



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR



Andreolina Alves de Sousa

**Caracterização molecular e diversidade genética de populações de
Aedes aegypti Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) das regiões norte
e nordeste do Brasil**

**Belém - PA
2024**



Andreolina Alves de Sousa

Caracterização molecular e diversidade genética de populações de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) das regiões norte e nordeste do Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Pará – UFPA, como requisito para obtenção do título de Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Iracilda Sampaio – UFPA

Coorientador: Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga - UEMA

Belém - PA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

S725c Sousa, Andreлина Alves de.
 Caracterização molecular e diversidade genética de
 populações de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera:
 Culicidae) das regiões norte e nordeste do Brasil / Andreлина
 Alves de Sousa. — 2024.
 xv, 105 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Maria Iracilda da Cunha
Sampaio

Coorientador(a): Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-
Graduação em Genética e Biologia Molecular, Belém, 2024.

1. *Aedes aegypti*. 2. Amazônia. 3. COI. 4. mtDNA .
5. ND4. I. Título.

CDD 576.58

Andreolina Alves de Sousa

Caracterização molecular e diversidade genética de populações de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) das regiões norte e nordeste do Brasil

Aprovada em: 29/11/2024

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 MARIA IRACILDA DA CUNHA SAMPAIO
Data: 02/01/2025 21:34:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Iracilda Sampaio (Presidente)
Universidade Federal do Pará – UFPA

Documento assinado digitalmente
 AMANDA ALVES FECURY
Data: 04/01/2025 07:27:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Amanda Alves Fecury (Titular)
Universidade Federal do Amapá – UNIFAP

Documento assinado digitalmente
 JOAQUIM PINTO NUNES NETO
Data: 08/01/2025 11:28:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Joaquim Pinto Nunes Neto (Titular)
Insituto Evandro Chagas – IEC

Documento assinado digitalmente
 CINTIA MARTINS PERINOTTO
Data: 03/01/2025 14:33:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Cíntia Martins Perinotto (Titular)
Universidade Federal do Delta do Parnaíba – UFDPAr

Documento assinado digitalmente
 ALCINA VIEIRA DE CARVALHO NETA
Data: 07/01/2025 21:54:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Alcina Vieira de Carvalho Neta (Titular)
Universidade Estadual do Maranhão – UEMA

Profa. Dra. Ana Cecília Ribeiro Cruz (Suplente)
Insituto Evandro Chagas – IEC

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

UFPA – Universidade Federal do Pará.

IEC – Instituto Evandro Chagas.

CENP – Centro Nacional de Primatas

LABMOL – Laboratório de Biologia Molecular pertencente ao Complexo GENBIMOL.

UEMA – Universidade Estadual do Maranhão, Campus Caxias.

Dedico à minha família, em especial, minha mãe
Francisca das Chagas Alves de Sousa, minha maior
motivação.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Pará, em nome do corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela formação na pós-graduação em nível de doutorado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos;

À minha querida orientadora Profa. Dra. Iracilda Sampaio pela oportunidade, orientação durante essa jornada e inspiração ao longo da minha vida acadêmica;

Ao meu querido coorientador Prof. Dr. Elmary Fraga por todos os ensinamentos, incentivo e amizade ao longo dos muitos anos de convivência, orientações e diversos projetos desenvolvidos no complexo Genbimol.

À querida Profa. Dra. Maria Claudene Barros por todos os ensinamentos, amizade, apoio e incentivo ao longo da minha vida acadêmica;

À Profa. Dra. Ana Cecília Ribeiro Cruz pela oportunidade de estágio no Instituto Evandro Chagas – IEC, parceria e colaboração, etapas fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa;

Ao Prof. Dr. Joaquim Pinto Nunes Neto por todo apoio e incentivo durante a pesquisa;

Ao Prof. Dr. Sandro Patroca da Silva por todos os ensinamentos durante o estágio no Instituto Evandro Chagas – IEC;

Ao doutorando Fábio Silva da Silva por toda a sua paciência e valiosos ensinamentos durante as etapas de análises de dados e organização do capítulo 2;

Aos meus colegas de turma, em especial, Ana Priscila, Lucas e Walna por todos os momentos bons e de superação compartilhados durante as disciplinas ao longo do doutorado.

