm maior importância (Forattini, 1962). No Brasil, são encontradas 52 espécies, incluídas em dois subgêneros: *Nyssorhynchus* e *Kerteszia*. Antes do emprego de técnicas como o teste de ELISA, poucas espécies brasileiras de *Nyssorhynchus*, como *An. darlingi* e *An. albicans*, haviam sido encontradas naturalmente infectadas com esporozoítos e, no Brasil, o principal vetor da malária é *An. darlingi*, presente em quase todo o território, exceto no Sertão Nordestino, no extremo sul e em áreas de elevadas altitudes (Forattini, 1962). Hoje, sabe-se que vários outros anofelinos do subgênero *Nyssorhynchus* são capazes de transmitir

malária humana. São principalmente exofílicos, zoofílicos de hábitos crepusculares, mas na ausência dos animais preferidos para fazerem o repasto sanguíneo ou em épocas de alta densidade, podem se alimentar no homem com freqüência. Neste caso, poderiam se infectar ao sugar portadores de gametócitos de plasmódios em áreas cuja endemicidade fora desencadeada e mantida às custas de *An. darlingi*. São considerados vetores secundários ou vetores potenciais na Amazônia as espécies: *An. deaneorum*, *An. braziliensis*, *An. nuneztovari*, *An. oswaldoi*, *An. triannulatus*, *An. strodeji*, *An. evansae*, *An. galvaoi* (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

A dificuldade em se determinar as espécies transmissoras de malária resulta em uma escassez de informações sobre as taxas de infecção em áreas endêmicas (Arruda et al., 1986). Adicionalmente, as espécies de plasmódios não pode ser diferenciadas através de características morfológicas do esporozoíta, o que é uma séria desvantagem em áreas onde ocorrem múltiplas espécies de plasmódios, como o Brasil. Nos últimos vinte anos, o desenvolvimento de técnicas imunológicas para determinação da infecção no mosquito tem facilitado bastante as pesquisas de identificação das espécies vetoras. Tais técnicas apresentam alta sensibilidade e especificidade, além de permitirem o processamento das amostras em local distante de sua coleta.

Os poucos estudos realizados no país utilizando técnicas imunológicas demonstraram uma importante diferença com relação ao padrão entomológico tradicionalmente conhecido. Como exemplos, citamos a detecção de *An. triannulatus* e *An. nuneztovari* (Arruda et al., 1986) como transmissores de *P. vivax*, além da implicação de *A. oswaldoi* e *A. deaneorum* como vetores anteriormente desconhecidos. Atualmente, as espécies consideradas mais importantes são *An. darlingi*, *An. albitarsis*, *An. aquasalis*, *An. deaneorum*, *An. oswaldoi* e *An. marajoara*, sendo *An. darlingi* considerado, de forma definitiva, como principal vetor (Oliveira-Ferreira et al. 1990; Tadei et al. 1998; Póvoa et al., 2001; Silva-Vasconcelos et al., 2002).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Caracterizar a variação sazonal da capacidade de transmissão da malária pelas espécies vetoras da Bacia Amazônica, relacionando-as à incidência desta doença.

2.2. Objetivos específicos

Investigar a diversidade das espécies de anofelinos em locais malarígenos do estado de Roraima, englobando diferentes ecossistemas.

Investigar a flutuação sazonal das formas adultas e imaturas das espécies de anofelinos vetores da malária em dois ecossistemas distintos, em relação à variação do nível dos rios e à incidência pluviométrica.

Analisar a variação sazonal da estrutura etária das populações de anofelinos vetores da malária, correlacionando-a às variações de densidade à incidência de malária em cada ecossistema.

3. APRESENTAÇÃO DO TRABALHO

Esta dissertação compreende os resultados do Projeto Roraima, um amplo estudo sobre eco-epidemiologia da malária neste Estado, financiado pelo Inter-American Institute for Global Change Research (IAI), coordenado, na América Latina, pelo Dr. Ulisses Confalonieri, da Fundação Oswaldo Cruz. O IAI envolve cerca de 12 instituições do Brasil e do exterior e financia projetos que abordam a relação entre doenças infecciosas e questões climáticas.

Nosso projeto abordou, como descrito na seção acima, diferentes parâmetros relacionados, principalmente, à ecologia do vetor e sua relação direta com a prevalência da malária na região. O trabalho de campo resultou em um grande volume de informações que serão aqui apresentadas. Para facilitar a compreensão de cada uma das questões levantadas durante a pesquisa (e outras que surgiram durante os estudos de campo), os dados desta dissertação serão apresentados sob a forma de artigos independentes. Acreditamos que assim a leitura será mais proveitosa se as abordagens (embora interdependentes) forem endereçadas separadamente. Para evitar uma profusão de estilos, padronizamos a redação em um único formato, e acrescentamos, em nosso ver, os possíveis títulos finais dos artigos e citamos para quais jornais pretendemos submetê-lo. O Capítulo II, que se refere à distribuição dos vetores em Roraima, e o VII, que descreve o parasito ciliado em anofelinos, já foram submetidos.

Esperamos, desta forma, apresentar esta quantidade elevada de resultados de uma forma mais sucinta, portanto, optamos por citar todas as referências bibliográficas ao final da dissertação, bem como eventuais informações complementares.

CAPÍTULO II: OCORRÊNCIA DE ESPÉCIES ANOFÉLICAS EM ÁREAS MALARÍGENAS DO ESTADO DE RORAIMA, BRASIL

1. INTRODUÇÃO

O ressurgimento da malária nas Américas tem sido um importante problema de saúde pública à Amazônia brasileira, bem como em várias outras localidades das Américas do Sul e Central. As estratégias de controle têm se voltado para serviços regionais descentralizados (OPAS, 1990) e, recentemente, se encontram direcionadas para uma abordagem integrada de controle de vetores (Rojas et al., 1992). Programas específicos para cada local necessitam estar baseados numa profunda compreensão da dinâmica de transmissão nas áreas de risco (Rubio-Palis & Zimmerman, 1997). O conhecimento sobre a distribuição das espécies vetoras nas regiões ecológicas é de vital importância para auxiliar no planejamento destes programas de controle locais.

Como abordagem inicial para melhor compreensão dos anofelinos vetores da malária em diferentes ecossistemas, uma classificação ecorregional, baseada na distribuição de vetores e determinantes ambientais foi proposta (Rubio-Palis & Zimmerman, 1997). Neste capítulo, descrevemos, o levantamento da distribuição das espécies de anofelinos em áreas malarígenas do Estado de Roraima. Este local, localizado ao norte da bacia amazônica, contém ecossistemas distintos e característicos. Averiguando as espécies anofélicas presentes em áreas de transmissão de malária discutimos os vetores responsáveis e abordamos suas preferência por determinados ecossistemas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Descrição da área

Roraima é o mais setentrional estado brasileiro e seu território compreende a bacia do Rio Branco, um dos maiores no sistema amazônico. A área do estado é de 225, 116 km² e se estende logo abaixo do equador até 5° de latitude norte. A diversidade de seus ecossistemas abrange desde densas florestas tropicais nas regiões sul e oeste, como na maior parte das montanhas na fronteira com a Venezuela, até diferentes tipos de savana no nordeste da região (Figura 2.1) (Furley, 1994). Aproximadamente um quadrilátero que consiste da região nordeste do estado é de planície, formada amplamente por savanas não arborizadas, que refletem a transição do clima úmido tropical, com chuvas freqüentes durante todo o ano, comum na floresta

amazônica, para uma área com seis meses de estiagem que vai de novembro a abril. Altitudes variam de 100 m nas planícies alagadas ao sul a 2.700 m nas montanhas ao norte e a oeste do estado. As áreas de savana estão localizadas em altitudes médias de 70 a 120 m (Furley, 1994; Barbosa et al., 1997).

A média anual de precipitação varia grandemente em todo o estado, de 1.100 - 1.400 mm/ano na região de savana, elevando-se ao sul e a oeste para cerca de 2.000 - 2.300 mm/ano. As temperaturas são constantemente altas em todo o estado, em torno de 27,8° C (média de 60 anos, 1939-1999) na savana e 26,4° na floresta (média de 21 anos, 1978-1999) com pouca variação (Barbosa et al., 1997). Latossolos (oxissolos) e solos podzólicos (ultissolos) são tipos de solos predominantes, comumente encontrados na bacia amazônica e que têm pouca correlação com a cobertura de vegetação. As savanas são entrecortadas por leitos de rios temporários e também abrangem numerosas depressões discretas que alagam durante os períodos chuvosos. Os cursos hídricos maiores apresentam matas de galeria, muitas vezes extensos e contínuos com a área de floresta. As florestas de baixa altitude ao sul do estado possuem pântanos e vales pouco definidos (Furley, 1994). Pouca informação climática está disponível sobre as áreas de florestas montanhosas, dado ao fato do acesso ser possível apenas através de aeronave. Devido à restrição de espaço, outros aspectos eco-fisiogeográficos não serão discutidos.

2.2. Espécies de anofelinos em cada ecossistema

Nas áreas de mata, *An. darlingi* está presente de forma disseminada, sendo usualmente a espécie mais encontrada. No entanto, assim como observado por Bruyning (1952), no Suriname, Stage & Giglioli (1947), na Guiana Inglesa e Rubio-Palis & Zimmerman (1997), na Venezuela, vários anos de coletas larvárias para análises de rotina têm demonstrado a ausência de criadouros de *An. darlingi* na savana. A ocorrência da espécie se limita às matas de galeria, “ilhas” de mata próximas da savana e grandes fragmentos de floresta se estendem nas áreas limítrofes, especialmente nas zonas de transição.

Pesquisas anteriores em Roraima têm igualmente estabelecido a ocorrência disseminada de espécies anofelinas em todo o estado, embora com marcadas diferenças de densidade entre os ecossistemas de savana e floresta. Embora ocorram de forma predominante na área de savana, *An. braziliensis* e *An. albitarsis* sensu lato [s.l.] são também encontradas na floresta. A mesma ocorrência disseminada é observada em *An. nuneztovari*.

2.3. Procedimento de amostragem

A pesquisa de campo foi conduzida pela equipe da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), supervisionada por dois biólogos, no período de janeiro de 1999 a janeiro de 2003, em 65 localidades. Estas, compreendendo todos os 15 municípios do estado, corresponderam aos focos de malária registrados pela FUNASA durante aquele período. Por causa da ocorrência difundida da malária e estrutura operacional limitada, não foi possível realizar uma amostragem extensiva em todos os locais. As amostras foram coletadas preferencialmente segundo os critérios de maior número de notificações e maior densidade demográfica. A latitude e longitude de cada área de coleta foram registrados com um aparelho de GPS Garmin® e foram determinadas pelo Sistema Geodésico Universal 1984. A vegetação característica de cada local é sumarizado na Tabela 2.1.

Os mosquitos adultos foram coletados no momento do pouso, segundo o protocolo aprovado para levantamentos entomológicos de rotina na FUNASA. O tempo de captura foi de três horas por dia (das 18 às 21 h) baseado no já conhecido pico de atividade da espécie na região, determinado em testes pilotos. O número de iscas humanas, bem como o número de dias de coleta em cada local, variaram. Coletas foram realizadas em ambiente intra e extradomiciliar durante todas as fases da lua, e independente de chuva e vento. Os levantamentos de formas imaturas foram conduzidos pela manhã, utilizando-se conchas de larvas padrões (500 mL) e um mínimo de 60 amostras foram retiradas dos criadouros de cada localidade. Dependendo do tamanho de cada local, o número real de conchadas chegou a 90. Larvas e pupas foram levadas ao laboratório em água do criadouro para identificação. Adultos e larvas foram identificados utilizando-se as chaves de Gorham et al. (1967) e Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994). Devido a variação nos procedimentos utilizados pela equipe de campo, a delimitação de um mínimo 18 homens x hora de coleta e realização de inspeções larvárias em três criadouros, foi estabelecida como mínimo para incluir um local na pesquisa. Por motivos de logística, amostragens em ambas as estações, seca e chuvosa, só foram realizadas em três locais, Awaris, Apiaú e Boa Vista.

Um teste T para amostras independentes foi utilizado para comparar os números médios de espécies encontradas em locais de savana e floresta.

3. RESULTADOS

Nos 65 locais analisados, mais de 853 h de iscas humanas foram efetuadas e 123 criadouros foram inspecionados à procura de estágios imaturos. A temperatura não variou significativamente durante o período de coletas em relação à média do estado. A umidade relativa variou de 60 a 92% na savana e 72 a 99% na floresta.

Os dados relacionando locais e espécies encontradas estão descritos na Tabela 2.1. Ao todo, foram identificadas 12 espécies de anofelinos a partir das 2.396 formas imaturas e mais de 4.000 adultos coletados durante a pesquisa de 48 meses. Devido à ausência de características morfológicas distintivas (com exceção da *An. deaneorum*), espécies crípticas dentro do complexo *An. albitarsis* não foram diferenciadas e se faz referência a elas como *An. albitarsis* sensu lato (s.l.) (Wilkerson et al., 1995). Utilizando *random-amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction* (RAPD-PCR), Wilkerson et al. (1995) verificaram a existência de quatro espécies crípticas nessa espécie. Duas podem ser diferenciadas pela proporção de escurecimento no segundo tarsômero posterior (Forattini, 1995) e ambas são encontradas nas áreas de estudo.

Também pela ausência de variações morfológicas que permitam pronta identificação, as espécies crípticas que seguem não foram levadas em consideração: *An. halophylus*, *An. konderi*, *An. costai*, *An. forattinii* e *An. dunhami*.

Apesar de terem havido focos de malária na região de savana, todos estes locais eram a menos de 300 m de matas de galeria ou outras áreas florestadas.

Em cerca de 86% dos locais malarígenos ocorreu *An. darlingi*, considerado o vetor primário da malária na Amazônia brasileira. A verificação de sua ocorrência nas áreas de savana foi apenas na forma de adultos, o que foi possível pela proximidade dos locais amostrados de áreas de florestas, onde os criadouros eram encontrados. A ausência de *An. darlingi* em algumas áreas florestadas, como São Luiz do Anauá (57), pode ser devido à limitada amostragem.

O complexo *An. albitarsis* foi encontrado em todos os 15 municípios do estado, em 97% de todos locais positivos. Apesar de marcada divergência nas densidades anofélicas da floresta e da savana em relação às formas adultas, com predominância de *An. darlingi* na primeira e *An. albitarsis* s.l. na segunda, pelo critério de presença e ausência, não pode ser demonstrada preferência de qualquer destas espécies por algum ecossistema ($P > 0,05$).

Anopheles braziliensis foi encontrado em 28% dos locais pesquisados e *An. nuneztovari* em 72%. Embora o primeiro demonstrou marcada preferência pelos locais

de savana ($\chi^2 = 8,44$; graus de liberdade [gl] = 1; $P < 0,01$), o último não apresentou preferência ($\chi^2 = 1,38$; gl = 1; $P > 0,05$).

As espécies que apresentaram menor frequência foram *An. squamifemur*, encontrada somente em dois locais (3%), e *An. mediopunctatus*, encontrada em três locais (5%) do estado. Excluindo a área urbana de Boa Vista, onde maior número de coletas foram realizadas, as áreas de savana abrigam uma média de 3,3 espécies anofélicas por local, em comparação com 4,5 espécies nas áreas de floresta, o que foi significativo com o teste T ($P < 0,05$).

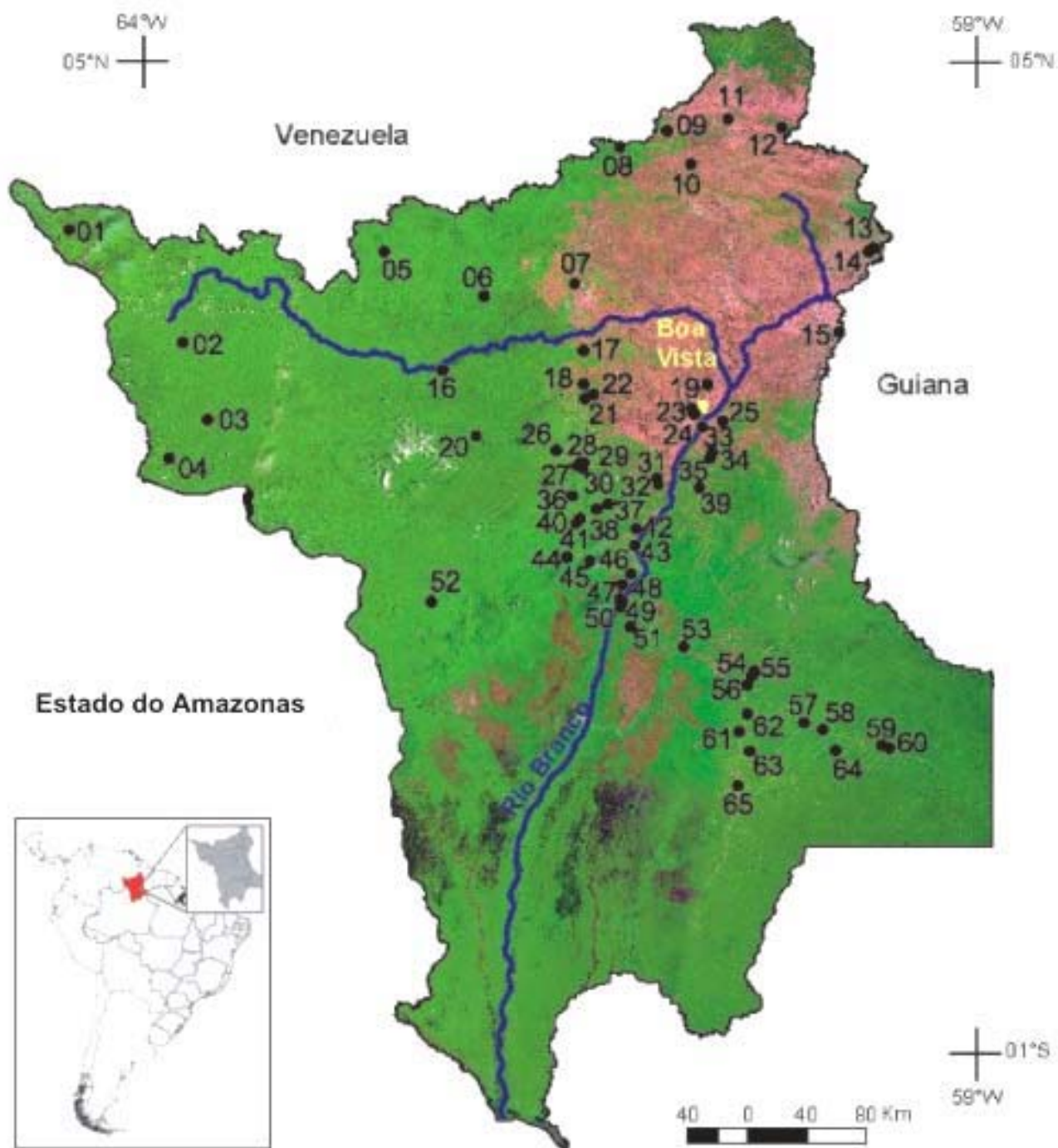


Figura 2.1: Mapa do estado de Roraima, Brasil, com os locais de coleta das amostras indicados pelos números. Correspondem às localidades listadas na Tabela 2.1.

4. DISCUSSÃO

Volumosa informação sobre a distribuição de anofelinos neotrópicos está disponível na literatura, revisada por Forattini (1962) e Ferreira (1964). Entretanto, dados de uma parcela significativa da região amazônica ainda são escassos,

especialmente em Roraima, uma área altamente endêmica para a malária. No mais extenso inquérito entomológico realizado no Brasil, somente a capital de Roraima, Boa Vista, foi amostrada (Deane et al. 1946, 1948). Neste estudo, Deane et al. (1948) relataram a presença de *An. albitarsis*, *An. argyritarsis*, *An. braziliensis*, *An. darlingi*, *An. nuneztovari*, *An. oswaldoi*, *An. rangeli*, *An. strodei*, *An. triannulatus*, *An. mattogrossensis*, *An. peryassui* e *Chagasia bonneae*. Cerqueira (1961) compilou dados sobre *Culicidae* coletados na região amazônica, onde não houve dados adicionais sobre Roraima. Vasconcelos et al. (2002) analisaram criadouros e abundância de mosquitos em dois distritos de Boa Vista; das cinco espécies registradas, *An. darlingi* e, principalmente, *An. albitarsis* s.l. foram implicados através de testes imunológicos como a principal espécie vetora na savana, devido a sua alta densidade e taxa de infecção.

Tadei (1988b) realizou coletas de anofelinos na ilha de Maracá, uma reserva nacional ao norte do estado, constituída essencialmente por áreas de florestas, e relatou *An. albitarsis*, *An. darlingi*, *An. braziliensis*, *An. nuneztovari*, *An. peryassui*, *An. mattogrossensis*, *An. mediopunctatus*, *An. argyritarsis*, *An. evansae*, *An. galvaoi*, *An. oswaldoi* e *An. triannulatus*. De uma forma geral, *An. albitarsis* foi de longe a espécie predominante, seguida de *An. apicimacula*, enquanto *An. darlingi* foi coletada em baixíssimas densidades (Tadei, 1988b).

Este trabalho representa o maior levantamento de espécies anofélicas já realizado em Roraima. Em alguns locais, como a nos arredores de Boa Vista, deve ser observado que a diversidade de espécies poderia simplesmente ser um reflexo de um maior esforço dispensado para coleta nesta área de fácil acesso. No entanto, não encontramos *An. argyritarsis* ou *C. bonneae*, apesar de mais de 390 h combinadas de coletas e amostragens em mais de 50 criadouros em Boa Vista. Em aproximadamente seis décadas entre os estudos de Deane et al. (1946, 1948) e o relatado neste trabalho, significativas alterações ocorreram ao redor de Boa Vista que podem ter afetado os criadouros de larvas e conseqüente diversidade de anofelinos neste local. A escassa informação disponível sobre *C. bonneae* relaciona sua presença em locais de amostragem de larvas a riachos de águas límpidas e profundas, abrigados por florestas, com leitos arenosos (Deane, 1948). Distúrbios causados à cobertura vegetal, particularmente o desmatamento, acentuam deficiências sazonais de água e podem ter impacto nos criadouros e na distribuição dos anofelinos (Salati et al., 1986).

Neste artigo, nós registramos pela primeira vez a ocorrência de *An. squamifemur* em Roraima. Como as áreas de pesquisa foram selecionados de acordo

com informação epidemiológica relacionada à notificação da malária, as amostragens seriam tendenciosas em relação a locais positivos para os anofelinos vetores, mais antropofílicos. Espécies mais zoofílicas podem ter sido sub-amostradas. Além disso, espécies crípticas não foram identificadas devido a limitações operacionais relacionadas à criação em laboratório das espécies coletadas, dificuldades em analisar aspectos morfológicos das fêmeas.

Como descrito previamente por Tadei (1988b), nós confirmamos a ocorrência difundida de *An. evansae* no norte da Amazônia, previamente apenas registrada abaixo do limite sul desta região. Sua distribuição geográfica era considerada tão marcante que foi sugerido utilizá-la como parâmetro para identificação taxonômica (Faran, 1980).

Na Amazônia, onde são registrados 99% dos casos de malária no Brasil, *An. darlingi* é considerado o vetor primário na maioria dos locais analisados (Póvoa, 2000a, apresenta uma revisão). Em certas regiões de floresta, *An. darlingi* ocorreu em pequenas quantidades e foi raro em alguns territórios indígenas, como em Sucuba (5), Suapi (9), Uraricoera (16) e Sicanabiú (20), onde coletas não foram sistemáticas e anuais. Quando amostragens anuais e múltiplas coletas noturnas em iscas humanas foram realizadas, como em Parafuri Xiriana, *An. darlingi* foi detectado durante apenas três meses do ano (dados não apresentados). Isto ocorreu mesmo diante de freqüentes surtos de malária ao longo do ano. Similarmente, baixas densidades de *An. darlingi* foram encontradas por Branquinho et al. (1993) no Estado do Acre.

O principal “vetor regional” – definido por Rubio-Palis & Zimmerman (1997) como o vetor principal mais amplamente distribuído dentro de uma região – implicado na ecorregião de savana tem sido *An. darlingi*. No norte do Brasil, outras espécies podem atuar como vetores secundários ou locais, i.e., aqueles que não ocorrem por toda região mas que atuam como vetores principais ou secundários dentro de um mesoclima específico (Rubio-Palis & Zimmerman, 1997). *Anopheles albitarsis* s.l., *An. nuneztovari* e, em algumas áreas, *An. braziliensis* têm sido incluídos como “vetores locais” (Arruda, 1986; Póvoa, 2000b; Tadei, 2000). Também, estudos sobre taxas de infecção, com oocistos e esporozoítos, levaram à sugestão de *An. oswaldoi* s.s. como um vetor potencial no Acre (Branquinho et al., 1996). O papel de *An. oswaldoi* como vetor em Roraima, além da quantidade de contribuição atribuída às outras espécies, permanece indefinido. A questão da espécie vetora é complicada pela ocorrência concomitante de *An. darlingi* nos locais onde estes outros vetores secundários foram implicados.

Apesar de somente 16% do estado ser coberto por savana, cerca de 70% da população humana está concentrada nesta região, principalmente em Boa Vista. No entanto, todo foco de malária na região de savana foi em áreas perto de florestas de galeria ou outras áreas florestadas. Distribuição preferencial de povoados próximos a florestas de galeria devido a vantagens econômicas e históricas de uma hidrovía não explica completamente a distribuição da malária, já que vários assentamentos indígenas podem ser encontrados por toda a ecorregião. Estes dados sugerem que *An. albitarsis* s.l., encontrado por toda a savana, não atue como vetor importante em Roraima.

Este fato está em desacordo com dados de infectividade entomológica verificados em Boa Vista por Vasconcelos et al. (2002). Este autor relatou elevada taxa de infecção plasmodial em *An. albitarsis* s.l. em duas áreas de transição savana-mata de galeria na periferia de Boa Vista. No entanto, diante da ocorrência concomitante de *An. darlingi* nestas áreas, a contribuição de cada espécie permaneceu duvidosa. Atualmente, a transmissão de malária é muito baixa em todo o estado, possivelmente por conta das estratégias de controle, ou talvez, por efeito dos inúmeros incêndios em quase toda a área de savana do estado em 1997 e 2002 (Vasconcelos et al., 2002), não sendo passível de estudos transversais no momento.

Com o intento de melhor esclarecer a contribuição destas duas espécies, re-analisamos os dados apresentados por Vasconcelos et al. (2002), pois representam o único seguimento longitudinal de uma avaliação comparativa destas duas espécies durante surtos de malária. Como verificado na Figura 2.2, a transmissão é iniciada por *An. darlingi*, embora ocorra em menor densidade que *An. albitarsis* s.l. Somente após um aumento inicial no número de casos de malária, *An. albitarsis* s.l. é encontrado infectado. Este fato, somado à ausência de epidemias de malária nas áreas sem *An. darlingi* de Roraima e do restante da Amazônia (W. Tadei, comunicação pessoal) sugere que, embora obtendo taxas de infectividade mais altas durante epidemias, a ocorrência de *An. albitarsis* s.l. por si só pode não ser suficiente para o desencadeamento de epidemias de malária.

Há a possibilidade deste fato ocorrer para outros vetores secundários de malária na Amazônia. A necessidade de transmissão inicial por outro vetor, levanta dúvida sobre a validade de estudos transversais de incriminação vetorial com o propósito de determinar áreas de risco epidemiológico para malária. A própria definição de vetor secundário pode necessitar revisão.

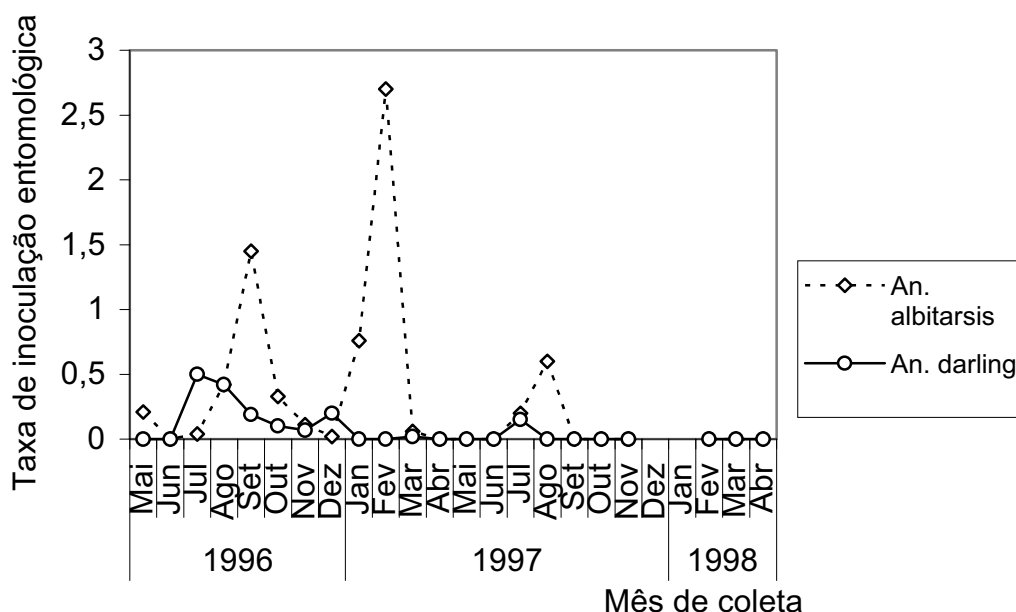


Figura 2.2: Flutuação mensal das taxas de infecção plasmodial em *An. darlingi* (linha contínua) e *An. albitarsis* s.l. (linha pontilhada) em áreas de Boa Vista – RR durante 24 meses. (Dados: Vasconcelos et al., 2002.)

Mapas de menor escala, possivelmente considerando dados quantitativos da distribuição de anofelinos, são necessários para detectar pequenas variações locais no terreno e topografia. O papel de *An. albitarsis* s.l. na transmissão de malária em Roraima e as conseqüências epidemiológicas de sua quase onipresença nas regiões de floresta e savana merecem estudos mais aprofundados, com diferenciação de suas espécies crípticas.

