



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL (MCTA)

**FRANCISCO PIRES DE CASTRO JÚNIOR**

**CICLOS DE VIDAS COMPARADOS E VARIABILIDADE  
GENÉTICA DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) DO  
SEMI-ÁRIDO PARAIBANO.**

Campina Grande, Paraíba

2010

**FRANCISCO PIRES DE CASTRO JÚNIOR**

**CICLOS DE VIDAS COMPARADOS E VARIABILIDADE GENÉTICA  
DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) DO SEMI-ÁRIDO  
PARAIBANO.**

Dissertação apresentada à Pós-Graduação  
em Ciência e Tecnologia Ambiental-CTA  
como requisito para obtenção do título de  
Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental,  
área de concentração em Ciência Ambiental.

**Orientador:** Prof. Dr. Eduardo Barbosa Beserra - UEPB

**Co-orientador:** Ph.D. Raul Porfírio de Almeida – Embrapa Algodão

**Colaborador:** Prof. Msc. Walter Fabrício Silva Martins

**Campina Grande, Paraíba**

**2010**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL-UEPB

C355c Castro Júnior, Francisco Pires de.  
Ciclos de vidas comparados e variabilidade genética de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) do semi-árido paraibano. [manuscrito] / Francisco Pires de Castro Júnior. – 2010.  
60 f.: il. color.

Digitado

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental), Centro de Ciências e Tecnologias, Universidade Estadual da Paraíba, 2010.

“Orientação: Prof. Dr. Eduardo Barbosa Beserra, Departamento de Biologia”.

“Co-Orientação: Ph.D Raul Porfírio de Almeida, Embrapa - Algodão”

1 *Aedes aegypti*. 2. Dengue. 3. Biologia. 4. Variações Genéticas. I. Título.

21 ed. CDD 576.58

**FRANCISCO PIRES DE CASTRO JÚNIOR**

**CICLOS DE VIDAS COMPARADOS E VARIABILIDADE GENÉTICA  
DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) DO SEMI-ÁRIDO  
PARAIBANO.**

Dissertação apresentada à Pós-Graduação  
em Ciência e Tecnologia Ambiental-CTA  
como requisito para obtenção do título de  
Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental,  
área de concentração em Ciência Ambiental.

**Orientador:** Prof. Dr. Eduardo Barbosa Beserra - UEPB

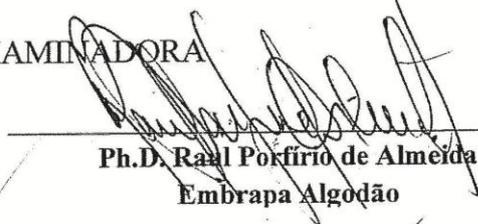
**Co-orientador:** Ph.D. Raul Porfírio de Almeida – Embrapa Algodão

**Colaborador:** Prof. Msc. Walter Fabrício Silva Martins

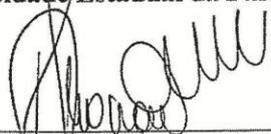
**COMISSÃO EXAMINADORA**



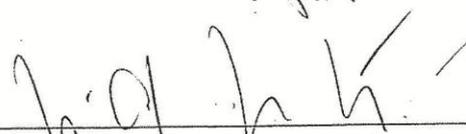
**Prof. Dr. Eduardo Barbosa Beserra**  
Universidade Estadual da Paraíba



**Ph.D. Raul Porfírio de Almeida**  
Embrapa Algodão



**Prof.ª Dr.ª Dilma Maria de Brito M. Trovão**  
Universidade Estadual da Paraíba



**Prof. Dr. Luiz Carlos Serrano Lopes**  
Universidade Federal da Paraíba

Campina Grande, Paraíba, 04 de Fevereiro de 2010.

## **Dedicatória**

Acima de tudo, dedico a Deus pela oportunidade de viver e pela força que me concede para enfrentar as tribulações da vida. Agradeço pela força, coragem, obstinação, disciplina, inspiração e fé que me impulsionaram a concretizar mais um importante passo em minha carreira. A Ele dedico meu trabalho.

Agradeço de forma ímpar todo apoio e dedicação, toda a presteza e prontidão, todo carinho a minha grande esposa Andreza Farias de Almeida Pires, que pacientemente e amorosamente suportou todas as minhas ausências.

Agradeço especialmente a minha cunhada Tatá pelos sinceros e valiosos votos de Felicidade e Sucesso que sempre me foram desejados.

A minha querida Josefa (Sogra) pelos ensinamentos da vida cotidiana e dos costumes populares.

A minha irmã pela sua influência fraternal e seu carinho ao telefone comigo.

Dedico em especialmente ao Docente José Cavalcanti da Silva por ter colaborado com seus conselhos e ensinamentos mesmo antes de entrar no mestrado.

A realização deste trabalho contou com a participação de diversas pessoas, que direta e indiretamente apoiaram a causa. Desculpando-me pela omissão de alguns nomes MEUS MAIS SINCEROS AGRADECIMENTOS. A estes, dedico meu trabalho.

Finalmente, gostaria de dedicar esta pesquisa aos meus pais, que me deram o melhor presente que uma pessoa pode dar a alguém, que foi a oportunidade de estudar. Aos meus pais Francisco Pires de Castro e Suely Cassiano Pires de Castro que torceram pelo meu sucesso profissional. Eles foram fundamentais em mais uma conquista e são exemplos de vida.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual da Paraíba e ao curso de Pós-graduação em Ciência e tecnologia ambiental pela oportunidade de realização do Mestrado.

À Embrapa Algodão pela oportunidade de desenvolver a pesquisa de genética.

Ao Prof. Dr. Eduardo Barbosa Beserra por todas as orientações, puxões de orelha e ensinamentos transmitidos ao longo desses seis anos de agradável convívio. Agradeço pela confiança, paciência e incentivo no meu crescimento profissional.

Ao co-orientador Ph.D. Raul Porfírio de Almeida, pela oportunidade de desenvolver parte do trabalho no Laboratório de Biotecnologia e Patologia de Insetos da Embrapa Algodão.

Ao co-orientador Prof. Msc. Walter Fabrício Silva Martins, pela contribuição e pelas preciosas sugestões que muito enriqueceram este trabalho.

Às Prefeituras das cidades de Campina Grande, Cuité, Alcantil, Pedra Lavrada, Serra Branca, Queimadas, Barra de Santana, Monteiro, Santa Luzia e Livramento que permitiram coletas de populações de *A. aegypti*, que foram indispensáveis para a realização deste trabalho.

À Secretaria de Saúde, ao 3º Núcleo Regional de Saúde e à Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) pelo apoio oferecido, especialmente, durante as instalações das armadilhas para a coleta dos ovos de *A. aegypti*.

Ao Amigo Raynner Rilke Duarte Barboza, pelos momentos de descontração, amizade e companheirismo.

Ao estagiário (Maurício) e a técnica de laboratório (Renata) do Núcleo de Manejo Integrado de Pragas da UEPB, pela colaboração no andamento das pesquisas.

Ao Docente Dr. Luiz Lopes, pela grande contribuição na análise estatística dessa pesquisa.

Dedico ao meu maravilhoso Deus por tudo que me concedeu e por tudo que fez em minha vida.

**“Cientificismo é a crença irracional na verdade científica” – Fritjof Capra**

## CICLOS DE VIDAS COMPARADOS E VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) DO SEMI-ÁRIDO PARAIBANO.

### Resumo

A eficiência de um programa de controle do *Aedes aegypti* depende do conhecimento sobre as variações biológicas e genéticas que ocorrem entre as suas populações. A presente pesquisa teve por objetivo comparar os padrões dos ciclos de vida e variabilidade genética entre populações de *A. aegypti* coletadas em diferentes regiões do semi-árido paraibano. Os ciclos de vida foram estudados a temperatura ambiente de  $26 \pm 2^\circ \text{C}$ , umidade relativa de  $60 \pm 10\%$  e fotofase de 12 horas. Diariamente avaliou-se o período de desenvolvimento e a viabilidade das fases de ovo, larva e pupa, razão sexual e longevidade, fecundidade e comprimento de asas dos adultos. Além destas variáveis foi realizada, uma análise de agrupamento (“Cluster analyses”), utilizando-se uma matriz de distância euclidiana através do método da média não-ponderada. A análise da estrutura gênica das populações foi realizada através das Extrações de DNAs totais e análise por RAPD-PCR. As durações das fases de ovo, larva e pupa, variaram de 3,79 a 4,79 dias, 9,15 a 10,89 dias e de 2,18 a 2,59 dias, respectivamente. A longevidade dos adultos de *A. aegypti* apresentou uma variação de 37,82 a 58,29 dias para os machos e 40,03 a 73,07 dias para as fêmeas. As populações de *A. aegypti* de Serra Branca e Cuité apresentam maior similaridade, em relação aos agrupamentos formados. Os índices de variabilidade genética apresentaram maior diversidade na população de Barra de Santana ( $P = 93,33\%$ ;  $H_o = 0,373$ ) e o menor na população de Cuité ( $P = 60,00\%$ ;  $H_o = 0,171$ ). Em função dos resultados verificou-se que há um padrão diferenciado de desenvolvimento entre as populações de *A. aegypti* procedentes de diferentes municípios do semi-árido paraibano. Os índices de diversidade genética heterozigosidade  $H_o$  e polimorfismos sugerem elevada variação genética intrapopulacional e baixa variabilidade interpopulacional. Tal fato pode indicar constantes migrações de vetores para essas localidades com elevado número de indivíduos.

Palavras-Chave: Biologia populacional, dengue, vetor, variações genéticas, ciclo de vida.

**COMPARED LIFE CYCLES AND GENETIC VARIABILITY OF *Aedes aegypti*  
(DIPTERA: CULICIDAE) IN PARAIBA SEMI-ARID.**

**Abstract**

The efficiency of a program to control *Aedes aegypti* depends on the knowledge about the biological and genetic variations that occur between their populations. The present study addressed to compare the life cycles patterns and genetic variability among populations of *A. aegypti* collected in different regions of Paraíba semi-arid. Life cycles were studied at environmental temperature ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , relative humidity of  $60 \pm 10\%$  and photophase of 12 hours), the period of development and viability of egg phases, larva and pupa, sex ratio, longevity, fecundity and size of adults were evaluated daily. Beyond these variables grouping analysis (Cluster Analysis), using a matrix of Euclidean distance by the method of unweighted average was used. The Analysis of gene structure of populations was carried out by total DNA extractions and RAPD-PCR analysis. Phase's durations of egg, larva and pupa varied from 3.79 to 4.79 days, 9.15 to 10.89 days and 2.18 to 2.59 days, respectively. Adults' longevity of *A. aegypti* means variation from 37.82 to 58.29 days for males and from 40.03 to 73.07 days for females. Populations of *A. aegypti* from Serra Branca and Cuité cities presented major similarity in relation to the formed groupings. Genetic variability indexes showed highest diversity in Barra de Santana population ( $P = 93.33\%$ ,  $H_o = 0.373$ ), however, it was lowest in Cuité population ( $P = 60.00\%$ ,  $H_o = 0.171$ ). According to the results it was verified that there is a distinct pattern of development among populations of *A. aegypti* from different municipalities of Paraíba semi-arid. Genetic diversity heterozygosity  $H_o$  and polymorphisms indexes suggest a high intrapopulation genetic variation and low interpopulation variability. Such fact may indicate constant migration of the vectors to these locations with high number of individuals.

**Keywords:** Population biology, dengue, vector, genetic variation, life cycle.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Duração (dias) ( $\bar{X} \pm EP$ ) das fases de ovo, larva e pupa, e razão sexual das populações de *A. aegypti* de diferentes regiões do semi-árido paraibano. Temperatura ambiente:  $26 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ , UR:  $60 \pm 10\%$  e fotofase: 12 horas. \_\_\_\_\_ 33
- Tabela 2.** Viabilidade (%) ( $\bar{X} \pm EP$ ) das fases de ovo, larva e pupa das populações de *A. aegypti* de diferentes regiões do semi-árido paraibano. Temperatura ambiente:  $26 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ , UR:  $60 \pm 10\%$  e fotofase: 12 horas. \_\_\_\_\_ 34
- Tabela 3.** Longevidade dos adultos e número de ovos por fêmea de *Aedes aegypti* de populações do semi-árido paraibano. Temperatura ambiente:  $26 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ , UR:  $60 \pm 10\%$  e fotofase: 12 horas. \_\_\_\_\_ 37
- Tabela 4.** Oligonucleotídeos iniciadores, número de bandas e tamanho dos fragmentos. \_\_\_\_\_ 40
- Tabela 5.** Análise da diversidade genética de populações de *Aedes aegypti*, por localidade, número de indivíduos analisados (N) e medidas de variabilidade genética: porcentagem de *loci* polimórficos (P) e heteroziosidade observada ( $H_o$ ) obtidas por RAPD. \_\_\_\_\_ 42
- Tabela 6.** Distância genética de Nei (1978) calculada entre as populações de *Aedes aegypti*. \_\_\_\_\_ 47
- Tabela 7.** Análise de variância molecular (AMOVA) em nove populações de *Aedes aegypti* do semi-árido paraibano. \_\_\_\_\_ 48

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Municípios de Coleta de populações de *A. aegypti* no semi-árido paraibano \_\_\_\_\_ 27
- Figura 2.** Aferição do pH das águas para o desenvolvimento larval de *Aedes aegypti* \_\_\_\_\_ 30
- Figura 3.** Comprimento (mm) das asas dos adultos de populações de *Aedes aegypti* do semi-árido paraibano \_\_\_\_\_ 38
- Figura 4.** Fenograma resultante da análise de agrupamento de características biológicas de 10 populações de *Aedes aegypti* provenientes do semi-árido paraibano \_\_\_\_\_ 39
- Figura 5.** Gel de agarose 1,4 % corado com brometo de etídio mostrando o padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de *Aedes aegypti*, obtidos com o iniciador OPN-3 \_\_\_\_\_ 40
- Figura 6.** Gel de agarose 1,4 % corado com brometo de etídio mostrando o padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de *Aedes aegypti*, obtidos com o iniciador OPZ-17 \_\_\_\_\_ 41
- Figura 7.** Gel de agarose 1,4 % corado com brometo de etídio mostrando o padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de *Aedes aegypti*, obtidos com o iniciador OPE-17 \_\_\_\_\_ 41
- Figura 8.** Dendrograma construído pelo método UPGMA, baseado na distância genética de Nei (1978), mostrando o relacionamento entre as populações estudadas de *Aedes aegypti* \_\_\_\_\_ 46

## Abreviaturas

<b>AEC</b> .....	Antes da era comum
<b>AFLP</b> .....	Amplified Fragment Length Polymorphisms (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados)
<b>DNA</b> .....	Desoxirribonucleico Acid(Ácido desoxiribonucleico)
<b>Embrapa</b> .....	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
<b>EMEPA</b> .....	Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba S. A.
<b>IBGE</b> .....	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>ITS</b> .....	Internal Transcribed spacers (Espaçadores transcritos internos)
<b>PCR</b> .....	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
<b>RAPD</b> .....	Random Amplified Polymorphic DNA (DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2. OBJETIVOS</b>	15
<b>3. ESTADO DA ARTE</b>	16
3.1 Característica Etimológica e Geográfica da Caatinga	16
3.2 Características Físicas do bioma Caatinga	16
3.3 Histórico e estado atual da Dengue	17
3.4 Aspectos bioecológicos de <i>Aedes aegypti</i>	19
3.5 Variabilidade genética em culicídeos vetores	21
3.6 Utilização da técnica da PCR-RAPD (Reação em Cadeia da Polimerase - Polimorfismo do DNA Amplificado Randomicamente)	23
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	26
4.1 Caracterização da área de estudo	26
4.2 Obtenção das populações de <i>Aedes aegypti</i>	28
4.3 Criações das populações de <i>Aedes aegypti</i> em laboratório	28
4.4 Ciclos de vidas comparados de <i>Aedes aegypti</i>	29
4.5 Isolamento de DNA e Análise por RAPD-PCR	30
4.6 Análise de variabilidade genética	31
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	32
5.1 Ciclo aquático de <i>Aedes aegypti</i>	32
5.2 Longevidade de adultos e número de ovos por fêmea de <i>Aedes aegypti</i>	36
5.3 Comprimento (mm) das asas de <i>Aedes aegypti</i>	37
5.4 Análise de agrupamento de características biológicas de populações de <i>A. aegypti</i> provenientes do semi-árido paraibano	38
5.5 Variabilidade Genética de populações de <i>Aedes aegypti</i> detectados através de PCR-RAPD	40
5.6 Dendrograma construído pelo método UPGMA e Distância genética de Nei (1978), mostrando o relacionamento entre as populações de <i>Aedes aegypti</i>	45
5.7. Análise da variância molecular (AMOVA)	47
<b>6. CONCLUSÕES</b>	50
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	51

## 1.0 INTRODUÇÃO

*Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) é um mosquito de origem africana, provavelmente da região da Etiópia, considerado um importante vetor do vírus que causa a dengue nas Américas e da febre amarela na América Central e no Sul e no Oeste da África. (CHOOCHOTE et al., 2004; FANTINATTI et al., 2007). A espécie foi introduzida no Brasil durante o período colonial, provavelmente durante o tráfico negreiro, por via marítima (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

Este inseto é caracterizado como um mosquito cosmopolita, com ocorrência nas áreas tropicais e subtropicais do globo terrestre. Há uma concentração deste mosquito nas vilas e cidades, onde há um maior contingente populacional, onde as condições ambientais e sociais contribuem para o estabelecimento de suas populações, embora também possa ser encontrado distante dos aglomerados urbanos (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; NATAL, 2002).