Aos colegas do complexo Genbimol, que compõem minha família científica (Aira Victória, Aglay Morgana, Amanda Caroline, Amanda Cristiny, Aryel Moraes, Cleison Costa, Dalton Costa, Daniel Limeira, Edmilson Camelo, Elidy Costa, Eline Lima, Geysla Fernandes, Jordância Silva, Marcelo Almeida, Márcia Oliveira, Maria Histelle, Naruna Melo, Paulo Rubens, Raimundo Gierdson, Roseane Oliveira e Samira Brito).

A todos os amigos que de perto ou de longe sempre torceram pelo meu sucesso (Alcilene Lindoso, Cleycelena Muniz, Daniele Miranda, Déborah Gaído, Derise Assunção, Diones Ribeiro, Francineto Reis, Georgianna Santos, Gizélia Cunha, Hélio Helder, Hérica Romena, Herderson Francisco, Hosana Veloso, Igo Evans, Isa Ferreira, Isabel Ferreira, Jaqueline Sampaio, João Alberto, Jociel Costa, Joelma Nascimento, José Orlando, Joventina Velozo, Larissa Coimbra, Lecyanne Machado, Leda Cabral, Lígia Matias, Lilia Rios, Lívia Fonseca, Maira Rodrigues, Maurício Rodrigues, Michael Jakson, Mônica Falcão, Nathália Pereira, Raquel Rodrigues, Rita Nascimento, Rozijane Fernandes, Samara Cristina, Sara Pacheco, Sebastiana Ibiapina, Sidna Garcia).

As pessoas mais importantes da minha vida, agradeço imensamente a minha família. Ao meu pai Vicente (*in memorian*), a minha mãe Francisca, aos meus irmãos José Augusto, Idelbrando, Eugênio, Amanda e aos meus sobrinhos que são tesouros em minha vida: Alice Catharine, Vicente Neto, Isabelly Caroline, Maria Cecília, João Augusto, Dilermando e Beatriz por todo o amor e compreensão, principalmente nos momentos importantes em que estive ausente.

A todos o meu **Muito Obrigada!!!**

RESUMO

O *Aedes aegypti* é o principal vetor das arboviroses dengue, chikungunya e zika no mundo. Os altos índices de notificações de pessoas infectadas, especialmente com dengue, em todas as regiões do Brasil revelam a necessidade de estudos que nos permita inferir sobre a dinâmica populacional do vetor em escala regional, devido as peculiaridades de cada região. Neste contexto, o presente estudo, caracterizou o genoma mitocondrial parcial de um espécime de *A. aegypti* e investigou a diversidade genética com base em sequencias de DNA de genes mitocondriais das populações de *A. aegypti* de 22 localidades do norte e nordeste do Brasil, a fim de gerar informações sobre os processos evolutivos e de variabilidade genética da espécie. É válido destacar a relevância desse estudo, no qual foi obtido pela primeira vez, o genoma mitocondrial de um representante do *A. aegypti* proveniente do nordeste brasileiro, o que representa um avanço importante nas discussões a acerca da taxonomia e da biologia evolutiva da espécie. Além disso, neste estudo, verificou-se uma clara tendência global de seleção purificadora forte ($dN/dS < 1$), o que sugere que é menos provável que a população evolua rapidamente em resposta a novos tratamentos, uma vez que quaisquer mutações que perturbem funções essenciais são fortemente selecionadas. O estudo de variabilidade genética das 22 populações revelaram altos índices de diversidade genética e a ocorrência de duas linhagens mitocondriais. Entre os haplótipos obtidos, quatro sequências apresentaram alta similaridade com haplótipos da subespécie *A. aegypti formosus* (Aaf), que ocorre no continente africano, sugerindo a presença da subespécie Aaf na América do Sul, o que reforça a importância de estudos dessa natureza, pois as consequências epidemiológicas da circulação das subespécies *A. aegypti aegypti* (Aaa) e *A. aegypti formosus* (Aaf), e sua mistura genética podem ter implicações profundas na saúde da população local e na gestão da saúde pública no Brasil.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, Amazônia, Arboviroses, COI, mtDNA e ND4.