Este capítulo, com pequenas modificações, foi submetido ao *Journal of Medical Entomology*, com o título **Distribution of Anopheline Species in Roraima State, Northern Amazon, Brazil**, tendo os seguintes autores: Ducinéia A. Barros, José F. Luitgards-Moura, Helen C. Gurgel, Jânio Silva, Pedro Rufino, Janylene S. Gomes, Luiz O. R. Silva, Nildimar A. Honório, Ulisses E. C. Confalonieri, Mércia E. Arruda, Simão D. Vasconcelos & Fábio S. M. Barros.

Tabela 2.1: Distribuição das espécies de anofelinos no estado de Roraima, Brasil, como resultado de estudos de campo no período de 1999-2003. Os números entre parênteses correspondem aos locais amostrados na Figura 2.1. O tipo de vegetação predominante em cada local de coleta foi classificado como: savana (S); floresta (F) ou floresta de montanhas (MF)

Municipalidade	Localidade	Tipo de Vegetação	Latitude	Longitude	An. albitarsis s.l.	An. darlingi	An. nuneztovari	An. iriamulatus	An. brazilensis	An. peryassui	An. oswaldoi s.l.	An. mattogrossensis	An. strodei	An. evansae	An. squamifemur	An. mediopunctatus s.l.
Alto Alegre (3)	Surucucu	F	63° 38'	02° 50'	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alto Alegre (4)	Xitiei (base)	F	63° 52'	02° 36'	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Alto Alegre (5)	Sucuba	MF	62° 34'	03° 51'	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Alto Alegre (18)	Ubim (Fazenda)	F	61° 22'	03° 03'	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Alto Alegre (20)	Sicanabiti (Ilha)	F	62° 01'	02° 44'	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Alto Alegre (21)	Piracicaba (Fazenda)	F	61° 21'	02° 57'	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Alto Alegre (22)	Centro Urbano	F	61° 18'	02° 59'	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Amajari (1)	Awaris (base)	MF	64° 28'	03° 59'	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Amajari (6)	Fazenda Internacional	F	61° 58'	03° 35'	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amajari (7)	Centro urbano	S	61° 25'	03° 39'	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Amajari (16)	Uranicoera (base)	F	62° 13'	03° 08'	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Amajari (17)	Maracá (Ilha)	F	61° 22''	03° 15'	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Amajari (19)	Milho	S	60° 37'	03° 02'	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Boa Vista	Centro urbano	S	60° 40'	02° 49'	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Boa Vista (23)	Monte Cristo	S	60° 43'	02° 54'	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Boa Vista (24)	Santa Fé (Fazenda)	S	60° 42'	02° 52'	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bonfim (15)	Centro urbano	S	59° 49'	03° 21'	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Canta (25)	Nova do Surraão (Colônia)	S	60° 41'	02° 49'	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Canta (33)	Vintem (Vila)	S	60° 40'	02° 47'	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Canta (34)	Giselda (Fazenda da)	F	60° 35'	02° 38'	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Canta (35)	Centro urbano	F	60° 36'	02° 36'	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Canta (39)	Vila central	F	60° 40'	02° 25'	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Caracaraí (44)	Ajarani	F	61° 28'	02° 00'	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Caracaraí (45)	São José (Vila)	F	61° 19'	01° 58'	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Caracaraí (46)	Bem Querer	F	61° 05'	01° 54'	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Caracaraí (47)	Marará (Vila)	F	61° 08'	01° 44'	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Caracaraí (48)	Centro urbano	F	61° 08'	01° 50'	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Caracaraí (49)	Vista Alegre	F	61° 08'	01° 44'	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Caracaraí (50)	Rancho do Rio Branco	F	61° 08'	01° 44'	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Caracaraí (51)	Barauma	F	61° 01'	01° 36'	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Caracaraí (52)	Missão Catrimani	F	62° 17'	01° 44'	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Caracaraí (53)	Ita (Colateral)	F	60° 45'	01° 27'	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Caracaraí (54)	São Francisco	F	60° 21'	01° 17'	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Caracaraí (55)	São Sebastião (Colateral)	F	60° 20'	01° 18'	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Município	Localidade	Tipo de Vegetação	Latitude	Longitude	An. albitarsis s.l.	An. darlingi	An. numezovari	An. triannulatus	An. brazilensis	An. peryassui	An. oswaldoi	An. mattogrossensis	An. strodei	An. evansae	An. squamifemur	An. mediopunctatus s.l.
Caracarái (56)	Anauazinho (Fazenda)	F	60° 22'	01° 13'	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carobe (59)	Quinta colateral	F	59° 34'	00° 52'	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Carobe (60)	Sétima colateral	F	59° 31'	00° 50'	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Iracema (37)	Nova (Fazenda)	F	61° 17'	02° 17'	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Iracema (38)	Ceará (Fazenda do)	F	61° 13'	02° 19'	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Iracema (40)	Colateral 14	F	61° 24'	02° 12'	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Iracema (41)	São Miguel (Fazenda)	F	61° 23'	02° 14'	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
Iracema (42)	Centro urbano	F	61° 03'	02° 10'	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Iracema (43)	Rancho beira rio	F	60° 34'	01° 18'	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mucajai (2)	Parafuri/Xiriana (base)	F	63° 47'	03° 18'	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
Mucajai (26)	São Mateus (Fazenda)	F	61° 31'	02° 38'	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Mucajai (27)	Germano (Colateral)	F	61° 21'	02° 33'	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Mucajai (28)	Bela Vista (Colateral)	F	61° 21'	02° 34'	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Mucajai (29)	Uniap (Colateral)	F	61° 21'	02° 33'	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Mucajai (30)	Apiatú - Colateral 7	F	61° 16'	02° 32'	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Mucajai (31)	Coronel Tamandaré	F	60° 55'	02° 28'	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Mucajai (32)	Centro urbano	F	60° 54'	02° 26'	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Mucajai (36)	Campos Novos	F	61° 26'	02° 22'	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Normandia (13)	Centro urbano	S	59° 37'	03° 52'	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Normandia (14)	Iara (Fazenda)	S	59° 39'	03° 51'	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pacaraima (8)	Nova Esperança	MF	61° 09'	04° 29'	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Pacaraima (9)	Maloca do Suapi	S	60° 51'	04° 34'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pacaraima (10)	Samã II	S	60° 43'	04° 22'	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Rorainópolis (61)	Centro urbano	F	60° 25'	00° 56'	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Rorainópolis (62)	Martins Pereira (Vila)	F	60° 22'	00° 51'	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Rorainópolis (63)	Colateral 19	F	60° 21'	00° 51'	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Rorainópolis (65)	Colateral 8	F	60° 26'	00° 37'	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
São Luiz do Anauá (57)	Centro urbano	F	60° 02'	01° 00'	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
São João Baliza (58)	Centro urbano	F	59° 55'	00° 57'	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
São João Baliza (64)	Rural ural	F	59° 51'	00° 50'	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
Uiramutã (11)	Água Fria (Vila)	S	60° 29'	04° 38'	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Uiramutã (12)	Centro urbano	S	60° 09'	04° 35'	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-

CAPÍTULO III: CRIADOUROS DE *ANOPHELES DARLINGI* (DIPTERA: CULICIDAE) EM UMA ÁREA DE ASSENTAMENTO AGRÍCOLA NA AMAZÔNIA: VARIAÇÃO SAZONAL E SUA RELAÇÃO COM A ATIVIDADE ANTRÓPICA

1. INTRODUÇÃO

Na região amazônica, os imigrantes, agricultores de baixa renda, vivem em casas precariamente construídas, usualmente sem paredes, durante os primeiros anos de assentamento. Nestas condições, são bastante expostos às picadas de mosquitos do gênero *Anopheles*. A malária representa uma grave enfermidade, pois muitas destas pessoas não possuem família para substituí-los nos campos e colheitas podem ser perdidas (Sawyer, 1987). Em muitas ocasiões, pouca assistência é provida pelas autoridades governamentais locais e os assentamentos desenvolvem-se de forma caótica, com destruição desnecessária de floresta, que é posteriormente abandonada (Furley, 1994). Acredita-se que o controle da malária poderia melhorar significativamente esta situação. Estratégias de controle descentralizadas, seletivas para cada situação epidemiológica, têm sido propostas pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS/OMS). Como pré-requisito, é fundamental conhecer os fatores locais que influenciam a transmissão em áreas de risco, especialmente sobre a existência de condições favoráveis ao vetor.

Na Amazônia, *Anopheles darlingi* Root é o vetor mais importante da malária (Oliveira-Ferreira et al., 1990; Tadei et al., 2000). Esta espécie é encontrada em muitas regiões da América Central e do Sul, a leste dos Andes. Previamente, tem sido bem estabelecido que as epidemias na Guiana Inglesa, Suriname, Venezuela e Brasil coincidem com ciclos onde ocorre aumento da reprodução e da área de ocorrência da espécie (Gabaldon, 1949; Rachou, 1958). A maior parte das epidemias recorrentes ocorrem em ciclos de dois a sete anos, que refletem a periodicidade das irregularidades meteorológicas, representadas por chuvas mais fortes, alagamentos ou secas prolongadas, que possivelmente provocam o aumento de sobrevivência e proliferação dos vetores (Nájera et al., 1998). Apesar de considerável literatura sobre anofelinos africanos, há ainda pouco entendimento sobre as razões determinando a resposta dos vetores na Amazônia a estes ciclos. O conhecimento dos padrões de transmissão é ainda fragmentado e tem sido, em sua maior parte, limitado a relatos sobre a prevalência humana da doença ou estudos envolvendo mosquitos adultos (Escobar, 1994). Há poucas informações referentes ao acompanhamento de criadouros de *An. darlingi*, que são conhecidos por serem

notoriamente difíceis de encontrar (Manguin et al., 1996; Roberts et al., 2002; Vittor et al., 2002), o que em parte explica a ausência de estudos sistemáticos com as formas imaturas desta espécie. Vários pesquisadores têm relatado ausência de larvas em áreas onde eram detectados adultos de *An. darlingi*, às vezes após anos de coleta sistemática (Charlwood, 1980; Roberts et al., 1996; W. Tadei, comunicação pessoal).

Anopheles darlingi é uma espécie tipicamente ribeirinha (Rozendaal, 1992; Forattini 2002) e os números de adultos capturados a mais de 1 km dos rios são baixos e até considerados como ausentes (Roberts, 1996). No entanto, a espécie apresenta uma capacidade de vôo documentada de mais de 7 km (Charlwood & Alecrim, 1989) por estudos de marcação e recaptura. É possível que esta capacidade não demonstre o comportamento normal do vetor em um ambiente rural (Wernsdorfer & McGregor, 1988). Adicionalmente, dados quantitativos que determinam o percentual da população a percorrer determinada distância estão ausentes.

Acredita-se que *An. darlingi* dependa dos níveis do lençol d'água, como ocorre com *An. funestus* Giles na África (Charlwood, 1995), e é marcadamente afetado por pequenas mudanças na pluviometria e umidade (Forattini, 2002). Cada espécie de *Anopheles* ocupa habitats específicos dentro de um ambiente (Consoli & Lourenco-de-Oliveira, 1994). As mudanças ambientais que ocorrem após o desmatamento de uma área, podem provocar o surgimento de uma sucessão de anofelinos na área. As mudanças podem levar à redução dos predadores, que ocupam nichos ecológicos específicos e são menos aptos às adaptações necessárias a sua sobrevivência. Isto permite a propagação de espécies oportunistas, com altas taxas de reprodução e boa capacidade de dispersão (Vittor et al., 2002). A malária tem sido considerada uma endemia re-emergente em regiões tropicais com rápido crescimento populacional ou desflorestamento, como no Brasil ou Indonésia. Em média, 5,8 milhões de hectares são desmatados nos trópicos a cada ano (Achard et al., 2002). Na América Latina, poucos estudos têm sido conduzidos ligando a transmissão de malária com a destruição das florestas pelo homem.

Como parte de um estudo sobre a dinâmica de transmissão da malária no norte da Amazônia, investigamos as características dos habitats larvários de *An. darlingi* e suas variações durante um ano, face às mudanças ocorridas em resposta às chuvas e a degradação da vegetação circundante. As variações temporais e espaciais produzidas na incidência de malária são analisadas.

Adicionalmente, observações sobre a capacidade de dispersão da espécie, a partir de seus criadouros, são incluídas para servirem de guia à influência destes sobre a população humana residente nas redondezas.

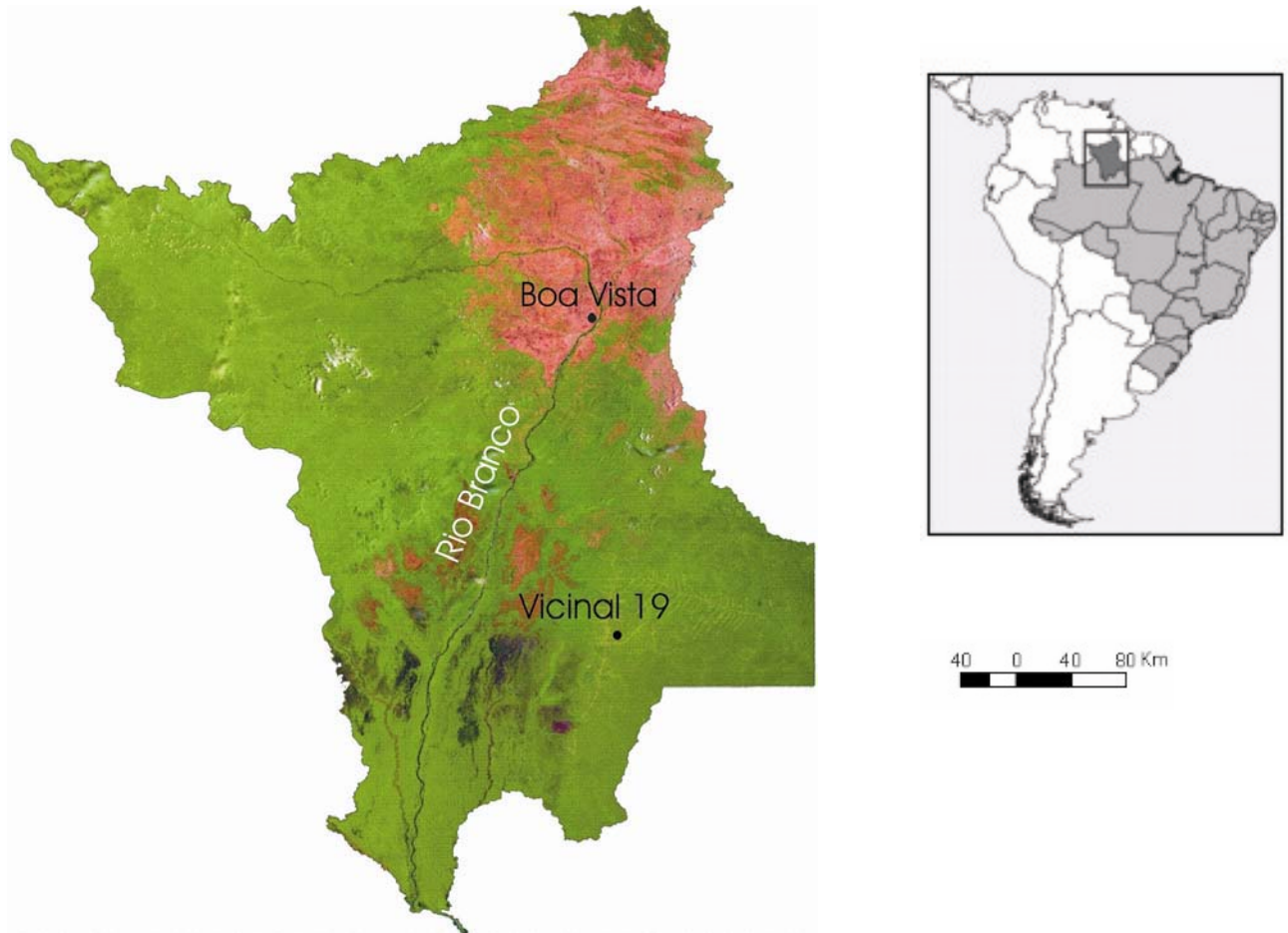


Figura 3.1: Mapa do Estado de Roraima com indicação dos locais de estudo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Local de estudo

Roraima está localizada ao norte da Amazônia brasileira (Figura 3.1) e apresenta uma diversidade de ecossistemas. Enquanto no nordeste predominam extensas planícies de savana, o restante do estado apresenta floresta tropical densa. A malária em Roraima é instável e hipoendêmica (Chaves & Rodrigues, 2000). Após um pico no final da década de noventa, a incidência da doença no estado tem diminuído nos últimos anos, embora tenham permanecido focos locais, como a área avaliada. Nesta área a malária é causada, quase exclusivamente, por *Plasmodium vivax*.

O clima possui um período seco bem definido, de novembro a abril, e um período de chuvas fortes, de maio a outubro (Barbosa, 1997; Crócia, 1994). O fenômeno do El Niño afeta a região a cada sete anos, causando irregularidades na precipitação e temperatura (Barbosa, 1998). Durante o episódio de 1997/1998, a precipitação e os níveis dos rios caíram substancialmente no estado, resultando na propagação de extensas queimadas sobre toda a região de savana.

O local de estudo foi uma colateral, a Vicinal 19, do Assentamento Anauá (00°51'N, 60°21'W). O assentamento está localizado no município de Rorainópolis, a 298 km ao sul de Boa Vista, a capital do estado, a maior parte dos colonos instalou-se nos últimos três anos. É uma área habitada por 333 agricultores residindo na área, compreendendo 77 casas distribuídas ao longo da estrada de 18,8 km, que adentra a densa floresta tropical. É um assentamento típico, havendo mais 21 mil habitantes na região do Anauá, localizado nos arredores. No estado, são 77.420 pessoas em áreas rurais, sob condições similares (BRASIL, 2000).

A área é atravessada por pequenos riachos, dos quais o maior é o Igarapé Azul, com diâmetro médio de 8 m. Quase todos os pequenos rios (igarapés) da região são temporários, formando poças na estação seca, embora seus volumes d'água sejam capazes de, temporariamente, alagar a floresta circundante durante a estação chuvosa. Os colonos, também, têm criado coleções hídricas artificiais, como pequenas criações de peixes e poços. Outras alterações consistiram da introdução de espécies animais como porcos, galinhas e pequenas criações de gado.

A determinação da dispersão de *An. darlingi* foi realizada em uma segunda área do estado, localizada nos arredores de Boa Vista (02°49'N, 60°40'W). Este local é descrito no Capítulo III.

2.2. Estudos larvários: variáveis ambientais

As amostras de formas imaturas foram coletadas a cada dois meses, no período de agosto de 2003 a julho de 2004. As coletas foram direcionadas aos criadouros de *An. darlingi*, baseado em mapeamento prévio, realizado por nossa equipe.

As pesquisas larvárias foram realizadas utilizando conchas padrão de 500 mL (Bioquip Co., Gardena; Service, 1991). Na área de floresta, todas as coleções hídricas foram mapeadas dentro de uma área de 7,6 x 0,5 km, ao redor das zonas residenciais. Todos os grandes criadouros e a maioria dos pequenos, com exceção de poucos com características idênticas aos já amostrados, foram pesquisados, em cada ocasião. As amostras foram sempre numerosas, com o objetivo de determinar a presença até de espécies pouco abundantes. Realizou-se uma média de 60 conchadas (desvio padrão [DP] = 30). O número dependia do tamanho da "área receptiva" do criadouro. Definimos este termo como a área do perímetro da coleção hídrica onde ocorria vegetação emergente, algas, detritos na superfície ou outras formas de substrato, capazes de abrigar estágios imaturos de anofelinos. Houve uma média de três conchadas por metro de "área receptiva". Este parâmetro demonstrou-se bem mais preciso que o volume d'água, pois as larvas de

anofelinos *Nyssorhynchus* possuem distribuição extremamente desigual na coleção hídrica (Forattini, 2002; W. Tadei, comunicação pessoal). Em nossa experiência, larvas de *Nyssorhynchus* ou *Stethomyia* são encontradas livres na coleção hídrica muito raramente. As exceções foram larvas arrastadas durante períodos de alagamentos.

Larvas e pupas foram levadas ao laboratório de campo em água dos criadouros para identificação. As pupas e larvas de primeiro e segundo estágios foram mantidas sob condições de laboratório para posterior identificação, que foi realizada usando uma chave modificada de Gorham (1967) e a chave de Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994).

As seguintes variáveis ambientais foram obtidas para cada criadouro: tipo, solo, vegetação de borda, vegetação circundante, força da correnteza, perenidade, pH, tamanho, profundidade, distância da casa mais próxima e incidência luminosa. Os valores de pH foram determinados com fitas coloridas (Merck™). A profundidade foi medida com um bastão milimetrado. A distância da casa mais próxima foi estimada pela análise do mapeamento com GPS no programa GPS Trackmaker™. Os comprimentos e áreas dos criadouros foram estimados através de aferições usando-se fita métrica. A incidência luminosa, força da correnteza e outras variáveis foram estimadas visualmente pelo mesmo pesquisador, sendo considerados .

2.3. Estudo larvários: desmatamento e outras atividades antrópicas

Amostragens foram realizadas de forma contínua ao longo do leito de um mesmo igarapé e reproduzidas em cada período de coleta. As formas imaturas obtidas em cada trecho de 60 m foram identificadas separadamente para a determinação da distribuição de *An. darlingi*. Algumas áreas eram isentas de atividade antrópica, enquanto outras, desmatadas e em seguida queimadas, para o plantio de macaxeira ou arroz.

Adicionalmente, em três locais não relacionados aos anteriores, documentamos as variações nos números de larvas antes e após o desmatamento.

2.4. Incidência de malária

Para a verificação das tendências sazonais da malária, a variação nas notificações na Vicinal 19 foi determinada com base nos dados extraídos dos livros de anotações das equipes de controle locais. Foram analisados dados referentes ao período compreendido entre agosto de 2003 e julho 2004. Para melhorar demonstrar a reprodutibilidade dos dados, foram incluídos os períodos de julho 2002 a julho 2003 nas análises.

2.5. Variáveis meteorológicas

As variações nos níveis dos rios foram monitoradas com o auxílio de uma madeira milimetrada aferida semanalmente. Um pluviômetro foi instalado na área de estudo e monitorado diariamente até o término da pesquisa. Os dados foram comparados com os registros do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) (ver Capítulo VI).

2.6. Dispersão dos mosquitos adultos

Na área de savana de Boa Vista, os criadouros de *An. darlingi* encontram-se limitados à mata ciliar do Rio Branco. Não ocorre reprodução na área de savana adjacente (Bruyning, 1952; Stage & Giglioli, 1947; vide Materiais e Métodos do Capítulo I). Isto permitiu a realização de capturas estratificadas de mosquitos adultos na savana, segundo protocolo aprovado pelo comitê de ética da Fundação Oswaldo Cruz. As capturas no ato do pouso foram realizadas a diferentes distâncias da faixa de criadouros, na mata ciliar do Rio Branco, ao longo de uma linha imaginária perpendicular a este rio. Os membros da equipe de captura foram posicionados a 0 m, 350 m, 690 m, 820 m e 1540 m da transição mata ciliar-savana.

Este estudo foi replicado cinco vezes durante o ano, durante os horários de pico de atividade dos mosquitos adultos, das 18 às 22 h, determinado por estudos prévios. A densidade populacional média da comunidade onde esta dispersão foi analisada é de 58 habitantes/km².

2.7. Análise dos dados

O teste t de Student foi utilizado para comparar as médias das variáveis contínuas e os *odds ratios* foram determinados para as variáveis categóricas. A presença de associação foi determinada com o teste qui-quadrado (χ^2). Regressão múltipla logística foi utilizada para analisar a associação das variáveis ambientais com a presença de larvas de *An. darlingi*. A análise de cluster foi utilizada para a determinação de padrões sazonais de colonização dos criadouros por *An. darlingi*.

O índice de diversidade de Margalef foi utilizado para determinar as diversidades de espécies nas zonas de transição, comparando-as com áreas não-transicionais. Este índice pode ser calculado como $D = \frac{(S-1)}{\ln N}$, onde S = número de espécies e N = número de indivíduos (Margalef, 1957). Apesar de ser matematicamente similar ao índice de Fisher (Fisher et al., 1943), mais comumente empregado, ele possui maior flexibilidade por ser mais prontamente calculado. As médias obtidas em cada área foram comparadas com o teste t de Student.

Variações sazonais das densidades larvárias em cada criadouro não foram analisadas, devido a mudanças ocorridas nos volumes e aspectos dos criadouros positivos para *An. darlingi*.

Equações de regressão linear simples puderam ser obtidas com o método dos mínimos múltiplos a partir do $\ln(n+1)$ das densidades para a determinação da dispersão de *An. darlingi*. O objetivo é calcular os dois parâmetros constantes, α e b , da equação de regressão exponencial $y = b \cdot e^{a \cdot x}$, onde y = número de fêmeas capturadas, e = base do logaritmo neperiano e x = distância dos criadouros.

3. RESULTADOS

Durante o período de coleta, mais de 13.300 amostras foram tomadas, em 21 criadouros da Vicinal 19.

3.1. Associação da presença de *An. darlingi* com variáveis ambientais

As médias e os intervalos de confiança de 95% (IC 95%) foram determinados para as variáveis contínuas (Tabela 3.1). Seis criadouros foram negativos para formas imaturas de *An. darlingi* e 15 foram positivos. Nenhuma apresentou diferenças significativas entre os locais positivos e negativos para *An. darlingi*. Para a variável “tamanho” não houve alteração quando se considerava a largura dos rios ou quando se excluía da análise este tipo de criadouro. Os *odds ratios* para a ocorrência de larvas de *An. darlingi* para as variáveis categóricas são demonstrados na Tabela 3.2. Apenas a variável sombra apresentou associação significativa.

Tabela 3.1: Variáveis contínuas dos criadouros da Vicinal 19 de acordo com a presença ou ausência de formas imaturas de *An. darlingi* no período de agosto de 2003 a julho de 2004

Variáveis contínuas	Média (IC 95%) em locais <u>sem</u> <i>An. darlingi</i> (N = 6)	Média (IC 95%) em locais <u>com</u> <i>An. darlingi</i> (N = 15)
pH	4,83 (3,80 - 5,86)	5,40 (5,11 - 5,68)
Tamanho (m)	12,65 (0 - 37,06)	34,06 (0 - 69,71)
Profundidade (m)	0,36 (0,18 - 0,53)	0,43 (0,33 - 0,43)
Casa mais próxima (m)	266,0 (51,27 - 480,72)	173,33 (97,87 - 248,79)

Tabela 3.2: Associação das características categóricas dos criadouros da Vicinal 19 pela presença de formas imaturas de *An. darlingi* no período de agosto de 2003 a julho de 2004

Características	Presença de larvas de <i>An. darlingi</i>				
	No. de locais	No. positivo	% positivo	Odds ratio*	IC 95% do odds ratio
Tipo					
Pequeno rio	6	4	66,7	0,73	0,09-5,63
Lagoa	2	1	50,0	0,36	0,02-6,85
Açude para criação de peixes	8	7	87,5	4,38	0,41-47,02
Barragem pela elevação da estrada	3	1	33,3	0,14	0,01-2,01
Área alagada	3	2	66,7	0,92	0,07-12,28
Correnteza					
Fraca/ausente	12	8	66,7	0,57	0,08-4,13
Moderada	4	3	75,0	1,25	0,10-15,11
Rápida	5	4	80,0	1,82	0,16-20,71
Solo					
Argila	6	3	50,0	0,25	0,03-1,92
Areia	11	8	72,7	1,14	0,17-7,60
Folhas mortas	4	4	100,0	2,18	0,20-24,21
Vegetação de borda					
Gramma emergente	9	5	55,6	0,25	0,03-1,86
Folhiço	12	10	83,3	4,00	0,54-29,81
Algas	5	4	80,0	1,82	0,16-20,71
Cobertura vegetal					
Floresta primária	10	8	80,0	2,29	0,32-16,51
Floresta secundária	12	5	41,7	1,00	0,13-7,45
Sem cobertura	4	2	50,0	0,31	0,03-2,94
Sazonalidade					
Temporário	7	2	28,6	0,03	0,00-0,42
Permanente	14	13	92,9	32,50	2,38-443,17
Incidência luminosa					
Sombreado	15	14	93,3	28,00*	1,99-394,42
Ensolarado	6	2	33,3	0,04	0,00-0,50

*apresentou associação significativa ($P < 0,05$) com o teste de qui-quadrado.

Um teste qui-quadrado com a correção de Yates revelou valores altos ($\chi^2 = 4,99$; graus de liberdade [gl] = 1; $P < 0,05$) para locais sombreados, quando comparados com locais ensolarados. Locais sombreados apresentavam um risco relativo de presença de larvas de *An. darlingi* 2,13 vezes maior que o de locais ensolarados.

Um modelo generalizado linear com variável dependente binomial descrevendo um local positivo ou negativo para *An. darlingi*, produziu resultados significativos apenas para a variável sombra. Este parâmetro por si só explicava a presença de larvas de *An. darlingi* ($P \ll 0,001$).

3.2. Variação sazonal dos criadouros de *An. darlingi* e relação com os açudes

O padrão de ocorrência de larvas variou ao longo do ano para algumas espécies de anofelinos, dentre as quais se encontrava *An. darlingi*. Uma análise de cluster agrupou os padrões de colonização dos criadouros de *An. darlingi* ao longo do ano em duas categorias principais: a primeira compreendia a estação seca (janeiro a março); a segunda o período chuvoso (maio, julho e agosto) e de transição chuva-seca (novembro). Como se pode visualizar na Figura 3.2, a diferença nos habitats larvários de *An. darlingi* se dá pela presença de colonização do leito empossado do pequeno rio durante a estação seca. A presença dos açudes permitem colonização por formas imaturas e ocorrência de casos de malária, embora em quantidades menores, durante todo o ano.