A dengue é um problema de saúde pública mundial que tem preocupado as autoridades em saúde dos países tropicais, por serem estes os mais atingidos em decorrência de suas características ambientais que favorecem a sua propagação. A busca de relações entre fatores ambientais e a propagação da dengue tem sido investigada com o intuito de estabelecer mecanismos de controle e prevenção de epidemias. Estudos recentes avaliaram a relação entre a ecologia, fatores socioeconômicos, dinâmicas sócias e a incidência da dengue. (QUINTERO et al., 2009; RIBEIRO et al., 2006).

Desde a década de 90 se utilizam as mais sofisticadas técnicas para melhor compreender a bioecologia dos mosquitos que têm papel na veiculação de arboviroses, como a técnica de marcadores moleculares que permite a caracterização da variabilidade genética, sendo uma grande ferramenta para estudos de genética de populações, biologia evolutiva, taxonomia e biologia da conservação, permitindo a análise da diversidade e diferenciação genética das populações naturais (OOSTERHOUT et al., 2004). O estudo da variabilidade genética em populações de culicídeos através de marcadores moleculares tem sido utilizado com o objetivo de entender a dinâmica populacional destes vetores.

A eficiência de um programa de controle de *A. aegypti* depende do conhecimento dos aspectos genéticos e biológicos, pois populações de *A. aegypti* de distintas regiões geográficas podem diferir quanto a importantes características biológicas, e essas diferenças são fundamentais nas orientações das ações de controle do vetor (SOUZA-SANTOS, 1999), como constatado por Beserra et al. (2006), que verificaram variações no ciclo de vida de

populações de *A. aegypti*, atribuindo-as às adaptações as condições climáticas das suas regiões de origem.

Estudos relacionados aos padrões genéticos e de desenvolvimento de populações de *A. aegypti* são relevantes para a compreensão de aspectos biológicos e ecológicos desse vetor, pois pode proporcionar dados que auxiliem os métodos atuais de monitoramento e controle da espécie.

O conhecimento sobre os padrões de dispersão e diversidade genética de insetos é fundamental para a elaboração de programas de controle do *A. aegypti*. Atualmente, existem várias técnicas disponíveis para detectar polimorfismos de DNA, podendo-se destacar: DNA mitocondrial (DNAMt), Polimorfismo do DNA Amplificado Randomicamente (RAPD), Isoenzimas, Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP), genes de RNA ribossomal (RNAr), seqüenciamento e Microssatélite. Entre as vantagens propostas por estes marcadores moleculares, se destacam a necessidade de pequena quantidade de material biológico, facilidade de realização e automação em grande escala (MITCHELL-OLDS, 1995).

Os marcadores de DNA, especialmente o RAPD têm desempenhado um papel importante na análise da diversidade genética de populações de *A. aegypti*, permitindo distinguir a presença de espécies alopátricas e simpátricas (LANZARO et al., 1990), a origem geográfica de populações (POWELL et al., 1980), o número de famílias presentes em sítios de oviposição de mosquitos (APOSTOL et al., 1993) e correlacionar susceptibilidade à infecção por patógenos com diferenças genéticas em populações geográficas (FAILLOUX et al., 1995). A técnica de PCR-RAPD não necessita do conhecimento prévio do genótipo do organismo a ser estudado e possibilita um maior número de marcadores possíveis de serem mapeados, além de permitir de maneira rápida a identificação o grau de similaridade entre os genótipos (inter e intraespecíficos) (WILLIAMS et al., 1990).

Portanto, os marcadores moleculares constituem uma ferramenta eficiente nos estudos de biologia populacional e quando associado aos estudos de biologia do desenvolvimento, fornecem informações fundamentais para a definição das estratégias de controle de insetos vetores.

## 2.0 OBJETIVOS

**2.1 Objetivo Geral:** Comparar os padrões de ciclos de vida e variabilidade genética entre populações de *A. aegypti* coletadas em diferentes regiões do semi-árido paraibano.

### 2.2 Objetivos Específicos:

I - Comparar o ciclo de vida das populações de *A. aegypti* coletadas em diferentes municípios do semi-árido paraibano;

II - Quantificar a variabilidade genética nas populações de *A. aegypti*, através dos índices de heterozigosidade e polimorfismo;

III-Estimar as distâncias gênicas existentes entre as diferentes populações de *A. aegypti*;

IV-Estimar o grau de diferenciação genética e caracterizar a estrutura genética entre as populações de *A. aegypti* em diferentes níveis hierárquicos.

### 3.0 ESTADO DA ARTE

#### 3.1 Característica Etimológica e Geográfica da Caatinga

A etimologia da palavra caatinga é proveniente do tupi e sua formação lexical significa KAA (floresta, mata) e – TINGA (um sufixo que significa “branco”, “claro”) (AMANCIO ALVES, 2007), menção ao aspecto da vegetação durante a estação seca, quando a maioria das árvores perde as folhas e os troncos esbranquiçados e brilhantes dominam a paisagem (PRADO, 2003).

Em relação às várias definições existentes, a caatinga abrange um mosaico de arbustos espinhosos e florestas sazonalmente secas que cobre grande parte dos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e a parte nordeste de Minas Gerais, no vale do Jequitinhonha. Estendendo-se por cerca de 735.000 km<sup>2</sup> a 800.000 km<sup>2</sup> (CASTELLETTI et al., 2003; LEAL et al., 2005; PRADO, 2003).

Este bioma compreende cerca de 70% da região Nordeste e 11% do território nacional Bucher (1982)<sup>1</sup> *apud* Castelletti et al. (2003), apresentando características físicas e biológicas únicas no Nordeste brasileiro, consistindo de formações áridas e semi-áridas heterogêneas rodeadas por formações méxicos-fitogeográficos, possuindo limite crítico da Caatinga. Segue aproximadamente a isoietas de 1000 mm, na qual estende-se a pouco mais de 3°-16° de latitude Sul e de 35°-45° longitude Oeste (MARES et al., 1985; PRADO, 2003). No caso particular do Estado da Paraíba, 92% de toda sua área está inserida neste Bioma (IBGE, 2004).

#### 3.2 Características Físicas do bioma Caatinga

O principal e mais marcante componente físico do bioma Caatinga é seu clima, onde, segundo a classificação de Köppen, é do tipo semi-árido BSh (ANDRADE-LIMA, 1981). O tipo climático é Bsh - semi-árido quente, estando inserido na área mais seca do Estado com precipitações médias anuais muito baixas (média de 500 mm), e uma estação seca que pode atingir onze meses (EMEPA, 2008). Temperaturas médias anuais muito elevadas é outra característica acentuada (REIS, 1976), com valores entre 26 a 28°C (NIMER, 1972).

---

<sup>1</sup> BUCHER, E.H. 1982. Chaco and caatinga – South American arid savannas, woodlands and thickets. Pp. 48-79 in: B. J. Huntley & B. H. Walther (eds.) Ecology of tropical savannas. Springer-Verlag, New York.

Entretanto, todas as áreas superiores a 250 m de altitude possuem temperaturas médias mais baixas (20 – 22°C) (PRADO, 2003).

De acordo com Arruda (1997), a região Nordeste se caracteriza por apresentar altas temperaturas e ser a região mais seca do país. A sua variabilidade espacial e temporal de precipitação são elevadas, o que é característico de climas semi-áridos. Os índices, de um ano para outro, possuem desvio de até 200%. A análise climatológica indica que a semi-aridez é provocada por mecanismos da circulação geral da atmosfera, conhecida como circulação de HADLEY-WALKER. A interação das células de HADLEY e WALKER estabelece a variabilidade e a intensidade de aridez (SILVA, 1980).

Esse clima possui precipitação anual de baixa a moderada, variando de 300 mm na maioria das regiões áridas até mais de 1600 mm nas regiões de platô elevado os quais recebem chuvas orográficas (MARES et al., 1985). Cerca de 50% da área recebe menos de 750 mm, enquanto certas regiões localizadas têm menos de 500 mm, tais como o raso da Catarina, juntamente com uma grande área central dos Estados de Pernambuco e Paraíba (PRADO, 2003). O semi-árido nordestino apresenta uma longa estação seca, onde as chuvas são caracterizadas como torrenciais e irregulares, havendo períodos de extrema deficiência hídrica, denominados de seca, que têm ocorrido com frequência irregular a cada 10 - 20 anos (RODAL et al., 1992).

Este cenário possui condições ideais para a infestação do *Aedes aegypti* no Brasil e, em particular na Região Nordeste, sendo este alvo de grande preocupação no passado devido aos episódios de febre amarela urbana ((SUPERINTENDÊNCIA DE CAMPANHAS DE SAÚDE PÚBLICA, 1988). Esse inseto prefere a umidade, sendo mais comum no litoral e ao longo dos cursos d'água, mas isso não implica a sua inexistência em lugares áridos. É o que se verificou com a distribuição rural em grandes áreas semi-áridas do Nordeste brasileiro e paraibano (PESSÔA & MARTINS, 1978).

### **3.3 Histórico e estado atual da Dengue**

Segundo Andries (2008), o primeiro relato da doença semelhante à Dengue foi registrado numa enciclopédia chinesa da dinastia Chin (265 a 420 anos AEC). Foi denominada pelos chineses de veneno da água, pois acreditavam que de alguma maneira estava associada a insetos aquáticos.

Há divergência entre os autores em relação à primeira epidemia de dengue no mundo. Alguns autores acreditam que os primeiros relatos sobre a dengue ocorreram na Ilha de Java

em 1779 e, posteriormente, em 1780, nos Estados Unidos. Outros autores acreditam que a primeira epidemia da doença aconteceu em 1784 no continente europeu e, outros, preferem acreditar que o primeiro registro de casos aconteceu em Cuba, em 1782 (SILVA et al., 2008).

A Dengue é uma doença que possui ampla distribuição nos países tropicais e subtropicais, onde as condições do meio ambiente favorecem o desenvolvimento e a proliferação do *Aedes aegypti*, principal vetor (BARRERA et al., 2000; FORATTINI, 2002; McCONNELL & GUBLER, 2003).

Durante o século XIX, os surtos da dengue eram comuns em cidades portuárias do Caribe e nas Américas do Norte, Central e do Sul. (HALSTEAD, 2006). No Brasil, os principais casos da dengue foram registrados em meados do século XIX, entretanto, os primeiros relatos na literatura datam de 1916 e de 1923 (SANTOS et al., 2002; TEXEIRA et al., 1999). Apenas no início da segunda metade do Século XX foi observada soropositividade para o dengue na Amazônia, mas a primeira epidemia só viria a ser registrada em 1982, em Boa Vista (RR), produzida pelo vírus VDEN-1 e VDEN-4 (SANTOS et al., 2002).

Entre 1986 e 1990, as epidemias da dengue se restringiram aos estados das Regiões Sudeste (Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais) e Nordeste (Pernambuco, Alagoas, Ceará e Bahia) (FUNASA, 1999). A partir de 1990, observou-se uma ampliação das áreas de transmissão com aumento da circulação do VDEN-1 e introdução do VDEN-2, neste mesmo ano, também no Rio de Janeiro, agravou a situação da doença no Estado. (NOGUEIRA et al., 1990).

Segundo Câmara et al. (2007) a ocorrência da dengue depende de condições ecológicas e sócio-ambientais que propiciam a dispersão do vetor. Tanto a forma clássica como a hemorrágica da dengue é causada por vírus da família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*. Apenas são conhecidos 4 sorotipos de vírus da dengue (VDEN-1,VDEN-2,VDEN-3 e VDEN-4) (SCANDAR et al.,2003). A transmissão do vírus envolve a ingestão de sangue virêmico pelo mosquito e a passagem para um hospedeiro secundário humano susceptível (MONATH, 1994).

Atualmente, a dengue tem causado preocupação por ser um problema de saúde pública do Brasil e do Mundo (FIGUEIREDO, 1998; RIBEIRO et al., 2006). Em 2002, O sorotipo VDEN-3 provocou uma grande epidemia, inicialmente no Rio de Janeiro e mais tarde em todo o país (CUNHA et al., 2008).

No ano de 2008 foram notificados cerca de 900 mil casos da dengue nas Américas, dos quais, aproximadamente, 25 mil eram do tipo hemorrágica. Mais de 736 mil casos da doença foram provenientes do continente Sul-americano (PAHO, 2008).

A região Nordeste apresentou o maior número de casos de dengue notificados com 48,3% do total, seguido pelas regiões Sudeste com 37,2%, Centro-Oeste com 7,6%, Norte com 5,7% e Sul com 1,2%. Juntas, as regiões Nordeste e Sudeste concorreram para 85,5% dos casos notificados de dengue, sendo as séries históricas do estudo de cada região brasileira obtidas da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), compreendendo o período de 1986 a 2003 (CÂMARA et al., 2007).

Entre os meses de Janeiro a agosto de 2009, a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/ MS) registrou 406.883 casos suspeitos de dengue e 1.514 casos confirmados de Febre Hemorrágica da Dengue (FHD). A Região Nordeste registrou 136.713 casos suspeitos de dengue, sendo o Estado da Bahia com o maior número de casos suspeitos da doença na região com 101.676. No Estado da Paraíba foram notificados 884 casos (6,46 %), com menor índice da região Nordeste (SVS, 2009).

### **3.4 Aspectos bioecológicos de *Aedes aegypti***

O principal vetor do vírus da dengue é o mosquito *A. aegypti*, (L.) (BARRERA et al., 2000; MCCONNELL & GUBLER, 2003). O *A. aegypti* acompanhou o homem em sua permanente migração pelo mundo, e permaneceu onde as alterações antrópicas favoreceram a sua proliferação.

Este vetor tem conseguido explorar o ambiente antrópico, que fornece condições adequadas para sobrevivência dos adultos e enormes variedades de habitats para os estádios imaturos, favorecendo o aumento da densidade e a dispersão ativa e passiva do vetor (FORATTINI, 2002). A eficiência de dispersão deste culicídeo ocorre pela sua capacidade de realizar diapausa na fase de ovo quando em condições ambientais adversas.

O ciclo de vida desse inseto compreende quatro fases de desenvolvimento: ovo, larva (com quatro estádios), pupa e adulto (LOZOVEI, 2001). As formas imaturas se desenvolvem em água doce, parada e com pouca matéria orgânica, embora tenha sido verificado também em ambientes poluídos (CLEMENTS, 1999 *apud* FORATTINI & BRITO, 2003). As fêmeas adultas possuem hábitos diurnos com pico das atividades hematofágicas e postura durante os períodos matutino e vespertino (FORATTINI, 2002).

Os ovos de *A. aegypti* medem aproximadamente 1,0 mm de comprimento, tem forma alongada e são brancos inicialmente, tornando-se negro brilhante com o desenvolvimento embrionário (AGRELO, 1996). As larvas são exclusivamente aquáticas, sendo este período de alimentação e crescimento. O estágio larval do gênero *Aedes* é facilmente diferenciado de

outros gêneros por se manterem verticalmente na superfície da água e nadarem com um movimento característico de serpenteio, alimenta-se de partículas em suspensão na água e tem duração de quatro a oito dias (ALDAMA & GARCIA, 2001; CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002)). A fase pupal é a que intermedeia a fase larval e a adulta, semelhantes as larvas, as pupas são aquáticas, mas não se alimentam. (AGRELO, 1996; ALDAMA & GARCIA, 2001).

O adulto de *A. aegypti* apresenta sobre o mesonoto faixas longitudinais de escamas branco-prateadas em fundo escuro formando figura semelhante a uma lira. Os artículos tarsais das pernas posteriores possuem anéis claros e escuros, sendo o último inteiramente branco, os tergitos abdominais estão recobertos de escamas escuras, porém a fase ventral dos últimos segmentos possui manchas de escamas brancas presentes também nas extremidades laterais dos segmentos anteriores (ALDAMA & GARCIA, 2001; CARRERA, 1991; FORATTINI, 2002).

Os adultos de *A. aegypti* realizam o repasto açucarado, entretanto, apenas as fêmeas fazem o repasto sangüíneo, o qual é realizado com o objetivo de proporcionar o desenvolvimento ovariano, sendo a cópula importante fator estimulante para o início da atividade hematofágica (PAIXÃO, 2007). Barata et al. (2001) revelaram a preferência de *A. aegypti* por humanos como fonte de alimentação em 87,9% das fêmeas observadas.