ABSTRACT

Aedes aegypti is the main vector of the arboviruses dengue, chikungunya and zika in the global context. The high rates of notifications of people infected, especially with dengue, in all regions of the Brazil reveal the need for studies that allow us to make inferences about the population dynamics of the vector on a regional scale, due of the peculiarities of each region. In this context, this study characterised the partial mitochondrial genome of a specimen of *A. aegypti* and investigated the genetic diversity based on DNA sequences of mitochondrial genes of *A. aegypti* populations from 22 locations in the north and northeast of Brazil, to provide information on the evolutionary processes and genetic variability of the species. It is important to mention the relevance of this study, in which it was obtained first time, the mitochondrial genome of a representative of *A. aegypti* from northeastern Brazil, representing an important advance in discussions about the taxonomy and evolutionary biology of the species. In addition, there was a clear global trend towards strong purifying selection ($dN/dS < 1$) in this study, suggesting that the population is less likely to evolve rapidly in response to new treatments, as any mutations that disrupt essential functions are strongly selected. The study of the genetic variability of the 22 populations revealed high levels of genetic diversity and the occurrence of two mitochondrial lineages. Among the haplotypes obtained, four sequences showed high similarity with haplotypes of the *A. aegypti formosus* (Aaf) subspecies, which occurs on the African continent, suggesting the presence of the Aaf subspecies in South America, which reinforces the importance of studies of this nature, since the epidemiological consequences of the circulation of the subspecies *A. aegypti aegypti* (Aaa) and *A. aegypti formosus* (Aaf), and their genetic mixing can have profound implications for the health of the local population and for public health management in Brazil.

Keywords: *Aedes aegypti*, Amazonia, Arboviroses, COI, mtDNA and ND4.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1.** Vista dorsal de uma fêmea de *Aedes aegypti* com destaque para as principais partes presentes na cabeça, tórax e abdômen. Fonte: Imagem adaptada de Goeldi, (1905)._____ **17**
- Figura 2.** Ciclo de vida do *Aedes aegypti* com a descrição das fases aquática (ovos, larvas e pupas) e terrestre (alados)._____ **18**
- Figura 3.** Fêmeas de *Aedes aegypti*. A esquerda a subespécie africana *Aedes aegypti formosus* e a direita a subespécie cosmopolita *Aedes aegypti aegypti*._____ **19**
- Figura 4.** Representação gráfica da divisão das linhagens do *Aedes aegypti* e o tempo estimado dos eventos a partir de dados genéticos. A linha azul representa a introdução no Novo Mundo, a linha vermelha representa a Ásia sendo derivada do Novo Mundo._____ **20**
- Figura 5.** Mapa global da distribuição prevista para *Aedes aegypti*. O mapa mostra a probabilidade de ocorrência (de 0 azul a 1 vermelho) do vetor em uma resolução espacial de 5 km×5km._____ **20**
- Figura 6.** Genoma Mitocondrial do *Aedes aegypti*. _____ **23**
- Figura 7.** Área de obtenção das amostras de *Aedes aegypti* em sete estados entre as regiões Norte e Nordeste do Brasil _____ **26**

CAPÍTULO 1

- Figure 1.** Location of the municipality of Balsas, in Maranhão state, showing the site from which the biological samples were collected. _____ **37**
- Figure 2. (A)** Genomic coverage and structural organisation of the sequence obtained in the present study, **(B)** circular configuration of the genome, **(C)** AT% and GC% nucleotide composition and **(D)** AT/GC skews. _____ **39**
- Figure 3. (A)** Relative synonymous codon usage (RSCU) of the mtDNA of *Ae. aegypti*. **(B)** Boxplot of the mean evolutionary pressure that affects the PCGs

identified in the present study, based on the ratio of non-synonymous (dN) to synonymous (dS) substitutions (dN/dS) recorded. _____ 40