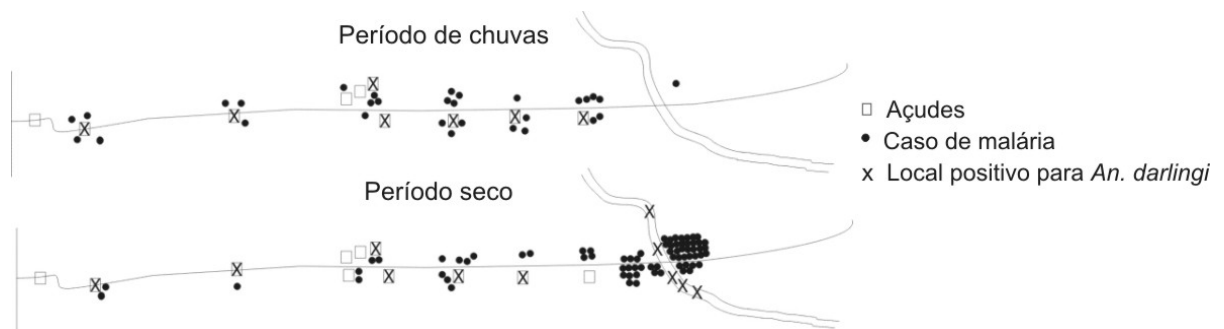


Figura 3.2: Croqui dos criadouros positivos para *An. darlingi* ("x") descritos durante as estações chuvosas (acima) e seca (abaixo), ao longo da estrada da Vicinal 19, em Rorainópolis - RR. Barragens e açudes são indicados por "□". A maior parte destes são coleções hídricas para a criação de peixes. O Igarapé Azul é indicado por linhas tortuosas ("||"). Cada caso de malária ("•"), ocorrido de agosto de 2002 a julho 2004 é representado, em cada uma das estações. Escala aproximada de 1:150.000.

Os níveis hídricos do rio baixaram significativamente durante a estação seca. Em novembro, ainda se encontrava cheio, mas o fluxo cessou no início de dezembro. O período de chuvas se iniciou em abril, mas o fluxo contínuo só recomeçou na primeira metade de maio. Com o decorrer da estação chuvosa, ocorreram variações significativas do nível do rio. Os dados pluviométricos e de níveis hídricos associados estão parcialmente demonstrados na Figura 3.3, que representa a transição seca-chuva. Uma considerável quantidade de chuva é necessária para o reinício do fluxo no leito do rio. Os níveis do rio tiveram uma variação muito significativa durante a estação chuvosa. Após as fortes chuvas houve elevações, algumas vezes drásticas, seguida de abruptas reduções do nível da água.

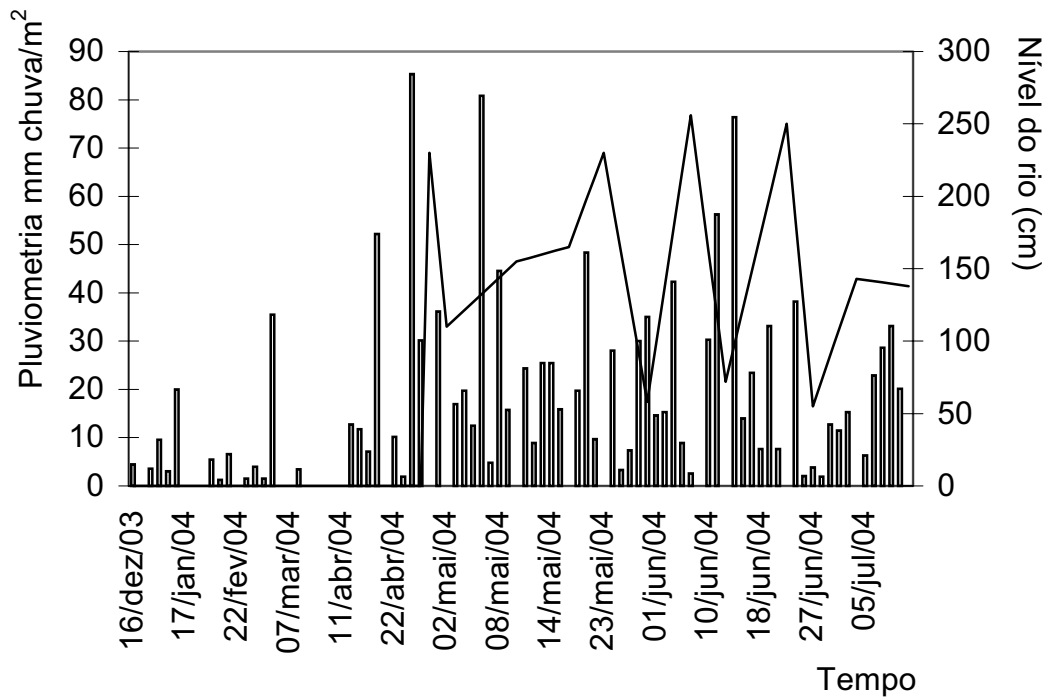


Figura 3.3: Gráfico representativo das flutuações observadas nos níveis de água do Igarapé Azul (linha contínua) em Rorainópolis - RR, relacionadas às variações pluviométricas (barras verticais) durante oito meses de avaliação (dezembro de 2003 a julho de 2004).

3.3. Dispersão

A curva para a equação de regressão exponencial foi determinada com maior significância durante o mês de maior densidade de picada (agosto), embora não tenha apresentado variações significativas ($P > 0,05$) nos outros meses. As estimativas dos parâmetros da equação, pelo método dos mínimos quadrados foi: $\alpha = - 0,003$ ($P << 0,001$) e $b = 4,435$ ($P < 0,01$); ($r = - 0,98$).

A partir desta equação se pode verificar que 20,3% da população adulta de *An. darlingi* voa a mais de 500 m do criadouro, mas somente 4,6% a mais de 1.000 m e menos de 1% voa mais de 1.500 m.

3.4. Ação antrópica e incidência de malária

As larvas de *An. darlingi* foram encontradas apenas em áreas bem sombreadas, geralmente sob floresta primária (Figura 3.4). As outras áreas desmatadas representadas na Figura 3.4 apresentavam ausência de imbaúbas (*Cecropia spp.*) ou qualquer outra vegetação capaz de oferecer sombra. Em alguns locais que haviam sido degradados a mais tempo, o crescimento de vegetação secundária, como *Cecropia spp.*, entre outras espécies, permitia a ocorrência de *An. darlingi*.

O índice de diversidade de Margalef, correspondeu a 1,09 (DP = \pm 0,32; n = 11) na área de transição e 0,69 (DP = \pm 0,36; n = 18) nas áreas não-transicionais. A diferença foi estatisticamente significativa pelo teste t de Student ($P < 0,01$). Isto aponta para uma tendência a maior colonização, por parte das espécies de anofelinos, em áreas de transição floresta-área desmatada.



Figura 3.4: Croqui da área do Igarapé Azul (“||”), na Vicinal 19, Rorainópolis – RR. Estão indicados os locais onde foram encontradas cada larva de *An. darlingi* e de outros Anophelinae ao longo de um ano de coletas. As casas habitadas estão assinaladas, assim como a estrada do assentamento. Escala aproximada de 1:10.000.

Houve acentuada redução do número de larvas de *An. darlingi* após o desmatamento (Figura 3.5). Resultados similares foram obtidos para outros dois locais, submetidos às mesmas condições. Os dados demonstram significativa redução da densidade larvária após a retirada da cobertura vegetal. O desmatamento teve um efeito negativo similar sob a prevalência de larvas de *An. oswaldoi*, *An. mattogrossensis* e *Chagasia sp.* Nas áreas degradadas, era comum a ocorrência de *An. triannulatus* e *An. albitarsis sensu lato* (s.l.)

A maior parte (87,5%) dos açudes foi positiva para *An. darlingi*, todos estes em mais de uma ocasião. Durante o período de janeiro de 2002 a julho de 2004, a associação de casos de malária na Vicinal 19 com a proximidade aos açudes pode ser visualizada na Figura 3.2. Apesar da distribuição uniforme dos moradores ao longo da estrada da vicinal, os casos de malária se encontraram agrupados ao redor de açudes e uma barragem, formada pela elevação da estrada. Todos os açudes haviam sido construídos para a prática da piscicultura, com barragens que bloqueavam o fluxo de pequenos riachos, mas apenas um apresentava uma criação efetiva.

A incidência de malária pode ser visualizada na Figura 3.6, demonstrando picos durante as estações secas, apesar de ocorrer transmissão durante todo o ano. Quase a totalidade dos casos é devido a *P. vivax*.

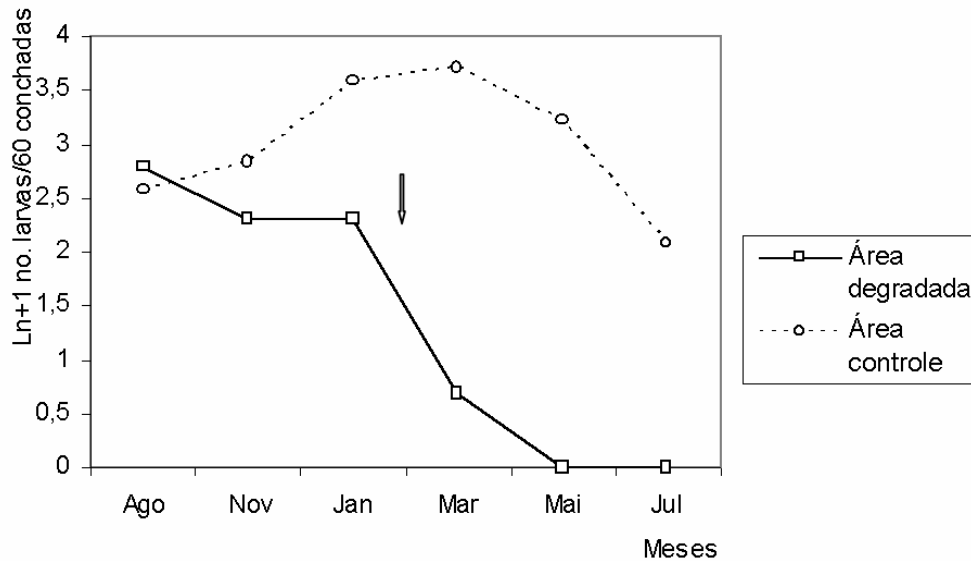


Figura 3.5: Logaritmo do número de larvas (n+1) coletadas em 60 amostras de dois criadouros da Vicinal 19, Rorainópolis. A vegetação circundante de um local foi desmatada em março (linha contínua) (seta). O outro local (linha pontilhada) representa uma área controle que, embora próxima, não sofreu alteração da cobertura vegetal.

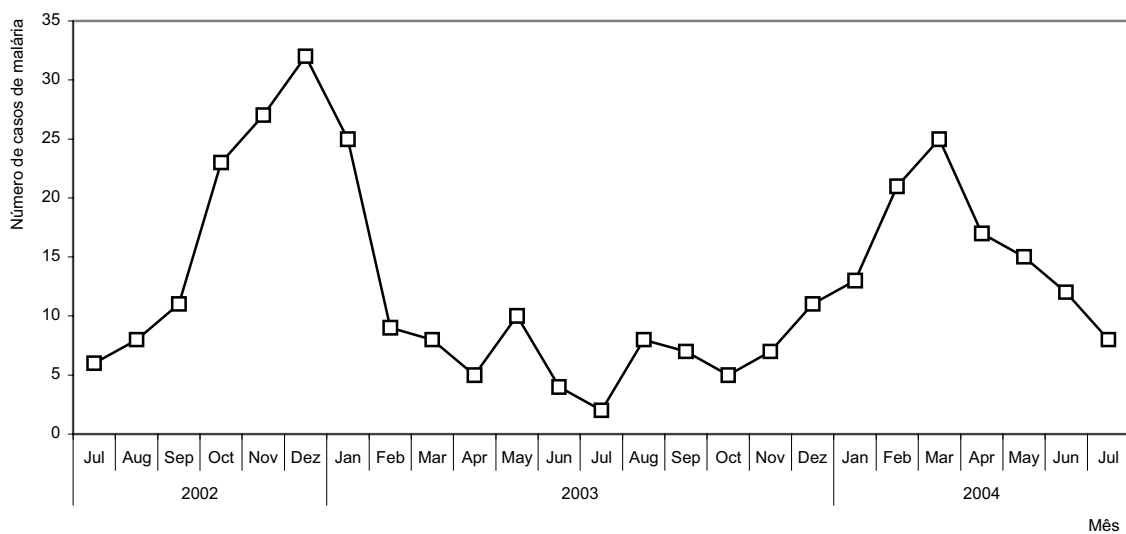


Figura 3.6: Casos de malária na Vicinal 19 de Rorainópolis – RR, de janeiro de 2002 a julho de 2004. Os períodos compreendidos entre outubro/novembro e abril/maio correspondem às estações secas. (Fonte: registros das equipes de microscopia em Rorainópolis.)

4. DISCUSSÃO

4.1. Criadouros de *An. darlingi*: associação com parâmetros ambientais

Há significativas variações na literatura, com relação às condições dos criadouros de *An. darlingi*. Nas regiões norte e nordeste do Brasil, Deane et al. (1946) reportou habitats ensolarados durante a estação chuvosa e sombreados na seca. Cerqueira (1961) analisou

coleções do Instituto Nacional de Pesquisas na Amazônia (INPA) e relatou sua ocorrência até mesmo em pegadas de animais e outras pequenas coleções hídricas. Ferreira (1964) sugeriu que variações pudessem ocorrer devido a condições regionais: os criadouros seriam ensolarados no norte do Brasil e sombreados no sul. Na Guiana Inglesa, Stage & Giglioli (1947) relataram a ocorrência de *An. darlingi* em canais de irrigação, campos de arroz ou de cana e planícies para criação de gado. As condições de sombreamento dos locais não foram descritas. Estes autores relataram que *An. darlingi* não se reproduzia em águas negras, comuns nas florestas. Usando dados do Instituto Smithsonian, Faran & Linthicum (1981) registraram o encontro de larvas em pequenos rios, lagoas e pântanos. A maior parte dos criadouros era parcialmente sombreada e todos apresentavam vegetação flutuante ou emergente na forma de grama e, algumas vezes, algas verdes.

De acordo com Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994), as larvas preferem águas profundas, límpidas e com sombreamento parcial, onde permanecem entre vegetação flutuante e detritos. Na estação chuvosa, no entanto, Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994) afirmam que *An. darlingi* também pode se reproduzir em poços d'água e pegadas de animais, embora a fonte para essa afirmação não é clara. Possivelmente as condições descritas apresentam relação com a intensidade de chuvas nos locais. Sua ocorrência nas poças sombreadas das margens dos rios, mas ausência nas poças ensolaradas foi relatada por Rozendaal (1990), no Suriname. Komp (1942) e Forattini (2002) afirmaram que as larvas preferem criadouros totalmente ou parcialmente sombreados e, em Belize, as larvas têm sido significativamente associadas com locais sombreados (Manguin, 1996). A mesma associação foi informalmente relatada para os estados do Amazonas e Rondonia (Tadei, 1988a; Tadei, 1993). Em Roraima, após mais de 20 anos de pesquisa, uma associação significativa de ocorrência de larvas com criadouros sombreados em todo o estado é aparente (D.A. Barros, comunicação pessoal).

Baseados nos dados apresentados no presente artigo, acreditamos que a sombra é o principal fator que determina a presença de *An. darlingi* e influencia sua distribuição. Nas margens da floresta Amazônica, onde ocorre uma savana não arborizada, a espécie é totalmente ausente, ao contrário de espécies campestres como *An. albitarsis* *l.s* e *An. braziliensis*. No entanto, *An. darlingi* reaparece em locais da savana onde ocorrem cursos hídricos com vegetação ciliar. Dados similares foram observados por Bruyning (1952), no Suriname, Stage & Giglioli (1947), na Guiana Inglesa e Rubio-Palis & Zimmerman (1997), na Venezuela.

A explicação para a preferência de locais sombreados pode estar relacionada com o ambiente larvar (as larvas não se desenvolvem em um determinado meio) ou às

preferências de oviposição da fêmea (a oviposição é realizada em locais com características específicas). Como as larvas se desenvolvem perfeitamente bem no sol, em condições de campo (Russel & Rao, 1942a), a ocorrência preferencial em locais sombreados pode ser atribuída ao comportamento de oviposição das fêmeas. É conhecido que a maioria das fêmeas ovipõem nos períodos crepusculares (Russell & Rao, 1942b; Detinova, 1962). Em algumas épocas do ano, o céu se apresenta muito nublado nestes períodos do dia, e as larvas podem ser encontradas, de forma relativamente freqüente, também em locais ensolarados. Em períodos chuvosos, também não é incomum encontrar larvas deslocadas pelas correntes, como já presenciamos, sendo arrastadas em direção aos escoadouros dos açudes.

4.2. Variações sazonais dos criadouros e da malária e relação com os açudes

Estudos sobre variação sazonal de anofelinos têm demonstrado variabilidades específicas para cada espécie, de acordo com seu habitat (Rozendaal, 1987). A maior parte destes trabalhos, envolveu locais com características geomorfológicas bastante distintas das consideradas aqui. Em Rondônia, Klein & Lima (1990) encontraram boa correlação entre a densidade de *An. darlingi* adultos com aumentos do Rio Guaporé, embora não tenham relatado níveis de significância. Rozendaal (1992) tentou correlacionar a pluviometria e os níveis dos rios com a abundância de adultos de *An. darlingi*. A hipótese era que os criadouros se tornariam disponíveis conforme havia queda dos níveis hídricos e formação de poças nas margens do Rio Marowijne, no Suriname. Em algumas áreas deste mesmo rio, ocorriam alagamentos durante o período de chuvas, com aumento na densidade de *Anopheles darlingi* adultos. O nível dos rios e a pluviometria demonstraram correlações positivas com a densidade de mosquitos, embora estas não tenham sido estatisticamente significativas. Ambos o Rio Guaporé, com mais de 200 m e o Marowijne, com até 4 km, representam grandes cursos hídricos, característicos das áreas de colonização mais distantes, no interior da Floresta Amazônica.

A construção de estradas e a instalação de assentamentos no seu entorno gerou ambientes com características próprias. Distantes dos grandes rios, essas áreas apresentam particularidades poucos estudadas em relação ao comportamento de seus criadouros ao longo do ano. Em Ariquemes - RO, ao longo da BR-364, Tadei (1988a) observou um aumento da densidade de larvas e adultos durante a estação seca, seguido de queda após o início das chuvas.

Na Vicinal 19, a colonização de açudes e barragens por *An. darlingi* ocorreu durante todo o ano. O leito do pequeno Igarapé Azul tornou-se um criadouro favorável apenas

durante a estação seca, quando foram detectados surtos de malária nas suas margens. Com o início das chuvas, houve mortalidade larvária, presumivelmente devido ao carreamento conseqüente às flutuações dos níveis d'água. Este efeito seria devido ao arrastamento das formas imaturas (Russel et al., 1962). As freqüentes variações nos níveis do criadouro têm sido previamente relacionadas à mortalidade larvária em uma represa artificial (Carvalho, 1953).

A colonização do leito do rio por *An. darlingi* foi primeiramente percebida numa área de transição floresta-campo de plantação. Neste local, o desmatamento da mata ciliar havia levado à erosão das bordas do rio e toras de árvores haviam caído no leito, diminuindo o fluxo hídrico. O número e a diversidade de larvas nestas áreas era notável. Este fato pode em parte explicar a alta incidência de malária neste ponto.

A densidade de adultos de *An. darlingi*, relatada no Capítulo VI, está nitidamente correlacionada à ocorrência de larvas nos leitos dos rios: sofrem um aumento durante a estação seca, e apresentam uma abrupta queda após o início da estação chuvosa. Isto indica que a colonização dos rios permitiria um aumento significativo na densidade dos mosquitos. A transmissão da malária seguiria de perto este aumento de densidade, embora tenha sido demonstrado que o aumento da longevidade de *An. darlingi* seja ainda mais importante que o aumento na densidade do vetor (Capítulo VI).

Com base na incidência de casos (Figura 3.6) e nos demais dados apresentados, sugerimos que ocorram dois padrões de transmissão da malária. A malária provocada por reprodução de *An. darlingi* nos açudes, que ocorre durante todo o ano, como demonstrado na Figura 3.2 seria responsável por uma transmissão basal permanente. Picos de transmissão seriam causados pelo aumento de proliferação de *An. darlingi* nos leitos dos pequenos rios com água empossada durante a seca.

4.3. Presença do homem e *An. darlingi*

A associação de malária com a construção de açudes para piscicultura tem sido reportada em outros países (Guarda et al., 1999; Vittor et al., 2002). Esta prática está se tornando comum entre os colonos assentados em vários locais da Amazônia, o que pode influenciar drasticamente o padrão de ocorrência da malária em futuro próximo.

Muitos dados sugerem que na América do Sul e Central *An. darlingi* é uma espécie invasora na maior parte dos locais em que é encontrado (Deane, 1948; Gabaldon, 1953). Em sua área central de distribuição (estados de Goiás e interior do Piauí e Bahia), uma proporção significativa de sua população é naturalmente exofílica e zoofílica. O antropofilismo seria uma característica específica de algumas de suas linhagens. Acredita-

se que as modificações produzidas pela presença do homem como fonte de alimento, ou conseqüente às modificações ambientais provocadas por este, podem ter estendido drasticamente a região de ocorrência da espécie (Deane, 1948; Gabaldon, 1953; Giglioli, 1956). É compatível com isto o fato de, quanto maior o afastamento da área central de ocorrência, maior o grau de antropofilismo (Deane, 1948).

Apesar de não ter sido possível demonstrar estatisticamente, no presente estudo, verificamos uma associação da presença de larvas de *An. darlingi* e a ocorrência de moradias humanas (Figura 3.4). É possível que o padrão de ocorrência de larvas se relacione à presença de moradias humanas. Vittor et al. (2002), no entanto, têm coletado *An. darlingi* em locais desabitados.

4.4. Desmatamento e *An. darlingi*

Em Trinidad, florestas foram derrubadas na década de 40 para o plantio de cacau, que requer árvores altas, que lhes fornecem sombra, permitindo seu crescimento adequado. As árvores usadas, do gênero *Erythrina*, levavam ao desenvolvimento de elevados números de bromélias em seus galhos, que proporcionaram um nicho de oviposição do *An. bellator* nas coleções de água de suas folhas. O vetor se disseminou por toda a área e causou uma epidemia de malária, que decaiu após a remoção das bromélias (Downs & Pittendrigh, 1949). Tadei et al. (1993) tem amostrado larvas e adultos de anofelinos em áreas da Amazônia alteradas pela atividade antrópica, como estradas e hidrelétricas, comparando-as com áreas não alteradas. Enquanto *An. darlingi* estava ausente nas áreas não alteradas, sua presença foi reportada em 13 das 14 áreas alteradas. Vittor et al. (2002) estabeleceram uma associação positiva entre as larvas de *An. darlingi*, à quantidade de vegetação secundária alta e superfícies impermeáveis, em fotos de satélite (o que está associado com assentamentos humanos pois representam estradas e solo impactado). No entanto, como comentado pelos próprios autores, não foi controlada a relação entre a proximidade com o homem e a ocorrência de larvas de *An. darlingi*.

A espécie é encontrada em densidades relativamente elevadas em locais bem sombreados de igarapés, principalmente perto de residências. Quando o desmatamento e as queimadas destroem a cobertura vegetal e expõem a área ao sol, as larvas se tornam ausentes. No entanto, como verificamos em vários locais degradados, o crescimento de vegetação secundária, como *Cecropia spp.*, entre outras espécies, permitia o reaparecimento de *An. darlingi*. Possivelmente por se tratar de áreas de transição, às vezes se encontravam larvas desta espécie em grandes quantidades.

Os dados aqui apresentados sugerem que a associação entre *An. darlingi* e desmatamento é complexa, mas passível de ser estudada através de trabalhos prospectivos. Estudos futuros necessitam ser elaborados para o melhor esclarecimento da relação entre a ocorrência desta espécie e a ocupação das áreas pelo homem, na presença ou ausência de desmatamento.

4.5. Dispersão de *An. darlingi*

Embora a maior parte dos estudos com malária no Brasil, como ocorre com os estudos larvários, tenham se baseado em áreas de colonização ao longo de grandes rios, vários autores têm também avaliado sua ocorrência em zonas agrícolas não alagáveis (Silva, 1975; Albuquerque, 1982; Sawyer, 1987; Tadei, 1988a; entre outros). No entanto, pouca ênfase tem sido atribuída às características distintivas deste padrão epidemiológico em relação à malária ribeirinha da Amazônia. A marcante diferença na sazonalidade da malária de terra firme, em comparação com a dos grandes rios, é tratada mais detalhadamente no Capítulo VI.

Ao contrário da malária ribeirinha, onde há abundância de locais de reprodução nas regiões alagadas durante as cheias dos rios, nas áreas agrícolas de terra firme, os criadouros são relativamente escassos e a população mais atingida pelos anofelinos é limitada a determinados focos. Isto pode ser verificado, pela equação de regressão da dispersão de *An. darlingi*. Os casos de malária encontraram-se concentrados perto das coleções hídricas mais significativas, positivas para *An. darlingi*. Não foram reportados casos a mais de 900 m, que cujos valores seriam iguais ou menores que 6,2% da população emergente. Embora forneçam dados ilustrativos da dispersão da espécie como um todo, os valores devem ser avaliados com cautela quando aplicados a uma área distinta de onde foram coletados, já que possivelmente são influenciados pelas densidades locais de humanos e animais domésticos.

O reconhecimento de distribuição extremamente desigual dos casos de malária numa determinada área tem aplicação direta no melhor direcionamento das atividades de controle. Além disso, sugerimos o aumento da vigilância desta prática em áreas endêmicas. O controle da malária seria beneficiado pelo desestímulo ao alagamento de áreas sombreadas e de tratamento adequado das reservas já existentes.

Este capítulo, com pequenas modificações, será submetido ao *Journal of Medical Entomology*, com o título **Breeding Sites of a Riverine Malaria Vector in the Amazon: seasonal variation and relation to human activity**, tendo os seguintes autores: Fábio S. M. Barros; Mércia E. Arruda; Simão D. Vasconcelos; José F. Luitgards-Moura; Nildimar A. Honório & Ulisses E. C. Confalonieri.

CAPÍTULO IV: VARIAÇÕES SAZONAIS DA ESTRUTURA ETÁRIA DE POPULAÇÕES DE ANOFELINOS VETORES DA MALÁRIA NA AMAZÔNIA

1. INTRODUÇÃO

Nas Américas, a malária impõe um ônus significativo à saúde das populações humanas, sendo que nos últimos 15 anos, a teoria de controle tem mudado para uma baseada na ocorrência de transmissão focal, o que tem aumentado a importância de estratégias regionalmente orientadas (Barata, 1995). Um conhecimento detalhado dos determinantes locais da transmissão, especialmente de fatores entomológicos, tem adquirido renovada importância. Fatores que influenciam a capacidade vetorial incluem a preferência pelos hospedeiros, grau de sinantropia, durações dos ciclos gonotróficos e as taxas de sobrevivência. O conhecimento da longevidade e composição etária das populações dos mosquitos anofelinos é crítico para compreender a dinâmica de transmissão e para o eventual sucesso de esforços de controle (Detinova, 1962). Enquanto a capacidade vetorial é diretamente proporcional à densidade de adultos, ela varia de acordo com as taxas de sobrevivência elevadas ao 8º - 10º expoente (vide Capítulo VI). Adicionalmente, combinando fatores parasitológicos e entomológicos, é possível estimar uma taxa de proliferação da malária (Garret-Jones & Grab, 1964).

Apesar dessa utilidade, poucos estudos foram desenvolvidos sobre esse aspecto em anofelinos da Amazônia. Visando uma melhor compreensão dos padrões de transmissão da malária, conduzimos uma série de estudos sobre a estrutura etária e sobrevivência das populações de anofelinos vetores em duas áreas endêmicas de Roraima, descritos neste capítulo e no seguinte. Também determinamos a duração dos ciclos gonotróficos, o que é necessário para o cálculo das taxas de sobrevivência diária.

Em relação à paridade de populações de anofelinos, existe uma concordância geral de que os dados mais sugestivos são aqueles obtidos através do exame de amostras de fêmeas capturadas durante sua busca por sangue (Garret-Jones & Grab, 1964). Os locais de estudo localizavam-se em dois ecossistemas distintos, um na savana e outro na floresta. O monitoramento de cada área foi realizado no ambiente natural e no antrópico. É interessante observar que estudos anteriores apontam diferentes espécies como os vetores da malária em cada um dos ecossistemas. Para a região de floresta tropical *Anopheles darlingi* é considerado o vetor mais importante, tal como na maior parte da Amazônia (ver

Póvoa, 2000a para uma revisão), mas diversas outras espécies têm sido apontadas como vetores locais ou secundários (Arruda, 1986; Póvoa, 2000b; Tadei, 2000). No ecossistema de savana, *An. albitarsis* sensu lato (s.l.) Lynch-Arribálzaga foi recentemente apontado como o vetor mais destacado (Silva-Vasconcelos, 2002) e sua importância pode estar aumentando com o crescimento do uso de campos irrigados para o cultivo de arroz, nas margens do Rio Branco.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Locais de estudo

Roraima engloba a totalidade da bacia do Rio Branco, um grande afluente do Rio Negro e um dos maiores rios do sistema amazônico. O estado apresenta uma extensa variedade de ecossistemas, variando desde a densa floresta tropical, ao sul e oeste, até diferentes tipos de savanas na região nordeste. Uma planície natural quase despida de vegetação arbórea, em forma de quadrilátero localiza-se a nordeste do estado (Crocia, 1994). As savanas são drenadas por cursos d'água, alguns temporários. Os mais volumosos, como o rio Branco, e muitos outros menores, alimentam uma vegetação ciliar periodicamente inundada e que ganha um aspecto de continuidade e semelhança entre si.

Boa Vista (02°49'N, 60°40'W), a capital do estado, com 200 mil habitantes (BRASIL, 2000), está situada às margens do Rio Branco. A existência de uma considerável interface entre a floresta e áreas densamente povoadas tem favorecido, nas últimas décadas, grandes epidemias de malária na periferia da cidade. A cidade e seu entorno foram descritos com detalhes em outro trabalho (Silva-Vasconcelos, 2002). Um dos locais de estudo, Jardim das Copaíbas, é um pequeno povoado rural localizado a cinco quilômetros ao sul do centro de Boa Vista e isolado do restante da cidade por algumas propriedades rurais pouco habitadas. O local foi escolhido pelas suas características geográficas, localizando-se na savana, porém margeando as florestas de galeria do Rio Branco, permitindo uma comparação entre a floresta tropical densa e a savana. As habitações são ainda localizadas próximas da floresta, embora uma considerável atividade antrópica esteja em curso e muitas áreas tenham sido degradadas no passado, tornando-se florestas secundárias.