A oviposição ocorre frequentemente no ciclo diurno, no qual é bimodal, com um pico matutino das 6:00 às 8:00 horas e outro, vespertino das 16:00 às 18:00 horas (FORATTINI, 2002). Em pesquisa realizada por Gomes et al. (2006) foi observada maior taxa de oviposição em laboratório durante o período de escotofase, ao entardecer, 72 horas após a realização do repasto sangüíneo. Em campo, a periodicidade de oviposição foi entre a 9ª e a 10ª hora da fotofase e entre a 1ª e a 2ª hora da escotofase.

As posturas, embora possam ser realizadas diretamente na água, são geralmente feitas nas paredes úmidas dos recipientes, pouco acima da superfície líquida (FORATTINI, 2002). Em ambiente natural apresentam como potenciais criadouros qualquer lugar que possa acumular água como ocos de árvores, buracos em rochas e bromélias. Em ambiente doméstico os criadouros podem ser recipientes artificiais como pneus, latas, caixas-d'água e lagos artificiais (DONALÍSIO & GLASSER, 2002; FORATTINI, 2002; LOZOVEI, 2001). Sabe-se que a fêmea produz em média 120 ovos, porém o número de ovos por postura depende da quantidade de sangue ingerido durante o repasto sangüíneo (FORATTINI, 2002), que são depositados em mais de um criadouro, comportamento denominado oviposição aos saltos (*skip oviposition*) (MOGI & MOKRY, 1980 *apud* FORATTINI, 2002).

Segundo Marzochi (1994) as alterações climáticas e os movimentos migratórios dos seres humanos fornecem condições ideais para o desenvolvimento do mosquito, para a circulação do vírus em diversas áreas e para o desenvolvimento do vírus dentro do organismo do vetor. No Estado da Paraíba, Beserra e Castor-Júnior (2008) mostraram que há um padrão diferenciado de desenvolvimento e de potencial biótico das populações de *A. aegypti*, provavelmente resultante de sua adaptação às condições climáticas próprias de cada região.

Dessa forma, é fundamental o desenvolvimento de estudos bioecológicos que auxiliem no entendimento da dinâmica populacional do mosquito, para que se possam desenvolver modelos para se determinar as áreas vulneráveis a infestações de *A.aegypti*. Beserra et al. (2009a) e Beserra et al. (2006) avaliaram o efeito da temperatura sobre o ciclo de vida de populações de *A. aegypti* e determinaram as exigências térmicas, e estimaram o número de gerações anuais do inseto em campo. Em laboratório, Beserra et al.(2009b) relataram a relação entre o ciclo de vida e a densidade larval, tamanho e fecundidade de *A.aegypti*.

### **3.5 Variabilidade genética em culicídeos vetores**

O estudo da variabilidade genética entre populações de culicídeos pode ser feito através de marcadores moleculares, pois permitem a análise de diferenciação genética de suas populações. Santos et al. (2003) identificaram através da técnica de RAPD, em populações de *A. aegypti* de distintas regiões geográficas do Estado de São Paulo, similaridade genética entre mosquitos cuja origem geográfica foi mais próxima, todavia, mosquitos da cidade litorânea como Santos, foram geneticamente mais próximos aos mosquitos criados em laboratório que àqueles coletados em regiões de Bauru, Araçatuba, Marília e Presidente Prudente do estado de São Paulo.

Santos et al.(2004) analisaram a estrutura genética de populações naturais de *Anopheles triannulatus* procedentes de Macapá (AP), Aripuanã (MT), Ji-Paraná (RO) e Manaus-Lago Janauari (AM), utilizando 16 locos enzimáticos. De acordo com os resultados verificou-se maior polimorfismo na população de Macapá e menor variabilidade genética na população de Manaus. Lourenço de Oliveira et al. (2003) verificaram também a diferenciação genética entre populações de *Aedes albopictus* provenientes do Brasil, dos Estados Unidos e das Ilhas Caiman, usando como marcador molecular as isoenzimas. Os autores constataram que tanto as populações do Brasil quanto a dos Estados Unidos eram altamente diferentes geneticamente.

Ravel et al. (2001) analisaram em estudos preliminares, através da técnica de microssatélites e AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados), a estrutura genética de populações de *A. aegypti* no México. Estes autores constataram polimorfismo limitado através de microssatélites, enquanto que pela análise dos marcadores AFLP foi possível verificar grupamentos de indivíduos da mesma cidade e do mesmo distrito.

A análise da estrutura genética de populações naturais de *A. aegypti* e *A. albopictus* na ilha de La Reunion, Oceano Índico, foi utilizada para verificar a diversidade e a taxa de dispersão dos mosquitos, constatando-se uma diferenciação genética para a população de *A. albopictus* dependente de características biológicas e fatores ecológicos (PAUPY et al., 2001).

Vazeille et al. (2001) analisaram a estrutura genética de populações de *A. aegypti* e *A. albopictus* em Madagascar, com o objetivo de verificar o fluxo gênico entre as populações. Foi verificada uma diferenciação genética menor entre as populações de *A. albopictus* coletadas em aglomerações conectadas por estradas altamente freqüentadas, indicando que o transporte humano favorece a dispersão do mosquito. Estes resultados têm implicações na transmissão epidêmica do vírus entre as duas espécies de *Aedes*.

Ayres et al. (2004), relataram que populações de *A. aegypti* do Brasil apresentavam altos níveis de diferenciação genética, nas áreas que utilizavam freqüentemente inseticidas químicos. Outros pesquisadores sugeriram que inseticidas geram uma pressão de seleção, sendo o principal fator que provoca a diversidade genética em populações de *A. aegypti* de áreas urbanas altamente povoadas (OCAMPO & WESSON, 2004; PAUPY et al., 2000).

Lima Júnior e Scarpassa (2009) investigaram a estrutura genética de coleções de *A. aegypti* de diferentes regiões geográficas da Amazônia usando o marcador ND4 do DNA mitocondrial. Os autores constataram, na análise da relação filogenética, duas linhagens distintas na Amazônia. Estas diferenças filogenéticas podem ter sido resultado da capacidade de dispersão passiva do vetor. Bracco et al. (2007) analisaram o parentesco e a estrutura genética de populações de *A. aegypti*, de 36 localidades nas Américas (Brasil, Peru, Venezuela, Guatemala, E.U.), três da África (Guiné, Senegal, Uganda), e três da Ásia (Singapura, Camboja, Taiti). Os Resultados das análises genéticas evidenciam presença de duas linhagens: uma relacionada à África (Senegal) e outra África e Ásia (Guiné e Uganda), sugerindo duas possíveis subespécies que circulam nas Américas.

Mukwaya et al. (2000) utilizando ITS (“internal transcribed spacers”), em um estudo com o complexo *Aedes simpsoni*, geralmente encontrado na região afro-tropical e considerado como o principal vetor de febre amarela da África central e oriental, separaram mediante um

cladograma as populações antropofílicas das não-antropofílicas. Estes resultados sugerem a existência de duas espécies diferentes de *A. simpsoni*.

O uso de marcadores de RAPD para análise genética de populações permite a constatação de grande número de polimorfismo a partir de pequena quantidade do DNA da amostra (OCAMPO & WESSON, 2004). Julio et al. (2009) analisaram os níveis de diversidade genética e diferenciação microgeográfica de populações de *A. aegypti* em setes bairros de Córdoba (Argentina), utilizando a técnica de RAPD-PCR. Os resultados do estudo revelaram altos níveis de variabilidade genética. Acredita-se que a diversidade genética nos bairros da cidade Córdoba é por estarem localizados na periferia e por serem focos iniciais de reinfestação, bem como apresentarem capacidade de dispersão das fêmeas de *A. aegypti*, originando populações diferentes.

### **3.6 Utilização da técnica da PCR-RAPD (Reação em Cadeia da Polimerase - Polimorfismo do DNA Amplificado Randomicamente)**

A biologia molecular utiliza-se de ferramentas para compreender diversos aspectos relacionados com o material genético dos insetos. Dentre os culicídeos, o gênero *Aedes* têm recebido especial atenção, possivelmente pela capacidade de transmitir a dengue e a febre amarela.

Dentre as técnicas de estudo do DNA, a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi concebida por Kary Mullis em meados da década de 80 (MULLIS & FALOONA, 1987; SAIKI et al., 1985). Desde sua concepção, esta técnica causou uma verdadeira inovação na biologia, quer seja na pesquisa visando à compreensão de processos biológicos fundamentais como nas áreas aplicadas envolvendo diagnósticos e melhoramento genético de vegetais e animais (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica que envolve a síntese *in vitro*, de milhões de cópias de um segmento de DNA na presença da enzima DNA polimerase (ALBERTS et al., 1997). A reação de PCR se baseia no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos iniciadores (pequenas moléculas de DNA de fita simples) que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla alvo da amplificação (FERREIRA & GRATTAGLIA, 1998).

A maior aplicação desta metodologia é a possibilidade de se ampliar, numa determinada seqüência do DNA, sem a necessidade do uso de tradicionais técnicas da clonagem molecular. Uma simples cópia de um gene específico dentro de um genoma pode

ser amplificada para alguns microgramas, partindo-se de quantidades mínimas como picogramas de DNA total. A condição básica para a aplicação da técnica, depende da construção de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), os quais são complementares as duas fitas opostas de DNA e que estejam flanqueando a seqüência a ser amplificada (MITCHEL et al., 1997).

A partir do desenvolvimento da PCR, outras metodologias foram empregadas em conjunto. Dentre as técnicas mais utilizadas no estudo de espécies e populações vetoras, destacam-se: PCR-RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), PCR-AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), microssatélites ou STR (Short Tandem Repeat), SSCP (Singlestrand Conformation Polymorphism), AS-PCR (Allele-specific PCR) e o seqüenciamento de genomas inteiros de genes e regiões específicas do genoma.

Williams et al. (1990) e Welsh e McClelland (1990) desenvolveram simultaneamente as técnicas PCR-RAPD (DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso) e PCR-AP (PCR com Iniciadores Arbitrários), respectivamente, que dispensam o conhecimento prévio sobre a seqüência a ser amplificada.

A PCR-RAPD é uma variação da PCR que se baseia na amplificação do DNA, através da utilização de um único oligonucleotídeo curto com seqüência arbitrária e baixa temperatura de anelamento (35-36°C/baixa estringência). Estas duas modificações diminuem a especificidade da reação de maneira que fragmentos de seqüência anônima possam ser amplificados (BOWDITCH et al., 1993; WILLIAMS et al., 1990). Embora os iniciadores apresentem seqüência arbitrária, devem conter em torno de 10 pares de bases, conteúdo GC de 50-70% e não devem conter seqüências palindrômicas, para evitar o autopareamento (WILLIAMS et al., 1993).

Alterações em fatores como temperatura de anelamento, concentração do iniciador, tamanho e seqüência do iniciador, concentração de magnésio e quantidade de DNA podem alterar o padrão de bandas RAPD amplificados (WELSH & MCCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1993). Isto exige que as condições experimentais sejam otimizadas para materiais distintos, e que estas sejam rigorosamente seguidas. A AP-PCR é similar a PCR-RAPD, porém faz uso de iniciadores mais longos. Além disso, utiliza ciclos de baixa estringência (anelamento a 40°C) seguidos por ciclos de alta estringência (anelamento a 60°C) (WELSH & MCCLELLAND, 1990).

A maioria dos marcadores RAPD comporta-se como marcadores genéticos dominantes (BOWDITCH et al., 1993). Dominância nesse caso não se refere ao conceito

clássico de interação gênica entre alelos de um mesmo loco, e sim puramente do ponto de vista de interpretação relativa entre genótipo e fenótipo de um indivíduo.

Ao se observar uma banda RAPD, não é possível distinguir se aquele segmento originou-se a partir de uma ou duas cópias da sequência amplificada. Ou seja, um indivíduo diplóide homocigoto para aquele loco RAPD possui dois alelos. RAPD idênticos (*AA*) a partir dos quais a amplificação ocorre. Por outro lado, um indivíduo heterocigoto (*Aa*) para o mesmo loco RAPD possui um alelo (*A*) que é amplificado e o outro (*a*) que não o é (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996). A PCR-RAPD não permite a diferenciação entre indivíduos homocigotos dominantes e heterocigotos, somente a presença ou ausência da banda RAPD pode ser detectada (WILLIAMS et al., 1993).

A técnica PCR-RAPD tem sido empregada com sucesso em diferentes grupos de insetos e com diferentes objetivos, como por exemplo: a) para identificação de espécies de: *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae) (RAMPELOTTI et al., 2008), parasitóides (*Trissolcus* spp) (ALJANABI et al., 1998), *Anopheles* (CALADO & NAVARRO-SILVA, 2005), de subespécies de *A. aegypti* (BALLINGER-CRABTREE et al., 1992) b) caracterização da estrutura e variabilidade genética de populações de *Lutzomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Diptera: Psychodidae) (SOUZA et al., 2004) e *A. aegypti* (APOSTOL et al., 1996; AYRES et al., 2003).

Willians et al.(1990) relatou que os fragmentos obtidos por RAPD têm se mostrado sensíveis às pequenas mudanças nas condições de reação, principalmente no que diz respeito ao tipo de DNA polimerase utilizado, concentração do DNA molde, do cloreto de magnésio e do perfil de temperatura do termociclador utilizado.

## 4.0 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Caracterização da área de procedência do vetor

Nesta pesquisa as amostras das populações de *A. aegypti* coletadas em 10 municípios do semi-árido paraibano (bioma caatinga), a saber: Campina Grande, Alcantil, Monteiro Pedra-Lavrada, Barra de Santana, Serra Branca, Cuité, Santa Luzia, Queimadas e Livramento (Figura 1), todos descritos a seguir (EMBRAPA, 2006; IBGE, 2008; RODRIGUEZ et al., 2002). A escolha da área de estudo obedeceu aos seguintes critérios: (1) indicativo da existência de focos de *A. aegypti* (2) importância nas mesorregiões ou microrregiões onde estão localizados, (3) acessibilidade, (5) carência de estudos bioecológicos e genéticos nas regiões citadas, (6) Apoio logístico dos agentes de saúde.

**1. Campina Grande** - A população total do município é estimada em 371.060 habitantes, sendo a sua área geográfica de 621 km<sup>2</sup>. O município está localizado na mesorregião do Agreste e microrregião de Campina Grande. Suas coordenadas geográficas são 07° 13' 50" latitude Sul e 35° 52' 52" de longitude Oeste .

**2. Alcantil** - A população total do município é estimada em 5.068 habitantes, sendo a sua área geográfica de 305 km<sup>2</sup>. O município está localizado na mesorregião Borborema e microrregião do Cariri Oriental. Suas coordenadas geográficas são 07° 44' 38" latitude Sul e 36° 03' 22" de longitude Oeste.

**3. Monteiro** - A população total do município é estimada em 29.980 habitantes, sendo a sua área geográfica de 986 km<sup>2</sup>. O município está localizado na mesorregião da Borborema e microrregião do Cariri Ocidental. Suas coordenadas geográficas são 07° 53' 22" latitude Sul e 37° 07' 12" de longitude Oeste;

**4. Pedra Lavrada** - A população total do município é estimada em 6.810 habitantes, sendo a sua área geográfica de 352 km<sup>2</sup>. O município está localizado na mesorregião da Borborema e microrregião Seridó Oriental Paraibano. Suas coordenadas geográficas são 06° 45' 28" latitude Sul e 36° 28' 15" de longitude Oeste.

**5. Barra de Santana** - A população total do município é estimada em 8.619 habitantes, sendo a sua área geográfica de 369 km<sup>2</sup>. O município está localizado na mesorregião Borborema e microrregião do Cariri Oriental. Suas coordenadas geográficas são 07° 31' 13" latitude Sul e 35° 59' 59" de longitude Oeste.

**6. Serra Branca** - A população total do município é estimada em 12.413 habitantes, sendo a sua área geográfica de 738 km<sup>2</sup>. O município está localizado na mesorregião

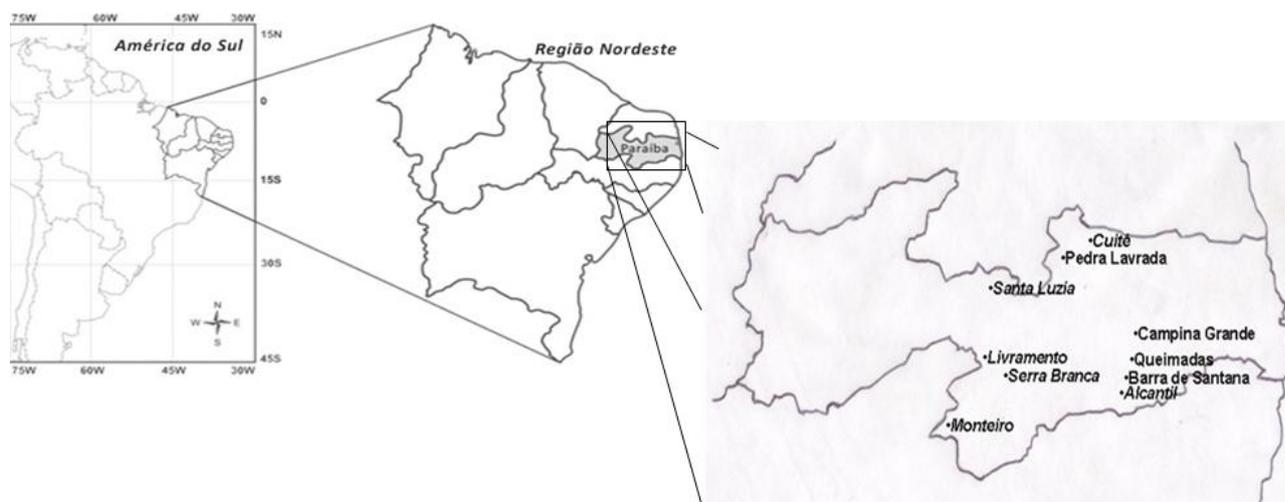
Borborema e microrregião do Cariri Ocidental. Suas coordenadas geográficas são 07° 29' 00" latitude Sul e 36° 39' 54" de longitude Oeste.