Figure 4. Reconstruction of the phylogeny using the maximum likelihood method of the mosquitoes analysed in the present study, based on the 13 concatenated PCGs of the *Ae. aegypti* obtained in this study and 28 other taxa available in public databases. Support values (BPP) are shown at each node. _____ 41

CAPÍTULO 2

Figura 1. Distribuição geográfica dos haplótipos para o gene ND4 por localidade onde foram obtidas as amostras de *A. aegypti* nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. _____ 64

Figura 2. Distribuição geográfica dos haplótipos para o gene COI por localidade onde foram obtidas as amostras de *A. aegypti* nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. _____ 65

Figura 3. (A) Rede de haplótipos das relações genéticas entre 33 haplótipos de *A. aegypti* para o gene ND4. **(B)** Estrutura genética do gene ND4 para as 514 amostras de *A. aegypti* nas 22 localidades amostradas nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. _____ 71

Figura 4. (A) Rede de haplótipos das relações genéticas entre 28 haplótipos de *A. aegypti* para o gene COI. **(B)** Estrutura genética do gene COI para as 452 amostras de *A. aegypti* nas 22 localidades amostradas nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. _____ 72

Figura 5. Árvore Inferência Bayesiana com base em 33 haplótipos para o gene mitocondrial ND4 a partir de amostras de *A. aegypti* obtidos nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. _____ 77

Figura 6. Árvore Inferência Bayesiana com base em 28 haplótipos para o gene mitocondrial COI a partir de amostras de *A. aegypti* obtidos nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. _____ 78

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Municípios de obtenção das amostras de <i>A. aegypti</i> nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, coordenadas geográficas e tamanho amostral para cada gene (ND4 e COI) .	57
Tabela 2. Descrição dos haplótipos identificados para o gene ND4 a partir das amostras de <i>A. aegypti</i> obtidas nas regiões Norte e Nordeste do Brasil.	66
Tabela 3. Descrição dos haplótipos identificados para o gene COI a partir das amostras de <i>A. aegypti</i> obtidas nas regiões Norte e Nordeste do Brasil.	67
Tabela 4. Caracterização genética para o gene ND4 a partir de amostras de <i>A. aegypti</i> obtidas nas regiões Norte e Nordeste do Brasil.	68
Tabela 5. Caracterização genética para o gene COI a partir de amostras de <i>A. aegypti</i> obtidas nas regiões Norte e Nordeste do Brasil.	69
Tabela 6. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para o gene ND4 a partir das amostras de <i>A. aegypti</i> obtidas nas regiões Norte e Nordeste do Brasil.	73
Tabela 7. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para o gene COI a partir das amostras de <i>A. aegypti</i> obtidas nas regiões Norte e Nordeste do Brasil.	73
Tabela 8. Distância genética par a par (F_{ST}) para as 22 localidades onde foram obtidas amostras de <i>A. aegypti</i> nas regiões Norte e Nordeste. Os valores para o gene ND4 estão na diagonal abaixo e os valores para o gene COI estão na diagonal acima.	75
Tabela 9. Número efetivo de migrantes por geração (N_m) entre as localidades das regiões Norte e Nordeste onde foram obtidas as amostras de <i>A. aegypti</i> . Os valores para o gene ND4 estão na diagonal abaixo e os valores para o gene COI estão na diagonal acima.	76

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	16
1. INTRODUÇÃO GERAL	17
1.1 Origem, biologia e distribuição do <i>Aedes aegypti</i>	17
1.2 Importância Epidemiológica do <i>Aedes aegypti</i>	21
1.3 Estudos de Variabilidade Genética em Populações de <i>Aedes aegypti</i>	22
2. OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo Geral	25
2.2 Objetivos Específicos	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Procedência e Obtenção das Amostras	26
3.2. Extração do DNA genômico	27
4. REFERÊNCIAS	28