O segundo local de estudo, a Vicinal 19 de Rorainópolis (00°51'N, 60°21'W), é um assentamento rural localizado no interior da floresta tropical, no sul do estado de Roraima, 298 km ao sul de Boa Vista. Assentamentos similares foram descritos com detalhes por Crócia (1994). A maioria dos assentados ali chegou nos últimos três anos e muitas

habitações permanecem cercadas pela floresta tropical. Em ambas as áreas de estudo havia pequenos rebanhos de gado, pertencente aos assentados.

A malária em Roraima é hipoendêmica e instável e é constituída, quase que totalmente, por *Plasmodium vivax*. Após um pico no fim dos anos 1990, a incidência da doença no estado tem declinado nos últimos anos (Chaves & Rodrigues, 2000). Poucos estudos têm abordado a epidemiologia da malária no estado, apesar das marcantes diferenças geográficas e socioeconômicas daquela incidente na Amazônia Ocidental, onde a maior parte dos trabalhos têm sido realizado. Um exame inicial do problema foi documentado por Chaves & Rodrigues (2000).

Nas áreas de estudo, a doença é comum entre todas as faixas etárias e a transmissão ocorre peridomesticamente (Barros et al., dados não publicados). Os índices de esplenomegalia são muito baixos (inferiores a 3%). O tratamento das habitações com inseticidas residuais foi realizada eventualmente e com intervalos de seis meses entre cada aplicação.

O clima, influenciado pela Convergência Intertropical, apresenta uma estação seca bem definida, com a duração de seis meses, de novembro a abril, onde 55-60% das precipitações ocorrem no período de maio a julho, os três meses mais chuvosos (Barbosa, 1997). Informações climáticas de longo prazo (1939-1999) estão disponíveis apenas para Boa Vista, pelo Instituto Nacional de Meteorologia. Invernos secos e cálidos e verões quentes e chuvosos são característicos da região do estudo. A precipitação média anual apresenta consideráveis variações dentro do estado. Em Rorainópolis a precipitação anual é mais elevada que em Boa Vista, onde varia de 1.100-1.400 mm. As temperaturas são permanentemente altas, em torno de 27,8°C (média de 60 anos), com pequena variação anual. A umidade relativa situa-se em torno de 73,8% (média; ± 3.6) na savana e 77,9% (média; ± 6.6) nas áreas de floresta, com pouca variação ao longo do ano.

2.2. Capturas de mosquitos adultos

Os estudos foram conduzidos durante campanhas bimestrais, de agosto de 2003 a julho de 2004, incluindo tanto estações chuvosas (maio a outubro) quanto estações secas (novembro a abril). Os mosquitos adultos foram coletados no ato do pouso, utilizando-se protocolo aprovado pelo comitê de ética da Fundação Oswaldo Cruz. A cada bimestre, as capturas eram realizadas durante quatro dias em cada local de estudo, seguindo o mesmo procedimento nas duas áreas. Estudos anteriores determinaram o pico crepuscular da atividade de picada na savana (dados não apresentados). Um pico visível, porém menos definido, ocorreu nas áreas de florestas, onde a atividade permanecia alta durante toda a

noite. Durante duas noites, os mosquitos foram capturados no peridomicílio (num perímetro de 30 metros ao redor de uma habitação) em turnos de 12 h, de 18 às 6 h. Capturas também eram realizadas nas áreas intra, peri e extradomiciliares (a mais de 50 metros de uma habitação) de 18 às 22 h durante outras duas noites, baseado no pico de atividade das espécies nas duas regiões. As coletas foram conduzidas durante as fases lunares de quartos minguantes e novas, independentes de chuva ou vento. Essas condições foram cuidadosamente registradas. O número de iscas humanas variou de seis a oito, localizadas uma dentro da casa, três a quatro na vizinhança próxima e duas a três a mais de 50 m de algum abrigo humano existente. Os mosquitos foram armazenados num ambiente úmido, segundo o capturador e a hora de coleta, em recipientes plásticos adequados e sem solução açucarada. Em ambas as localidades, as capturas foram realizadas principalmente em torno da mesma habitação, mas outras casas foram escolhidas para comparações e amostradas em cada um dos períodos de coleta. Uma vez que as luzes poderiam ter afetado o comportamento dos mosquitos, em Boa Vista a casa escolhida foi a mais distante da iluminação pública e relativamente próxima (60 m) de criadouros de mosquitos. Estes eram representados por uma faixa de floresta ciliar inundada e um pequeno açude para criação de peixes. Em Rorainópolis, as casas estavam localizadas ao longo de uma estrada vicinal que adentrava 18,8 km na floresta tropical e não dispunha de iluminação a partir do km 9. A casa escolhida como estação de coleta estava no km 11, próxima (30 m) de um açude para criação de peixes, muito comum nos assentamentos rurais da área de floresta do Estado de Roraima.

A latitude e longitude de cada estação de coleta foram registradas com o auxílio de um aparelho de Sistema de Posicionamento Geográfico (GPS) Garmin® e foram determinados através dos dados do Sistema Geodésico Universal 1984 (WGS-84). Os mosquitos adultos foram identificados usando as chaves de Gorham et al. (1967) e Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994).

2.3. Aparência das porções terminais e duração dos ciclos gonotróficos

Como o enfoque deste projeto concentrou-se em espécies vetoras locais, as dissecções foram realizadas quase exclusivamente em mosquitos *An. darlingi*, na área de floresta, e *An. albitarsis* s.l. na região de savana. Um percentual significativo, aproximadamente 20% do total de adultos coletados foi dissecada.

As dissecções e observações de mosquitos foram realizadas sob microscópio de dissecção (40 x) com fonte de luz de fibra ótica. Observações nos ovários foram conduzidas usando-se um microscópio binocular clínico convencional (100 – 1000 x). As

dissecções foram realizadas logo após a identificação, na mesma noite da coleta. Antes da dissecção, os mosquitos capturados eram classificados de acordo com os estágios de Sella (WHO, 1975).

A fisiologia da contração da porção terminal do ovariolo foi estudada por Detinova (1962) em *An. maculipennis* Meigen, que dividiu o processo em cinco fases, designadas de A a E. Observou-se que estas porções terminais mantinham suas formas saculares (dilatação tipo A) por 19 - 20 h. Após este período o processo acelerava-se consideravelmente e pequenas dilatações compactas (tipo E) eram encontradas nas extremidades dos ovariolos dentro do segundo período de 24 h após a postura. Dessa forma, o tempo despendido entre a postura até a ingestão de sangue pode ser estimado pelo exame do estado de contração das terminações ovariolares, após a passagem do ovo maduro (Detinova, 1962). Se o tempo de desenvolvimento do ovo for conhecido, a duração aproximada do ciclo gonotrófico – aqui definido pelo tempo gasto entre uma ingestão de sangue e a seguinte – pode ser estimada. A ovogênese em *An. darlingi* é completada em 48 h após a alimentação sanguínea (Roberts et al., 1983). Como é quase certo que o saco ovariole leva 24 h para contrair-se após a postura (Detinova, 1962), é assumido que as fêmeas com dilatações saculares apresentam um ciclo de postura aproximado de dois dias e aqueles com terminações plenamente contraídas, no mínimo três dias. Uma média ponderada pode ser calculada para as proporções de fêmeas com cada um dos tipos descritos (Charlwood, 1980; Charlwood & Alecrim, 1989; Charlwood, 1997). Em razão das significativas diferenças encontradas (dados não apresentados), mosquitos dissecados mais de seis horas após a captura não foram considerados para avaliação das dilatações saculares nas terminações ovariolares. Todos os dados foram coletados no período maio-julho, correspondente ao início da estação chuvosa.

2.4. Dissecções para determinação das taxas de paridade e da estrutura etária

Utilizando-se a técnica de Polovodova (Detinova, 1962), determinamos as taxas de paridade durante todo o período de coleta. Devido às limitações logísticas, as dilatações dos terminais foliculares foram analisadas em apenas dois momentos de coleta, correspondentes ao fim da estação seca e início da chuvosa. Em cada dissecção, um mínimo de seis, mas quase sempre 10 a 15 ovariolos eram examinados em busca de dilatações. Os estágios de Sella foram sistematicamente registrados.

A determinação da presença e a contagem de dilatações nos pedículos ovariolares são facilmente realizadas em fêmeas com as porções terminais do ovariolo bem contraídas. Em fêmeas que depositaram ovos recentemente, as porções terminais se

apresentam na forma sacular, não permitindo a determinação do número de oviposições. Nestes ovários, ainda se pode buscar contar as dilatações quando visíveis, nos ovaríolos que apresentam folículos em degeneração. Frequentemente, isso não é possível, devido às limitações de tempo e do fato de serem realizados grandes números de disseções em cada noite.

2.5. Análise: taxas de sobrevivência diária, curvas de sobrevivência e densidade de fêmeas epidemiologicamente perigosas

O método dos mínimos quadrados foi usado para o ajustamento das funções exponenciais descrevendo as curvas de sobrevivência de *An. darlingi* e *An. albitarsis* s.l. Taxas de sobrevivência diárias (p) foram calculadas pelo método de Davidson da seguinte forma: $p = \sqrt[x]{\% \text{paridas}}$, onde x = duração do ciclo gonotrófico em dias (Davidson & Draper, 1953). Foram estabelecidos limites de confiança de 95% para a população de fêmeas paridas, como proposto por Bliss (1967), e calculadas as correspondentes taxas de fêmeas paridas para esses valores. Testes de qui-quadrado (χ^2) foram usados para comparações do estado de contração sacular e dos diversos grupos etários de anofelinos provenientes de diferentes ecossistemas.

Os dados longitudinais de paridade foram combinados com dados de mosquitos adultos para a determinação da densidade de fêmeas epidemiologicamente perigosas em cada estação. Para uma espécie de mosquito tornar-se um vetor eficiente de malária, um número considerável de indivíduos deve sobreviver mais de 10 dias para a transmissão da malária por *P. vivax* ou *P. falciparum* (Bates, 1965).

3. RESULTADOS

675 *An. darlingi* foram dissecados, sendo 133 (19,7%) provenientes da savana e 542 (82,3%) da floresta, onde foi o anofelino predominante. Na savana *An. albitarsis* s.l. foi a espécie mais abundante. Das 550 fêmeas dissecadas, apenas 21 (3,8%) foram originários da região de floresta. Ambas as espécies foram encontradas peridomesticamente em números consideráveis.

3.1. Aparência das porções ovariolares terminais

As porções terminais foram verificadas em 550 *An. darlingi* e 159 *An. albitarsis* s.l. nas áreas de floresta e savana, respectivamente, podem ser visualizadas na Tabela 4.1. Os dados são apresentados separadamente, embora não houve diferença significativa entre as

espécies ($\chi^2 = 6,44$; $df = 3$; $P > 0,05$). Os resultados para *An. darlingi* variaram significativamente entre os espécimens coletados em cada ecossistema ($\chi^2 = 28,15$; $df = 1$; $P \ll 0,001$). Dilatações dos tipos A e C foram encontradas mais comumente na savana. Isso sugere uma considerável variação no tempo médio desde a postura até a alimentação de sangue nos dois ecossistemas. Os mosquitos capturados foram encontrados principalmente nos estágios de Sella 1 (não alimentados, abdômen contraído) ou 2 (recém alimentados), com poucas exceções.

Tabela 4.1: Aparência da porção terminal dos ovariolos de *An. darlingi* e *An. albitarsis* s.l. dissecados em áreas de savana e floresta do Estado de Roraima

Aparência	<i>An. darlingi</i>		<i>An. albitarsis</i> s.l.	
	floresta	savana	floresta	savana
A (sacular alongada)	100	127	1	66
B (primeiros sinais de contração)	25	0	0	16
C (contração perceptível)	2	22	0	20
D (grandes dilatações formadas)	2	0	0	3
E (dilatações bem definidas)	218	54	3	50
Total	347	203	4	155

3.2. Durações dos ciclos gonotróficos

É pouco conhecido o tempo necessário para a ocorrência de cada estágio de contração sacular. Como sugerido por Detinova (1962), os tipos A - C foram considerados como fêmeas que recentemente depositaram ovos. Os resultados para ambas as espécies são apresentados na Tabela 4.3. A faixa de variação é devido a cálculos separados nos meses de maio e julho. A reduzida captura de *An. albitarsis* s.l. na floresta impossibilitou a determinação da duração de seu ciclo gonotrófico. Para *An. darlingi*, o ciclo foi mais curto na área de savana em comparação com a de floresta.

3.3. Idade fisiológica por dilatações terminais

O número de dilatações nos terminais ovariolares de *Anopheles darlingi* e *An. albitarsis* s.l., pode ser visualizado para cada ecossistema na Tabela 4.2. *Anopheles darlingi* apresentou uma proporção maior de fêmeas jovens que *An. albitarsis* s.l. ($\chi^2 = 20,05$; $df = 3$; $P \ll 0,001$). Não foi encontrada diferença significativa na idade das fêmeas capturadas dentro das casas, no perímetro de 30 m em torno da casa e na área extradomiciliar.

É interessante observar que os poucos *An. albitarsis* s.l. coletados na floresta eram fêmeas jovens picando imediatamente após o pôr-do-sol. Este grupo era significativamente

mais jovem que aquele coletado na savana ($\chi^2 = 9,94$; $df = 2$; $P < 0,01$). Para *An. darlingi*, o número de dilatações entre mosquitos na savana e na floresta não difere significativamente ($\chi^2 = 2,59$; $df = 2$; $P > 0,05$). No entanto, entre os mosquitos coletados na floresta, verificaram-se consideráveis diferenças ao comparar-se a idade fisiológica de fêmeas *An. darlingi* em maio e em julho ($\chi^2 = 23,10$; $df = 3$; $P \ll 0,001$).

Tabela 4.2: Número de dilatações nas porções ovariolares terminais de fêmeas de *An. darlingi* e *An. albitarsis* s.l. coletadas em Rorainópolis e Boa Vista - RR, coletados em maio a julho de 2004

No. de dilatações	<i>Anopheles darlingi</i> , Rorainópolis			<i>Anopheles albitarsis</i> s.l., Boa Vista		
	Floresta	Savana	Totais	Floresta	Savana	Totais
0	520	180	700	13	70	83
1	82	50	132	3	41	44
2	39	8	47	0	11	11
3	7	0	7	0	1	1
Não contável *	117	145	262	1	102	103
Total	765	383	1148	17	225	242

* = Apresentaram dilatações saculares, nas quais a contagem não pode ser realizada.

3.4. Curvas de sobrevivência

As curvas de sobrevivência, calculadas a partir dos dados coletados no início da estação chuvosa, são mostradas na Figura 4.1. A regressão linear indica um adequado ajustamento de curvas exponenciais: para *An. darlingi*, $r^2 = 0,99$; $F_{(1;2;0.05)} = 143,78$ ($P < 0,01$); para *An. albitarsis* s.l., $r^2 = 0,95$; $F_{(1;2;0.05)} = 35,50$ ($P < 0,05$). As taxas de sobrevivência por ciclo e dia são mostradas para cada uma das espécies nos diferentes ambientes na Tabela 4.3. Os dados obtidos na savana apresentam uma elevada proporção (em torno de 40%) de fêmeas paridas com dilatações saculares em seus ovariolos. Esse fato impediu a contagem e pode ter sido sub-estimada a verdadeira taxa de sobrevivência. Os dados para a floresta foram coletados no mês de julho.

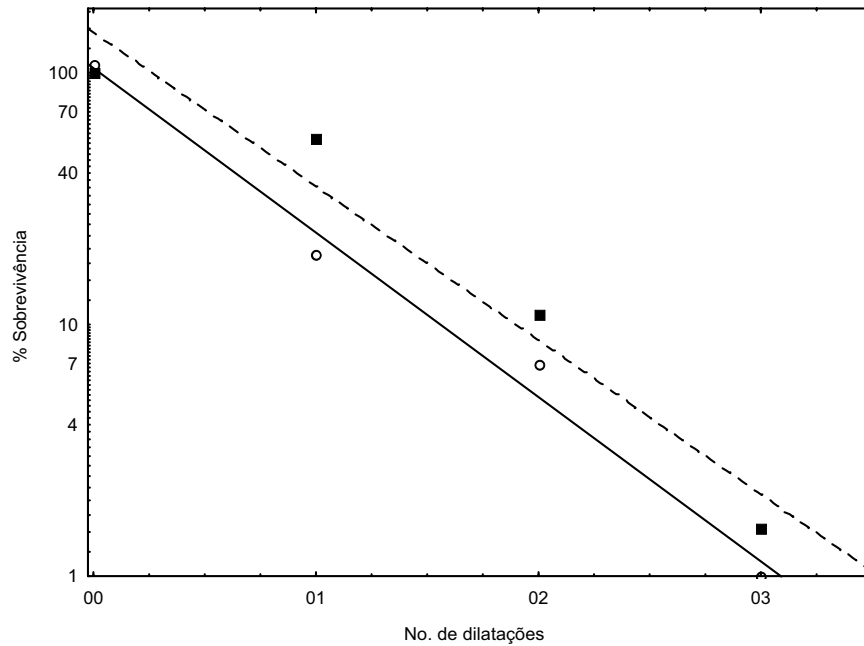


Figura 4.1: Curvas de sobrevivência para dados agregados de *An. darlingi* (linha contínua e círculos) e *An. albitarsis* s.l. (linha pontilhada e quadrados) capturados na floresta e savana, respectivamente, no início e meio da estação chuvosa (maio - julho, 2004). As linhas representam o ajustamento por mínimos quadrados dos dados para as funções $y = b \cdot e^{a \cdot x}$.

3.5. Taxas de paridade de Davidson

Foram determinadas as taxa de paridade de Davidson para *An. darlingi* e *An. albitarsis* s.l. durante nove meses de coleta. Os dados são apresentados na Tabela 4.3. De maneira geral, taxas de sobrevivência de 76% (intervalo de confiança de 95% = $\pm 2\%$) foram encontradas para *An. darlingi*. Aplicando correções para as diferentes durações de ciclo gonotrófico, a taxa de sobrevivência foi semelhante entre mosquitos capturados na savana e na floresta.

Tabela 4.3: Duração dos ciclos gonotróficos e taxas de sobrevivência de *Anopheles darlingi* e *Anopheles albitarsis* s.l. de floresta e savana, coletados de novembro de 2003 a julho de 2004

Área	Duração do ciclo gonotrófico (dias)	Regressão da taxa de sobrevivência (/ciclo) (Julho)	Regressão da taxa de sobrevivência (/dia) (Julho)	Taxa de sobrevivência de Davidson (/dia) (\pm IC 95%)					
				Nov (chuva)	Jan (seco)	Mar (seco)	Mai (transição)	Jul (chuva)	
<i>An. darlingi</i>	Floresta	2,66 - 2,68	0,254	0,623	0,63 (0,09)	0,92 (0,04)	0,76 (0,06)	0,81 (0,05)	0,62 (0,06)
	Savana	2,26 - 2,37	0,176*	0,470*	N.D.	N.D.	N.D.	0,87 (0,07)	0,69 (0,09)
<i>An. albitarsis</i> s.l.	Savana	2,15 - 2,38	0,245*	0,594*	0,78 (0,03)	0,74 (0,06)	0,84 (0,14)	0,86 (0,06)	0,81 (0,06)

*Apresentaram altas proporções (74% e 56%) de dilatações não computadas devido à aparência sacular dos ovariolos terminais

N.D.= não disponível devido a baixos números coletados.

3.6. Variação sazonal no número de fêmeas epidemiologicamente perigosas

Em relação ao capacidade de transmissão da malária, a proporção de *An. darlingi* na área de floresta que sobreviveria o suficiente para o completo desenvolvimento de *P. vivax* no mosquito, varia largamente ao longo do ano, de 0,8 - 1,0% na estação chuvosa, até 42,7% na estação seca. Na savana, as estimativas são disponíveis apenas para o início da estação chuvosa e variam de 25,7 a 2,3% em maio e julho, respectivamente. Para a área de floresta, considerando a densidade de picadas de fêmeas adultas observada nas áreas (discutidos no Capítulo VI), haveria uma média de 0,17 (\pm 0,03 IC 95%) picadas epidemiologicamente perigosas/homem/hora na estação chuvosa e 1,49 (\pm 0,21 IC 95%) na estação seca. Na savana, por sua vez, haveria 1,0 (\pm 0,43 IC 95%) picada/pessoa/hora, de *An. darlingi*, no início da estação chuvosa.

Em relação a *An. albitarsis l.s.*, haveria 0,51 (\pm 0,09 IC 95%) picada/pessoa/hora epidemiologicamente perigosa no meio da estação seca e 1,52 (\pm 0,37 IC 95%) na estação chuvosa.

Na savana a variação seria causada, principalmente, pelas alterações nas densidades de mosquitos, já que há pouca variação nas taxas de sobrevivência. Ao contrário, na floresta ela dependeria mais da variação nas taxas de sobrevivência. É compatível com as taxas calculadas aqui o fato de, na savana, os picos de transmissão ocorrerem na estação chuvosa, e, na floresta, durante a seca (vide capítulo VI para uma discussão destes temas).

4. DISCUSSÃO

4.1. Definição do status de paridade

Embora a avaliação de parâmetros para a determinação etária seja tema do Capítulo IV, abordaremos aqui apenas o que concerne à determinação do estado de paridade ou nuliparidade. Considerando os estudos sobre a estrutura etária de anofelinos, no curso de nossas investigações, logo se verificou que a presença de apenas uma alteração fisiológica visível no aparelho reprodutivo das fêmeas não determinava com precisão o *status* de paridade dos inúmeros mosquitos capturados no campo. Por exemplo,

não raro, ovários do II estágio avançado não apresentaram nenhum enovelamento traqueal, e não era difícil observar a presença de um certo número de enovelamentos bem definidos nos ovários de fêmeas paridas, especialmente quando se buscava ao redor de folículos degenerados. Portanto, para uma determinação adequada da idade e *status* de paridade, usamos o aspecto do sistema traqueal, tamanho do ovário, presença de dilatações e a presença de corpos amarelos ou retenção de ovos. A incidência de retenção de ovos e a presença de corpos amarelos são relatados no Capítulo IV.

4.2. Duração do ciclo gonotrófico

Para a estimativa de taxas de sobrevivência de adultos a partir de dados fisiológicos, é preciso conhecer com precisão a duração do ciclo gonotrófico. Uma considerável controvérsia permanece em relação a este assunto. Em um clássico estudo, Gillies e Wilkes (1965), estudando *An. gambiae* Giles no nordeste da Tanzânia, determinaram que o primeiro ciclo gonotrófico, a partir de uma alimentação de sangue até à seguinte, dura aproximadamente 3 - 4 dias, e os ciclos seguintes 3 dias. Uma re-análise desses dados estimou a duração do primeiro ciclo em cerca de 4,7 - 5 dias (Service, 1993). Utilizando a técnica de Polovodova, Charlwood e Wilkes (1979) estudaram a estrutura etária de populações de *An. darlingi* capturadas em Mato Grosso, verificando que a maioria das fêmeas paridas apresentava dilatações bem definidas e interpretaram esse fato como um indicativo de que o ciclo gonotrófico exigia pelo menos 3 dias.

Roberts et al. (1983), trabalhando no Rio Ituxi, no sul da Amazônia brasileira, dissecaram *An. darlingi* no campo e usaram métodos de marcação-soltura-recaptura para estudar o tempo entre sucessivas alimentações com sangue. Foi determinado que 42% das fêmeas recapturadas buscavam nova alimentação na segunda noite após o repasto sanguíneo. Uma re-análise desses dados, proposta por Charlwood & Alecrim (1989), permitiu determinar um ciclo de 2,6 dias. Roberts et al. (1983), sugerem que esses dados podem refletir condições sazonais ou ambientais diversas das de Charlwood & Wilkes (1979). Os dados destes últimos autores, também podem ter apresentado um pequeno desvio, uma vez que as disseções eram realizadas somente na manhã seguinte após a noite de captura. Usando experimentos de captura-recaptura em Jaru, Rondônia, esses últimos autores concluíram que *An. darlingi* possuía um ciclo de postura de aproximadamente dois dias e estimaram um ciclo de 2,3 dias para a população como um todo.

Nenhum trabalho determinou adequadamente a duração do ciclo gonotrófico em *An. albitarsis* s.l., embora taxas de sobrevivência diárias tenham sido determinadas.

Nossos resultados são relativamente similares aos de Roberts et al. (1983) e divergem consideravelmente daqueles de Charlwood & Wilkes (1979), que relatam que apenas 30 (5,4%) de 557 fêmeas paridas capturadas em Mato Grosso, apresentaram dilatações bem definidas.

É sabido que a grande maioria de fêmeas fazem a postura ou à noite logo após o pôr-do-sol, ou pela manhã, ao nascer do sol (Russell & Rao, 1942). Diante das taxas, na área de savana, de fêmeas com dilatações A – C, nossos dados sugerem uma elevada proporção, em torno de 60 - 70%, de *An. albitarsis* s.l. e *An. darlingi*, realizando posturas no último período crepuscular ou na mesma noite, logo após o por do sol, e imediatamente buscando uma nova refeição de sangue.

Considerando *An. darlingi*, verificou-se uma percentagem significativamente maior de fêmeas com postura recente na savana que na floresta. Isso ocorreu apesar da proporção relativamente mais elevada de fêmeas mais jovens neste último ambiente, como consequência da mortalidade mais alta nesta área. A razão dessa disparidade provavelmente reflete diferenças entre os locais de coleta e os criadouros. Estes foram determinados por extensas coletas larvárias realizadas no período de coleta nas áreas de estudo (dados apresentados para a área de floresta no Capítulo III). *Anopheles darlingi* é uma espécie muito exigente em relação a seus criadouros (Rachou, 1958). Na savana, os criadouros de mosquitos são encontrados relativamente próximos das casas, em áreas de malária endêmica, uma vez que a transmissão é praticamente restrita a florestas de galerias, que se tornam pantanosas durante as estações chuvosas. O fator determinante, criadouros de água clara espelhada, é relativamente abundante. Na área de floresta estudada, ao contrário, devido à ausência de grandes rios nas vizinhanças, a inundação torna-se menos comum, o que resulta em criadouros mais escassos e normalmente localizados bem mais distantes da maioria das casas. Os dados sugerem que a duração do ciclo gonotrófico pode diferir para as mesmas espécies quando localizadas em diferentes ecossistemas. Além disso, fatores ambientais são mais determinantes do que uma variação inter-específica. As condições de sobrevivência mais severas na região de floresta podem explicar a quase ausência de outras espécies sinantrópicas neste meio, conhecidas por serem menos aptas que *An. darlingi*, como sugerido por Charlwood & Alecrim (1989).

4.3. Taxas de sobrevivência diária e curvas de sobrevivência

Charlwood (1980), considerou que apenas fêmeas possuindo quatro ou mais dilatações (0,4% do total) seriam epidemiologicamente perigosas, mas provavelmente, fêmeas mais velhas estariam sub-representadas na população amostral (Service, 1993).

Dessa maneira, as taxas e curvas de sobrevivência precisam ser estimadas para uma adequada avaliação das taxas de adultos fisiologicamente mais velhos.

Para *An. albitarsis*, Boyd (1930) comparou a percentagem de fêmeas mostrando oocistos, com a percentagem de esporozoítos e, que o intervalo entre estas duas fases deveria ser de 7 a 10 dias. O autor concluiu que 50% da mortalidade ocorreu neste intervalo. Kakitani & Forattini (2000) relataram taxas de sobrevivência similares para *An. albitarsis* s.l. em um sistema de irrigação agrícola em São Paulo. Entretanto, contrariando esses relatos de baixas taxas de sobrevivência, Correa et al. (1950) recuperaram fêmeas de *An. albitarsis* s.l. 60 dias após a data de soltura. As taxas de sobrevivência diárias obtidas para *An. albitarsis* s.l. devem ser interpretadas com cautela, uma vez que, além de representarem um agrupamento de espécies crípticas, experimentos do tipo marcar-soltar-recapturar não foram realizados para determinar a duração de seus ciclos gonotróficos na natureza.

As taxas observadas para *An. darlingi* variaram ao longo do ano para a área de floresta. Os dados fornecem estimativas da sobrevivência das espécies numa área particular e durante um período de tempo, sem considerar o desvio estatístico produzido por flutuações de recrutamento. O recrutamento, que consiste no número de formas imaturas originando adultos num determinado período, provavelmente, não foi constante ao longo do ano, como sugerido pelos levantamentos larvais realizados no mesmo período (dados não apresentados). O recrutamento produz um desvio porque variações na taxa de nascimentos, que afetam as percentagens de fêmeas paridas, não podem ser diferenciadas das variações reais na sobrevivência dos adultos. Considerando *An. darlingi* na área de floresta, apesar da variação com uma tendência a menores níveis na estação chuvosa, as diferenças nas densidades larvais não podem ser consideradas estatisticamente significantes pela análise de variância (ANOVA). Ainda que flutuações no recrutamento realmente ocorram, definitivamente haveria mais recrutamento de *An. darlingi* na estação seca. Isso tenderia a reduzir, e não aumentar, como foi verificado, nas taxas de sobrevivência diárias no período da seca. Adicionalmente, no Capítulo V, aplicamos, em uma ocasião, correção para flutuações diárias com o intento de corrigir este efeito, demonstrando igual resultado. Desta forma, sugerimos que variações de recrutamento na área de floresta possam ser desconsideradas.

Na savana, em relação aos dados de *An. albitarsis* s.l., as grandes variações nos criadouros disponíveis, com extensas inundações na estação chuvosa, tornam impossível a comparação de dados larvais. Há a possibilidade de o fato de não serem encontradas variações significativas nas taxas de sobrevivência diárias de quaisquer das espécies ter

sido mascarado pelo aumento do recrutamento. Além disso, com relação às curvas de sobrevivência, os dados na área de savana devem ter sido afetados pela elevada percentagem de fêmeas paridas com dilatações saculares em seus ovários, prejudicando a contagem do número de dilatações. Na floresta, ocorreu também uma percentagem razoável dessas fêmeas, mas em proporção muito mais baixa (33%, se comparado a 56-74%).