**7. Cuité** - A população total do município é estimada em 20.197 habitantes, sendo a sua área geográfica de 735 km<sup>2</sup>. O município está localizado na mesorregião do Agreste Paraibano e microrregião Curimataú Ocidental. Suas coordenadas geográficas são 06° 29' 01" latitude Sul e 36° 09' 13" de longitude Oeste .

**8. Santa Luzia**- A população total do município é estimada em 14.292 habitantes, sendo a sua área geográfica de 456 km<sup>2</sup>. O município está localizado na mesorregião Borborema e microrregião do Seridó Ocidental Paraibano. Suas coordenadas geográficas são 06° 52' 20" latitude Sul e 36° 55' 07" de longitude Oeste.

**9. Queimadas**- A população total do município é estimada em 38.883 habitantes, sendo a sua área geográfica de 409 km<sup>2</sup> . O município está localizado na mesorregião Agreste Paraibano e microrregião de Campina Grande. Suas coordenadas geográficas são 07° 21' 30" latitude Sul e 35° 53' 54" de longitude Oeste ;

**10. Livramento** - A população total do município é estimada em 7.105 habitantes, sendo a sua área geográfica de 283 km<sup>2</sup>. O município está localizado na mesorregião Borborema e microrregião do Cariri Ocidental. Suas coordenadas geográficas são 07° 22' 27" latitude Sul e 36° 56' 47" de longitude Oeste.



**Figura 1.** Municípios de Coleta de populações de *A. aegypti* no semi-árido paraibano

## 4.2 Obtenção das populações de *Aedes aegypti*

As coletas das amostras de populações de *A. aegypti* foram realizadas com o emprego de armadilha para coleta de ovos (ovitampas), entre os meses de novembro de 2007 e maio de 2008, até o estabelecimento das populações em laboratório. As Armadilhas para coleta de ovos, foram constituídas de um balde plástico de cor preta, medindo 30 cm de diâmetro por 15 cm de profundidade, contendo furos a 7,5 cm do fundo, para evitar o preenchimento total e o transbordamento de água. No interior destas utilizou-se como substrato de oviposição, palhetas de eucatex de 12 cm de comprimento por 2,5 cm de largura, presas por um clipe à parede interna do balde. As armadilhas foram recolhidas três dias após sua instalação e o material coletado conduzido ao laboratório, identificada à espécie, utilizando-se a chave de identificação segundo Forattini (2002) e em seguida estabelecidas às criações.

## 4.3 Criações das populações de *Aedes aegypti* em laboratório

A criação das populações de *A. aegypti* foi desenvolvida no Laboratório de Controle Biológico do Núcleo de Manejo Integrado de Pragas (NMIP) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), em sala de criação climatizada a temperatura de  $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa de  $60 \pm 10\%$  e fotofase de 12 horas, utilizando-se a primeira geração de laboratório ( $F_1$ ), segundo metodologia descrita abaixo.

As palhetas de eucatex com postura de *A. aegypti* foram colocadas para secar por um período de 24 horas sendo, em seguida, acondicionadas em bandejas plásticas de cor branca medindo 40,0 cm de comprimento x 27,0 cm de largura x 7,5 cm de profundidade com um terço da sua capacidade preenchida com água desclorada. Após a eclosão das larvas, foi ofertada ração para peixe ornamental (Alcon/goldfish crescimento) na proporção de 100 mg/bandeja as quais foram cobertas por uma tela de malha fina. As pupas, após sexadas, foram transferidas em copos descartáveis de 250 ml para as gaiolas de criação dos adultos.

Essas gaiolas, construídas de armação de madeira e tecido tipo organza medindo 40,0 cm x 40,0 x 30,0 cm de fundo, receberam 200 indivíduos, sendo 100 machos e 100 fêmeas. Aos adultos ofertou-se uma solução de mel a 20%, e às fêmeas foi permitido repasto sanguíneo, em codornas, *Coturnix japonica* (TEMMINCK & SCHLEGEL, 1849) durante quarenta minutos, três vezes por semana. Após cada repasto foi colocado em cada gaiola, um

pote de plástico descartável com capacidade para 150 ml, e um funil envolto interiormente com um papel toalha e água desclorada para servir como substrato de oviposição.

#### **4.4 Ciclos de vidas comparados de *Aedes aegypti***

Os ciclos de vida das populações de *A. aegypti* foram estudados em salas climatizadas a temperatura de  $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa de  $60 + 10\%$  e fotofase de 12 horas, considerando a primeira geração de laboratório ( $F_1$ ). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dez tratamentos (populações) e quatro repetições. Durante a fase larval as repetições foram constituídas de bandejas plásticas de cor branca medindo 40,0 cm de comprimento x 27,0 cm de largura x 7,0 cm de profundidade, cobertas com uma tela de malha fina, contendo 1 litro de água destilada e 100 larvas de *A. aegypti* recém eclodidas. As pupas foram sexadas e mantidas em copos de polietileno (250 ml) até próximo à emergência dos adultos, quando então foram transferidas para as gaiolas de criação dos adultos.

Diariamente, foram aferidas a temperatura da água de desenvolvimento larval e pupal através de um termômetro químico com aferição até  $60^{\circ}\text{C}$  e pH por meio de um pHmetro digital (Figura 2). Os Adultos foram mantidos em gaiolas de madeira telada ( $20,0\text{ cm}^3$ ) contendo vinte casais, em cinco repetições, sendo fornecidas a estes uma solução de mel a 20% e para as fêmeas, permitido repasto sanguíneo em codornas, durante 15 minutos, três vezes por semana.

A forma de alimentação das larvas foi a mesma da metodologia de criação de *A. aegypti* (ver item 4.3). A avaliação do período embrionário foi realizada a partir das 20 primeiras posturas, distribuídas em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro x 1,5 cm de profundidade, contendo água destilada suficiente para encobrir os ovos. Foram realizadas avaliações diárias, registrando-se o período de desenvolvimento e a mortalidade das fases de ovo, larva e pupa, a razão sexual, a longevidade, a fecundidade e o tamanho dos adultos. Para a avaliação do tamanho dos adultos, utilizou-se como parâmetro a envergadura das asas. A medição das asas foi realizada através de uma ocular micrométrica acoplada a um microscópio estereoscópico, fazendo a medição a partir da álula até a extremidade da asa, desconsiderando-se a franja, segundo metodologia descrita em Gama et al. (2005).

As variáveis biológicas avaliadas foram submetidas à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Com os parâmetros biológicos, foi realizado, ainda, uma análise de agrupamento (“Cluster analyses”), utilizando-se uma matriz de

distância euclidiana através do método da média não-ponderada, para se avaliar o grau de similaridade entre as populações estudadas (BESERRA et al., 2003).



**Figura 2.** Aferição do pH das águas para o desenvolvimento larval de *Aedes aegypti*

#### **4.5 Isolamento de DNA e Análise por RAPD-PCR**

A pesquisa foi desenvolvida no laboratório de Biotecnologia e Patologia de Insetos da Embrapa/Algodão, Campina Grande, PB.

O DNA genômico do *A. aegypti* foi extraído utilizando cerca de 20 indivíduos por população, colocados em tubos de microcentrífuga e macerados individualmente com adição posterior de 500 µl de tampão de lise (NaCl 0,4M, EDTA 2mM, Tris-HCl 10mM, pH 8,0), proteinase K (2,5 µl) e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 72 µl à 10%. O homogenato foi incubado por 2 horas a 65° C. Posteriormente, foram adicionados 500 µl de uma mistura de clorofórmio: álcool isoamílico (CIA) (24:1) e em seguida as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 min a 4° C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o ácido nucléico precipitado através da adição de igual volume de isopropanol gelado, e a mistura mantida a -20° C por 1 h para precipitação do DNA. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 14.000 rpm por 30 min a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado uma vez com 500 µl de etanol a 70%, centrifugado a 14.000 rpm por 10 min a 4° C, seco, resuspendido em 20 µl de Tris-EDTA (Tris 10 mM, EDTA 1 mM), misturado em agitador tipo “vórtex” por 1 min.

Para amplificação dos marcadores RAPD-PCR, inicialmente foram testados sessenta oligonucleotídeos (Operon®) das séries OPP1-10, OPN 1-10, OPZ 1- 20 e OPE 1-20. Destes, foram selecionados os que apresentarem melhor eficiência e reprodutibilidade. A reprodutibilidade dos amplicons obtidos foi testada utilizando o mesmo DNA em três diferentes reações de PCR. Cada reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25 µl, usando os seguintes componentes: Tris-HCl 10 mM pH 9,0, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 400 pmol de cada oligonucleotídeo, 2U de Taq DNA polimerase, 0,2 mM de cada dNTP e 15 ng de DNA molde. As amplificações foram realizadas em um termociclador programado para 40 ciclos a 94° C por 1 min, 35° C por 1 min, 72° C por 2 min e um ciclo final de 72° C por 10 min. O produto final da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,4 % no tampão Tris-Borato-EDTA/TBE (Tris 0,089 M; Ácido bórico 0,0089 M; EDTA 0,002 M, pH 8,3) corado com Syber green (SAMBROOK et al. 1989), e visualizado em um transiluminador de ultravioleta.

#### 4.6 Análise de variabilidade genética

Para análise dos dados de RAPD, quatro premissas foram assumidas: 1) os alelos apresentam herança mendeliana; 2) as populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg; 3) bandas com mesma mobilidade eletroforética são homólogas; e 4) alelos não amplificados são tidos como recessivos. Após eletroforese foi realizada uma análise binária nos géis, onde os *loci* foram analisados como presente (1) ou ausente (0), não levando em consideração a intensidade das bandas. A partir da matriz construída foram calculados os índices de diversidade genética: frequências alélicas, proporção de *loci* polimórficos e heterozigosidade, utilizando o programa TFPGA versão 1,3 (MILLER, 1997).

De acordo com McDermott e McDonald (1993), os cálculos da distância genética de Nei (1978) e o índice de diferenciação genética ( $G_{ST}$ ), foram obtidos utilizando o software POPGENE versão 1.32 (YEH & BOYLE, 1997). A distância genética de Nei (1978) foi utilizada para a construção do dendrograma utilizando-se o mesmo software (YEH & BOYLE, 1997). As comparações dentro e entre as populações de *A. aegypti* foram realizadas através da análise de variância molecular (AMOVA) (EXCOFFIER et al., 1992), utilizando o programa GenAlEx versão 6.2 (PEAKALL & SMOUSE, 2006).

## 5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Ciclo aquático de *Aedes aegypti*

Houve pouca variação na temperatura média da água em que ocorreu o desenvolvimento de *A. aegypti* sendo a menor temperatura de 24,75°C, verificada durante o desenvolvimento de larvas provenientes do município de Monteiro e a maior de 25,14°C, para aquelas dos municípios de Livramento e Alcantil (Tabela 1). Nestas condições, além de serem controladas a temperatura, umidade relativa e fotoperíodo, não se constatou diferenças estatísticas significativas com relação à duração e viabilidade das fases de ovo, larva e pupa entre as amostras das populações dos diferentes municípios (Tabela 1 e 2).

A duração do período de desenvolvimento teve uma variação de 3,79 a 4,79 dias para a fase de ovo, de 9,15 a 10,89 dias para fase de larva e de 2,18 a 2,59 dias para a fase de pupa respectivamente (Tabela 1).

A viabilidade variou de 82,8% a 97,7% para a fase de ovo, de 91,2% a 99,2% para fase de larva e de 93,5% a 98,4% para a fase de pupa respectivamente (Tabela 2).

O tempo médio de desenvolvimento observado nesta pesquisa para a fase de ovo são similares aos resultados obtidos por Beserra et al. (2006), que ao compararem os ciclos de vidas de amostras de populações de *A. aegypti* dos municípios de Brejo dos Santos, Boqueirão, Campina Grande, Itaporanga e Remígio, no estado da Paraíba, registraram, a 26° C, uma variação média de 4,1 a 4,7 dias. Resultados corroborados, ainda, pelos experimentos de Beserra e Castro-Júnior (2008) que em estudo análogo, constataram uma variação média de 3,8 a 4,4 dias para a fase de ovo. Porém, para a fase larval, os tempos de desenvolvimentos variando de 9,15 a 10,89 dias verificados nesta pesquisa, foram maiores do que os relatados por estes autores que verificaram uma variação de 6,8 a 8,3 dias. Isso pode ser explicado pela diferença de densidades nas quais as larvas foram submetidas. No estudo de Beserra e Castro-Júnior (2008) as larvas estavam em menor densidade populacional, cinco larvas para 250 ml de água, enquanto que o presente estudo apresentou uma maior densidade populacional do vetor, com 100 larvas para 1.000 ml de água.

**Tabela 1.** Duração (dias) ( $\bar{X} \pm EP$ ) das fases de ovo, larva e pupa, e razão sexual das populações de *A. aegypti* de diferentes regiões do semi-árido paraibano. Temperatura ambiente:  $26 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ , UR:  $60 \pm 10\%$  e fotofase: 12 horas.

População	Temperatura da água ( $^{\circ}\text{C}$ )	Duração			Razão sexual <sup>1</sup> .
		Ovo <sup>1</sup> .	Larva	Pupa	
Campina Grande	$24,98 \pm 0,14$	$4,59 \pm 0,33$ <sup>n.s.</sup>	$9,35 \pm 0,60$ <sup>n.s.</sup>	$2,47 \pm 0,10$ <sup>n.s.</sup>	$0,31 \pm 0,09$ <sup>n.s.</sup>
Pedra Lavrada	$24,94 \pm 0,11$	$4,79 \pm 0,31$ <sup>n.s.</sup>	$9,96 \pm 0,49$ <sup>n.s.</sup>	$2,34 \pm 0,02$ <sup>n.s.</sup>	$0,32 \pm 0,02$ <sup>n.s.</sup>
Santa Luzia	$25,08 \pm 0,06$	$3,87 \pm 0,17$ <sup>n.s.</sup>	$9,84 \pm 0,29$ <sup>n.s.</sup>	$2,36 \pm 0,20$ <sup>n.s.</sup>	$0,45 \pm 0,10$ <sup>n.s.</sup>
Livramento	$25,14 \pm 0,10$	$3,79 \pm 0,38$ <sup>n.s.</sup>	$10,57 \pm 0,42$ <sup>n.s.</sup>	$2,41 \pm 0,07$ <sup>n.s.</sup>	$0,41 \pm 0,05$ <sup>n.s.</sup>
Queimadas	$25,08 \pm 0,09$	$4,33 \pm 0,29$ <sup>n.s.</sup>	$10,82 \pm 0,26$ <sup>n.s.</sup>	$2,44 \pm 0,05$ <sup>n.s.</sup>	$0,47 \pm 0,05$ <sup>n.s.</sup>
Alcantil	$25,14 \pm 0,12$	$4,29 \pm 0,20$ <sup>n.s.</sup>	$9,28 \pm 0,60$ <sup>n.s.</sup>	$2,18 \pm 0,14$ <sup>n.s.</sup>	$0,39 \pm 0,03$ <sup>n.s.</sup>
Serra Branca	$24,91 \pm 0,16$	$4,34 \pm 0,21$ <sup>n.s.</sup>	$10,25 \pm 1,08$ <sup>n.s.</sup>	$2,41 \pm 0,06$ <sup>n.s.</sup>	$0,42 \pm 0,05$ <sup>n.s.</sup>
Barra de Santana	$25,04 \pm 0,11$	$4,65 \pm 0,31$ <sup>n.s.</sup>	$9,15 \pm 0,94$ <sup>n.s.</sup>	$2,59 \pm 0,09$ <sup>n.s.</sup>	$0,48 \pm 0,06$ <sup>n.s.</sup>
Monteiro	$24,75 \pm 0,13$	$4,07 \pm 0,22$ <sup>n.s.</sup>	$10,89 \pm 0,30$ <sup>n.s.</sup>	$2,43 \pm 0,10$ <sup>n.s.</sup>	$0,51 \pm 0,03$ <sup>n.s.</sup>
Cuité	$24,83 \pm 0,11$	$4,02 \pm 0,28$ <sup>n.s.</sup>	$10,29 \pm 0,45$ <sup>n.s.</sup>	$2,47 \pm 0,04$ <sup>n.s.</sup>	$0,42 \pm 0,02$ <sup>n.s.</sup>
<b>C.V. (%)</b>	-	<b>14,08</b>	<b>12,04</b>	<b>8,55</b>	<b>6,22</b>

1. Médias originais. Para efeito da análise estatística os dados foram transformados em  $\sqrt{X + 0,50}$

<sup>n.s.</sup> Não significativo pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

**Tabela 2.** Viabilidade (%) ( $\bar{X} \pm EP$ ) das fases de ovo, larva e pupa das populações de *A. aegypti* de diferentes regiões do semi-árido paraibano. Temperatura ambiente:  $26 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , UR:  $60 \pm 10\%$  e fotofase: 12 horas.