CAPÍTULO 1 - Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae) from the Brazilian Amazon region	34
Abstract	35
1. Introduction	35
2. Materials and Methods	36
2.1. Collection of the Biological Samples and the Extraction of the Total DNA	36
2.2. Genomic Sequencing	37
2.3. Data Processing and Description of the Genome	38
2.4. Phylogenetic Analysis	38
3. Results	38
4. Discussion	41
References	44
Supplementary Table 1. Taxa used in the evolutionary analyzes.	46
Supplementary Table 2. <i>Aedes aegypti</i> OR350416 nucleotide composition metrics.	47

Supplementary Table 3. Nucleotide distances by Maximum Likelihood Composition.	48
---	----

Supplementary Figure 1. Secondary structures of tRNAs and rRNAs of <i>Aedes aegypti</i> OR350416.	49
--	----

CAPÍTULO 2 - Análise Molecular de linhagens mitocondriais de populações de <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae): Insights sobre a ocorrência da forma silvestre no Brasil	52
---	----

Resumo	54
---------------	----

Introdução	55
-------------------	----

Material e Métodos	57
---------------------------	----

Procedência e Obtenção das Amostras	57
-------------------------------------	----

Extração de DNA, amplificação e sequenciamento dos genes mitocondriais	58
--	----

Análises de caracterização e diversidade genética para os genes ND4 e COI	59
---	----

Estrutura genética populacional	60
---------------------------------	----

Análises Filogenéticas	61
------------------------	----

Resultados	62
-------------------	----

Análises de caracterização e diversidade genética para os genes ND4 e COI	62
---	----

Estrutura genética populacional	73
---------------------------------	----

Análises Filogenéticas	77
------------------------	----

Discussão	78
------------------	----

Análises de caracterização e diversidade genética para os genes ND4 e COI	79
---	----

Estrutura genética populacional	83
---------------------------------	----

Referências	86
--------------------	----

Tabela S1. Haplótipos obtidos nas amostras de <i>A. aegypti</i> das regiões Norte e Nordeste do Brasil compartilhados com haplótipos de outros estudos do Brasil e de outros países com base no marcador molecular ND4. Destaque apenas para os haplótipos compartilhados com outros estudos	98
---	----

Tabela S2. Haplótipos obtidos nas amostras de <i>A. aegypti</i> das regiões Norte e Nordeste do Brasil compartilhados com haplótipos de outros estudos do	
--	--

Brasil e de outros países com base no marcador molecular COI. Destaque apenas para os haplótipos compartilhados com outros estudos.	99
Tabela S3. Distância em quilômetros entre as 22 localidades das regiões Norte e Nordeste onde foram obtidas as amostras de <i>A. aegypti</i> .	100
Figura S1. Estimativa de ΔK para as amostras das 22 localidades das regiões Norte e Nordeste do Brasil com base no gene ND4 (número putativo de populações).	101
Figura S2. Estimativa de ΔK para as amostras das 22 localidades das regiões Norte e Nordeste do Brasil com base no gene COI (número putativo de populações).	101
Anexo. Submission Confirmation to Journal of Medical Entomology	102
CONCLUSÕES FINAIS	104

APRESENTAÇÃO

A tese está organizada em capítulos. A introdução geral aborda a origem do *A. aegypti*, as principais características morfológicas, o ciclo de vida, a distribuição geográfica, a história evolutiva, a sua importância epidemiológica, e por fim, os estudos de variabilidade genética com populações de *A. aegypti* que visam contribuir na implementação de estratégias de controle do vetor para a prevenção de epidemias.

O capítulo 1, “Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from the Brazilian Amazon region”, consiste na descrição e caracterização da composição do genoma mitocondrial de um representante da espécie coletado na região nordeste do Brasil. A sequência de nucleotídeos obtida em nosso estudo compartilha um alto nível de identidade com um genoma de referência obtido em uma pesquisa que também descreveu três cromossomos do *A. aegypti*. Portanto, baseada nas análises filogenéticas as informações produzidas nesse estudo terão importante utilidade em estudos que tratem da taxonomia, dos processos evolutivos e de variabilidade genética da espécie.