Realizamos uma re-análise dos dados de Charlwood (1980) sobre *An. darlingi* em Mato Grosso, e calculadas, usando um modelo exponencial de regressão das dilatações, taxas de sobrevivência diárias de 64,58% para a população de indivíduos que picam, ao final da estação chuvosa. Com os mesmos dados, utilizando o método de Davidson, calculou-se taxas de sobrevivência diária de 70,35%. Isso ocorre se considerarmos a duração do ciclo gonotrófico de 3 dias, como proposto então pelos autores, baseado nos trabalhos de Gillies & Wilkes (1965) em *An. gambiae*. Mas se os dados forem corrigidos para se utilizar o ciclo de 2,3 dias proposto por Charlwood & Alecrim (1989), esses números cairiam para 56,53% pelo modelo de regressão e 63,21% pelo método de Davidson. Os experimentos de captura-recaptura conduzidos por Charlwood & Alecrim (1989) no início da estação chuvosa produziram taxas de sobrevivência de 83% diariamente ou 57-59% por ciclo de postura. Até o momento, nenhuma explicação foi capaz de justificar as grandes diferenças na sobrevivência diária observadas nesses experimentos.

Tais resultados são significativamente compatíveis com aqueles apresentados no presente trabalho. Para a taxa de paridade de Davidson, que foi obtida ao longo de todo o ano, e, a partir de mosquitos capturados na floresta (o mesmo ecossistema analisado pelos autores acima), as taxas observadas ao final da estação chuvosa foram 63% ($\pm 9,0$ IC 95%), enquanto que para o início desse mesmo período, 81% ($\pm 5,0\%$ IC 95%). Isso sugere que *An. darlingi* possa apresentar grandes variações sazonais na taxa de sobrevivência da população. Além disso, estas flutuações podem ocorrer de forma uniforme, ao longo do ano, em toda a região Amazônica. Isto levaria a importantes implicações sobre a epidemiologia da malária na bacia Amazônica, dado que, em uma espécie vetora, a taxa de sobrevivência é o principal fator influenciando sua capacidade de transmissão.

4.4. Relação de sobrevivência e transmissão da malária

O ajustamento ao modelo exponencial das curvas de sobrevivência sugere uma taxa de mortalidade constante na população de mosquitos. Os dados obtidos para o início da estação chuvosa são bem compatíveis com as taxas de sobrevivência de Davidson.

Não há um padrão de sazonalidade claro para a malária, estabelecido na região Amazônica. Tem sido sugerido que a malária ocorre em picos nas transições das estações (Klein, 1990). As razões disto seriam que as populações de mosquitos atingiriam o auge durante a transição da estação chuvosa para a seca e diminuiriam no meio dessas estações (Charlwood, 1980). A explicação para este último fato seria que os temporais causam, além da perda de larvas, carregadas pelas enxurradas ou afogadas, a morte dos adultos (Charlwood, 1980; W. Tadei, comunicação pessoal). É possível que as fortes chuvas, muito comuns durante a estação chuvosa da Amazônia, possam provocar as altas taxas de mortalidade em adultos. Isto está de acordo com a verificação de consideráveis diferenças ao comparar-se a idade fisiológica de fêmeas de *An. darlingi* no início da estação chuvosa (maio), quando as tempestades estão mais espaçadas, com as capturadas no pico da estação chuvosa (julho).

Analisando mais detalhadamente os casos de malária na área de floresta, onde esta ocorria em níveis consideráveis durante a pesquisa, os casos atingiram o auge em março, logo após o pico, aqui relatado, das taxas de sobrevivência de *An. darlingi* (vide Capítulo III). A percentagem de mosquitos que sobrevivem mais de 10 dias apresentou boa correlação com os casos de malária registrados no mês seguinte ($r = 0,83$), embora os pares de variáveis fossem muito poucos para consideração de suas significâncias. Detalhes da incidência de malária e as medidas das capacidades vetoriais para as áreas de estudo são relatadas no Capítulo VI, onde um modelo para a compreensão da sazonalidade de vetores da malária é proposto.

Este capítulo, com pequenas modificações, será submetido ao *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, com o título: **Age Structure of Anopheline Mosquito Populations in Malaria-Endemic Regions of the Amazon**, tendo os seguintes autores: Fábio S. M. Barros; Mércia E. Arruda; Simão D. Vasconcelos; José F. Luitgards-Moura; Nildimar A. Honório & Ulisses E. C. Confalonieri.

CAPÍTULO V: OBSERVAÇÕES SOBRE A ESTRUTURA ETÁRIA DE POPULAÇÕES DE MOSQUITOS ANOFELINOS NO NORTE DA AMAZÔNIA

1. INTRODUÇÃO

A malária ocorre numa grande variedade de formas epidemiológicas e se encontra largamente distribuída em vastas regiões do planeta, onde 40% da população permanece sob risco de contrair a doença (WHO, 2000). Nas últimas décadas, a teoria de controle tem sido modificada para considerar a ocorrência de transmissão focal da doença, com o objetivo de estabelecer estratégias de combate regionalmente orientadas (Barata, 1995). Para tanto, um melhor conhecimento dos determinantes locais da transmissão, especialmente fatores entomológicos, tornou-se de fundamental importância. A longevidade e a composição etária de populações de mosquitos anofelinos têm sido consideradas cruciais para a compreensão da dinâmica da transmissão e para a avaliação dos esforços de controle da malária (Detinova 1962).

Na Amazônia, *Anopheles darlingi* Root é o vetor primário da malária (Oliveira-Ferreira, 1999; Tadei, 2000). Muito pouco é conhecido da composição etária e da longevidade desse vetor e praticamente nada tem sido relatado sobre os vetores secundários na Amazônia. Neste trabalho são relatadas observações sobre métodos de determinação da estrutura etária de populações de mosquitos adultos de espécies vetoras encontradas no norte da Bacia Amazônia. Visando a padronização das técnicas de coleta utilizadas, a realização de determinação etária no dia seguinte é comparada a sua verificação na mesma noite. Densidades horárias de picadas são analisadas em relação à idade das fêmeas buscando alimentação de sangue. Também é analisado o grau de desenvolvimento ovarial dos anofelinos e relatado o efeito da borrifação de habitações sobre a composição etária das populações de mosquitos em busca de alimentação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Capturas de mosquitos adultos

Os locais de estudo situavam-se em dois ecossistemas do Estado de Roraima, savana e mata e foram descritos previamente no Capítulo IV. Os trabalhos foram conduzidos de agosto de 2003 a julho de 2004, através de seis campanhas de coleta

incluindo tanto a estação chuvosa (maio a outubro) como a seca (novembro a abril), como descrito no Capítulo IV.

2.2. Parâmetros para determinação da idade fisiológica

Devido à escassez de estudos anteriores sobre a composição etária de anofelinos na Amazônia, avaliamos a utilização de diversos métodos. As fêmeas capturadas em campo eram dissecadas logo após a identificação na mesma noite da coleta, utilizando-se a técnica de Polovodova (Detinova, 1962). A avaliação do desenvolvimento folicular foi feita de acordo com o estado de enovelamento do sistema traqueal e segundo o critério de Christophers, de N a V (WHO, 1975). Os estágios de Sella, a presença de ovos retidos nos ovários e a presença de ácaros hidracnídeos (Hydrachnidia = Hydrachnellae = Hydracarina) foram sistematicamente registrados. A retenção de ovos tem sido sugerida como um parâmetro para determinação da condição de paridade (Detinova, 1962). Como as larvas de ácaros aquáticos algumas vezes infestam mosquitos, a presença de ácaros hidracnídeos do tipo higrobátide tem sido sugerida como uma indicação de nuliparidade (Gillet, 1957; Corbet, 1963) ou como um parâmetro para a determinação de diferenças entre os criadouros das espécies de mosquitos (Shapiro et al., 1944).

A presença e o número de corpos amarelos, que são indicadores de degeneração folicular num determinado ovário (Detinova 1962), foi mensurado, uma vez que consideramos que eles podem ajudar a estimar a taxa de ocorrência de degeneração folicular para uma determinada espécie. Isso poderia indicar que, se a degeneração folicular é demasiadamente comum em uma dada espécie, a contagem do número de dilatações da população pelo método de Polovodova poderia superestimar o verdadeiro número de posturas.

As dissecções nos mosquitos foram conduzidas utilizando-se um microscópio binocular de dissecção (40 x) e as observações ovarianas foram realizadas com o auxílio de um microscópio convencional (100 – 1000 x). Considerando que só as espécies vetoras locais foram selecionadas para este projeto, as dissecções foram realizadas quase exclusivamente em mosquitos *An. darlingi* e *An. albitarsis* s.l.

2.3. Efeito da borrifação com inseticida residual sobre a idade da população de mosquitos

Os efeitos imediatos da borrifação domiciliar sobre a estrutura etária de fêmeas adultas, em condições de campo, foi avaliada em uma única ocasião. Uma das residências onde estavam sendo realizadas capturas em série foi borrifada com inseticida residual

(cipermetrina) durante o período de coleta. Os resultados podem ser comparados com aqueles obtidos nas duas noites anteriores à borrifação.

2.4. Correção para flutuações diárias no recrutamento

As taxas de sobrevivência das espécies coletadas, foram calculadas ao longo do ano pelo método de Davidson (Davidson & Draper, 1953) e estão relatadas no Capítulo IV. No entanto, é bem conhecido que variações no recrutamento diário podem causar desvios nas taxas de fêmeas paridas (Service, 1993). Para avaliar essa condição, foi realizada uma correção nos valores de *An. albitarsis* s.l. para a savana, onde as diferenças diárias nas densidades eram mais pronunciadas. A correção utilizada baseia-se na proposta por Garret-Jones (1973). Nela, a densidade de paridas obtidas em uma noite é associada às densidades medidas durante vários dias, i.e., $p^t = V/M$, onde p = taxa de sobrevivência diária; t = duração do ciclo gonotrófico; V = densidade média de fêmeas paridas em uma noite; e M = média geral da densidade de picadas durante vários dias de coleta. Esses pares de densidades são determinados para dias diferentes e o percentual de paridas é obtido com a média aritmética desses valores.

2.5. Dissecções no dia seguinte

Mosquitos dissecados na manhã seguinte (após de seis horas ou mais do momento de coleta) à noite de coleta foram comparados com os exemplares analisados logo após a identificação taxonômica, realizada na mesma noite, a menos de 3 h após sua captura. Uma amostra numerosa de cada grupo de mosquitos foram comparados utilizando-se os estágios de Christophers, combinado com a técnica de Polovodova simplificada (Rubio-Palis, 1994). Nesta última, se verifica ou não a presença de dilatações pediculares apenas para determinar se a fêmea é parida ou nulípara. Não há a intenção de contar as dilatações. Nas dissecções na manhã seguinte também se pode comparar fêmeas que foram mantidas com acesso apenas a água com aquelas mantidas com solução açucarada.

2.6. Análise

O teste t de Student foi usado para comparar números médios de ovos retidos entre *An. darlingi* e *An. albitarsis* s.l. Testes de qui-quadrado para grupos de idades de mosquitos foram usados para diversas comparações. Uma análise de variância (ANOVA) foi realizada para a verificação de picos na densidade horária de mosquitos adultos.

3. RESULTADOS

3.1. Paridade e retenção de ovos

Das 675 fêmeas de *An. darlingi* dissecadas, 295 (43,7%) estavam paridas e 17 (0,3%) apresentavam retenção de ovos. Das 550 fêmeas de *An. albitarsis* s.l. dissecadas, 304 (55,2%) estavam paridas e 14 (4,6%) possuíam retenção de ovos. Os números médios de ovos retidos por fêmea de *An. darlingi* e *An. albitarsis* s.l. foram 3,20 (desvio padrão [DP] = 5,26) e 2,62 (DP = 1,77) respectivamente e não diferiam significativamente pelo teste t de Student ($P > 0,05$). Ocorreu um único relato de uma fêmea *An. albitarsis* s.l. com 37 ovos maduros retidos em seus ovários, concentrando-se em locais variados.

3.2. Presença de ácaros hidracnídeos e corpos amarelos

Duzentos e oitenta e oito mosquitos foram analisados para a presença de ácaros; 171 destes eram fêmeas nulíparas. Apenas um espécime (0,6% das nulíparas), uma fêmea de *An. albitarsis* s.l., foi encontrada positiva. Noventa e três *An. darlingi* e 76 *An. albitarsis* s.l. da floresta e savana, respectivamente, foram dissecados em busca da presença de corpos amarelos nos ovários. Em 50 (53,8%) exemplares de *An. darlingi*, corpos amarelos foram facilmente visualizados, embora isso fosse possível em apenas 10 (13,2%) fêmeas de *An. albitarsis* s.l. O número e tamanho das estruturas variaram grandemente, com uma média de 14 (DP = 29,75) corpos amarelos/fêmea em ambas as espécies. As cores variaram de laranja a amarelo claro até rosa, vermelho e marrom. Algumas vezes, cores misturadas foram encontradas em um único corpo amarelo. Raramente os corpos amarelos estavam amplamente distribuídos por todo o ovário.

3.3. Grau de desenvolvimento ovarioles

Um total de 1.345 *An. darlingi* e 1.003 *An. albitarsis* s.l. foram analisados, entre novembro de 2003 e julho de 2004, a fim de determinar o estágio de desenvolvimento ovarioles. Os dados não diferiram significativamente entre as espécies, como pode ser visualizado na Figura 5.1. Os estágios I e I-II foram calculados conjuntamente, uma vez que a diferenciação não era possível de forma consistente.

A maior parte das fêmeas das populações estudadas foram encontradas no estágio II, contribuindo com mais da metade do total para cada espécie, enquanto as contribuições para os estágios I e III foram quase iguais. Outros estágios raramente foram encontrados. Os dados diferem significativamente para ambas as espécies quando fêmeas paridas foram comparadas com as nulíparas: $\chi^2 = 9,63$; graus de liberdade [gl] = 2; $P < 0,05$ para *An. darlingi*; e $\chi^2 = 17,9$; gl = 2; $P < 0,001$ para *An. albitarsis* s.l.) Verificou-se ainda

que apenas 16,4% e 10,4% de fêmeas nulíparas de *An. darlingi* e *An. albitarsis* s.l., respectivamente, tinham seus ovários no estágio III ou acima. Nas mesmas condições, foram encontradas 21,0% e 20,3% de fêmeas paridas dessas espécies, respectivamente. Apenas uma fêmea de *An. albitarsis* s.l. (0,2%) foi coletada alimentando-se no estágio 7 de Sella, apresentando elevado número de ovos plenamente desenvolvidos (estágio V) em seus ovários.

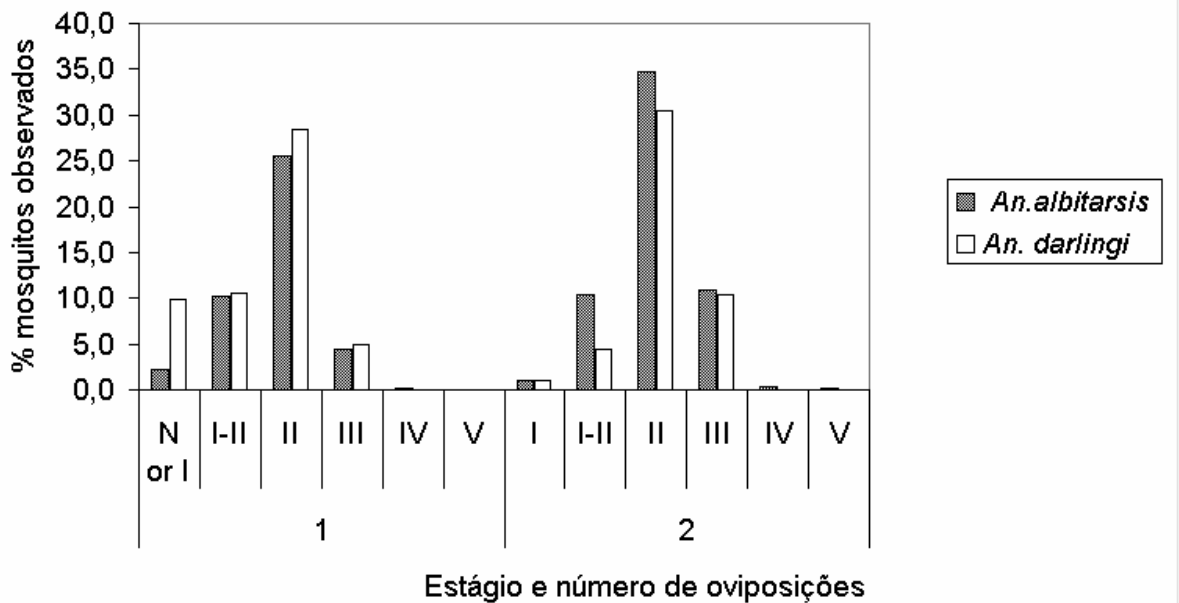


Figura 5.1: Representação gráfica dos estágios de desenvolvimento ovariano, relacionado ao estado de paridade, encontrado em 1345 *An. darlingi* e 1003 *An. albitarsis* s.l. provenientes de Rorainópolis e Boa Vista, respectivamente, coletados entre novembro de 2003 e julho de 2004.

3.4. Efeito da borrifação

A idade da população, com relação aos estágios de Christophers e número de oviposições, nas duas noites anteriores à borrifação (Figura 5.2) não diferiu das percentagens médias observadas na Figura 5.1. Nas duas noites após à borrifação, um acentuado declínio das fêmeas nulíparas nas áreas peri e extradomiciliares foi observado, contribuindo para quase a totalidade da redução observada no número de adultos (Figura 5.2).

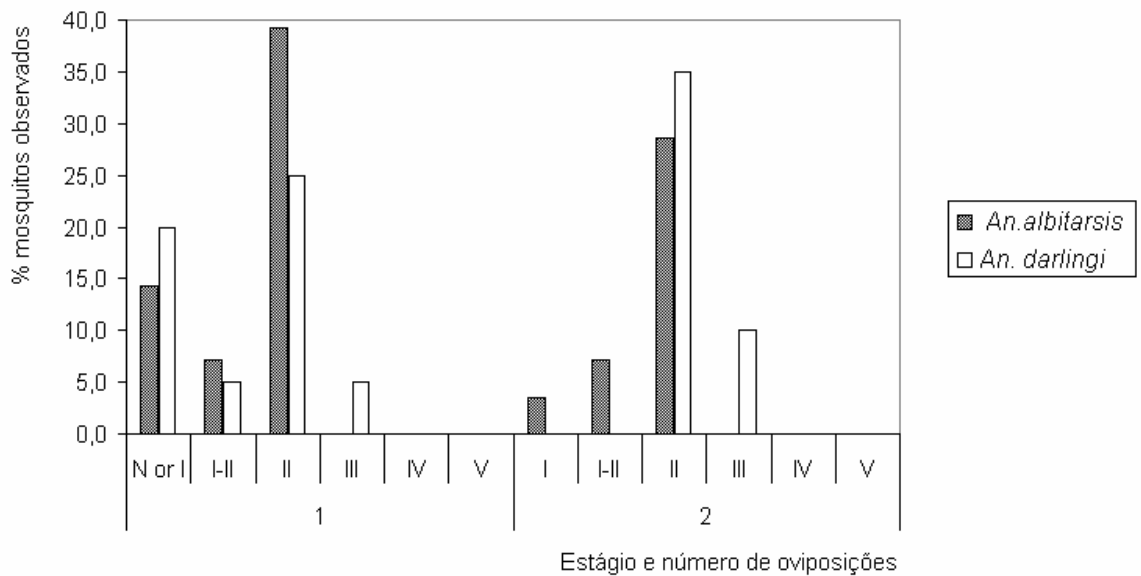


Figura 5.2: Representação gráfica dos estágios de desenvolvimento ovario lar em 20 fêmeas de *An. darlingi* e 28 fêmeas de *An. albitarsis* s.l., capturadas em dois dias antes do uso de Cipermetrina em uma residência localizada em Boa Vista.

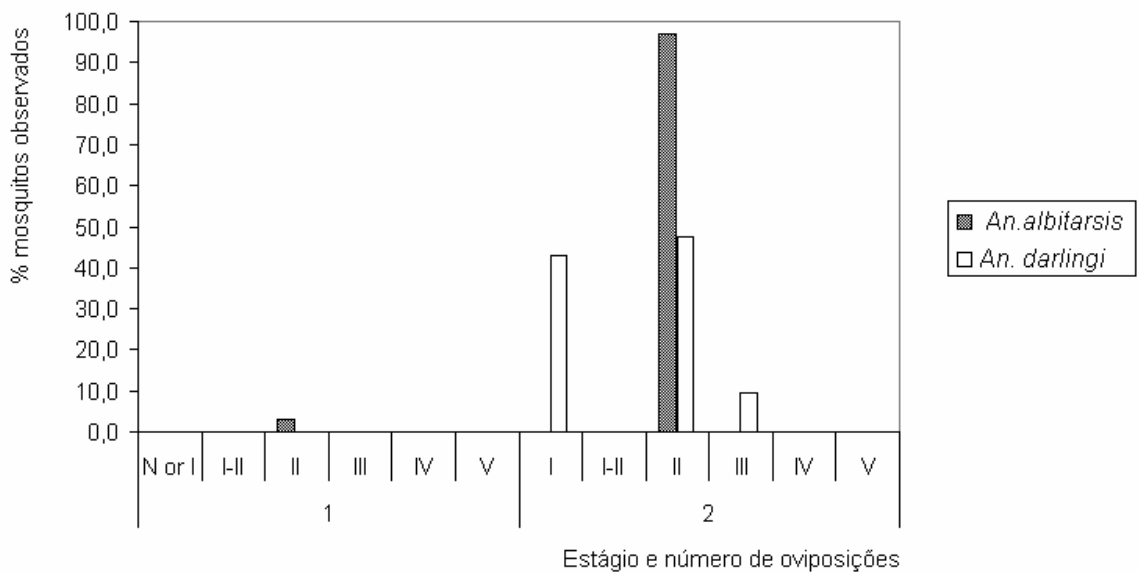


Figura 5.3: Representação gráfica dos estágios de desenvolvimento ovario lar em 21 fêmeas de *An. darlingi* e 32 fêmeas de *An. albitarsis* s.l., capturadas após o uso de Cipermetrina em uma residência localizada em Boa Vista.

3.5. Correção para flutuações no recrutamento diário e horário de alimentação sanguínea de acordo com a idade fisiológica

A correção de Garret-Jones foi usada em novembro de 2003, quando as altas densidades de mosquitos coletadas assim o permitiram. Foi estimada uma taxa de sobrevivência diária para *An. albitarsis* s.l. de 78%, similar aos dados não corrigidos

(descrito no Capítulo IV). Uma vez que um número considerável de fêmeas deve ser dissecado na mesma noite para realizar a correção, ela não pode ser repetida em outras estações do ano.

A paridade e o grau de desenvolvimento ovaríolar foram estudados em 211 *An. darlingi* e 149 fêmeas de *An. albitarsis* s.l. Eles diferiram de acordo com o horário de captura dos mosquitos, mostrado na Tabela 5.1. Em área de floresta, um número significativamente maior de fêmeas de *An. darlingi* mais velhas foram capturadas no período de 19 às 20 h ($\chi^2 = 20,00$; gl = 4; $P \ll 0,01$). As fêmeas desta amostra foram significativamente mais velhas que as capturadas em outros horários ($P \ll 0,001$). Para *An. albitarsis* s.l., ocorreu uma diferença significativa entre as proporções de paridas na primeira hora de captura e no resto da noite ($\chi^2 = 21,16$; gl = 2; $P \ll 0,001$). Esta divergência foi quase exclusivamente quanto à percentagem de fêmeas que depositaram ovos recentemente, ainda apresentando dilatações saculares nas porções terminais de seus ovaríolos. Enquanto este grupo representou apenas 14% das fêmeas na primeira hora, elas representaram 38% das capturadas nas horas seguintes.

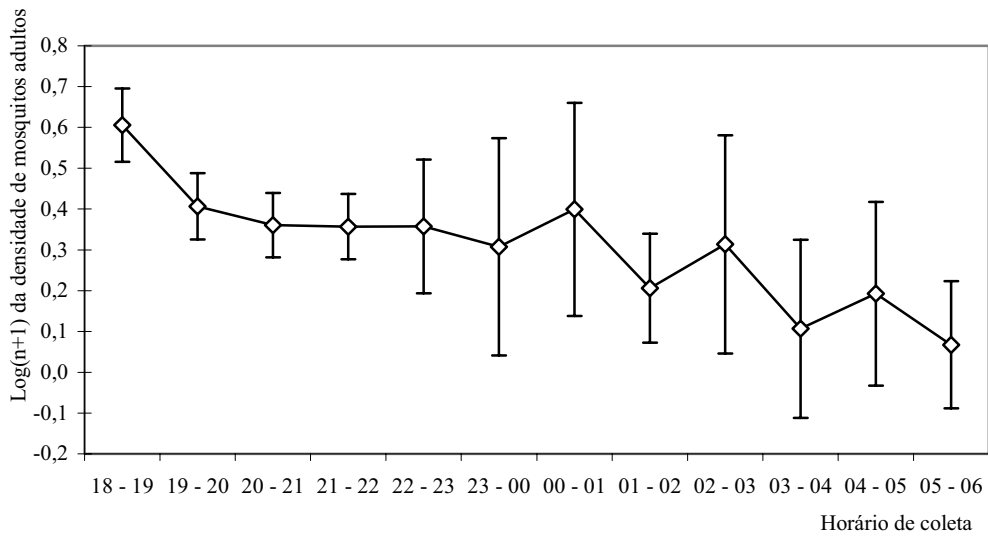
Tabela 5.1: Estado de paridade e desenvolvimento ovaríolar de *An. darlingi* (de Rorainópolis) e *An. albitarsis* s.l. (de Boa Vista) de acordo com o horário de picada em maio a julho de 2004

Paridade e estado de desenvolvimento ovaríolar	Horário de alimentação sanguínea				
	<i>An. darlingi</i> (N = 211)			<i>An. albitarsis</i> (N = 149)	
	18-19h	19-20h	20-06h	18-19h	19-06h
Nulíparas N a I-II	25	13	18	10	1
Nulíparas II a III	34	12	50	41	13
Paridas	16	24	19	35	49
Total	75	49	87	86	63

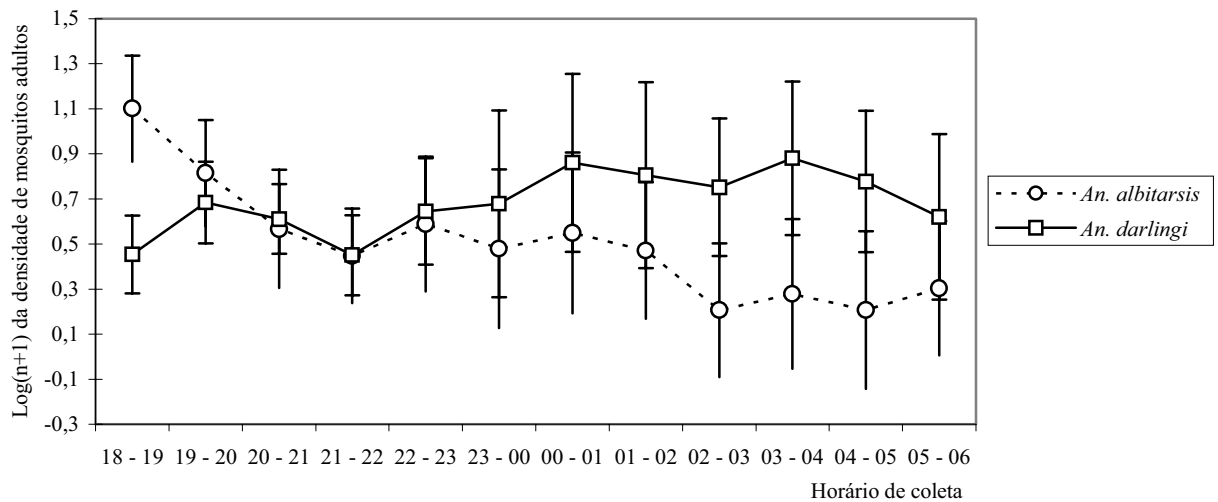
3.6. Densidades horárias de picada

Para a área da floresta, uma ANOVA do logaritmo das médias de picadas por hora de *An. darlingi* indicou um densidade significativamente maior ($F_{11;285} = 5,58$; $P \ll 0,001$) de mosquitos buscando alimentação nas primeiras horas, quando comparados com as horas mais tardias. As densidades médias de adultos por hora, com os intervalos de confiança de 95% (IC 95%), na estação seca, estão representadas na Figura 5.3. Na estação chuvosa, com a diminuição das densidades de *An. darlingi*, nenhum padrão foi identificado. Na savana, observamos maior atividade de picadas de *An. albitarsis* s.l. no início da noite, de acordo com a ANOVA ($F_{11;180} = 13,81$; $P \ll 0,001$). Nesta área, a curva de picadas de *An.*

darlingi apresentou três discretos picos: às 19 - 20 h, 0 - 1 h e 3 - 4 h. Estes picos foram significativamente diferentes dos valores no início da noite ($P < 0,05$).



A



B

Figura 5.4: Representação gráfica da média de picadas por mosquitos/homem/hora em 12 h de coleta peridomiciliar. *Anopheles darlingi* (linhas contínuas) foram provenientes de Rorainópolis (A) e Boa Vista (B). Os dados de Rorainópolis referem-se apenas à estação seca. *Anopheles albitalarsis* s.l. (linha pontilhada) foram capturados em Boa Vista. Nesta área, não houve variação sazonal.

3.7. Dissecções no dia seguinte

Houve diferença significativa nas idades fisiológicas do grupo de mosquitos dissecados na manhã seguinte, em comparação aos controles (Tabela 5.2). Os dados

referem-se a *An. albitarsis* s.l. proveniente da área de savana, mas o mesmo padrão foi verificado com *An. darlingi*. Os mosquitos dissecados a mais de seis horas da captura foram significativamente mais velhos ($\chi^2 = 34,33$; gl = 5; $P \ll 0,001$).