População	Temperatura da água (°C)	Viabilidade		
		Ovo	Larva	Pupa
Campina Grande	$24,98 \pm 0,14$	$92,60 \pm 4,96^{n.s.}$	$91,25 \pm 3,20^{n.s.}$	$95,03 \pm 1,53^{n.s.}$
Pedra Lavrada	$24,94 \pm 0,11$	$96,86 \pm 1,76^{n.s.}$	$95,25 \pm 3,54^{n.s.}$	$94,20 \pm 2,40^{n.s.}$
Santa Luzia	$25,08 \pm 0,06$	$97,74 \pm 1,31^{n.s.}$	$92,75 \pm 7,25^{n.s.}$	$96,22 \pm 1,69^{n.s.}$
Livramento	$25,14 \pm 0,10$	$82,88 \pm 8,10^{n.s.}$	$96,50 \pm 2,60^{n.s.}$	$98,46 \pm 0,90^{n.s.}$
Queimadas	$25,08 \pm 0,09$	$86,22 \pm 6,17^{n.s.}$	$98,75 \pm 1,25^{n.s.}$	$97,43 \pm 0,82^{n.s.}$
Alcantil	$25,14 \pm 0,12$	$93,35 \pm 2,53^{n.s.}$	$94,25 \pm 3,38^{n.s.}$	$96,41 \pm 1,21^{n.s.}$
Serra Branca	$24,91 \pm 0,16$	$96,68 \pm 1,68^{n.s.}$	$99,25 \pm 0,75^{n.s.}$	$94,68 \pm 3,77^{n.s.}$
Barra de Santana	$25,04 \pm 0,11$	$97,51 \pm 1,22^{n.s.}$	$93,25 \pm 5,76^{n.s.}$	$95,84 \pm 2,41^{n.s.}$
Monteiro	$24,75 \pm 0,13$	$95,06 \pm 2,31^{n.s.}$	$98,75 \pm 1,25^{n.s.}$	$93,57 \pm 3,17^{n.s.}$
Cuité	$24,83 \pm 0,11$	$87,04 \pm 5,66^{n.s.}$	$97,25 \pm 0,95^{n.s.}$	$97,44 \pm 0,64^{n.s.}$
<b>C.V. (%)</b>	-	<b>20,63</b>	<b>7,57</b>	<b>4,39</b>

<sup>n.s.</sup> Não significativo pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

Embora, não se tenha detectado diferenças significativas com relação ao período de desenvolvimento embrionário nas populações *A. aegypti*, estudos de Beserra et al.(2009a) verificaram que a 26°C em amostras de populações de Boqueirão, Campina Grande e Remígio, a duração média foi de 6,1, 4,7 e 5,2 dias respectivamente, por tanto maiores que as encontradas no presente estudo.

A duração média de desenvolvimento verificada nesta pesquisa para a fase de pupa foi semelhante aos com os resultados verificados por Beserra et al. (2006), que comparando o ciclo de vida de amostras de populações de *A. aegypti*, registraram, a 26° C, uma variação média de 2,1 a 2,7 dias para a fase de pupa. Resultados corroborados pelos experimentos de Beserra e Castro-Júnior (2008) constataram, ainda, uma variação média de 2,0 a 2,5 dias para fase de pupa.

A razão sexual foi praticamente a mesma para as dez populações, obtendo-se uma variação de 0,31 a 0,51, constatando-se que houve, proporcionalmente, maior quantidade de machos do que de fêmeas. Observa-se que apenas nas populações de Queimadas, Barra de Santana e Monteiro os valores foram próximos de 0,50, sendo a razão sexual nessas populações de um macho para uma fêmea aproximadamente (Tabela 1).

A viabilidade do estágio de ovo verificada para as populações estudadas foi considerada alta e está próxima das relatadas em outros estudos, como o de Farnesi et al. (2009), que a 25° C encontraram porcentagem de eclosão de 96,0%, e o de Beserra et al. (2006) e Silva e Silva (1999), que verificaram acima de 80,0% de eclosão de larvas para populações de *A. aegypti*. O presente estudo apresentou alta viabilidade larval e pupal com porcentagem acima de 90,0% (Tabela 2), esses resultados são semelhantes dos estudos obtidos por Tejerina et al. (2009) que estudaram quatro subpopulações de *A. aegypti* da província das Missões (Argentina), sob condições semi-naturais, provenientes das localidades de Posadas (PB), San Javier (SE), Bernardo de Irigoyen (NE) e Puerto Libertad (NW). A pesquisa registrou alta porcentagem de sobrevivência larval e pupal (97-100%), e não se detectaram diferenças significativas entre as quatro subpopulações.

Os valores dos padrões de desenvolvimento discordam das observações de Beserra et al. (2006) e Beserra e Castro-Júnior (2008) segundo os quais os padrões de crescimento do *A. aegypti*, quando submetidos às mesmas condições de laboratório, sofreram diferenciações em função da região de origem da população.

## 5.2 Longevidade de adultos e número de ovos por fêmea de *Aedes aegypti*

A longevidade dos adultos de *A. aegypti* apresentou uma variação de 37,82 a 58,29 dias para os machos e 40,03 a 73,07 dias para as fêmeas (Tabela 3). Comparando-se a longevidade de machos e de fêmeas nas populações de *A. aegypti*, observa-se que em todas as populações foi constatada diferença estatística significativa entre os sexos. Os resultados de longevidade concordam com os relatados por Beserra et al. (2009b) para *A. aegypti* que encontraram longevidades médias variando de 67,20 a 80,52 dias para as fêmeas e 50,08 a 62,23 dias para os machos. Estudos realizados com outras espécies do gênero *Aedes*, como *A. albopictus*, também verificaram maior longevidade das fêmeas em relação aos machos (CALADO & NAVARRO-SILVA, 2002; DELATTE et al., 2009; LÖWENBERG NETO & NAVARRO-SILVA, 2004).

Segundo Panizzi e Parra (1991), a produção de ovos é influenciada por fatores bióticos e abióticos, possui influência indiretamente no desenvolvimento larval e diretamente na fase adulta. O fator nutricional adequado para a fase larval pode ser um estimulante de oviposição, assim como influenciar o número de ovariolos por ovários diferenciados e, conseqüentemente, o potencial para produção de ovos.

O número de ovos por fêmea diferiu significativamente de acordo com o município de coleta do vetor (Tabela 3). A menor fecundidade, com média de 153,61 ovos/fêmea ocorreu para população de Pedra Lavrada, enquanto a de Campina Grande apresentou a maior fecundidade com 310,61. Com exceção dos municípios de Campina Grande, Alcantil, Barra de Santana e Monteiro, onde o número médio de ovos/fêmea foi maior que 200, verifica-se que a fecundidade foi menor do que a encontrada para essa espécie por Beserra et al. (2006), onde, exceto para *A. aegypti* de Brejo dos Santos, nas demais populações as fêmeas ovipositaram acima de 200 ovos. O que é corroborado pelos resultados de Beserra e Castro-Júnior (2008) obtiveram a fecundidade entre 217,3 e 260,4 ovos/fêmea. Beserra et al. (2009a) também constataram alta fecundidade para *A. aegypti*, observando uma média de 610,6 ovos/fêmea para essa espécie originada do município de Boqueirão. Porém, ao contrário da presente pesquisa, para a população de Campina Grande, os autores observaram baixa fecundidade, com media de 89,4 ovos/fêmeas à temperatura de 26°C.

**Tabela 3.** Longevidade dos adultos e número de ovos por fêmea de *Aedes aegypti* de populações do semi-árido paraibano. Temperatura ambiente:  $26 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ , UR:  $60 \pm 10\%$  e fotofase: 12 horas.

População	Longevidade <sup>1</sup>		Número de ovos/fêmea <sup>1,2</sup>
	Macho	Fêmea	
Campina Grande	49,62 ± 2,38AB	71,47 ± 3,27AB	310,61 ± 38,33A
Pedra Lavrada	49,36 ± 2,86AB	62,69 ± 4,01ABC	153,61 ± 11,60 D
Santa Luzia	46,66 ± 3,17AB	51,32 ± 3,31 CD	155,22 ± 5,55 CD
Livramento	37,82 ± 0,96 B	40,03 ± 0,61 D	193,38 ± 12,56 BCD
Queimadas	40,82 ± 2,24 B	44,32 ± 2,20 CD	173,15 ± 9,58 CD
Alcantil	58,29 ± 2,02A	73,07 ± 4,12A	298,47 ± 31,50 AB
Serra Branca	47,09 ± 2,50AB	62,48 ± 2,54ABC	176,58 ± 10,09 CD
Barra de Santana	42,92 ± 2,60 B	55,26 ± 5,64ABCD	265,14 ± 50,09 ABC
Monteiro	44,90 ± 5,52AB	53,92 ± 6,48 BCD	228,92 ± 16,57ABCD
Cuité	51,00 ± 4,29AB	60,39 ± 4,20ABC	180,24 ± 5,17 CD
<b>C.V. (%) = 6,53</b>	<b>14,78</b>	<b>15,45</b>	<b>11,66</b>

1. Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

2. Médias originais. Para efeito da análise estatística, os dados foram transformados em  $\sqrt{X + 0,50}$

### 5.3 Comprimentos (mm) das asas de *Aedes aegypti*

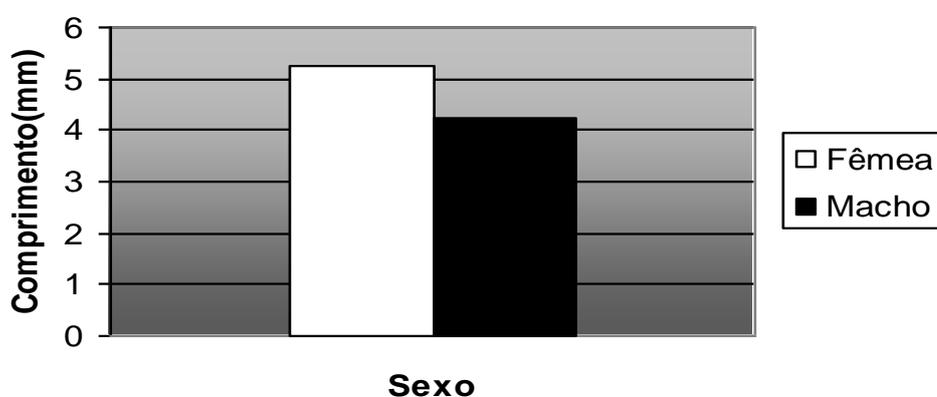
Não houve interação significativa entre sexo e população quanto ao comprimento das asas, porém, detectou-se diferença entre os sexos onde, independente da população, as fêmeas foram maiores que os machos, com médias variando de 5,13 mm a 5,34 mm, enquanto os machos apresentaram médias variando de 4,18 a 4,25 mm (Figura 3).

Porém independente da origem da população e do sexo, o comprimento alar foi sempre maior do que os encontrados por Gama et al. (2005), que obteve uma variação de 2,45 a 2,91 mm para as fêmeas e de 1,99 a 2,26 mm para os machos. Esse maior tamanho de *A. aegypti*, em relação ao que foi observado por Gama et al. (2005), também foi verificado por Beserra et al (2009b), onde para as fêmeas o tamanho variou de 3,8 a 5,2, e para os machos de 3,4 a 4,2 mm.

A massa pupal e a envergadura das asas dos insetos são indicadores de fecundidade em *A. albopictus* e *Aedes geniculatus*. (ARMBRUSTER & HUTCHINSON, 2002). A relação

entre o comprimento das asas de fêmeas e fecundidade foi também significativa e positiva para Blackmore e Lord (2000). Os estudos de Ponlawat e Harrington (2007) verificaram um número maior de espermatozoides nos testículos e em vesículas seminais de machos de *A. aegypti*, que apresentavam um grande tamanho corporal, indicando assim uma maior capacidade reprodutiva.

Tais resultados são de grande interesse epidemiológico uma vez que, segundo Gama et al. (2005) e Gleiser et al. (2000), fatores bionômicos de Culicídeos como: longevidade, fecundidade, dispersão espacial e frequência de picadas no hospedeiro podem ser influenciados pelo tamanho do mosquito adulto.



**Figura 3.** Comprimento (mm) das asas dos adultos de populações de *Aedes aegypti* do semi-árido paraibano. Temperatura ambiente:  $26 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ , UR:  $60 \pm 10\%$  e fotofase: 12 horas. Diferença não significativa pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ). C.V.= 6.53 %.

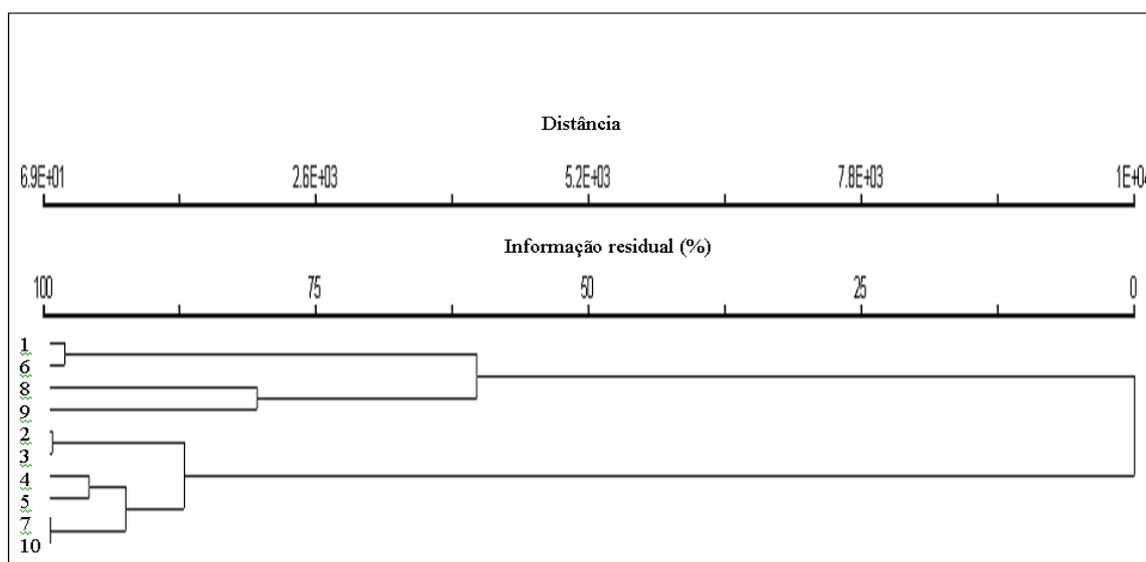
#### 5.4 Análise de agrupamento de características biológicas de populações de *A.aegypti* provenientes do semi-árido paraibano.

A análise de agrupamento procura avaliar o conjunto de dados de forma a compor grupos que apresentem maior similaridade entre esses conjuntos de dados. Com base na similaridade dos dados biológicos descritos nos itens anteriores (5.1 a 5.3), verificou-se que foram formados dois grupos distintos (Figura 4). O primeiro formado pelas populações de Campina Grande, Alcantil, Barra de Santana e Monteiro e o segundo formado pelas populações de Pedra Lavrada, Santa Luzia, Livramento, Queimadas, Serra Branca e Cuité.

Dentro do primeiro grupo, as amostras de populações de *A. aegypti* de Campina Grande e Alcantil formam um primeiro sub-grupo, reunidas principalmente pela similaridade das longevidades dos adultos (Tabela 3). Um segundo sub-grupo é formado pelos amostras do

vetor de Barra de Santana e Monteiro, reunidas pela similaridade da razão sexual, desenvolvimento pupal e comprimento alar dos machos (Tabela 1 e Figura 3).

Em relação ao segundo grupo, as populações de Serra Branca e Cuité apresentam maior similaridade entre si, em relação aos agrupamentos menores formados. As variáveis que contribuíram para maior similaridade entre estas populações foram à longevidade dos adultos e número de ovos por fêmea (Tabela 3). O resultado revelou que, apesar dessas populações serem procedentes da mesma região geográfica do semi-árido paraibano, porém coletadas em épocas diferentes, apresentaram diferenças nas variáveis biológicas. Os municípios paraibanos apresentam determinada distância geográfica e com isso as populações biológicas de *A. aegypti* possuem adaptações próprias a essas regiões de origem. A realização de estudos dentro do contexto da bioecologia e variabilidade genética são de fundamental importância para se determinar as causas responsáveis pelas distintas diferenças fenotípicas apresentadas pelas populações de *A. aegypti* coletadas em diferentes localidades do Estado da Paraíba.