O capítulo 2, “Molecular analysis of the mitochondrial lineages of Brazilian populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): insights into the local occurrence of the wild type”, aborda um estudo de genética populacional com base em sequências de DNA de dois genes mitocondriais, realizado com 22 populações provenientes das regiões norte e nordeste do Brasil. Com base nas análises de caracterização da diversidade genética, rede de haplótipos, análises de agrupamento bayesiano e análises filogenéticas verificamos a ocorrência de duas linhagens mitocondriais na área amostrada, e além disso, as análises moleculares nos permitiu confirmar a circulação da subespécie *A. aegypti formosus* no Brasil, o que pode ter importantes implicações epidemiológicas com a circulação de novas arboviroses com impacto direto na saúde pública. E por fim, as conclusões finais.

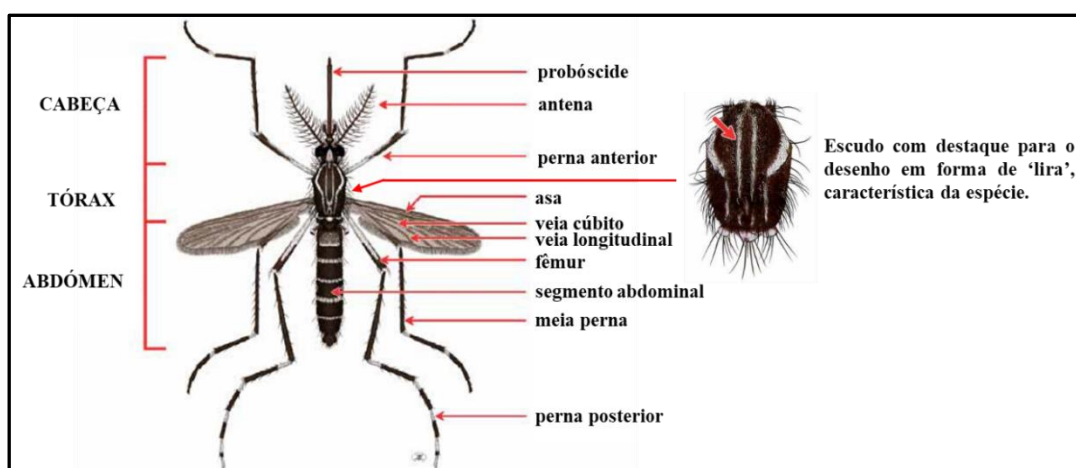
1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Origem, biologia e distribuição do *Aedes aegypti*

O *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) originário da África, é uma das espécies de mosquitos de maior importância epidemiológica com ampla distribuição mundial (Paupy *et al.*, 2012, Ayala *et al.*, 2020, Sousa *et al.*, 2023).

As principais características morfológicas dos mosquitos adultos é um tórax castanho escuro ornamentado com faixas ou desenhos de escamas claras, geralmente branco-prateadas, que se prolongam até o escutelo, formando um desenho em forma de lira (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994) (Figura 1).

Figura 1. Vista dorsal de uma fêmea de *Aedes aegypti* com destaque para as principais partes presentes na cabeça, tórax e abdômen.