Tabela 5.2: Estado de paridade e desenvolvimento ovarioilar de *An. albitarsis* s.l. de Boa Vista de acordo com o tempo levado para dissecção, em novembro de 2003 e janeiro de 2004

Hora da dissecção	Nulíparas N a I-II	Nulíparas II	Nulíparas III	Paridas I-II	Paridas II	Paridas III ou mais	Total
Mesma noite (< 3hrs)	25	21	2	25	21	9	103
Manhã do dia seguinte (> 6hrs)	27	66	20	23	64	54	254

4. DISCUSSÃO

4.1. Retenção de ovos, ácaros hidracnídeos e corpos amarelos

Observamos índices de retenção de ovos e presença de corpos amarelos. Até onde sabemos, não existem relatos similares na literatura para essas espécies que permitam comparações. Observamos que a retenção de ovos, por si só, apresenta limitada sensibilidade para a determinação da presença de paridade. A utilidade da consideração dos ácaros hidracnídeos depende do comportamento da espécie em questão, devendo cada uma ser avaliada individualmente (Service, 1993). Uma vez que as ninfas de ácaros eram freqüentemente encontradas em mosquitos anofelinos em ambas as áreas de estudo, decidimos procurar sistematicamente esse fator nas fêmeas dissecadas das espécies pesquisadas. Como apenas um espécimen foi positivo, acreditamos que haja pouco valor na sua consideração para o monitoramento da história natural das espécies nas regiões estudadas.

Apesar do limitado conhecimento da causa ou significado das diferentes cores encontradas, a descoloração granular da gema degenerada, aqui chamada “corpos amarelos”, foi interpretada como indicador de degeneração folicular (Detinova 1962). A inadequada ingestão de sangue é considerada como a principal causa de degeneração folicular (Detinova 1962) e a ausência de desenvolvimento de ovos tem sido relacionada à ‘menor massa após as refeições sanguíneas’ em *An. albitarsis* s.l., mas à nuliparidade em *An. darlingi* (Lounibos et al. 1998). Estes últimos têm relatado que 6,6% de *An. darlingi* capturados no campo, mas 22,9% de nulíparas de *An. albitarsis* s.l. criados em laboratório, deixam de desenvolver ovos após uma alimentação de sangue.

A presença desses corpos foi avaliada porque postulamos que ela possa servir para estimar a taxa de ocorrência de degeneração folicular, e portanto de alimentações incompletas, numa dada espécie. A incidência de corpos amarelos em *An. darlingi* foi maior

que em *An. albitarsis* s.l. Essa condição pode estar relacionada aos hábitos alimentares de cada espécie. Uma alimentação sanguínea incompleta pode ser mais comum em espécies antropofílicas, como *An. darlingi*, que entre mosquitos mais zoofílicos, como *An. albitarsis* s.l. Além disso, também é possível que existam diferenças fisiológicas entre as espécies.

Uma vez que um repasto sanguíneo é necessária para a degeneração folicular, a ausência de fêmeas nulíparas abrindo corpos amarelos em nossa amostra sugere que a necessidade de mais de uma refeição sanguínea, pelo menos durante o primeiro ciclo gonotrófico, é um fato incomum. Contudo, a sensibilidade deste método para detectar a ocorrência de refeições anteriores é desconhecida, necessitando de mais estudos.

4.2. Estágio de desenvolvimento ovarioelar

Como inicialmente determinado por Mer e confirmado por vários pesquisadores, a lei da concordância gonotrófica aplica-se apenas a fêmeas cujos ovários estão no estágio II no momento da refeição de sangue (Detinova, 1962). Postulamos que, através da avaliação dos estágios de Christophers das populações adultas, poderíamos estimar e comparar as taxas de discordância gonotrófica verificadas entre essas espécies. Adicionalmente, poderíamos estimar as taxas de ocorrência de desenvolvimento autógeno dos ovários.

Como esperado, a maioria (em torno de 60%) dos mosquitos das populações em atividade de picar se encontrava no estágio II. O desenvolvimento inicial dos ovários ocorreria sem a necessidade de ingestão sanguínea e acredita-se que uma boa proporção das fêmeas nulíparas pode utilizar outra fonte de energia para o desenvolvimento inicial de seus ovos (Forattini, 1962). Os escassos dados disponíveis indicam que a alimentação de néctar é comum em fêmeas de *Nyssorhynchus*, incluindo *An. darlingi* (Senior-White, 1952; Pajot, 1975). Como sugerido por Charlwood (1980), ovários de *An. darlingi* em fêmeas que se alimentam apenas de açúcar poderiam até mesmo alcançar o estágio III. No entanto, Senior White (1955) relatou que 2% de *An. aquasalis* apresentaram estágios III a V e Lounibos et al. (1998) apontaram que apenas raramente esses estágios foram encontrados em *An. darlingi*.

Acredita-se que, sob circunstâncias normais, fêmeas nulíparas não desenvolverão ovários além do estágio II sem uma prévia refeição sanguínea (Detinova, 1962). Forattini et al. (1993), trabalhando com *Anopheles (Kerteszia)* utilizaram a prevalência significativamente mais alta de estágios III a V em fêmeas nulíparas, quando comparado às paridas, para concluir que uma fração da população em atividade de picar apresentava discordância gonotrófica e provavelmente iniciava a hematofagia bem antes da postura dos ovos. Nossos dados, ao contrário, mostram uma maior prevalência de estágios ovarioelares

mais avançados no grupo de paridas. A ocorrência de uma refeição sanguínea prévia por parte das fêmeas é indicada pela rara presença de estágios IV e V, demonstrando que a discordância gonotrófica é bastante incomum nas espécies analisadas.

Surpreendentemente, encontramos uma proporção relativamente pequena, embora constante, de ovários de fêmeas paridas nos estágios I ou I-II em ambas as espécies. É geralmente aceito que o segundo folículo nos ovariolos desenvolve-se, simultaneamente ao primeiro, no estágio II, ficando assim preparado para maior desenvolvimento, sem necessidade de alimentação suplementar, tal como no primeiro ciclo (Detinova 1962). Esta observação necessita ser validada e compreendida por estudos futuros.

4.3. Efeito de borrifação na casa e correção para flutuações no recrutamento diário

Possivelmente o principal efeito verificado no potencial de transmissão da malária após o tratamento das moradias com inseticidas residuais é secundário à redução da longevidade dos vetores (Wernsdorfer & McGregor, 1988). A resistência comportamental aos inseticidas é bem conhecida e poderia consistir de mudanças na biologia da espécie (Service, 1991), como a ausência de repouso intradomiciliar após o repasto sanguíneo (Rozendaal, 1989). Apesar de não termos estudado detalhadamente a existência de resistência comportamental nas populações de mosquitos analisadas, acreditamos que esta ocorra em certo grau, dada aos seguintes fatos: realiza-se a borrifação já há anos no local, embora irregularmente; há uma elevada taxa de picadas no peridomicílio; e raramente indivíduos são encontrados em repouso no intradomicílio.

O desaparecimento das fêmeas nulíparas da população sugere que elas devem ter mantido um maior contato inicial com o inseticida. Isso indica que possa ocorrer mudanças comportamentais conforme a idade do vetor e, possivelmente, haja uma relação deste fato com a resistência aos inseticidas. Concluímos que estudos analisando apenas a diminuição da densidade do vetor após o uso de inseticidas, não constatariam a manutenção da população anofélica fisiologicamente mais velha, responsável por dar continuidade à transmissão da malária. Os dados apresentados sugerem a ocorrência de seleção de uma parcela da população anofélica. No entanto, mais estudos são necessários para demonstrar a importância desta constatação e se há relação com o processo de resistência biológica.

A constatação desta alteração provocada pela borrifação implica na necessidade de, em estudos futuros envolvendo paridade, se relatar o tempo desde o último tratamento domiciliar nos locais analisados.

4.4. Flutuações no recrutamento, horário de alimentação sanguínea e densidades horárias

Os dados apresentados no Capítulo IV, não parecem ter sofrido variações na taxa de recrutamento de mosquitos.

Houve variação das curvas de atividade de picada de acordo com a região analisada. Isto tem sido previamente assinalado para *An. darlingi* no Brasil (Charlwood & Hayes, 1978; Rosa-Freitas et al., 1992), no Suriname (Rozendaal, 1987) e na Guiana Francesa (Pajot, 1977). Embora bem menos comum que a atividade unimodal nas horas avançadas da noite (Deane, 1948; Elliot, 1972; Charlwood & Hayes, 1978; Hudson, 1984), ou da bimodal (Tadei et al., 1983; Tadei et al., 1988a; Rosa-Freitas et al., 1992) o comportamento de picada predominante no início da noite não é raro, havendo vários relatos (Albuquerque, 1982; Rozendaal, 1987; Tadei, 1988a; Lourenço-de-Oliveira, 1989). Menos comum, o comportamento trimodal têm sido relatado na Amazônia brasileira (Rosa-Freitas et al., 1992) e na Guiana Francesa (Pajot, 1977). A presença de variabilidade genética não tem explicado os diversos padrões de atividade (Rosa-Freitas et al., 1992). Os fatores determinantes dessas atividades permanecem sem clara definição.

Para *An. albitarsis* l.s, na área de savana, apesar de haver uma densidade anofélica consideravelmente mais alta no período de 18 - 19 h que no de 19 - 20 h, a sistemática diferença no percentual de fêmeas paridas, faz com que haja um aporte semelhante destas em ambos os períodos. As diferenças na atividade horária também foram evidentes para *An. darlingi*. Observações similares, indicando preferências horárias de determinadas faixas etárias de *An. darlingi* foram relatadas por Charlwood & Wilkes (1979). Pelo que sabemos, nenhum estudo havia previamente demonstrado este fato em *An. albitarsis* s.l.

A grande maioria das fêmeas de anofelinos ovipõe nos períodos crepusculares (Russell & Rao 1942b). Para a área de savana, o encontro de maior percentual de fêmeas nulíparas no início da noite, após o qual aumentam a quantidade de fêmeas paridas apresentando dilatações saculares nas terminações ovariolares (o que indica oviposição recente), sugere que a maior parte dos indivíduos das espécies analisadas ovipõe no início da noite, antes da alimentação sanguínea.

Para a área de floresta, fêmeas paridas de *An. darlingi* predominaram no segundo horário. O pico de atividade crepuscular seria causado por adultos jovens. Pode ser sugerido que, durante o período chuvoso, a diminuição do recrutamento, como consequência da maior mortalidade larvária secundária ao efeito das enxurradas (Capítulo III) poderia levar ao desaparecimento do pico de atividade crepuscular. No entanto, isto não

é corroborado pelos estudos de longevidade, que sugerem uma diminuição percentual de paridas durante as chuvas.

4.5. Horário das dissecações

Finalmente, quando se pretende avaliar os estágios ovariolares, enfatizamos a necessidade da realização das observações ovarianas durante a mesma noite de coleta, ao contrário dos exames feitos na manhã seguinte. A não observação deste fato pode levar à perda de dados. Quando se analisa a relação entre idade e horário de picada com mosquitos dissecados no dia seguinte, nenhuma diferença é demonstrável. Não houve diferenças entre fêmeas mantidas com açúcar ou apenas com água.

Este estudo representa observações preliminares sobre os métodos usados para a realização de avaliações etárias em populações de mosquitos anofelinos na Amazônia. Esperamos que trabalhos futuros sobre este tema aprofundem o conhecimento do assunto, permitindo uma avaliação mais precisa dos fatores relacionados à transmissão da malária em áreas endêmicas.

Este capítulo, com pequenas modificações, será submetido ao *Journal of Medical Entomology*, com o título **Observations on Age Structure of Anopheline Mosquito Populations in the Northern Amazon**, tendo os seguintes autores: Fábio S. M. Barros; Mércia E. Arruda; Simão D. Vasconcelos; José F. Luitgards-Moura; Nildimar A. Honório & Ulisses E. C. Confalonieri.

CAPÍTULO VI: VARIAÇÃO SAZONAL DOS VETORES DA MALÁRIA: UM MODELO PARA ÁREAS COM PADRÕES DE DRENAGEM DISTINTOS NA AMAZÔNIA

1. INTRODUÇÃO

As práticas de agricultura e o garimpo, que produzem migrações consideráveis e o estabelecimento de assentamentos nas florestas estão entre as principais causas do aumento de casos de malária em muitos países da América Latina (Sawyer, 1987). A Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS/OMS) tem proposto, recentemente, estratégias de controle descentralizadas, específicas para cada foco de transmissão. Isto tem aumentado a necessidade de informação pormenorizada dos fatores influenciando a transmissão nas áreas de risco (Zimmerman & Berti, 1994; Casman & Dowlatabadi, 2002). O conhecimento das variações sazonais das espécies vetoras e sua relação com a estrutura geomorfológica da área de ocorrência são de importância primária na elaboração de estratégias de controle mais efetivas. Até agora, antecipações das exacerbações de transmissão da malária não têm sido possíveis devido ao limitado conhecimento de sua flutuação.

Dentro das 52 espécies de anofelinos encontradas no Brasil, *Anopheles darlingi* (Root), *An. albitarsis* sensu lato (s.l.) (Lynch-Arribalzaga), *An. cruzi* (Dyar & Knab), *An. bellator* (Dyar & Knab) e *An. homunculus* (Forattini, 1962) têm sido encontrados infectados por esporozoítos através da dissecação manual e testes imunológicos têm adicionalmente incriminado *An. triannulatus* (Neiva & Pinto), *An. nuneztovari* (Gabaldon), *An. oswaldoi* (Peryassu) e *An. deaneorum* (Rosa-Freitas) como vetores potenciais (Arruda et al., 1986; Rosa-Freitas, 1990). Apesar disto, apenas as seguintes espécies são reconhecidas como vetores epidemiologicamente importantes: *An. darlingi*, *An. albitarsis*, *An. oswaldoi*, *An. marajoara* (Galvão & Dasmaceno) e *An. deaneorum* (Póvoa et al., 2000; Silva-Vasconcelos et al., 2002). Dos acima citados, o mais importante vetor na maior parte da Amazônia é *An. darlingi* (Deane et al. 1988; Oliveira-Ferreira et al., 1990; Tadei et al., 1998; Tadei & Thatcher, 2000).

Ainda há uma considerável escassez de dados na literatura sobre os padrões sazonais de anofelinos amazônicos. O conhecimento de seus padrões de variação e os determinantes desta flutuação são ainda fragmentados. No Suriname, Rozendaal (1992) tentou correlacionar a pluviometria e os níveis dos rios com a abundância de adultos de *An. darlingi* e formulou a hipótese que os criadouros se tornam disponíveis conforme há queda

dos níveis fluviométricos e formação de poças. Apesar das correlações positivas entre a abundância de *An. darlingi*, o nível do rio e a pluviometria, os valores estatísticos não foram significativos. Em Rondônia, Klein & Lima (1990) correlacionaram a densidade de *An. darlingi* com aumentos no nível do rio Guaporé, embora valores de significância não tenham sido relatados. Nenhum estudo tem, até agora, explicado as discrepâncias observadas nas variações de densidade em relação ao nível dos rios.

Este trabalho é parte de um estudo mais amplo, que analisou a dinâmica de transmissão da malária em ecossistemas deste estado, floresta e savana. Aqui relatamos os métodos de detecção de esporozoítos empregados em anofelinos capturados em dois ecossistemas distintos do norte da Amazônia. Estudos prévios sugeriram diferenças entre as espécies vetoras responsáveis pela transmissão da malária em cada área de estudo. Para a região de floresta tropical *An. darlingi* é considerado o vetor mais importante, tal como na maior parte da Amazônia. No ecossistema de savana, *An. albitarsis* s.l. (Lynch-Arribálzaga) foi recentemente apontado como o vetor mais importante (Silva-Vasconcelos, 2002). Apresentamos dados sobre a variação sazonal de densidades de adultos, junto com a determinação de suas taxas de infecção plasmodial, que são combinados com estudos concomitantes de taxas de sobrevivência para a determinação das capacidades vetoriais. Adicionalmente, correlacionamos dados de pesquisas larvárias (do Capítulo III) para obtermos uma ampla visão da dinâmica populacional dos vetores da malária.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Locais de estudo

As áreas de estudo estão localizadas no Estado de Roraima, especificamente em Boa Vista, (02°49'N, 60°40'W) e Rorainópolis (00°51'N, 60°21'W) e foram descritos previamente (Capítulos III e IV). Faremos referência aqui a apenas alguns aspectos específicos. Os locais diferem geomorfologicamente. O primeiro local, na savana, está situado às margens do Rio Branco. Este rio apresenta diâmetro de 400-500 m no local avaliado. A área de até 1 km em torno de suas margens se torna parcialmente alagada na estação chuvosa. O segundo local, na floresta, consiste de terras ligeiramente mais elevadas e é atravessado pelo Igarapé Azul, um pequeno curso d'água com um diâmetro médio de 8 - 10 m. Representa um assentamento típico dos existentes na Amazônia, principalmente nas áreas onde a abertura de estradas propiciou a instalação de agrupamentos humanos. Nas regiões amazônicas em que não há estradas, os grandes rios são a principal via de acesso e onde se instala a população.

A malária é instável e hipoendêmica nestas regiões e é causada, quase que totalmente, por *Plasmodium vivax*.

2.2. Capturas de mosquitos adultos

Os estudos foram conduzidos sob a forma de campanhas bimestrais, de agosto de 2003 a julho de 2004, incluindo tanto estações chuvosas (maio a outubro) quanto estações secas (novembro a abril). O protocolo de coleta foi aprovado pelo comitê de ética da Fundação Osvaldo Cruz e foi descrito previamente (Capítulo IV). Os mosquitos foram identificados usando as chaves de Gorham et al. (1967) e Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994).

2.3. Infectividade por *Plasmodium*

Usamos o Vectest™ Malaria Sporozoite Antigen Panel Assay (Medical Analysis Systems, Camarillo, CA, U.S.A.) para detectar e distinguir as proteínas circumsporozoíticas (CS) de *Plasmodium falciparum*, *P. vivax* 210 e variante 247 (CS), como descrito por Ryan et al. (2001). Doze fêmeas de mosquitos da mesma espécie foram depositados em um tubo eppendorf; e 13 gotas de reagente específico foram adicionadas. Em seguida, os mosquitos foram macerados com a ajuda de uma ponteira de silicone. Uma fita de nitrocelulose contendo anticorpos monoclonais específicos para cada espécie de *Plasmodium* foi imersa no tubo contendo o macerado de mosquitos e a leitura óptica foi realizada após 15 minutos. Casos positivos foram retestados uma vez.

2.4. Capacidade vetorial dos transmissores da malária:

As variações sazonais da capacidade vetorial (CV) foram determinadas para os vetores mais importantes em cada área. A seguinte fórmula foi utilizada: $CV = \frac{ma^2 p^n}{-\ln(p)}$,

onde ma = a densidade de mosquitos picando o homem; a = a percentagem de mosquitos, de uma determinada espécie, que ataca o homem, o que é indiretamente determinada pelo índice de mosquitos com sangue humano (HBI) dividido pela duração do ciclo gonotrófico; p = probabilidade diária de sobrevivência da população; e n = o tempo de maturação do parasito no mosquito (WHO, 2002).

O valor de ma foi medido diretamente. As taxas de sobrevivência diária foram estimadas por $p = \sqrt[x]{\%paridas}$, onde x = a duração do ciclo gonotrófico em dias (Davidson & Draper, 1953). Este último parâmetro foi estimado como descrito em Charlwood (1980), Charlwood & Alecrim (1989) e Charlwood (1997).

Mosquitos em repouso foram coletados durante seu repouso na vegetação com auxílio de um aspirador elétrico em um raio de 500 m em um raio de 500m ao redor das habitações humanas. No entanto, o pequeno número de indivíduos obtidos impediu o cálculo do HBI. Dados experimentais foram obtidos por Deane et al. (1949), que verificaram a preferência alimentar de *An. darlingi* numa gaiola, sob condições de laboratório, através de comparação das densidades picando o homem com boi, cavalo, carneiro, porco, galinha, cão e gato. As espécies de animais utilizadas neste estudo correspondem às mesmas presentes em nossas áreas de coleta, conforme foi determinado por um censo de animais domésticos. No entanto, a extrapolação pode ser imprecisa, pois variações nas densidades dos animais não foram levadas em consideração. Como não houve modificação nas taxas de animais domésticos existentes nos locais de estudo, o HBI foi considerado constante durante todo o período de pesquisa. Portanto foi assumido que o valor de a , é constante. Para *An. albiparvus* s.l., valores de a médios foram obtidos de Rubio-Palis (1994) e também considerados constantes.

A duração do ciclo esporogônico (n) foi estimada pelo método de Moshkovsky (WHO, 1975). A duração, em dias, para o desenvolvimento de *P. vivax* no mosquito é calculado pela divisão de 105 pelo número de graus, da temperatura média diária, que excedem 14,5°C. O cálculo foi realizado para cada um dos diferentes períodos do ano.

2.5. Nível dos rios e variáveis meteorológicas (temperatura, umidade relativa e pluviometria)

Os dados meteorológicos para Boa Vista foram obtidos de uma estação localizada a 9,6 km do local de estudo. A temperatura e umidade relativas foram monitoradas no campo. As variações dos níveis dos rios foram monitoradas com auxílio de um bastão milimetrado fixo. Na área de pequeno rio, um pluviômetro foi instalado. Variações ao longo do ano de temperatura e umidade relativa são demonstradas na Figura 6.1. A pluviometria apresentou boa correlação com as médias nos últimos dez anos obtidas pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) ($r = 0,75$; $P < 0,01$).

2.6. Incidência de malária

Foi determinada a variação nas notificações de malária em cada área de estudo. Dados para a Vicinal 19 foram extraídos dos casos registrados pelas equipes de controle locais. As notificações de Boa Vista foram obtidas do sistema de notificação governamental. Para esta área, os casos de todo o município foram utilizados, já que a malária estava ocorrendo em níveis muito baixos durante o período de estudo. Além disso,

havia um alto índice de subnotificação nos dados oficiais, principalmente devido às mudanças ocorridas no sistema de análise de dados de malária, em 2003.

2.7. Análise

Para a comparação das densidades de mosquitos adultos capturados em cada estação, foi realizada uma análise de variância (ANOVA). Correlação linear simples foi utilizada para a associação de densidades anofélicas com os dados ambientais.

3. RESULTADOS

3.1. Vetores da malária

Os 13.037 mosquitos adultos capturados pertenciam a nove espécies. *Anopheles darlingi*, *An. albitarsis* s.l., *An. evansae* (Brèthes), *An. triannulatus* e *An. nuneztovari* foram encontrados tanto na área do Rio Branco quanto na área do Igarapé Azul. *Anopheles braziliensis* (Chagas) esteve limitado à savana e *Chagasia sp*, *An. mediopunctatus* (Theoblad) e *An. oswaldoi* foram encontrados apenas na área de floresta. As espécies mais comuns nas áreas de savana e floresta foram *An. albitarsis* s.l. e *An. darlingi*, respectivamente.

Um total de 11.625 adultos foram analisados pelo Vectest™ (Tabela 6.1). Diante dos baixos índices de transmissão na área, detectamos infecção pelo *P. vivax* em apenas cinco espécimens de *An. albitarsis* s.l. Não foi possível demonstrar padrão sazonal das taxas de inoculação entomológicas (EIR). Esta taxa, para *An. albitarsis* s.l. em julho, foi de 0,20%. Considerando a densidade desta espécie neste mês, a taxa de picadas infectantes seria 0,386/homem/noite e 11,60 picadas infectantes/homem durante todo o mês de julho.

Tabela 6.1: Resultados do Vectest™ para os mosquitos capturados em agosto de 2003 a julho de 2004

	Floresta (área de pequeno rio)		Savana (área de grande rio)		Total testado
	Nº testado	Nº +	Nº Testado	Nº +	
<i>An. darlingi</i>	1.841	0	1.669	0	3.510
<i>An. albitarsis</i> s.l.	380	0	7.466	5*	7.846
<i>An. nuneztovari</i>	92	0	81	0	173
<i>An. triannulatus</i>	25	0	71	0	96
Total	2.338		9.287		11.625

*todos os espécimens positivos foram coletados em julho de 2004

3.2. Variações nas densidades de *An. darlingi* e *An. albitarsis* s.l.

As flutuações nas densidades de *An. darlingi* e *An. albitarsis* s.l., na área de grande rio, e desta última espécie na área de pequeno rio é demonstrada na Figura 6.1. Uma ANOVA do logaritmo das densidades demonstrou significativa variação para *An. darlingi* nas duas áreas ($F_{5;42} = 18,63$; $P < 0,001$, e $F_{5;293} = 5,20$; $P < 0,001$, respectivamente). O mesmo resultado foi obtido com *An. albitarsis* s.l. Apesar de ser a espécie predominante na savana, esta espécie foi capturada na floresta em densidades demasiadamente baixas para tecer considerações sobre sua sazonalidade.

Os números de *An. darlingi* foram mais elevados durante o final da estação seca na área de pequeno rio. No entanto, na área de grande rio, o pico se deu no final da estação chuvosa. Enquanto na primeira área a densidade foi inversamente correlacionada à pluviometria mensal e o nível dos rios ($r = -0,88$ e $r = -0,84$, respectivamente; ambos $P < 0,05$), na área de grande rio, uma correlação positiva era aparente tanto para *An. darlingi* ($r = 0,95$ e $r = 0,92$; ambos $P < 0,05$), quanto *An. albitarsis* l.s ($r = 0,95$ e $r = 0,89$; ambos $P < 0,05$). Considerando-se o grau de chuvas (*degree of wetness*), definido como $\frac{\text{No. dias com chuva/mes} \times \text{pluviometria total}}{\text{No. dias no mes}}$, não houve mudança nas correlações.

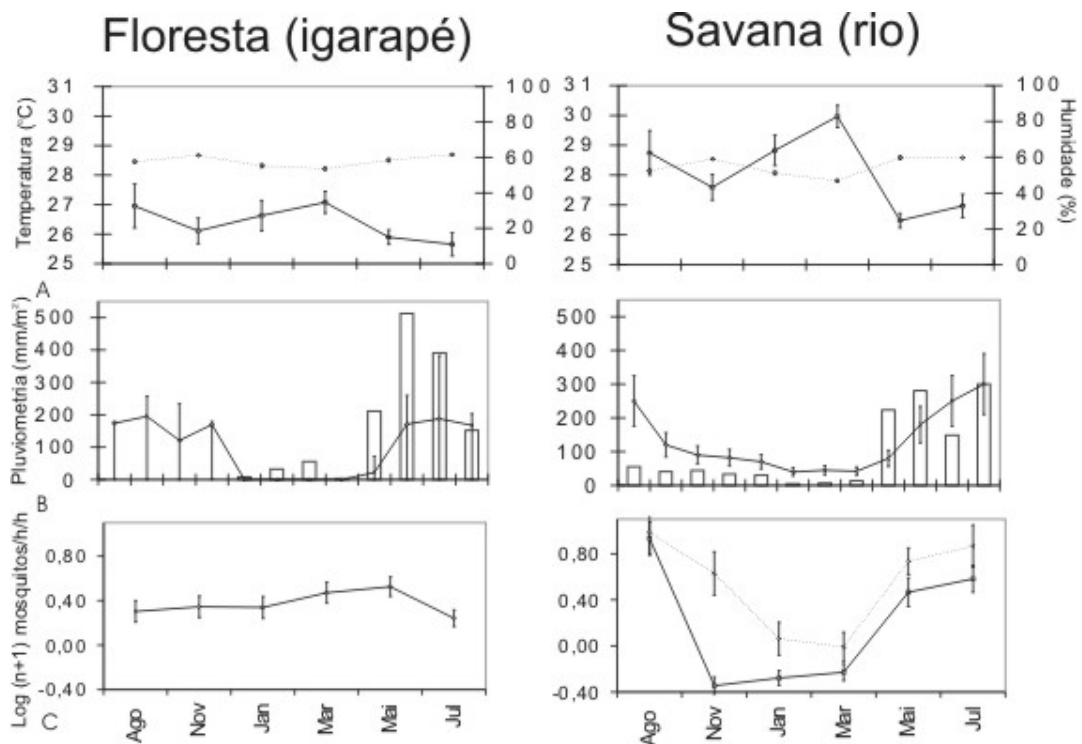


Figura 6.1: Umidade (linha pontilhada) e temperatura (linha contínua) médias na área de pequeno rio (esquerda) e grande rio (direita) durante os períodos de coleta (Figura 6.1a). A Figura 6.1b demonstra os dados de pluviometria (barras) e nível dos rios (linhas). Este último parâmetro é anumérico e representa as variações do Igarapé Azul (esquerda) e do Rio Branco (direita). Alguns dados pluviométricos de Rorainópolis estão ausentes. O Log(n+1) das médias de adultos de *An. darlingi* (linha contínua) e *An. albitarsis s.l.* (linha pontilhada) são demonstrados na Figura 6.1c. As linhas verticais indicam os intervalos de confiança de 95%.

3.3. Variação das capacidades vetoriais e incidência de malária

Os valores de ma e p são demonstrados na Tabela 6.2 para as duas áreas. As durações dos ciclos esporogônicos (n) são também descritas e valores muito similares foram obtidas em ambas as localidades.

A duração dos ciclos gonotróficos foi determinada uma única vez, no início da estação chuvosa, e foi considerada constante durante o ano. Os valores foram de 2,15-2,38 para *An. albitarsis s.l.* e *An. darlingi* na savana, e 2,67 para esta última espécie na floresta. O HBI relatado por Rachou (1958) para *An. darlingi* foi 45,7%, que produz um $\alpha = 0,171$. Estimativas médias de 28,3% foram obtidas de Rubio-Palis (1994) para *An. albitarsis s.l.*

Tabela 6.2: Densidade de picada médias ($m\alpha$) para *An. darlingi* e *An. albitarsis* s.l. e taxas de sobrevivência (p), calculadas pela taxa de paridade de Davidson. As durações dos ciclos esporogônicos (n) em cada período também são descritas e foram iguais em ambas as localidades estudadas

	$m\alpha$ (densidade de picada) para <i>An. darlingi</i> (média/homem/noite)	p	$m\alpha$ (densidade de picada) para <i>An. albitarsis</i> s.l. (média/homem/noite)	p	n
Nov (estação chuvosa)	34,13	0,631	176,96	0,781	7,343
Jan (estação seca)	45,02	0,919	33,30	0,737	7,292
Mar (estação seca)	36,18	0,762	21,48	0,838	7,241
Mai (estação seca)	47,66	0,812	61,08	0,856	8,678
Jul (estação chuvosa)	26,38	0,618	193,42	0,805	9,130

As variações na CV dos vetores estão demonstradas na Figura 6.2. A ausência de medição direta do HBI pode ter afetado os índices absolutos demonstrados. As espécies que ocorreram em valores muito baixos durante uma parte do ano não puderam ter a CV avaliada durante toda a pesquisa e não são demonstradas. Na área de pequeno rio, apenas *An. darlingi* foi considerado, enquanto na área de grande rio, as CV foram determinadas anualmente apenas para *An. albitarsis* s.l. No entanto, nesta última área, as variações de dinâmica populacional de *An. darlingi* seguiram o mesmo padrão de *An. albitarsis* s.l.