**Figura 4:** Fenograma resultante da análise de agrupamento de características biológicas de 10 populações de *A.aegypti* provenientes do semi-árido paraibano. 1:Campina Grande; 2:Pedra Lavrada; 3:Santa Luzia; 4:Livramento; 5:Queimadas; 6:Alcantil; 7:Serra Branca; 8:Barra de Santana; 9:Monteiro; 10:Cuité.

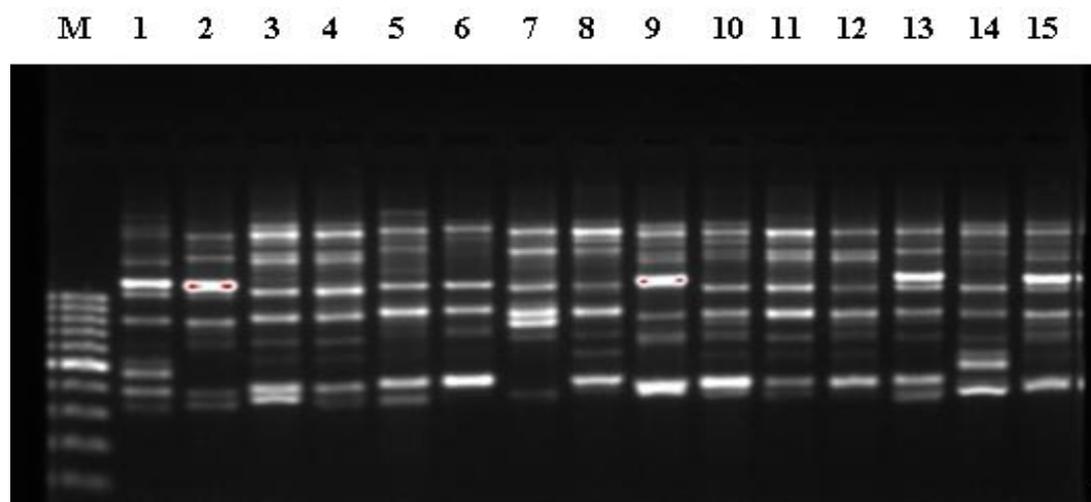
### 5.5 Variabilidade Genética de populações de *Aedes aegypti* detectados através de PCR-RAPD

Os indivíduos da população de Serra Branca foram excluídos da análise, por não apresentarem eficiência na amplificação. Isto pode ser atribuído à degradação do DNA obtido. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados no presente trabalho OPN-3, OPZ-17 e OPE-17 após análise de 121 insetos geraram 12, 10 e 8 fragmentos respectivamente, possibilitando a identificação de amplicons entre 220 e 2400 pb ( Tabela 4).

**Tabela 4.** Oligonucleotídeos iniciadores, número de bandas e tamanho dos fragmentos.

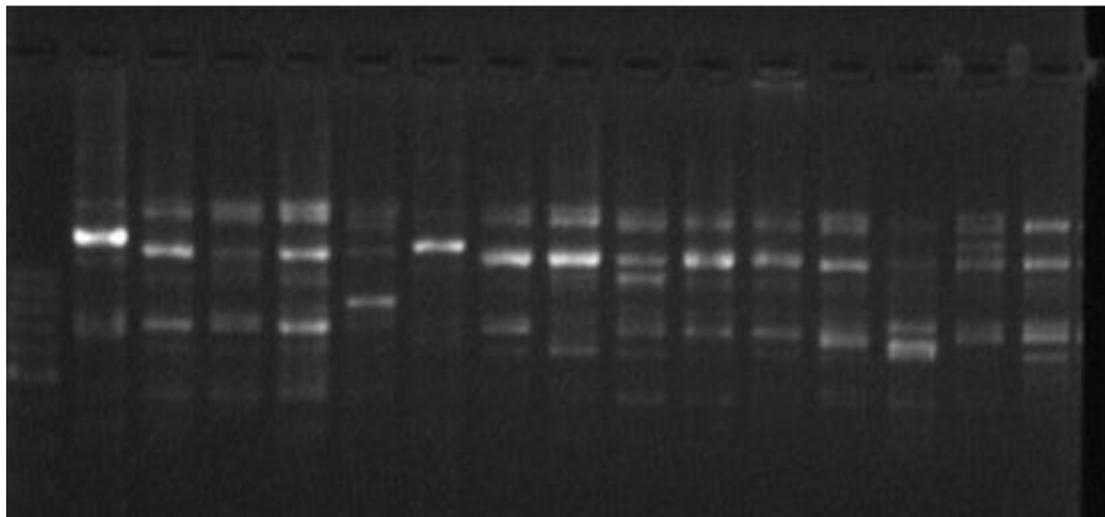
<i>Primers</i>	Seqüência (5'-3')	Número de bandas	Tamanho dos fragmentos (pb)
OPN-3	GGTACTCCCC	12	450-2000
OPZ-17	CCTTCCCCT	10	220-2400
OPE-17	CTACTGCCGT	8	290-2300

A amplificação do DNA de amostras de *A. aegypti* através da técnica PCR-RAPD revelou grande número de bandas e alto nível de polimorfismos. Os perfis obtidos através da amplificação do DNA de *A. aegypti* com os iniciadores OPN-3, OPZ-17 e OPE-17, revelaram grande número de fragmentos polimórficos, indicando que existe elevada variabilidade genética entre indivíduos e que esta é variável de acordo com o iniciador utilizado. Nas figuras 5 a 7, são apresentados os diferentes perfis obtidos com os três iniciadores das populações analisadas. A biodiversidade molecular das populações foi caracterizada através da proporção de *loci* polimórficos e heterozigosidade observada, os quais corresponderam em média a 80,00% e 0,294, respectivamente. Os índices de variabilidade genética revelaram maior diversidade na população de Barra de Santana ( $P = 93,33\%$ ;  $H_o = 0,373$ ) e menor na população de Cuité ( $P = 60,00\%$ ;  $H_o = 0,171$ ) (Tabela 5).



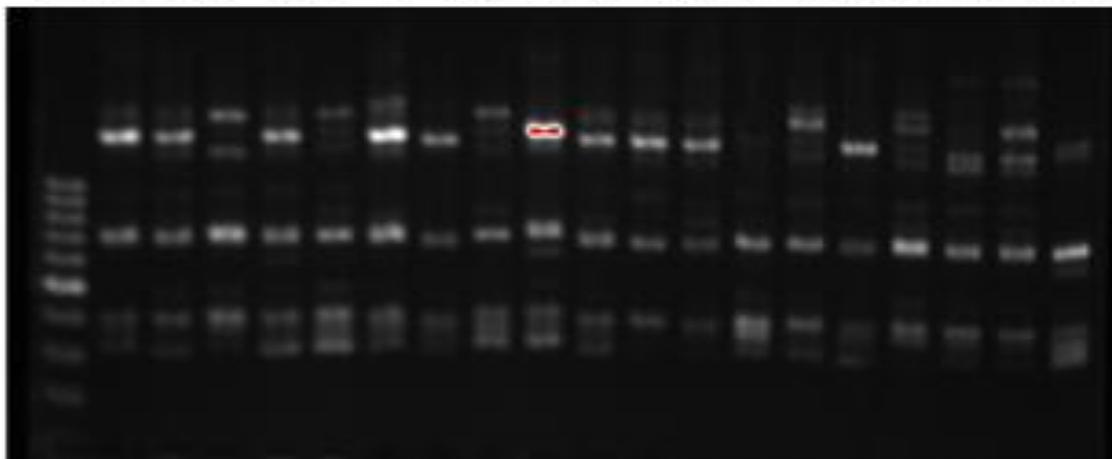
**Figura 5.** Gel de agarose 1,4 % corado com brometo de etídio mostrando o padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de *Aedes aegypti*, obtidos com o iniciador OPN-3.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



**Figura 6.** Gel de agarose 1,4 % corado com brometo de etídio mostrando o padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de *Aedes aegypti*, obtidos com o iniciador OPZ-17.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19



**Figura 7:** Gel de agarose 1,4 % corado com brometo de etídio mostrando o padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de *Aedes aegypti*, obtidos com o iniciador OPE-17.

**Tabela 5.** Análise da diversidade genética de populações de *Aedes aegypti*, por localidade, número de indivíduos analisados (N) e medidas de variabilidade genética: porcentagem de *loci* polimórficos (P) e heterozigosidade observada ( $H_o$ ) obtidas por RAPD

Populações	N	(P) %	$H_o$
Barra de Santana	14	93,33	0,373
Alcantil	15	80,00	0,314
Pedra Lavrada	15	90,00	0,337
Santa Luzia	15	70,00	0,261
Livramento	15	83,33	0,325
Queimadas	15	86,67	0,325
Monteiro	15	90,00	0,271
Campina Grande	8	66,66	0,266
Cuité	9	60,00	0,171
Média		80,00	0,294

A alta diversidade genética observada na população de Barra de Santana pode ser explicada devido à cidade ter uma proximidade com os municípios de Campina Grande-PB (maior cidade do interior da Paraíba) e Toritama-PE (pólo comercial têxtil). Esta localização geográfica favorece o fluxo de pessoas e mercadorias nesta região, facilitando, portanto, a dispersão das populações de *A. aegypti*. As características dessas duas cidades podem estar favorecendo o aumento do fluxo gênico entre as populações de *A. aegypti*. Contrariamente, os valores baixos de diversidade genética obtidos para as populações de Cuité e Campina Grande, sugerem um declínio populacional, indicando que estas populações de *A. aegypti* podem ter sofrido um *bottleneck* (efeito gargalo) recente.

No entanto, a estruturação genética encontrada na população de *A. aegypti* de Campina Grande não está associada ao isolamento geográfico, visto que as rodovias BR-230 e BR-104 oferecem boas condições de acesso à esta cidade. Além disso, Campina Grande é uma cidade turística e possui um pólo tecnológico e educacional que permitem um grande fluxo de pessoas. Por esta razão, esperava-se que a população de *A. aegypti* de Campina Grande apresentasse um alto nível de polimorfismo genético, o que na realidade não foi observado. No entanto, tal situação só pode ser consistente com duas hipóteses: 1) a população de *A. aegypti* de Campina Grande poderia ter sido mantida com poucos indivíduos devido a aplicação constante de inseticidas gerando repetidos eventos de *bottlenecks*; ou 2) a população de *A. aegypti* de Campina Grande teria sido fundada por poucos indivíduos e se mantido com um baixo tamanho efetivo de população. As duas situações resultam na redução da variabilidade genética por deriva genética (HARTL & CLARK, 1997).

A heterozigosidade média entre os 30 *loci* de RAPD ( $H_o = 0,294$ ) foi semelhante aos estudos de Hiragi et al. (2009) com populações de *A. aegypti* de Bthek (originária da criação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) e Planaltina, provenientes do Distrito Federal e a população Rock, originária da Flórida, onde a heterozigosidade foi de 0,2636 dos 10 *loci* analisados de RAPD. Portanto foi bem menor do que em análises de populações brasileiras com 21 ( $H_o = 0,388$ ) (PADUAN et al., 2006) e 27 *loci* de RAPD ( $H_o = 0,390$ ) (AYRES et al., 2003), populações de Porto Rico, com 57 *loci* de RAPD ( $H_o = 0,354$ ) (APOSTOL et al., 1996) e populações dos Bairros de Córdoba (Argentina), com 50 *loci* de RAPD ( $H_o = 0,351-0,404$ ) (JULIO et al., 2009). Em estudos com populações da Tailândia, a heterozigosidade foi de ( $H_o = 0,071$ ), o valor bem inferior do que no presente estudo (SUKONTHABHIROM et al., 2009).

A sensibilidade na detecção de polimorfismos com RAPD é muito eficiente para a identificação de genótipos e obtenção de “fingerprints” genômicos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Os polimorfismos podem ser provenientes de pequenas alterações na seqüência de DNA de diferentes indivíduos, decorrentes de mudanças na seqüência do sítio de iniciação (inserções/deleções/substituições) ou de alterações que modifiquem o tamanho da seqüência a ser amplificada (inserções/deleções). Assim, diferenças em apenas um par de bases podem ser detectadas pela técnica RAPD (WILLIAMS et al., 1990), e por isso grande número de polimorfismos pode ser revelado em indivíduos aproximadamente relacionados, inclusive irmãos.

O uso de inseticidas, a construção de moradias propiciando o aumento populacional, o aparecimento de criadouros artificiais permanentes, podem ser ações que alterem a estrutura populacional de *A. aegypti*. Apesar disto, estas diferenças podem ser muito sutis dependendo do estágio de isolamento reprodutivo.

A heterozigosidade média entre as populações de *A. aegypti* está em torno de 0,29, indicando que os mosquitos coletados em locais diferentes apresentam moderada diferenciação genética, por outro lado, a diferenciação entre os mosquitos coletados em diferentes localidades pode indicar modificações na estrutura populacional desta espécie em decorrência da ação antrópica. Os padrões de desenvolvimento não apresentaram variações quanto às fases de ovo, larva, pupa e razão sexual e em relação aos parâmetros da fase adulta revelou pouca variação, que é corroborado pela análise da estrutura genética dessas populações que revelou baixa diferenciação genética. Wondji et al. (2005) ao avaliar a estrutura populacional de *Anopheles arabiensis* em uma região dos Camarões durante a implementação do uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas, não observou diferenças

significativas e a pequena diminuição no tamanho estimado da população que ocorreu logo após a implementação dos mosquiteiros, rapidamente retornou aos valores anteriores.

Os polimorfismos observados entre indivíduos de mesma geração podem estar associados ao tipo de reprodução exibido pelas espécies, tendo em vista que a reprodução sexuada constitui-se num dos principais mecanismos para produzir indivíduos geneticamente diferentes. Em organismos com esse tipo de reprodução, o número de polimorfismos detectados pela PCR-RAPD é grande e os *loci* considerados polimórficos podem estar presentes em um ou ambos organismos. Já em espécies de insetos partenogênicos (reprodução assexuada), os indivíduos irmãos são geneticamente idênticos (clones) e por isso possuem mesmo padrão de bandas RAPD. Em *Diuraphis noxia* (Mordvilko) (Hemiptera, Aphididae), por exemplo, Black et al. (1992) observaram que distintas ninfas geradas a partir de uma mesma fêmea, não possuíam diferenças quanto aos perfis RAPD.

Ballinger-Cabtree et al.(1992) apontam que em *A. aegypti*, embora o número total e tamanho dos fragmentos variem entre indivíduos irmãos, os fragmentos presentes na geração F1 são observados nos progenitores. Outra possibilidade para explicar o número de fragmentos polimórficos entre indivíduos irmãos, nas espécies analisadas, envolve a cópula com mais de um macho.

O estudo da variabilidade entre indivíduos da mesma espécie, através da técnica PCR-RAPD, permite o reconhecimento de fragmentos variáveis dentro da espécie, e que poderiam ser erroneamente utilizados como caracteres taxonômicos para identificação de espécies semelhantes, especialmente quando poucas amostras são analisadas. Além disso, permite o melhor entendimento da variabilidade dentro e entre diferentes populações, ou seja, se certa heterogeneidade quanto aos fragmentos amplificados é observada entre indivíduos de mesma geração filial, conseqüentemente, grande variabilidade genética entre indivíduos de uma população local ou de localidades diferentes também é esperada.

Gorrochotegui-Escalante et al. (2000) determinaram taxas de fluxo gênico entre 10 populações de *A. aegypti* de sete localidades ao longo da costa nordeste do México através do uso de marcadores RAPD e da análise de um fragmento do gene mitocondrial ND4. Sete haplótipos foram detectados e as análises filogenéticas indicaram a presença de dois clados independentes bem suportados. Os marcadores RAPD indicaram que as populações estavam isoladas por distância.