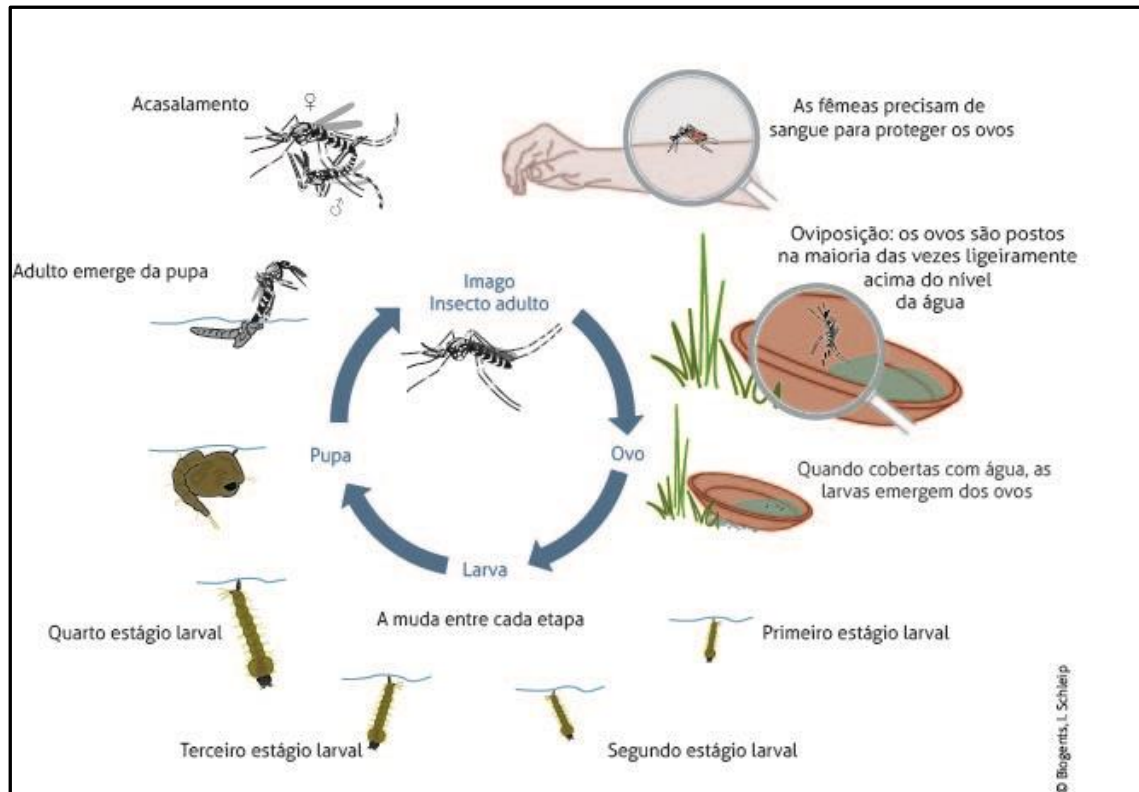


Fonte: Imagem adaptada de Goeldi, (1905).

O *A. aegypti* é uma espécie holometábola com ciclo de desenvolvimento dividido em duas fases: a aquática (ovos, larvas e pupas) e a terrestre (alados). Após o acasalamento, as fêmeas distribuem seus ovos em diferentes locais com capacidade de retenção de água (Brady e Hay, 2020). Os ovos ao entrarem em contato com a água, as larvas eclodem, passam por quatro estágios de crescimento de quatro a oito dias, nesse período alimentam-se da matéria orgânica presente no ambiente, logo após, surgem às pupas, que não se alimentam, essa fase dura em média dois dias até a emergência dos adultos, os machos e fêmeas se alimentam de néctar e seiva de vegetais a base de carboidratos, além disso, e as fêmeas também se alimentam de sangue dos

vertebrados, preferencialmente o homem, para a obtenção das proteínas para maturação e desenvolvimento dos ovos (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994) (Figura 2).