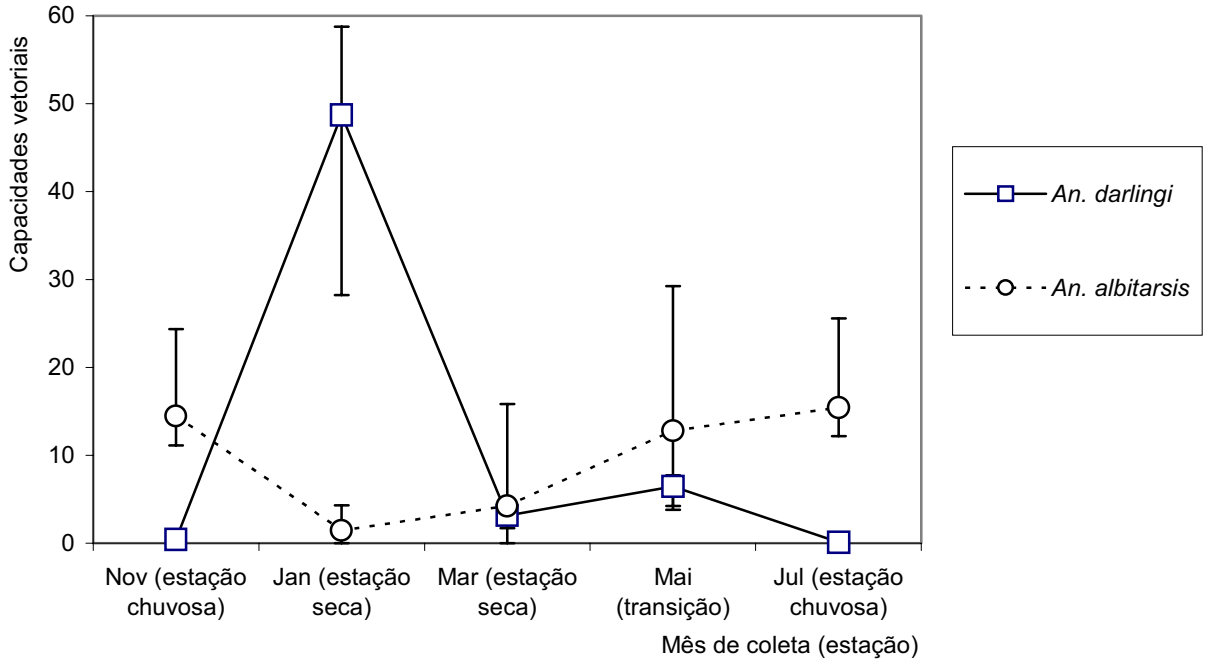


Figura 6.2: Variações nas capacidades vetoriais de *An. darlingi* (linha contínua) e *An. albitarsis* s.l. (linha pontilhada) capturados nas áreas e pequeno e grande rios, respectivamente. Os intervalos de confiança de 95% são demonstrados e refletem variações nas densidades médias dos vetores.

A incidência de malária nas áreas de estudo é demonstrada na Figura 6.3.

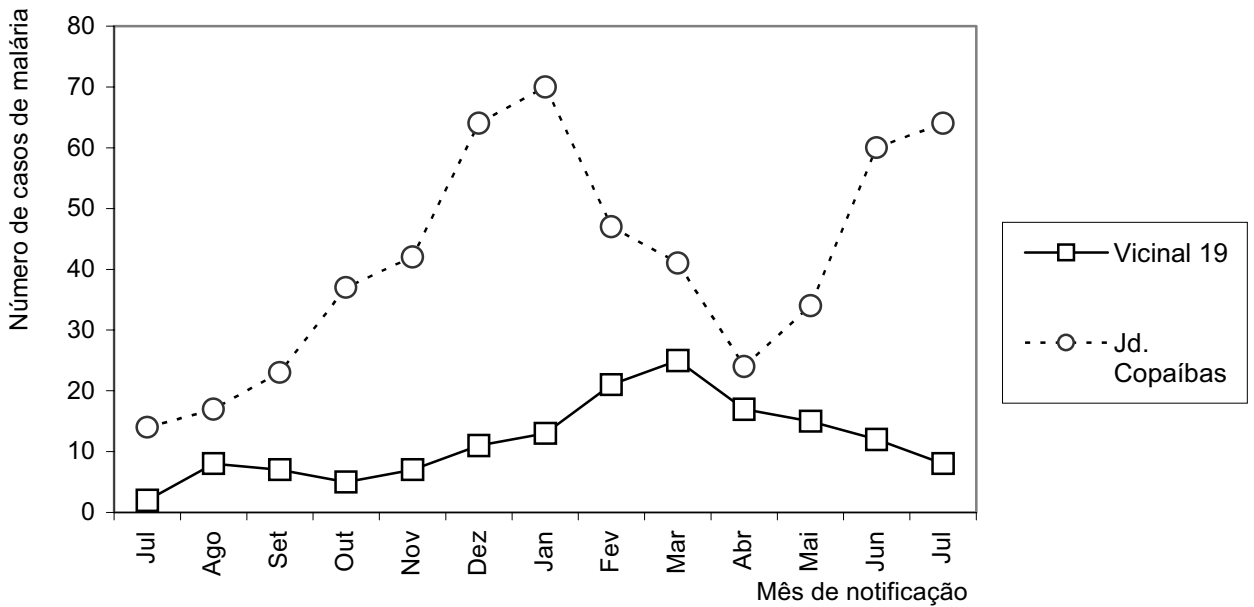


Figura 6.3: Casos de malária na Vicinal 19 de Rorainópolis (linha contínua), a área de pequeno rio, e em Boa Vista (linha pontilhada), de julho de 2003 a julho de 2004. O *P. vivax* foi responsável por quase a totalidade dos casos. (Fonte: registros das equipes de microscopia em Rorainópolis.)

4. DISCUSSÃO

4.1. Vetores da malária

O Vectest tem sido extensivamente avaliado e apresenta sensibilidade e especificidade de 92% e 98%, respectivamente, quando comparado com o *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) padrão (Ryan et al. 2002).

A baixa transmissão de malária nas áreas de estudo (índices esplênicos abaixo de 3%) provavelmente explica a ausência de mosquitos infectados durante a maioria (83%) das amostragens. Além disso, a ausência de *An. darlingi* infectado pode ser devido ao número relativamente reduzido de espécimens avaliados. O achado de *An. albitarsis* s.l. infectado e as altas taxas de inoculação entomológicas encontradas sugerem significativo papel deste vetor na área de savana, como já demonstrado por Silva-Vasconcelos, 2002.

4.2. Padrões sazonais das densidades de *An. darlingi*

Na literatura, não há descrição de um padrão uniforme de abundância sazonal de *An. darlingi*. Hayes & Charlwood (1979) relataram picos durante as estações secas em uma área de terras elevadas no norte do Estado do Amazonas. Fleming (dados não publicados, In Rozendaal, 1992) e Rozendaal (1987) relataram observações semelhantes em uma área cortada pelo pequeno rio Gran, no Suriname, além de outras áreas nas cabeceiras do Rio Suriname. Forattini (1987) também relatou picos durante as estações secas e quentes, além dos períodos de chuvas excessivas em São Paulo. Souza-Santos (2002) relatou aumentos de *An. darlingi* no final da seca em Machadinho d'Oeste, Rondônia, uma área cortada pelo pequeno Rio Marmelos.

Klein & Lima (1990), trabalhando em Costa Marques, Rondônia, relataram picos de *An. darlingi* durante as estações chuvosas, associados com os aumentos no nível do Rio Guaporé, com 200 a 500 m. Charlwood (1980), no Mato Grosso, relatou também picos durante as chuvas, devido às enchentes do Rio Aripuanã, com cerca de 50 a 80 m de largura. Há relatos de aumentos na reprodução de *An. darlingi* e da transmissão da malária associados ao nível dos Rios Negro e Solimões (W. Tadei, comunicação pessoal). É um procedimento de rotina monitorar o aumento dos níveis desses rios como forma de prever a ocorrência de epidemias de malária em Manaus e seus arredores. Mas em área de colônia agrícola, como Ariquemes-RO, ao longo da BR-364, Tadei (1988a) demonstrou aumento nas quantidades de larvas e adultos durante a estação seca, com queda após o início das chuvas. O mesmo pode ser constatado avaliando os dados de Albuquerque (1982), na rodovia BR - 174 (Manaus - Boa Vista) no norte do Amazonas, e por Silva (1975) nas áreas agrícolas de Santa Luzia-MA.

A altura do Rio Amazonas foi relacionada à prevalência da malária no departamento peruano de Loreto: os níveis mais altos e mais baixos do rio precedem os maiores e os mais baixos índices de prevalência da malária em dois meses (Guarda et al., 1999). No grande Rio Marowijne (Suriname), picos de densidade de *An. darlingi* ocorreram de forma diferente ao longo do ano (Rozendaal, 1987). Enquanto em algumas áreas mais perto da foz os picos ocorreram na estação seca, em outras, ocorreu durante as chuvas.

Embora sem estudos larvários ou de sobrevivência, Gil et al. (2003), analisaram a variação da fauna anofélica em dois assentamentos no Estado de Rondônia: um nas margens do grande Rio Madeira e o outro nas margens do pequeno rio Preto. Por seis anos consecutivos (1994–2000) foi documentado que na área de grande rio as densidades de *An. darlingi* atingiam seu pico no ápice da estação chuvosa, enquanto na área de terras mais elevadas, o pico ocorria na estação seca. O aumento da densidade de mosquitos adultos coincidiu com a incidência de malária. Estratégias de controle direcionadas especificamente para cada local causaram reduções significativas na incidência de malária (Camargo, 2004).

Dias (2003) analisou dados sobre vastas áreas do Estado de Roraima durante um período de 11 anos (de 1985 a 1996). Picos bimodais de transmissão de malária foram relatados. Aumentos nas notificações foram observados com o início das chuvas (abril-maio) e aumentavam gradativamente até o final da estação chuvosa, quando então declinavam. Percebia-se, então, uma segunda onda, quando as incidências aumentavam gradualmente desde o início da estação chuvosa e atingiam seu máximo nos meses mais secos, como dezembro. Acreditamos que estes dois padrões reflitam a ocorrência de malária nas áreas, com os dois tipos de drenagem descritas acima.

Neste trabalho relatamos diferentes padrões sazonais de densidades anofélicas e malária que dependeram do sistema de drenagem de cada área. Nossos resultados ajudam a explicar a variação demonstrada na literatura. Os resultados são esquematizados na Figura 6.4.

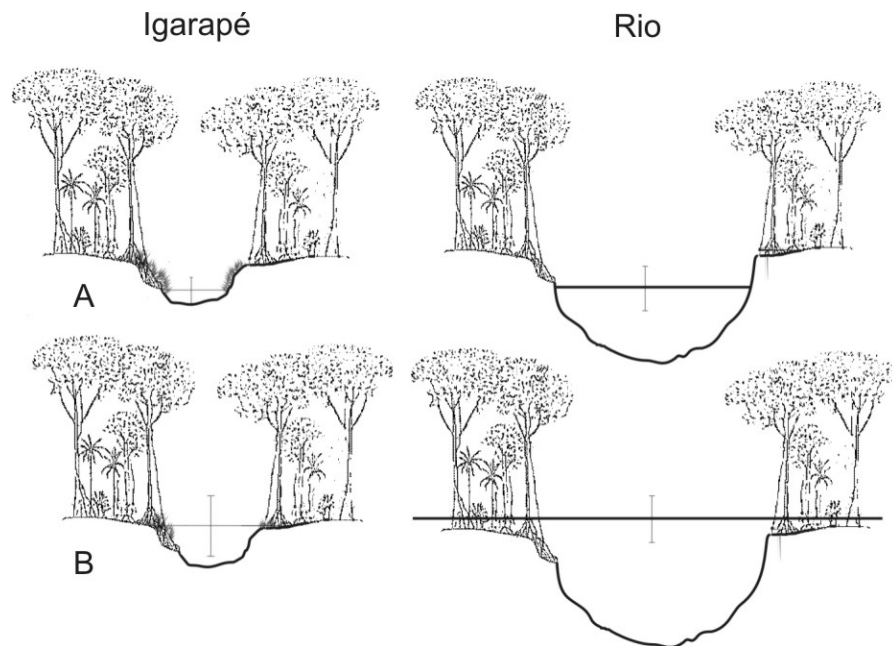


Figura 6.4: Um modelo para o entendimento da sazonalidade da malária em duas áreas com sistemas de drenagem distintos. O diagrama superior (A) representa a situação durante a estação seca e o inferior a estação chuvosa. A explicação é dada no texto.

Na área de pequenos rios temporários, típicos de regiões que foram colonizadas a partir da construção de estradas, como o sudoeste de Roraima e a maior parte de Rondônia, as populações de *An. darlingi* aumentariam durante a estação seca (Figura 6.4a), principalmente quando cessa o fluxo hídrico dos pequenos rios (como demonstrado no Capítulo III). As densidades máximas são atingidas no final da estação seca (Figura 6.1c). Quando se iniciam as chuvas (Figura 6.4b), os temporais provocam fortes enxurradas e ocorrem lavagem e morte das larvas (como descrito no Capítulo III). A colonização dos pequenos rios pelos mosquitos pode ser primeiramente percebida nas zonas de transição entre áreas florestadas e não-florestadas, onde toras de árvores caídas causariam significativa obstrução do fluxo d'água. Logo após o início das chuvas, as populações diminuiriam. Em nossas áreas de estudo, durante o período de chuvas as larvas praticamente só eram encontradas em coleções hídricas construídas para a criação de peixes, mantendo a transmissão de malária durante todo o ano.

Na área de grandes rios, mais baixas e alagadiças, típicas no Estado do Amazonas e no leste de Roraima, onde não existem estradas, durante a estação seca os criadouros são limitados a áreas protegidas de suas margens e locais de desembocaduras de outros rios (Barros et al., dados não apresentados). Mesmo quando ocorrem secas muito prolongadas e o fluxo do rio cessa, não ocorre reprodução de *An. darlingi* nas poças formadas, pois estas se localizariam no centro, não sombreado, do leito (Rozendaal, 1990). As populações de mosquitos vetores aumentam com o alagamento provocado pelas

chuvas (Figura 6.4b). As densidades máximas são atingidas no final da estação chuvosa, quando as populações atingem níveis muito altos. A coleção hídrica grande representa o somatório das aflúências de inúmeros pequenos rios e seus níveis apresentam muito mais estabilidade que estes últimos. Quando termina a estação chuvosa e os níveis dos rios voltam a baixar, a área de ocorrência de mosquitos retrocede em direção ao leito. Este modelo explica a maior parte da literatura disponível sobre a sazonalidade de vetores da malária.

4.3. Padrões sazonais na capacidade vetorial dos transmissores da malária

Além das variações nas densidades, descritas acima, a capacidade vetorial também sofre influência das taxas de sobrevivência.

A capacidade vetorial não representa um valor absoluto, mas um índice para a comparação da importância dos vetores. Dye (1992) demonstrou que não é necessária a medição de todos os componentes do índice. O importante é identificar qual é o componente chave que produz variação em cada situação. Tem sido demonstrado que estes fatores chave podem variar, em um mesmo local, dependendo da espécie (Rubio-Palis, 1994).

Chuvas torrenciais poderiam danificar mosquitos adultos (W. Tadei, comunicação pessoal) e justificam a diminuição nas taxas de sobrevivência observadas durante o período de chuvas. As variações na sobrevivência das espécies são conhecidas por causarem um profundo efeito sobre a capacidade vetorial, sendo muito mais importantes que as variações de densidades para as estratégias de controle (WHO, 2002). A importância relativa entre a diminuição das taxas de sobrevivência e as variações na densidade podem ser determinadas pelo cálculo da capacidade vetorial.

Houve uma variação de três ordens de magnitude na capacidade vetorial de *An. darlingi* na área de pequeno rio. Aproximadamente 97% desta mudança foi devido a aumentos na longevidade, ao contrário de variações nas densidades de picadas. Na área de grande rio, a variação de duas ordens de magnitude na capacidade vetorial de *An. albitalarsis* s.l. foi explicada na sua maior parte (60%) pelas mudanças na densidade. A longevidade variou pouco neste meio, possivelmente porque as chuvas nesta área eram pouco mais fracas que na área de pequeno rio mais ao sul.

Os resultados sugerem que, sob as condições tropicais encontradas na Amazônia, diferentes fatores limitantes podem estar atuando sobre a capacidade vetorial dos mosquitos. Onde ocorrem chuvas muito fortes, a longevidade pode apresentar papel primordial. Em locais onde extensas áreas são alagadas no período de chuvas e as quedas

d'água são menos severas, as densidades podem ser mais determinantes. A consideração do HBI poderia adicionar ainda mais variação a este quadro. A ausência de medidas diretas deste fator impedem a consideração dos valores absolutos para comparação com outros locais.

Os resultados apresentados aqui são baseados, principalmente, nos dados coletados durante o trabalho de campo realizado pelo nosso grupo em Roraima. Estudos futuros são necessários em outras regiões. Diferenças locais relacionadas ao grau de inclinação da margem do rio, e à presença de vegetação podem ser particularmente importantes para a determinação da presença de criadouros de mosquitos. Estudos sobre estes aspectos particularmente beneficiariam as estratégias de controle e os modelos de predição de malária.

Este capítulo, com pequenas modificações, será submetido ao *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, com o título **Seasonal variation of malaria vectors, with notes on their *Plasmodium* Infectivity: a model for areas with diverging drainage patterns in the Amazon**, tendo os seguintes autores: Fábio S. M. Barros; Wanderly P. Tadei; Mércia E. Arruda; Simão D. Vasconcelos; José F. Luitgards-Moura; Nildimar A. Honório & Ulisses E. C. Confalonieri.

CAPÍTULO VII: INFECÇÃO POR TETRAHIMENÍDEOS EM POPULAÇÕES DE MOSQUITOS DE UMA REGIÃO ENDÊMICA PARA MALÁRIA

1. INTRODUÇÃO

A malária é uma das principais causas de morbimortalidade no Brasil. Para a elaboração de estratégias de controle mais precisas, se faz importante um bom conhecimento da dinâmica das populações de mosquitos vetores, bem como de seus inimigos naturais.

Dentro dos variados parasitas de mosquitos existentes, desde o primeiro relato de *Lambornella stegomyiae* infectando larvas, em 1921 (Arshad & Sulaiman, 1995), apenas poucas espécies de protozoários ciliados têm sido demonstradas infectando mosquitos. A falta de estudos se referindo a este grupo de parasitos tem limitado o conhecimento sobre seu papel em regular as populações de mosquitos. Em uma região pouco estudada como a Amazônia, onde diversas espécies de Culicidae são encontradas envolvidas no ciclo de infecção da malária, é esperado que ainda hajam vários patógenos a serem descobertos, alguns dos quais com potencial como agente de controle biológico, que deve ser estudado.

Neste artigo, baseado em estudos de campo realizados em Roraima, no Norte da Amazônia, relatamos a presença de um protozoário ciliado encontrado infectando os ovários de Culicidae adultos e dispersos por sua hemolinfa. Baseado em sua morfologia geral e alguns caracteres distintivos visíveis, nós classificamos o ciliado à Ordem Tetrahymenida, Família Tetrahymenidae, como definidas por Corliss (1973). Apresentamos as observações iniciais sobre a identificação e ocorrência sazonal em formas adultas e imaturas de mosquitos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Local de Estudo

Roraima, o estado mais setentrional do Brasil, apresenta uma diversidade de ecossistemas, desde florestas tropicais densas, ao sul e oeste, a savana na região nordeste. Este estudo foi realizado na Vicinal 19 de Rorainópolis (00°51'N, 60°21'W), um assentamento agrícola recente, localizado em meio à densa floresta tropical do sul de Roraima. As casas são dispostas ao longo de uma estrada secundária que penetra a floresta. As residências escolhidas para a realização do estudo localizavam-se nos

arredores de barragens, construídas para a piscicultura, uma prática comum nos assentamentos desta área.

2.2. Amostragem

Coletas bimestrais de anofelinos adultos foram realizadas desde Agosto, 2003, a Julho, 2004, compreendendo tanto a estação chuvosa (maio a outubro), quanto a seca (novembro a abril). Os mosquitos adultos foram coletados em isca humana. As disseções das fêmeas, para a determinação etária, era realizada como descrito anteriormente (Capítulo IV). Intensas pesquisas larvárias foram realizadas na floresta, permitindo a determinação das taxas de infecção larvária e os locais onde ocorriam infecção por protozoários ciliados. Todos os principais criadouros de anofelinos em uma área de 7,6 x 0,5 km adjacente às residências foram mapeados e identificados. A maior parte das coleções hídricas pequenas também foram amostradas em todas as excursões de coleta. Usando conchas larvárias padrão (500 mL), um mínimo de 60 e máximo de 240 amostras foram coletadas em cada criadouro, segundo o tamanho da coleção hídrica. Criadouros artificiais contendo larvas de Culicidae foram mapeados e amostrados ocasionalmente. As larvas e pupas foram levadas ao laboratório, em água dos criadouros, para identificação e disseção. Quando possível, pupas e larvas de primeiro e segundo estágios foram mantidas em cultura para identificação. O protozoário foi corados com azul de metileno para melhor visualização. Para a comparação de densidades larvárias de locais positivos para tetrahimenídeos contra locais negativos, foi usado análise de variância (ANOVA).

3. RESULTADOS

Em novembro de 2003, durante disseções de mosquitos, verificamos a presença de elevados números de um protozoário ciliado tetrahimenídeo (Tabela 7.1) na hemolinfa de fêmeas adultas de *Anopheles darlingi*. Infecções subseqüentes foram encontradas em outras espécies de mosquitos do local, mas dados longitudinais foram mantidos somente para *An. darlingi*, já que foi a única espécie coletada em número suficiente para permitir o monitoramento de suas taxas de infecção ao longo do ano. Os protozoários possuem um corpo ovalado com 60 x 40 µm, com uma extremidade pontiaguda ou ligeiramente arredondada que apresenta membranelas adorais sigmóides (poliquinétides), um macronúcleo globular a elipsóide a uma cavidade bucal subapical, profunda e ligeiramente arredondada (Figura 7.1). Não foi possível realizar, nas amostras, contagens precisas das fileiras meridianas, mesmo nas coradas em azul de metileno, mas uma média de cinco

fileiras eram pós-orais. O micronúcleo e outras características não eram claramente identificáveis e não são descritas.

O número de parasitos por mosquito adulto nos ovários e hemolinfa variou enormemente. Em algumas fêmeas, toda a área do microscópio de dissecação estava coberta de parasitos se movendo ativamente. Em outras, os números variavam de 20 a 40 indivíduos. Quando infecções maciças ocorriam, os ovários eram encontrados, em sua maior parte, ocupados por parasitos. A maior parte dos ovários encontrava-se subdesenvolvidos, nos estágios I e I-II; mas alguns estavam em estágio II, de acordo com a classificação de Christophers (WHO, 1975).



Figura 7.1. Protozoário ciliado tetrahimenídeo, corado com azul de metileno. 5.000x.

Tabela 7.1. Percentual de *Anopheles darlingi* infectados por Tetrahimenídeos, coletados no Estado de Roraima, Brasil, entre Novembro 2003 e Julho 2004

Mês	% infectados (total dissecado)
Nov (transição)	0 (87)
Jan (estaçã seca)	12 (103)
Mar (estaçã seca)	3 (97)
Mai (transição)	0,8 (115)
Jul (estaçã chuvosa)	0,6 (159)

O parasito também foi logo detectado em larvas e sua ocorrência nos criadouros foi acompanhada durante todo o período de estudo (Tabela 7.2). Larvas de numerosas espécies foram identificadas e dissecadas para a verificação da presença do parasito. Este era encontrado principalmente em criadouros que apresentavam altas densidades larvárias. Diferenças significativas de densidade larvária entre locais positivos e negativos puderam

ser demonstradas por ANOVA ($F_{(1;56)}=25.34$; $P << 0,001$). Locais com mais de 0,44 larvas por amostra tendiam a ser positivos para o tetrahimenídeo e aqueles com taxas menores que isto, negativos. Larvas de *Culex sp.*, *Anopheles albitarsis* s.l., *An. strodei*, *Anopheles mattogrossensis*, *Anopheles darlingi* e *Anopheles oswaldoi* s.l. foram encontradas infectadas.

Tabela 7.2. Infecção por Tetrahimenídeo em larvas de mosquitos coletadas no Estado de Roraima, Brasil, entre Novembro 2003 e Julho 2004

MÊS (características dos criadouros)	% de larvas de III ou IV estágios infectadas (total dissecado)
Mar (pequenas coleções hídricas; poças nos rios temporários)	8,5 (129)*
Mai (grandes coleções hídricas; rios com fluxo)	0,5 (189)**
Jul (alagados em áreas baixas)	0 (121)

* Infecções foram observadas nas seguintes espécies: *An. albitarsis* s.l. (1 larva infectada), *An. strodei* (2), *An. mattogrossensis* (2), *An. darlingi* (2), *An. oswaldoi* (1) e *Culex sp.* (4 larvas infectadas).

** apenas uma larva de *An. darlingi* apresentava o parasito.

4. DISCUSSÃO

Até onde conhecemos, este é o primeiro registro de um protozoário tetrahimenídeo ciliado infectando larvas de mosquitos no Brasil. Lynn & Small (2002) reconhecem três gêneros na Família Tetrahymenidae e os distingue pelo formato das membranelas adorais e seu estilo de vida: *Tetrahymena* (poliquinétides orais retas, nunca sigmóides); *Lambornella* (apenas a poliquinétides oral 2 sigmóide; extremidade anterior da poliquinétide 1 curvada para a direita; parasitas ocorrem na cutícula das larvas de mosquitos; pode apresentar ciclo de Cida com a ocorrência de trofontes); e *Deltopylum* (poliquinétide oral 1 e 2 sigmóides).

No gênero *Tetrahymena*, apenas *T. pyriformis* tem sido demonstrada infectando larvas de mosquitos (Foissner, 2003), mas a evidente presença de poliquinétide orais sigmóides em nossos espécimes, os diferencia de *Tetrahymena*. *Lambornella* compreende três espécies descritas: *L. stegomyiae*, *L. clarki* – ambas conhecidas por infectarem larvas de mosquitos e a recentemente descrita *Lambornella trichoglossa*, não relatada em mosquitos (Foissner, 2003).

Deltopylum é um gênero monotípico, alocado na família Tetrahymenidae por Lynn & Small (2002), caracterizado por: grande tamanho (150–180 x 40–45 µm; trofontes com até 300 µm); vacúolo contrátil no meio do corpo; muitos (> 5) quinétides pós-orais; formato das membranelas adorais característico (todas apresentam o mesmo comprimento e são curvadas em sigmóide); um macronúcleo comprido e nodular; e o estilo de vida histiofágico, com um ciclo distinto incluindo a produção de pequenos tomitos e grandes trofontes (Foissner, 2003). Ainda não foi descrito infectando larvas de mosquitos.

Em uma de nossas amostras, 40-50 parasitos com formato globular de grande tamanho (ao redor de 300 µm) foram encontrados em uma larva, facilmente visível através de seu tegumento. Nesta mesma ocasião, no local de captura de adulto mais próxima, capturamos mosquitos adultos contendo o tetrahimenídeo. O significado destas formas parasíticas grandes, e se representam trofontes de *Lambornella stegomyiae* ou outra espécie parasita, permanece não esclarecido. Usando limitadas características morfológicas visíveis em exemplares de campo, não corados, e com o auxílio das chaves disponíveis em Das (2003), nós identificamos preliminarmente o parasita como *Lambornella* sp. Dificuldades em manter o parasito em culturas no laboratório, usando como meio larvas vivas ou maceradas tem, até agora impedido uma caracterização mais definitiva.

Embora não possamos atestar os efeitos negativos na sobrevivência de mosquitos adultos, acreditamos que a associação, pelo menos em intensas infecções, é patogênica para o mosquito hospedeiro. Os ovários de espécimes altamente infectados encontravam-se com o desenvolvimento comprometido, pois muitos estavam nos estágios N, I ou I-II, incomum na população de mosquitos coletados em isca humana, onde predominava o estágio II. Nessas altas infecções, grandes números de parasitos encontravam-se disperses pela hemolinfa e movendo-se dentro de túbulos de Malpighi. Ademais, a maior parte do tecido ovariano encontrava-se degenerado e substituído por parasitos movimentando-se ativamente. Em duas ocasiões, encontramos larvas de Culicidae em decomposição, hospedando o tetrahimenídeo, embora o relativamente baixo número de parasitos encontrados tornava obscuro se eram causadores ou haviam infectado a larva morta oportunisticamente. A destruição de estruturas ovarianas observada sugere transmissão trans-ovariana e pode denotar um comportamento histiofágico. A associação de infecção com o encontro de maiores densidades larvárias dá suporte à hipótese de transmissão trans-ovariana, mas também poderia ser devido a transmissão do patógeno entre as larvas.

Finalmente, nós observamos flutuações sazonais marcadas no número de larvas e adultos infectados, com a prevalência mais alta de infecção ocorrendo durante a estação

seca. A freqüente ocorrência de infecção em mosquitos adultos vetores da malária e seu possível papel em esterilizar as fêmeas sugere que pode desempenhar algum papel em limitar o crescimento populacional das espécies afetadas. Isto abre possibilidades para usar este organismo para o monitoramento da história natural e da disseminação de mosquitos, além de aprimorar os conhecimentos sobre relações parasito-hospedeiro e possivelmente desenvolver novas estratégias de controle biológico.

Este capítulo, com pequenas modificações, foi submetido ao *Journal of Invertebrate Pathology*, com o título **Tetrahymenidae Infection in Mosquito Populations in a Malaria-Endemic Region of the Amazon**, tendo os seguintes autores: Fábio S. M. Barros; Mércia E. Arruda; Simão D. Vasconcelos; Ulisses E. C. Confalonieri; José F. Luitgards-Moura & Nildimar A. Honório.