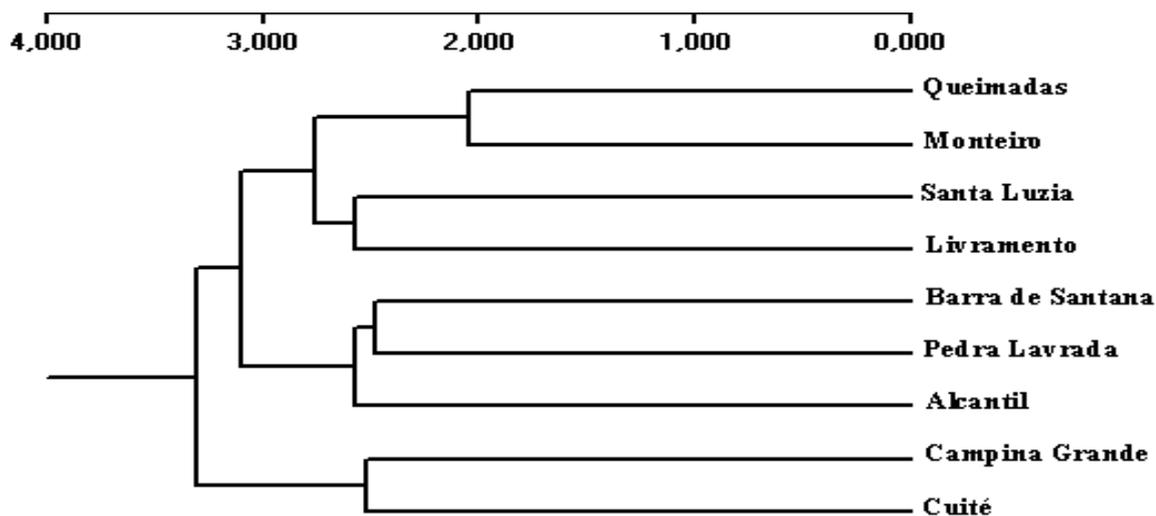
Ayres et al.(2002) utilizando a técnica de RAPD em populações de *A. albopictus* oriundas de três estados brasileiros (Rio de Janeiro, Minas Gerais e Pernambuco) revelaram que as populações do Rio de Janeiro e Minas Gerais eram similares geneticamente quando comparadas às populações de Pernambuco. Os autores concluíram também que a

variabilidade genética observada nas populações brasileiras era resultante de um balanço entre a deriva genética e um fluxo gênico restrito nessas populações.

### **5.6 Dendrograma construído pelo método UPGMA e Distância genética de Nei (1978), mostrando o relacionamento entre as populações de *Aedes aegypti*.**

O dendrograma construído através do método UPGMA a partir da distância genética (Figura 8) sugere a presença de três grupos, o primeiro formado pelas populações de Queimadas, Monteiro, Santa Luzia e Livramento, o segundo formado pelas populações de Barra de Santana, Pedra Lavrada e Alcantil, e o terceiro formado pelas populações de Campina Grande e Cuité.

Populações estruturadas geralmente mostram equilíbrio dinâmico entre fatores que favorecem a diferenciação (mutação, deriva e seleção natural direcional ou disruptiva, diferente em cada área) e fatores homogeneizadores (migração e seleção natural balanceada ou diferencial, uniforme em cada área) (SOLÉ-CAVA, 2001). No presente estudo, a presença de três agrupamentos, sugere que essas populações podem estar sob processo de diferenciação genética direcionada por fatores ecológicos, evolucionários e históricos.



**Figura 8.** Dendrograma construído pelo método UPGMA, baseado na distância genética de Nei (1978), mostrando o relacionamento entre as populações estudadas de *A. aegypti*.

Considerando os valores limites de distância genética adotados por Ayala (1975) e Schaffener et al. (2000), as distâncias genéticas obtidas nesta investigação, foram baixas (0,1060-0,3840) (Tabela 6), e dentro do limite esperado para o nível de espécie. Isto sugere que as populações analisadas são geneticamente similares e constituem uma mesma espécie.

A diferenciação genética entre as populações calculada através da distância genética de Nei (1978) demonstrou maior distância genética entre amostras de Monteiro e Cuité (0,3840) e menor distância entre as amostras de Queimadas e Campina Grande (0,1060) (Tabela 6). As baixas distâncias genéticas observadas entre as amostras podem estar relacionadas à proximidade entre as localidades estudadas, a qual permite a troca de material genético entre populações mediante a migração passiva do vetor.

**Tabela 6.** Distância genética de Nei (1978) calculada entre as populações de *Aedes aegypti*. BRS: Barra de Santana; AL: Alcantil; PL: Pedra Lavrada; SL: Santa Luzia; LIV: Livramento; QM: Queimadas; MT: Monteiro; CG: Campina Grande; CT: Cuité.

	BRS	AL	PL	SL	LIV	QM	MT	CG	CT
<b>BRS</b>	*****								
<b>AL</b>	0,1643	*****							
<b>PL</b>	0,1524	0,1621	*****						
<b>SL</b>	0,2159	0,3054	0,2550	*****					
<b>LIV</b>	0,1988	0,2555	0,2314	0,1778	*****				
<b>QM</b>	0,1733	0,2481	0,2167	0,1940	0,2163	*****			
<b>MT</b>	0,1465	0,2426	0,2851	0,1990	0,1895	0,1197	*****		
<b>CG</b>	0,1636	0,2087	0,1760	0,2855	0,2876	0,1060	0,1971	*****	
<b>CT</b>	0,2207	0,3139	0,2355	0,3318	0,3355	0,3293	0,3840	0,1634	*****

### 5.7. Análise da variância molecular (AMOVA)

A análise da variância molecular (AMOVA) foi utilizada para detectar a variação genética dentro e entre as populações. De acordo com os resultados verificou-se que somente 33% da variação ocorre entre as populações e que a maior variância, 67%, ocorre entre indivíduos dentro das populações (Tabela 7).

Os índices de diversidade genética heterozigosidade  $H_o$  e polimorfismos sugerem elevada variação genética intrapopulacional. Esta condição foi corroborada pela análise de variância molecular (AMOVA) que atribuiu 67% da variação a fatores intrapopulacionais. Apartir da análise de 18 loci isoenzimáticos também foi verificado, em populações desse culicídeo de quatro vizinhanças da cidade de Manaus, AM, que apesar de elas serem semelhantes geneticamente ( $D = 0.003$  a  $0.016$ ), a diferenciação de 4,88% entre as populações foi significativa, sendo que a análise molecular revelou maior variabilidade dentro das populações (FRAGA et al., 2003).

O elevado índice de variabilidade genética em populações de insetos vetores tem importantes implicações no mecanismo de transmissão da dengue, pois estas variações podem causar diferenças na susceptibilidade ao vírus da dengue (HERRERA et al., 2006). Lourenço-de-Oliveira et al. (2004) verificaram a estrutura genética de populações e a susceptibilidade dos insetos ao vírus da VDEN-2 e relataram que as populações *A. aegypti* de diferentes

regiões do Brasil são geneticamente heterogênicas dentro da maioria das regiões, ocasionando heterogeneidade em relação à taxa de infecção ao VDEN-2.

**Tabela 7.** Análise de variância molecular (AMOVA) em nove populações de *Aedes aegypti* do semi-árido paraibano -Brasil.

Fonte de Variação	GL	SQ	CV	Variação (%)	Índice de Fixação	P
Entre as populações	8	257,98	2,267	33	$G_{ST}=0,327^{**}$	< 0,001
Dentro das populações	101	471,90	4,672	67		
Total	109	729,98	6,939	100		

**GL= graus de liberdade; SQ = Soma do quadrado dos desvios; CV= Componentes de variação; P = significância**

A análise de estrutura genética realizada nas amostras estudadas revelou uma diferenciação genética significativa. Estes resultados correspondem ao elevado nível de estruturação genética verificada através de RAPD em dezesseis populações de *A. aegypti* coletadas em diferentes estados do Brasil considerando o nível de macro e microrregiões (AYRES et al., 2003). Paduan et al. (2006) também relataram elevados níveis de diferenciação genética entre populações coletadas em seis estados brasileiros, bem como entre municípios de um mesmo Estado.

Segundo Paupy et al. (2005), a ocorrência de baixa diferenciação genética entre as populações pode ser influenciada pela abundância de pontos de oviposição. Pois, a dispersão de *A. aegypti* pode ser determinada pela procura de locais para postura dos ovos.

Estes autores também descrevem que a estrutura genética de populações de mosquitos pode ser influenciada por fatores climáticos, aplicação de inseticidas e criadouros artificiais. De acordo com Paduan et al., (2006), populações com características semelhantes à encontrada no presente trabalho onde ocorrem elevados índices de diversidade dentro das populações e baixa diferenciação entre estas, são consequência da recente introdução desta espécie no Brasil, a qual ocorreu provavelmente com elevado número de indivíduos. A variabilidade genética (entre populações e também entre indivíduos dentro das populações) possibilita a sobrevivência e o sucesso em responder às mudanças ambientais, bem como a melhor utilização do ambiente, pois produz plasticidade, tornando possível a utilização de diferentes recursos e microhabitats (ALMEIDA et al., 2003).

Os resultados apresentados neste trabalho podem ter implicações no controle da dengue. Em áreas urbanas, o uso contínuo de inseticidas pode resultar em populações *bottleneck* e/ou populações fundadas com poucos indivíduos, via recolonização, os quais

podem causar mudanças genéticas nas populações de *A. aegypti*, ocasionando diferenças na capacidade vetora. Estudos demonstram uma correlação entre estrutura genética de populações e a capacidade vetora em *A. aegypti* (BEERNTSEN, et al., 2000; FAILLOUX et al., 2002). Portanto, conhecer a estrutura genética das populações de *A. aegypti* em cada região do semi-árido paraibano poderá ser o primeiro passo para se estudar a capacidade de transmissão da dengue por esse vetor, auxiliando no melhor entendimento da dinâmica de transmissão da dengue.

## 6.0 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos com 10 populações de *A. aegypti* do semi-árido paraibano, conclui-se que:

- 1) As populações de *A. aegypti* avaliadas não apresentaram padrões de desenvolvimento diferenciados no ciclo aquático em relação às suas localidades, merecendo maior investigação nesse sentido, de modo que se possam produzir mais informações que auxiliem no controle do vetor;
- 2) A técnica de RAPD mostra-se efetiva para avaliar as variações genéticas em populações de *Aedes aegypti* e os primers utilizados podem servir como potenciais ferramentas para auxiliar no controle da dengue;
- 3) Os índices de diversidade genética heterozigosidade  $H_o$  e polimorfismos sugerem elevada variação genética intrapopulacional. Tal fato possivelmente indicam constantes migrações de indivíduos para as localidades estudadas com elevado número de indivíduos;
- 4) Valores baixos de diversidade genética para a população de Campina Grande e Cuité indicam a ocorrência de um ou bottlenecks (efeito gargalo) recentes.

## 7.0 REFERÊNCIAS

- AGRELO, R. S. *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) y su papel como vectores em las Américas. La situación de Uruguay. 78p, 1996. **Disponível em:** <<http://www.cepes.ops-oms.org/bvsoir/repimdex/rep78/ref.fdf>>. Acesso em: 19 maio. 2003.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**, 3º. Ed., editora: Artes médicas, Porto Alegre, 1997, p. 1294.
- ALDAMA, P. C.; GARCIA, F. J. H. Ciclo de vida Del *Aedes aegypti* y manifestaciones Clínicas del dengue. **Acta Pediátrica de México**, México, DF, v. 22, n. 2, p.114-117, 2001.
- ALJANABI, S. M. et al. RAPD Analysis Revealing Polymorphism in Egg Parasitoids of Soybean Stink Bugs (Hemiptera: Pentatomidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. v. 27, n.3, p. 413-420, 1998.
- ALMEIDA, F. S.; SODRÉ, L. M. K. ; CONTEL, E. P.B. Population structure analysis of *Pimodolus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema rivers (Brazil). **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n.3, p.301-305, 2003.
- AMANCIO ALVES, J. J. Geocologia da Caatinga no Semi-Árido do Nordeste Brasileiro. **Climatologia e Estudos da Paisagem**, v. 2, n. 1, p. 58-51, 2007.
- ANDRADE-LIMA, D. Vegetação. In: IBGE/Conselho Nacional de Geografia. 1. ed. **Atlas Nacional do Brasil**. Rio de Janeiro: IBGE, v. 3, 1981.
- ANDRIES, S. Histórico. Instituto Virtual da Dengue do Estado do Rio de Janeiro. **Disponível em :** <<http://www.ivdrj.ufrj.br/historico.htm>> Acesso em: 07 agosto de 2008.
- APOSTOL, B. L.; BLACK IV, W. C.; MILLER, B. R.; REITER, P.; BEATY, B. J. Estimation of the number of full sibling families at an oviposition site using RAPD-PCR markers: applications to the mosquito *Aedes aegypti*. **Theoretical and Applied Genetics**, n. 86, p. 991-1000, 1993.
- APOSTOL, B. L et al. Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. **Heredity**, v.76, p. 325-334, 1996.
- ARMBRUSTER, P.; HUTCHINSON, R. A. Pupal mass and wing length as indicators of fecundity in *Aedes albopictus* and *Aedes geniculatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 39, p.699- 704, 2002.
- ARRUDA, M. B. **Conservação, Ecologia humana e sustentabilidade na Caatinga: Estudos da região do Parque Nacional da Serra da Capivara (PI)**. Série Meio Ambiente em Debate. Brasília, DF: IBAMA; 1997, n.13, 96 p.

- AYALA, F. J. Genetic differentiation during the speciation process. **Evolutionary Biology**, v.8, p.1-78, 1975.
- AYRES, C. F. J. et al. Genetic Diversity in Brazilian Populations of *Aedes albopictus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 6, p. 871-875, 2002.
- AYRES, C. F. J. et al. Genetic differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the major dengue vector in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, p. 430-435, 2003.
- AYRES C. E. J. et al. Genetic structure of natural populations of *Aedes aegypti* at the micro- and macrogeographic levels in Brazil. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.20, p.350-356, 2004.
- BALLINGER-CRABTREE, M. E.; BLACK IV, W. C. e MILLER, B. R. Use of genetic polymorphisms detected by the Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of *Aedes aegypti* subspecies and populations. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 47, n.6, p. 893-901, 1992.
- BARATA, E. F et al. População de *Aedes aegypti* (L.) em área endêmica de dengue, Sudeste do Brasil. **Revista de. Saúde Pública**, v. 35, n.3, p. 237-42, 2001.
- BARRERA, R. et al. Stratification of a city with hyperendemic dengue hemorrhagic fever. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v.8, n. 4, 2000.
- BEERNTSEN, B.T.; JAMES, A.; CHRISTENSEN, B.M. Genetics mosquito of vector competence. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, n.1, p. 115-137, 2000.
- BESERRA, E. B et al. Efeitos da temperatura no ciclo de vida, exigências térmicas e estimativas do número de gerações anuais de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Iheringia - Série Zoológica**, v.99, n.2, p.142-148, 2009a.
- BESERRA, E. B et al.. Relação entre Densidade Larval e Ciclo de Vida, Tamanho e Fecundidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) em Laboratório **Neotropical Entomology**, v. 38, n.6, p.847-852, 2009b.
- BESERRA, E. B.; CASTRO-JÚNIOR, F. P. Biologia comparada de populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) da Paraíba. **Neotropical Entomology**, v. 37, n.1, p. 81-85, 2008.
- BESERRA, E. B et al. Biologia e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. **Neotropical Entomology**, v. 35, n.6, 853-860, 2006.
- BESERRA, E. B.; SANTOS-DIAS, C. T.; PARRA, J. R. P. Características biológicas de linhagens de *Trichogramma pretiosum* desenvolvidas em ovos de *Spodoptera frugiperda*. **Acta Scientiarum**, v. 25, n. 2. p. 479-483, 2003.

- BLACKMORE, M. S.; LORD, C. C. The relationship between size and fecundity in *Aedes albopictus*. **Journal of Vector ecology**. v. 25, p. 212-217, 2000.
- BLACK, W C. IV et al. Use of random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae). **Bulletin of Entomological Research**, v.82 p. 151-159, 1992.
- BOWDITCH, B. M et al. Use of random amplified polymorphic DNA markers in comparative genomes studies. **Methods in Enzymology**. v. 224, p. 294-309, 1993.
- BRACCO, J. E. et al. Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n. 5, p.: 573-580, 2007.
- CALADO, D. C ; NAVARRO-SILVA, M.A. Influência da temperatura sobre a longevidade, fecundidade e atividade hematofágica de *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse, 1894 (Díptera: Culicidae) sob condições de laboratório. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 46, n. 1, p. 96-98, 2002.
- CALADO, D. C. ; NAVARRO-SILVA, M.A. Identificação de *Anopheles (Kerteszia) cruzii* Dyar & Knab e *Anopheles (Kerteszia) homunculus* Komp (Diptera, Culicidae, Anophelinae) através de marcadores moleculares (RAPD e RFLP). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n.4, p. 1127-1133, 2005.
- CÂMARA, F. P. et al. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p.192-196, 2007.
- CARRERA, M. **Insetos de interesse médico e veterinário**. Editora: UFPR, Paraná, 1991, p.96.
- CASTELLETTI, C. H. M.; SANTOS, A. M .M.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. Quanto ainda resta da Caatinga? Uma estimativa preliminar. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA J. M. C. (Eds.). **Ecologia e Conservação da Caatinga**. 1. ed. Recife, Brasil: Ed. Universitária da UFPE, 2003. p. 719-734
- CHOOCHOTE, W et al. Potential of crude seed extract of celery, *Apium graveolens* L., against the mosquito *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Journal of Vector ecology**, v.29, n.2, p. 340-346, 2004.
- CLEMENTS, A.N. *The biology of mosquitoes* . Sensory reception and behavior. CABI, v.2, 740 p. 1999 *Apud* FORATTINI, O. P.; BRITO M. **Reservatórios Domiciliares de Água e controle do *Aedes aegypti***. Revista de Saúde Pública, São Paulo. V.37, n.5, 2003.
- CONSOLI, R.A.G.B.; OLIVEIRA, R.L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Fundação Oswaldo Cruz. 228 p. 1994.
- CUNHA, M. C. M. et al. Fatores associados à infecção pelo vírus do dengue no Município de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, Brasil: características individuais e diferenças intra-urbanas. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.17, n.3, p.217-230, 2008.

DELATTE, H.; GIMONNEAU, G.; TRIBOIRE, A.; FONTENILLE, D. Influence of Temperature on Immature Development, Survival, Longevity, Fecundity, and Gonotrophic Cycles of *Aedes albopictus*, Vector of Chikungunya and Dengue in the Indian Ocean. **Journal of Medical Entomology**, v.43, n.1. p.33-41, 2009.

DONALISIO, M. R. e GLASSER, C. M. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. **Revista brasileira de epidemiologia**, v.5, n.3, p.259-279, 2002.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Urbanização nos Municípios da Paraíba**, Campinas, 21 mar. 2006a. Disponível em: <<http://www.urbanizacao.cnpm.embrapa.br/conteudo/uf/pb.html>>. Acesso em: 14 dez. 2008

EMEPA – Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba S. A. João Pessoa, 2008. Disponível em: <<http://www.emepa.org.br>>. Acesso em: 14 jan. 2009.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes application to human mitochondrial DNA restriction sites. **Genetic**. v.131, p. 479-491, 1992.

FAILLOUX, A. B.; DARIUS, H.; PASTEUR, N. Genetic differentiation in *Aedes polynesiensis*, the vector of dengue virus in French Polynesia. **Journal of the American mosquito control association**, n. 11, p. 457-462, 1995.

FAILLOUX, A. B.; VAZEILLE, M.; RODHAIN, F. Geographic genetic variation in population of the dengue virus vector *Aedes aegypti*. **Journal of Molecular Evolution**, v.55, p. 653-663, 2002.

FANTINATTI, E. C. S et al. Abundância e Agregação de Ovos de *Aedes aegypti* L. e *Aedes albopictus*(Skuse) (Diptera: Culicidae) no Norte e Noroeste do Paraná. **Neotropical Entomology**,v. 36, n.6, p.960-965,2007.

FARNESI, L. C. et al. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n.1, p. 124-126, 2009

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**.3º ed., EMBRAPA-CENARGEN, Brasília, 220 pp.1998.

FIGUEIREDO, L.T. History, present and future of Dengue fever in Brazil. In: TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.(Orgs.). **An Overview of Arbovirology on Brazil and Neighboring Countries**. Instituto Evandro Chagas, Belem. p. 154-163, 1998.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. São Paulo: Edusp, 2002, p. 453-492.

FORATTINI, O. P.; BRITO, M. Reservatórios Domiciliares de Água e controle do *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo. v.37, n.5, 2003.

FRAGA, E. C.; SANTOS, J. M. M.; MAIA, J. F. Enzymatic variability in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Manaus-AM, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, n.2, p. 181-187, 2003.

FUNASA. Evolução temporal das doenças de notificação compulsória no Brasil 1980-1998. Boletim Eletrônico Epidemiológico Edição Especial. Brasília: Funasa; 1999.

GAMA, R. A.; ALVES, K. C.; MARTINS, R. F.; EIRAS, A. E. & RESENDE, M. C. Efeito da densidade larval no tamanho de adultos de *Aedes aegypti* criados em condições de laboratório. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, n.1, p. 64-66, 2005.

GLEISER, R. M.; URRUTIA, J.; GORLA, D. E. Body size variation of the floodwater mosquito *Aedes albifasciatus* in Central Argentina. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 14, n.6, p. 38-43, 2000.

GORROCHOTEGUI-ESCALANTE, N., C. et al. Genetic isolation by distance among *Aedes aegypti* populations along the northeastern coast of Mexico. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v. 62, p. 200-209, 2000.

GOMES, A.S.; SCIAVICO, C.J.; EIRAS, A.E. Periodicidade de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) em laboratório e campo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.4, p.327-332, 2006.

HARTL, D.L. ; CLARK, A.G. **Principles of population genetics**, 3 ed. Sinauer Associates. Sunderland Massachusetts,1997, 542 p.

HERRERA, F. et al. Population genetic structure of the dengue mosquito *Aedes aegypti* in Venezuela. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 6, p. 625-633, 2006.

HIRAGI, C. et al. Variabilidade Genética em Populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) Utilizando Marcadores de RAPD. **Neotropical Entomology**, v. 38, n.4, p.542-547, 2009.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Canal Cidades@**. Brasília, 2008. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php>>. Acesso em: 12 jan. 2009.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Mapa de Biomas e de Vegetação**. Brasília, 2004. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=169](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=169)>. Acesso em: 20 jul. 2009.

JULIO, N. B. et al. Genetic structure of *Aedes aegypti* in the city of Córdoba (Argentina), a recently reinfested área. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.104, n.4, p.626-631. 2009.

LANZARO, G. C.; NARANG, S. K.; SEAWRIGHT, J.A. Speciation in an anopheline (Diptera: Culicidae) mosquito: enzyme polymorphism and the genetic structure of population. **Annual entomology society of America**, v. 83, p. 578-585, 1990.

LEAL, I. R.; SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M.; LACHER Jr., T. E. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 139-146, 2005.

LIMA JÚNIOR, R. S.; SCARPASSA, V. M. Evidence of two lineages of the dengue vector *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon, based on mitochondrial DNA ND4 gene sequences. **Genetics and Molecular Biology**, v.32, n.2, p. 414-420, 2009.

LÖWENBERG-NETO, P.; NAVARRO SILVA, M. A. Development, Longevity, Gonotrophic Cycle and Oviposition of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) under Cyclic Temperatures. **Neotropical Entomology**, Londrina, PR, Brasil, v. 33, n. 1, p. 29-33, 2004.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. et al. Large genetic differentiation and low variation in vector competence for dengue and yellow fever viruses of *Aedes albopictus* from Brazil, The United States and Cayman Islands. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v. 69, p. 105- 114, 2003.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. et al. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. **Tran. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 98, p.43-54, 2004.

LOZOVEI, A. L. In: Carlos Brisola Marcondes. **Entomologia médica e veterinária**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu. 1. 432 p. 2001.

MARES, M. A.; WILLIG, M. R.; LACHER JR., T. E. The Brazilian Caatinga in South American Zoogeography: Tropical Mammals in a Dry Region. **Journal of Biogeography**, v. 12, n. 1, p. 57-69, 1985.

MARZOCHI, K. B. F. Dengue in Brazil- Situation, Transmission and Control- A Proposal for Ecological Control. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.89, n.2, p.235-245, 1994.

McCONNELL, K. J. ; GUBLER, D. J. Guidelines on the cost-effectiveness of larval control programs to reduce dengue transmission in Puerto Rico. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v.14, n.1, p.9-16, 2003.

MCDERMOTT, J. M.; MCDONALD, B. A. Gene flow in plant pathosystems. **Annual Review of Phytopathology**, v. 31, p. 353-373, 1993.

MILLER, M. P. Tools for populations genetic analyses (TFPGA) 1.3. A windows program for analysis of allozyme and molecular populations genetic data. **Computer software distributed by authors**. 1997.

MITCHELL-OLDS, T. The Molecular basis of quantitative genetic variation in natural populations. **Tree**, v. 10, n. 8, p. 324-328, 1995.

MITCHELL, S. E. et al. Application of Multiplex PCR and Fluorescence-Based, Semi-Automated Allele Sizing Technology for Genotyping Plant Genetic Resources. **Crop science**, v. 37, p. 617-624, 1997.

- MOGI, M., MOKRY, J. Distribution of *Wyeomyia smithii* (Diptera: Culicidae) eggs in pitcher plants in Newfoundland, Canada. **Tropical Medical**, v. 22, p. 1-12. 1980 *apud* FORATTINI, O.P. Culicidologia médica. São Paulo: Edusp. v. 2, p. 864, 2002.
- MONATH, T. P. Dengue: The risk to developed and developing countries. **Proceeding of the National Academy of Sciences**. USA, Vol. 91, pp. 2395-2400, 1994.
- MUKWAYA, L. G. et al. Genetic differentiation in the yellow fever virus vector, *Aedes simpsoni* complex, in Africa: Sequence variation in the ribosomal DNA internal transcribed spacers of anthropophilic and non-anthropophilic populations. **Institute of Molecular Biology**, v.9, p.85-91, 2000.
- MULLIS, K. ; FALOONA, F. Specific Synthesis of DNA *in vitro* via polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 55, p. 335 – 350, 1987.
- NATAL, D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. **Biológico**, São Paulo, v. 64, n.2, p. 205-207, jul./dez. 2002.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**,v. 89, p.583-590,1978.
- NIMER, E. Climatologia da região Nordeste do Brasil. Introdução à climatologia dinâmica. **Revista Brasileira de Geografia**, v. 34, p. 3-51, 1972.
- NOGUEIRA, R.M et al. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**.v. 85, n. 2,p. 253-256, 1990.
- OCAMPO, C. B.; WESSON, D. M. Population dynamics of *Aedes aegypti* from a dengue Hyperendemic urban setting in Colombia. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 71, n. 4, p. 506–513, 2004.
- Organizacion Panamericana de la Salud.(PAHO) Number of reported cases of Dengue & Dengue Hemorrhagic Fever (DHF), Region of the Americas (by country and subregion) [monograph on the Internet]. Washington (DC): OPS; 2008 [cited 2009 Mar. 25]. Acessado em: <<http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/dengue-cases-2008.htm>>
- OOSTERHOUT, C. V.; HEUVEN, M. K. V.; BRAKEFIELD, P. M. On the neutrality of molecular genetic markers: pedigree analysis of genetic variations in fragmented populations. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 1025-1034, 2004.
- PADUAN, K. dos S.; JÚNIOR; J. P. A; RIBOLLA, P. E. M. Genetic variability in geographical populations of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in Brazil elucidated by molecular markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.29 n.2, 2006.
- PAIXÃO, K.S. **Avaliação do controle químico de adultos de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) de Fortaleza por meio de métodos convencionais e das armadilhas BG-Sentinel® e MosquiTRAP®.** 119p. Dissertação (Mestrado em Parasitologia): Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2007.
- PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas.** São Paulo: Manole, 1991. 359p.

- PAUPY, C. et al. *Aedes aegypti* in Tahiti and Moorea (French Polynesia): Isoenzyme differentiation in mosquito population according to human population density. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v. 62, p. 217-224, 2000.
- PAUPY, C. et al. Population structure of *Aedes albopictus* from La Réunion Island (Indian Ocean) with respect to susceptibility to a dengue virus. **Heredity**, v. 87, p. 273-583, 2001.
- PAUPY, C. et al. Factors influencing the population structure of *Aedes aegypti* from the main cities in Cambodia. **Heredity**. v. 95, p. 144-147, 2005.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAIEx 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecological Notes**. v. 6, p. 288–295. 2006
- PESSÔA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia Médica**. ed.10, 1ª reimpressão. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan. 1978.
- PONLAWAT, A.; HARRINGTON, L. C.. Age and body size influence male sperm capacity of the dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 44, p. 422-426, 2007.
- POOWELL, J. R.; TABACHINICK, W. J.; ARNOLD, J. Genetics and the origin of a vector population: *Aedes aegypti*, a case study. **Science**, n. 208, p. 1385-1387, 1980.
- PRADO, D. E. As caatingas da América do Sul. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Eds.). **Ecologia e Conservação da Caatinga**. 1. ed. Recife, Brasil: Ed. Universitária da UFPE, 2003. p. 3-73
- QUINTERO et al. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 25 Sup 1: p.93-103, 2009
- RAMPELOTTI, F. T. Diversidade Genética de *Tibraca limbativentris* Stål (Hemiptera: Pentatomidae) de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul, Usando Marcadores RAPD. **Neotropical Entomology** v. 3, n. 1, p. 020-029, 2008.
- RAVEL, S. et al. A preliminary study of the population genetics of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Mexico using microsatellite and AFLP markers. **Acta Tropical**. v. 78, p.241-250, 2001.
- REIS, A. C. Clima da caatinga. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 48, 1976.
- RIBEIRO, A.F.et al. Associação entre incidência de dengue e variáveis climáticas. **Revista de saúde pública**, v.40,n.4,p.671-676, 2006.
- RODAL, M. J. N.; SAMPAIO, E. V. S. B.; FIGUEIREDO, M. A. **Manual sobre métodos de estudo florístico e fitossociológico – Ecossistema Caatinga**. Sociedade Botânica do Brasil, 1992, 24 p.
- RODRIGUEZ, J.L. et al. **Atlas Escolar Paraíba**, 3. ed. João Pessoa: Grafset, 2002. p. 112
- SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p. 1350 – 1354, 1985.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: A laboratory manual. New York, **Cold Spring Lab**. v.9, p.16-23, 1989.

SANTOS, V. M. et al. Analysis of genetic relatedness between populations of *Aedes aegypti* from different geographic regions of São Paulo state, Brazil. **Revista Instituto de Medicina tropical de São Paulo**, v.45, n.2, p.99-101, 2003.

SANTOS, J. M. M.; MAIA, J. F.; TADEI, W. P. Differentiation and genetic variability in natural populations of *Anopheles (N.) triannulatus* (Neiva & Pinto, 1922) of Brazilian Amazonia. **Brazilian Journal of Biology**, v.64, n. 2, 2004.

SANTOS, A.; MARÇAL JUNIOR, O.; VICTORIANO, M. R. A incidência do dengue na zona urbana do município de Uberlândia, MG, em 1999. **Bioscience Journal**, v. 18, n. 1, p. 33-40, 2002.

SCANDAR, S. A. S. Inquérito sorológico, após epidemia de Dengue. Paraíso – São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.62, n.2, p. 83 - 89, 2003.

SCHAFFNER, F.; RAYMOND, M.; PASTEUR, N. Genetic differentiation of *Anopheles claviger s.s.* in France and neighbouring countries. **Medical and Veterinary Entomology**, v.14, p. 264-271, 2000.

**Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS)**. Dengue. Boletim da semana 01-30/2009. Ministério da Saúde.  
<[http://dtr2001.saude.gov.br/svs/epi/dengue/boletim/pdfs/be\\_dengue\\_30\\_2009.pdf](http://dtr2001.saude.gov.br/svs/epi/dengue/boletim/pdfs/be_dengue_30_2009.pdf)>. Acessado em 15.11.2009, 2009.

SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 4, p. 349-355, 1999.

SILVA, J. S.; MARIANO, Z. F; SCOPEL, I. A dengue no Brasil e as políticas de combate ao *Aedes aegypti*: da tentativa de erradicação às políticas de controle. **HYGEIA, Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**. v. 3, n.6, p.163-175, 2008.

SILVA, M. A. V. **Curso de meteorologia básica**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, (mimeog), 1980.

SOLÉ-CAVA, A. M .Biodiversidade molecular e genética da conservação, p.172-192. In Matioli S R (ed) *Biologia molecular e evolução*. **Holos**, Ribeirão Preto, 2001, 202p.

SOUZA, C. M.; FORTES-DIAS, C. L.; LINARDI, P. M. e DIAS,E. S. Phenetic studies on randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction-variability of four geographical populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 37, n.2, p. 148-153, 2004.

SOUZA-SANTOS, R. Fatores Associados à ocorrência de formas imaturas de *Aedes aegypti* na Ilha do Governador, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 4, p. 373-382, 1999.

SUKONTHABHIROM, S et al. Genetic structure among Thai populations of *Aedes aegypti* mosquitoes. **Journal of Vector Ecology**, v. 34, n.1, p. 43-49, 2009.

SUPERINTENDÊNCIA DE CAMPANHAS DE SAÚDE PÚBLICA (Brasil). **Relatório** do Seminário sobre Dengue e *Aedes aegypti* - Região Nordeste, 06 a 10 de junho de 1988, Recife, PE.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v.18, n. 24, p. 7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J. G. K et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WILLIAMS, J. G. K et al. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology**. v. 218, p.704-739, 1993.

WONDJI, C et al. Impact of insecticide-treated bed nets implementation on the genetic structure of *Anopheles arabiensis* in an area of irrigated rice fields in the Sahelian region of Cameroon. **Molecular Ecology**. v.14, n.12, p.3683-3693, 2005.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L.; GUERRA, Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Informe epidemiológico do SUS**, Brasília,v.8,n.4,p.5-33,1999.

TEJERINA et al. Bionomics of *Aedes aegypti* subpopulations (Diptera: Culicidae) from Misiones Province, northeastern Argentina. **Acta Tropica**, v. 109, n. 1, p. 45-49, 2009

VAZEILLE, M. et al. Population genetic structure and competence as a vector for dengue type 2 virus of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Madagascar. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v. 65, p. 491-497, 2001.

YEH, F. C.; BOYLE, T. J. B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. **Belgian Journal of Botany**, v. 129, p. 157, 1997.