CAPÍTULO VIII: CONCLUSÕES

Como os resultados já foram apresentados e discutidos em cada Capítulo, relataremos abaixo apenas brevemente os principais resultados:

- No Estado de Roraima, a presença de *An. darlingi* provavelmente é necessária à transmissão de malária. A inexistência de epidemias provocadas por *An. albicans* s.l., na ausência de *An. darlingi*, implica que o papel de um vetor secundário pode estar vinculado à presença de espécies transmissoras mais eficientes e seu entendimento seria mais complexo que o abordado por estudos que apenas comparam as taxas de infecção de cada espécie.

- O principal fator determinando a ocorrência de larvas de *An. darlingi* em um criador é a ocorrência de sombra.

- O desmatamento reduz os criadouros de *An. darlingi*, mas o crescimento de vegetação secundária alta permite sua re-ocorrência.

- Existem dois padrões de transmissão de malária distintos no Estado de Roraima. Um é representado pelas áreas de assentamentos agrícolas, cruzados por pequenos cursos hídricos temporários e distantes dos grandes rios. O segundo é representado pelas áreas à margem dos grandes rios.

- Em áreas de assentamentos, há aumento na reprodução de *An. darlingi* nas estações secas. Isto é provocado pela formação de poças no leito dos igarapés. No período de chuvas, há mortalidade larvária, pelo arrastamento das formas imaturas.

- No entanto, a presença de açudes de piscicultura permite a ocorrência de transmissão de malária durante todo o ano, pois abrigam formas imaturas de *An. darlingi* e seus níveis são estáveis durante o período de chuvas.

- Nas áreas de assentamento, a limitada dispersão de *An. darlingi* (somente 4,6% da população voa mais de 1.000 m) leva à ocorrência de focos bem definidos de transmissão malarígena em torno dos locais de emergência.

- Para uma mesma espécie, a duração do ciclo gonotrófico é distinta, de acordo com a área estudada, o que é explicado pelas divergentes disponibilidades de criadouros.

- As taxas de sobrevivência sofrem modificações ao longo do ano em cada área. Na área de assentamento estudada, submetida a intensas chuvas em um período do ano, houve diminuição da sobrevivência dos vetores nas estações chuvosas, provavelmente pelo aumento na mortalidade secundária ao contato com as gotas de chuva. Maiores taxas de sobrevivência na seca, levam ao aumento no número de mosquitos adultos que permanecem o tempo mínimo para o desenvolvimento do *Plasmodium*. O aumento da

sobrevivência na seca é o principal fator determinando o aumento da transmissão de malária.

- A variação sazonal da longevidade de *An. darlingi* pode ocorrer de forma uniforme em toda a Bacia Amazônica.

- Em locais à beira de grandes rios, há aumento na reprodução dos vetores da malária nas estações chuvosas, devido ao aumento do número de criadouros nas áreas alagadas. A incidência de malária segue este mesmo padrão. No entanto mais estudos devem correlacionar as características das margens dos rios com a ocorrência de criadores de vetores da malária.

- Não houve significativa variação das taxas de sobrevivência dos adultos nos locais às margens do grande rio, o que pode ter sido devido à precipitação mais reduzida registrada na área estudada.

- Ao contrário das áreas de assentamento, o principal fator determinando o aumento da capacidade vetorial das espécies transmissoras foi a variação das densidades dos vetores.

As principais implicações destes resultados são as seguintes:

- Estudos de incriminação vetorial devem levar em consideração a interação entre diferentes vetores presentes em um local antes de concluir sobre a capacidade de propagação da malária por determinada espécie.

- A verificação da existência de sombra permite que criadouros de *An. darlingi* possam ser mais prontamente identificados pelas equipes de controle. Tratamento de áreas bem delimitadas pode ser instituído se oportuno.

- A construção de açudes de piscicultura em áreas endêmicas de malária deve ser realizada sob supervisão entomológica e devidamente regulamentada.

- Os órgãos responsáveis pelas atividades de controle e previsão de epidemias devem reconhecer a divergência nos padrões de transmissão de malária de acordo com a drenagem hídrica de cada região.

- Enfatizamos a necessidade das equipes de controle de avaliar as taxas de sobrevivência de forma rotineira, ao contrário de apenas realizar a verificação das densidades vetoriais. Este fator pode ser determinante da transmissão na maior parte da Amazônia e explicar a distribuição da malária.

- A existência de focos de transmissão ao redor dos criadouros de *An. darlingi*, em áreas de assentamento exemplificam a importância de estudos entomológicos para direcionar a realização de atividades de controle. A realização de pesquisas larvárias

nestes locais pode permitir uma maior eficiência e menores custos dos tratamentos domiciliares com inseticidas.

9. REFERÊNCIAS

- Achard F., Eva H.D., Stibig H.J., Mayaux P., Gallego J., Richards T., Malingreau, J.P. (2002). Determination of deforestation rates of the World's human tropical forests. *Science* 297, 999-1002.
- Albuquerque B.C. (1982). Foco residual de Malária na Rodovia Manaus-Boa Vista. Dissertação de Mestrado, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ. 94pp.
- Arruda M.E., Carvalho M.B., Nussenzweig R.S., Maracic M., Ferreira W., Cochrane A.H. (1986). Potential vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in northern Brazil identified by immunoassay. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 35, 873-881.
- Arshad H.H., Sulaiman, I. (1995). Infection of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and *Ae. aegypti* with *Lambornella stegomyiae* (Ciliophora: Tetrahymenidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 66, 303-306.
- Barata R.C.B. (1995). Malaria no Brasil: Panorama Epidemiológico na Última Década. *Cadernos de Saúde Pública*, 11, 128-136.
- Barbosa R.I., Ferreira E.J.G., Castellón E.G. (1997). *Homem, Ambiente e Ecologia no Estado de Roraima*, Inpa, Manaus, 613pp.
- Barbosa R I. (1998). Avaliação da área dos sistemas naturais e agrossistemas atingida pelo fogo no estado de Roraima. *Relatório do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-Núcleo de Pesquisas de Roraima*. Boa Vista, Roraima.
- Bates M. (1965). *The Natural History of Mosquitoes*. Macmillan Company, New York. 378pp.
- Birley M.H., Charlwood J.D. (1989). The effect of moonlight and other factors on the oviposition cycle of malaria vectors in Madang, Papua New Guinea. *Annals Tropical Medicine and Parasitology*, 83, 415-422.
- Bliss C.I. (1967). *Statistics in Biology*, Vol.1. McGraw-Hill, New York, 558pp.
- Boyd M.F. (1930). *An Introduction to Malariology*. Harvard University Press, Cambridge, 437pp.
- Branquinho M.S., Lagos C.B., Rocha R.M., Natal D., Barata J.M., Cochrane A.H., Nardin E., Nussenzweig R.S., Kloetzel J.K. (1993) Anophelines in the state of Acre, Brazil, infected with *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, the variant *P. vivax* VK247 and *P. malariae*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87, 391-394.
- BRASIL (2000). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Censo 2000*. Ministério do Planejamento. 256pp.
- BRASIL (2001). Plano de intensificação das ações de controle da malária na Amazônia Legal. Ministério da Saúde - FUNASA. 250pp.

- BRASIL (2002). Plano de intensificação das ações de controle da malária na Amazônia Legal. Ministério da Saúde - FUNASA. 256pp.
- Bruyning C.F.A. (1952). Some observations on the distribution of *Anopheles darlingi*, Root in the savanna region of Suriname. *Tropical and Geographical Medicine*, 4, 171-174.
- Camargo L.M.A. (2004) Malaria: analysis of the epidemiological profiles of three distinct populations of Rondônia, Western Amazon, Brazil. Epidemiology Round Table. XIII Annual meeting of the Brazilian Society of Protozoology, Caxambu. In *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Online* (<http://memorias.ioc.fiocruz.br/97caxambu/rt14.html>.)
- Carvalho A. (1953). Da influência das variações de nível d'água e do DDT sobre a produção do *An. darlingi*. Trabalho apresentado no XI Congresso Brasileiro de Higiene, Curitiba, Brasil. Arquivos de Higiene e Saúde Pública. In Rozendaal JA, (1990). Observations on the Distribution of Anophelines in Suriname with particular reference to the malaria vector *Anopheles darlingi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85, 221-234.
- Casman E.A., Dowlatabadi, H. (eds) (2002). *The Contextual Determinants of Malaria*. Resources for the Future Press, Washington, DC. 382pp.
- Cerqueira N.L. (1961). Distribuição Geográfica dos Mosquitos da Amazônia. *Revista Brasileira de Entomologia*, 10, 111-168.
- Charlwood J.D., Hayes, J. (1978). Variações geográficas no ciclo de picada do *Anopheles darlingi* Root no Brasil. *Acta Amazônica*, 8, 601-603.
- Charlwood J.D., Wilkes T.J. (1979). Studies on the age-composition of samples of *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) in Brazil. *Bulletin of Entomological Research*, 69, 337-42.
- Charlwood J.D. (1980). Observations on the binomics of *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) from Brazil. *Bulletin Entomological Research*, 70, 685-692.
- Charlwood J.D. (1986). Survival rate variation of *Anopheles farauti* (Diptera: Culicidae) between neighbouring villages in coastal Papua New Guinea. *Journal of Medical Entomology*, 23, 361-5.
- Charlwood J.D., Alecrim W.A. (1989). Capture-recapture studies with the South American malaria vector *Anopheles darlingi*, Root. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 83, 569-576.
- Charlwood J.D. Kihonda, J. Sama, S., Billingsley, P.F. Hadji, H. Verhave, J.P. Lyimo, E. Luttikhuisen, P.C. Smith, T. (1995) The rise and fall of *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) in a Tanzanian village. *Bulletin of Entomological Research*, 85. 37-44.
- Charlwood J.D., Smith T., Billingsley P.F., Takken W., Lyimo E.O.K., Meuwissen J.H.E.T. (1997). Survival and infection probabilities of anthropophagic Anophelines from an area of high prevalence of *Plasmodium falciparum* in humans. *Bulletin of Entomological Reserch*, 87, 455-453.
- Chaves S.S., Rodrigues L.C. (2000). An initial examination of the epidemiology of malaria in the state of Roraima, in the Brazilian Amazon basin. *Revista do Insituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 42, 269-275.

- Consoli R.A.G.B., Lourenço-de-Oliveira R. (1994). *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz. 224pp.
- Corbet P.S. (1963). The reliability of parasitic water mites (Hydracarina) as indicators of physiological age in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Entomologia Experimental et Applicata*, 6, 215-33.
- Corliss J. O. (1973): History, taxonomy, ecology, and evolution of species of Tetrahymena. In: Elliott A. M. (ed.): *Biology of Tetrahymena*, Dowden, Hutchinson & Ross, Inc., Stroudsburg, pp.1-55
- Correa R.R., Lima F.O., Coda D. (1950). Observations on the flight and longevity in nature of *Anopheles albitarsis domesticus*. *Journal of the National Malariological Society*, 9, 280-294.
- Crocia N. (1994). *The frontier cycle*, Department of Geography, University of Durham, Working Paper 4. 32pp.
- Das B.P. (2003): *Chilodonella uncinata* – a protozoa pathogenic to mosquito larvae. *Current Science* 85, 483-489.
- Davidson G., Draper C. (1953). Field studies of some of the basic factors concerned in the transmission of malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 47, 522-535.
- Deane L.M., Causey O.R., Deane M.P. (1946). Studies on Brazilian Anophelines from the Northeast and Amazon Region. I. An illustrated key by adult female characteristics for the thirty-five species of Anopheline with notes on the malaria vectors (Diptera-Culicidae). *American Journal of Hygiene*. Monographic Series, no. 18.
- Deane L.M., Causey O.R., Deane M.P. (1948) Notas sobre a distribuição e a biologia dos Anofelinos das Regiões Nordeste e Amazônica do Brasil. *Revista do Serviço Especial de Saúde Pública*, 4, 827-966.
- Deane L.M., Vernin C.S., Dasmaceno R.G. (1949) Avaliação das preferências alimentares das fêmeas de *Anopheles darlingi* e *Anopheles aquasalis*, em Belém, Pará, por meio de provas de precipitina. *Revista do Serviço Especial de Saúde Pública*, 2, 793-808.
- Deane L.M., Ribeiro C.D., Lourenço-de-Oliveira R., Oliveira-Ferreira J., Guimarães A.E. (1988). Study on the natural history of malaria in areas of the Rondonia State, Brazil, and problems related to its control. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 30, 153-156.
- Detinova T.S. (1962). Age-grouping methods in Diptera of medical importance. WHO, Monographic series no. 47, 215pp.
- Dias R.C. (2003). Uma contribuição ao estudo da malária no estado de Roraima e sua associação com a precipitação pluviométrica no período de 1985 a 1996. Tese de Doutorado. Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz. 118pp.
- Downs W.G., Pittendrigh, C.S. (1946). Bromeliad malaria in Trinidad, British West Indies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 26, 47-66.

- Dye C. (1992). The analysis of parasite transmission by blood-sucking insect. *Annual Review Entomology*, 37, 1-19.
- Elliott R. (1972). The influence of vector behavior on malaria transmission. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 21, 755-763.
- Escobar A.L. (1994). *Malária no sudeste da Amazônia: uma meta-análise*. Dissertação de mestrado. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ. 266pp
- Faran M.E., Linthicum K.J. (1981). A Handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (Nyssorhynchus) (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematics*, 13, 1-81.
- Faran M.E. (1980). Mosquito Studies (Diptera, Culicidae) XXXIV. A revision of the Albimanus Section of the subgenus Nyssorhynchus of *Anopheles*. *Contributions of the American Entomological Institute*, 15, 1-213.
- Ferreira E. (1964). Distribuição geográfica dos anofelinos no Brasil e sua relação com o estado atual da erradicação da malária. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*. 16,329-348.
- Ferreira E. (1964) Distribuição Geográfica dos Anofelinos no Brasil e Sua Relação com o Estado Atual da Erradicação da Malária. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*. 16, 329-348.
- Foissner W. (2003). Morphology and ontogenesis of *Lambornella trichoglossa* nov. spec., a new tetrahymenid ciliate (Protozoa, Ciliophora) from Brazilian tank bromeliads (Bromeliaceae). *European Journal of Protistology*, 39, 63–82.
- Forattini O.P. (1962). *Entomologia Médica*. Vol. I Univ. São Paulo. São Paulo, 662pp.
- Forattini O.P. (1987). Comportamento exófilo de *Anopheles darlingi* Root em região meridional do Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 21, 291-304.
- Forattini O.P., Kakitani I., Massad E., Gomes A.C. (1993). Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 1- Parity of blood seeking *Anopheles* (Kerteszia) in South-eastern Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 27, 1-8.
- Forattini O.P, Kakitani I., Massad E., Marucci D. (1995). Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 7- Behaviour of adults Nyssorhynchus anophelines with special reference to *Anopheles albitarsis* s.l. in South-Eastern Brazil. *Revista Saúde Pública*, 1995, 29, 20-26.
- Forattin O.P. (2002). *Culicidologia Médica*. Vol 2. Ed. USP. São Paulo. 860pp
- Furley P.A. (1994). *The Forest Frontier*, Routledge. London. 235pp.
- Gabaldon A. (1949). The nation-wide campaign against malaria in Venezuela. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 43, 113-164.
- Gabaldon A. (1953). Fifth International Congress of Tropical Medicine and Malaria, Istanbul, vol. 2, 27pp. In: Giglioli G. (1956). Biological variations in *Anopheles darlingi* and *Anopheles gambiae*. *Bulletin of the World Health Organization*, 15, 461-471.

- Garret Jones C., Grab B. (1964). The assessment of insecticidal impact on the malaria mosquitoes vectorial capacity, from data on the proportion of parous females. *Bulletin of the World Health Organization*, 31, 71-86.
- Garret-Jones C. (1973). Prevalence of *Plasmodium falciparum* and *Wuchereria bancrofti* in *Anopheles*, in relation to short term female population dynamics. International Congress of Tropical Medicine and Malaria, IXth, vol.1, 290-300.
- Giglioli G. (1956). Biological variations in *Anopheles darlingi* and *Anopheles gambiae*. *Bulletin of the World Health Organization*, 15, 461-471.
- Gil L.H.S., Alves F.P., Zieler H., Salcedo J.M.V., Durlacher R.R., Cunha R.P.A., Tada M.S., Camargo L.M.A., Camargo E.P., Pereira-da-Silva L.H. (2003). Seasonal malaria transmission and variation of anopheline density in two distinct endemic areas in Brazilian Amazônia. *Journal of Medical Entomology*, 40, 636-641.
- Gillet J.D. (1957). Age analysis in the biting-cycle of the mosquito *Taeniorhynchus (Mansonioides) africanus* Theobald, based on the presence of parasitic mites. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 51, 151-8.
- Gillies M.T., Wilkes T. J. (1965). A study of the age-composition of populations of *Anopheles gambiae* Giles and *A. funestus* Giles in northeastern Tanzania. *Bulletin of Entomological Research*, 56, 237-62.
- Gorham J.R., Stojanovich C.J., Scott H.G. (1967). *Clave Ilustrada para los Mosquitos Anofelinos de Sudamerica Oriental*, National Communicable Disease Center, Atlanta, 62pp.
- Guarda J.A., Sayag C.R., Witzig R. (1999). Malaria reemergence in the Peruvian Amazon Region. *Emerging Infectious Diseases*, 5, 209-215.
- Hayes J., Charlwood J.D. (1979). Dinâmica estacional de uma população de *Anopheles darlingi* numa área endêmica de malária no Amazonas. *Acta Amazônica*, 9, 79-86.
- Hudson J.E. (1984). *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) in the Suriname rainforest. *Bulletin of Entomological Research*, 75, 129-142.
- Kakitani I.; Forattini O.P. (2000). Paridade e desenvolvimento ovariano de *Anopheles albittarsis* s.l. em área de agroecossistema irrigado. *Revista de Saúde Pública*, 34, 33-38.
- Klein T.A., Lima J.B.P. (1990). Seasonal distribution and biting patterns of *Anopheles* mosquitoes in Costa Marques, Rondonia, Brazil. *Journal of the American Mosquito Control Association* 6, 700-707.
- Komp W.H.W. (1942) The Anopheline mosquitoes of the Caribbean region. Washington. *Bulletin of the National Institute of Health* 179. 195pp.
- Lounibus L.P., Couto-Lima D., Lourenço-de-Oliveira R., Escher R.L., Nishimura N. (1998). Egg Maturation in Neotropical Malaria Vectors : One Blood Meal is Usually Enough. *Journal of Vector Ecology*, 23, 195-201.
- Lourenço-de-Oliveira R., Guimarães A.E.G., Arlé M., Silva T.F., Castro M.G., Motta M.A., Deane L.M. (1989) Anopheline species, some of their habitats and relation to malaria

- in endemic areas of Rondônia State, Amazon region of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 84, 501-514.
- Lynn D.H., Small E.B. (2002). Phylum Ciliophora. In: *An Illustrated Guide to the Protozoa*. J.J. Lee, P.C. Bradbury, and G.F. Leedale (eds.). Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas, pp.371-676.
- Manguin S., Roberts D.R., André R.G., Rejmankova E., Hakre S. (1996). Characterization of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) larval habitats in Belize, Central America. *Journal of Medical Entomology*, 33, 205-211.
- Margalef D.R. (1957). La teoria de la informacion em ecologia. *Memòries Real Academia de Ciències y Artes de Barcelona*, 32, 373-9
- Nájera J.A., Kouznetsov R.L. and Delacollette C. (1998). Malaria epidemics detection and control forecasting and prevention, WHO. <http://www.rbm.who.int/>
- Nascimento T.F.S., Lourenço-de-Oliveira R. (2002) *Anopheles halophylus*, a new species of the Subgenus *Nyssorhynchus* (Diptera: Culicidae) from Brazil, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97, 801-811.
- Oliveira-Ferreira J.R., Lourenço-de-Oliveira R, Teva A., Deane L.M., Ribeiro C.T. (1990). Natural malaria infections in anophelines in Rondonia State, Brazilian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 43, 6-10.
- OPAS- Organización Panamericana de la Salud, (1990). Los sistemas locales de salud, conceptos-métodos-experiencias. J.M. Paganini and R.C. Mir [eds.], Publication 519. OPS, Washington, DC.
- Pajot F., Le Pont F., Molez J.F. (1975). Données sur l'alimentation non sanguine chez *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root 1926 (Diptera. Culicidae) en Guyane française. Cahier ORSTOM, série Entomologie Medicale et Parasitologie 13, 131-134
In: Charlwood J. D. (1980). Observations on the binomics of *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) from Brazil. *Bulletin of Entomological Research* 70, 685-692.
- Póvoa M.M.; Silva A.N.M., Santos C.C.B., Segura M.N.O., Machado R.L.D. (2000a). Malaria transmission. *Ciência e Cultura* 52, 208-212.
- Póvoa M.M., Wirtz R.A., Lacerda R.N.L., Miles M.A., Warhurst D. (2000b). Malaria vectors in the municipality of Serra do Navio, State of Amapá, Amazon region, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96, 179-184.
- Rachou R.G. (1958). Anofelinos do Brasil. Comportamento das espécies vetoras de malária. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, 10, 145-181.
- Roberts D.R., Alecrim W.D., Tavares A.M., McNeill, K.M. (1983). Field observations on the gonotrophic cycle of *Anophles darlingi* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 20, 189-92.
- Roberts D.R., Manguin S., Harbach R.E., Woodruff R., Rejmankova E., Polanco J., Wulschleger B. (1996). Predictions of malaria vector distributions in Belize based on multispectral satellite data. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 54, 302-308.

- Roberts D.R., Manguin S., Rejmankova E., Andre R., Harbach R.E., Vanzie E., Kakre S., Polanco J. (2002). Spatial distribution of adult *Anopheles darlingi* and *An. albimanus* in relation to riparian habitats in Belize, Central America. *Journal of Vector Ecology*, 27, 21-30.
- Rojas W., Peñaranda F., Echavarría M. (1992). Strategies for malaria control in Colombia. *Parasitology Today* 8, 141-144.
- Rosa-Freitas M.G., Deane L.M., Momen H. (1990). A morphological, behavioural and isoenzymatic study in *Anopheles albimanus* from 10 populations. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 85, 275-289.
- Rosa-Freitas M.G., Broomfield G., Fristman A., Milligan P., Momen H., Molineux D. (1992). Cuticular hydrocarbons, isoenzymes and behavior of three populations of *Anopheles darlingi* from Brazil. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 8, 357-366.
- Rozendaal J.A. (1987). Observations on the biology and behaviour of anophelines in the Suriname rainforest with special reference to *Anopheles darlingi* Root. *Cahier ORSTOM, série Entomologie Médicale et Parasitologie* 25, 33-43.
- Rozendaal J.A. (1989). Biting and resting behavior of *Anopheles darlingi* in the Suriname rainforest. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 5, 351-358.
- Rozendaal J.A. (1990). Observations on the distribution of Anophelines in Suriname with particular reference to the malaria vector *Anopheles darlingi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85, 221-234.
- Rozendaal J.A. (1992). Relations between *Anopheles darlingi* breeding habits, rainfall, river level and malaria transmission rates in the rain forest of Suriname. *Medical and Veterinary Entomology*, 6, 16-22.
- Rubio-Palis Y. (1994). Variation of the vectorial capacity of some Anophelines in western Venezuela. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 50, 420-424.
- Rubio-Palis Y., Zimmerman R.H. (1997). Ecoregional classification of malaria vectors in the neotropics. *Journal of Medical Entomology*, 34, 499-510.
- Russell P.F., Rao T.R. (1942a). On relation of mechanical obstruction and shade to oviposition of *Anopheles culicifacies*. *Journal of Experimental Zoology*, 91, 303-329.
- Russell P.F., Rao T.R. (1942b). On the swarming, mating and ovipositing behaviour of *An. culicifacies*. *American Journal of Tropical Medicine*, 22, 417.
- Russell P.F.; West, L.S., Manwell, R.D., MacDonald, G. (1963). *Practical Malariology*. Oxford University Press. London. 750pp.
- Ryan J.R., Dave K., Collins K.M., Hochberg L., Sattabongkot J., Coleman R.E., Dunton R.F., Bangs M.J., Mbogo C.M., Cooper R.D., Shoeler G.B., Rubio-Palis Y., Magris M., Romero L.I., Padilla N., Quakyi I.A., Bigoga J., Leke R.G., Akinpelu O., Evans B., Walsey M., Patterson P., Wirtz R.A., Chan A.S.T. (2002). Extensive multiple test centre evaluation of the VectestTM malaria antigen panel assay. *Medical and Veterinary Entomology*, 16, 321-327.

- Ryan J.R., Dave K., Emmerich E., Garcia L., Yi L., Coleman R.E., Sattabongkot, J., Dunton R.F., Chan A.S.T., Wirtz R.A. (2001). Dipsticks for rapid detection of *Plasmodium* in vectoring *Anopheles* mosquitoes. *Medical and Veterinary Entomology* 15, 225-230.
- Salati E., Vose P.B., Lovejoy T.E. (1986). Amazon rainfall, potential effects of deforestation, and plans for future research. In Prance G.T., (ed.) *Tropical Rain Forests and the World Atmosphere*. Westview Press: Boulder. pp.61-74
- Sallum M.A.M., Wilkerson R.C., Forattini O.P. (1999) Taxonomic study of species formerly identified as *Anopheles mediopunctatus* and resurrection of *An. costai* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 36, 282-300.
- Sawyer D. (1987). Economic and social consequences of changing patterns of malaria in new colonization projects in Brazil. [Presented to 10th International Conference of Social Science and Medicine, Sitges, Spain.]
- Senior White R.A. (1952). Studies on the binomics of *Anopheles aquasalis* Curry 1932 (concl.) *Indian Journal of Malariology*, 6, 29-72.
- Service M.W. (1991) Agricultural development and arthropod-borne diseases: a review. *Revista de Saúde Pública*, 25, 165-178.
- Service M.W. (1993). *Mosquito ecology: field sampling methods*, 2nd ed. London. Chapman & Hall, 988pp.
- Shapiro J.M., Saliternik Z., Belferman S. (1944). Malaria survey of the Dead Sea Area during 1942, including the description of a mosquito flight test and its results. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 38, 95-116.
- Silva A.R. (1975). *Estudo clínico e epidemiológico, na recente colonização agrícola da região de Buriticupu, no estado do Maranhão*. Dissertação de mestrado. Pós-graduação em doenças infecciosas e parasitárias. Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ. 232pp.
- Silva-Vasconcelos A., Kató M.Y.N., Moura E.N., Souza R.T.L., Lacerda R.N.L., Sibajev A., Tsouris P., Póvoa M.M., Momen H., Freitas M.G.R. (2002). 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.
- Souza-Santos R. (2002). Distribuição sazonal de vetores da malária em Machadinho d'Oeste, Rondônia, Região Amazônica, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 18, 1813-1818.
- Stage H., Giglioli G. (1947). Observations on mosquito and malaria control in the Caribbean área, Part II- British Guyana. *Mosquito News*, 7, 73-76.
- Tadei W.P., Mascarenhas B.M., Podestá M.G. (1983). Biologia dos anofelinos amazônicos. VIII. Conhecimentos sobre a distribuição de espécies de *Anopheles* na região de Tucuui-Marabá (Pará). *Acta Amazônica*, 13, 103-140.
- Tadei V.P., Santos J.M.M., Costa W.L.S., Scardana V.M. (1988a). Biologia dos anofelinos amazônicos. XII. Ocorrência de espécies de *Anopheles*, dinâmica da transmissão e controle da malária na zona urbana de Ariquemes, Rondônia. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 30, 221-251.

- Tadei W.P., Rodrigues I.B., Santos J.B.M.F. (1988b). Estudo da incidência e distribuição de espécies de *Anopheles* na Estação Ecológica da Ilha e Maracá (Roraima). *Ciência e Cultura* 40, 903.
- Tadei W.P., Santos J.M.M., Scarpassa V.M., Rodrigues I.B. (1993). Incidência, distribuição e aspectos ecológicos de espécies de *Anopheles* (Diptera: Culicidae), em regiões naturais e sob impacto ambiental da Amazônia brasileira. In Ferreira E.J.G., Santos G.M., Leão E.L.M., Oliveira LA (Eds) (1993). *Bases Científicas para Estratégias de Preservação e Desenvolvimento da Amazônia*. Vol.2. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus. pp167-196.
- Tadei W.P., Thatcher B.D., Santos J.M.M., Scarpassa V.M., Rodrigues I. B., Rafael, M.S. (1998). Ecologic observations on Anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59, 325-335.
- Tadei W.P., Thatcher B.D. (2000). Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 42, 87-94.
- Vasconcelos A.S., Kato M.Y.N., Mourão E.N., Souza R.T.L., Lacerda R.N.L., Sibajev A., Tsouris P., Póvoa M.M., Momen H., Rosa-Freitas M.G. (2002). 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.
- Vittor A.Y., Gilman R., Tielsch J., Glass G., Shields T., Patz J.A. (2002) Deforestation and the presence of *Anopheles darlingi* larvae in the Peruvian Amazon. Phd Thesis, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health. 447pp.
- Wernsdorfer W.H., McGregor I. (1988). *Malaria: principles and practice of malariology*. Edinburgh, Churchill Livingstone. 1818pp.
- WHO- World Health Organization (1975). *Manual on practical entomology in malaria*. Part II. Geneva: World Health Organization. 191pp.
- WHO- World Health Organization, (1997). World malaria situation in 1994, *WHO Weekly Epidemiology Record*, 22, 161-167.
- WHO- World Health Organization, (2000). *Expert committee on Malaria*, Twentieth Report. Geneva: World Health Organization.
- WHO- World Health Organization (2002). *Malaria entomology and vector control*. Geneva: World Health Organization.
- Wilkerson R.C., Parsons T.J., Klein T.A., Gaffigan T.V., Bergo E., Consolim, J. (1995) Diagnosis by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction of four cryptic species related to *Anopheles albitarsis* from Paraguay, Argentina and Brazil. *Journal of Medical Entomology* 32, 697-704.
- Zimmerman R.H., Berti J. (1994). Integrated control of malaria for the preservation of neotropical wetlands, pp.797-803. In W. J. Mitch (ed.), *Global wetlands: Old World and New*. Elsevier, Amsterdam.