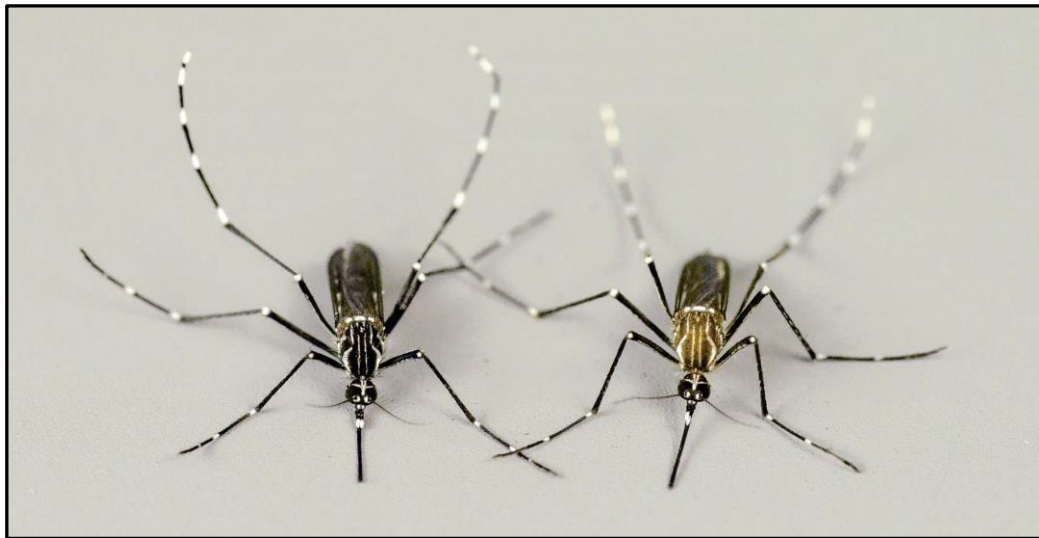
Figura 2. Ciclo de vida do *Aedes aegypti* com a descrição das fases aquática (ovos, larvas e pupas) e terrestre (alados).



Fonte: <https://eu.biogents.com/aedes-aegypti-o-mosquito-da-dengue/?lang=pt-br>

A espécie *A. aegypti* é considerada politípica diferenciada em subespécies com base nos aspectos morfológicos, ecológicos, genéticos e de suscetibilidade viral (Delatte *et al.*, 2011, Khater *et al.*, 2021). O *A. aegypti formosus* é a forma silvestre, ocorre nas florestas da África Subariana, deposita seus ovos em ocos de troncos de árvores e é mais zoofílico. O *A. aegypti aegypti* é a forma domesticada, bastante difundida por todo o mundo, deposita seus ovos em recipiente produzidos pelo homem e é mais antropofílico (Powell e Tabachnick, 2013; Brown *et al.*, 2014; Jaimes-Dueñez *et al.*, 2015; Powel, 2016; Fernando *et al.*, 2020) (Figura 3).

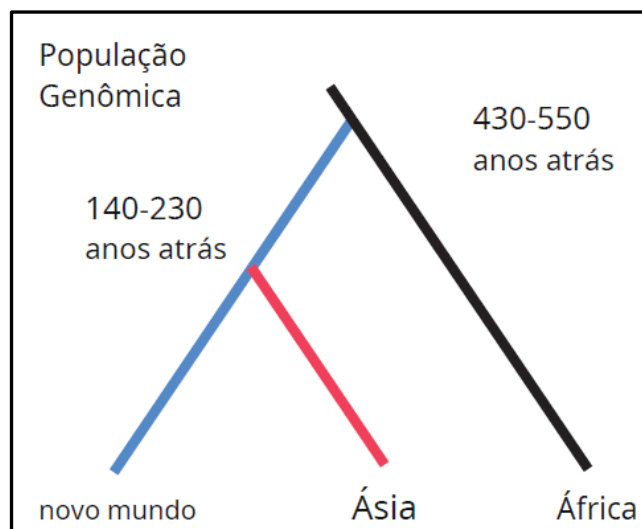
Figura 3. Fêmeas de *Aedes aegypti*. A esquerda a subespécie africana *Aedes aegypti formosus* e a direita a subespécie cosmopolita *Aedes aegypti aegypti*.



Fonte: Powel, (2016).

A história evolutiva do vetor é complexa, estudos sugerem que os mosquitos foram transportados da África para a América e depois da América para a Ásia, uma ideia apoiada pela descoberta de que as populações na América têm maior diversidade genética do que as da Ásia. A introdução desta espécie invasora nas Américas provavelmente ocorreu durante as navegações com o comércio de especiarias e de escravos entre os séculos XVI a XVIII, onde se espalhou rapidamente por todo o continente (Paupy *et al.*, 2012; Powel, Glória-Soria e Kotsakiozi, 2018; Pless *et al.*, 2022) (Figura 4).

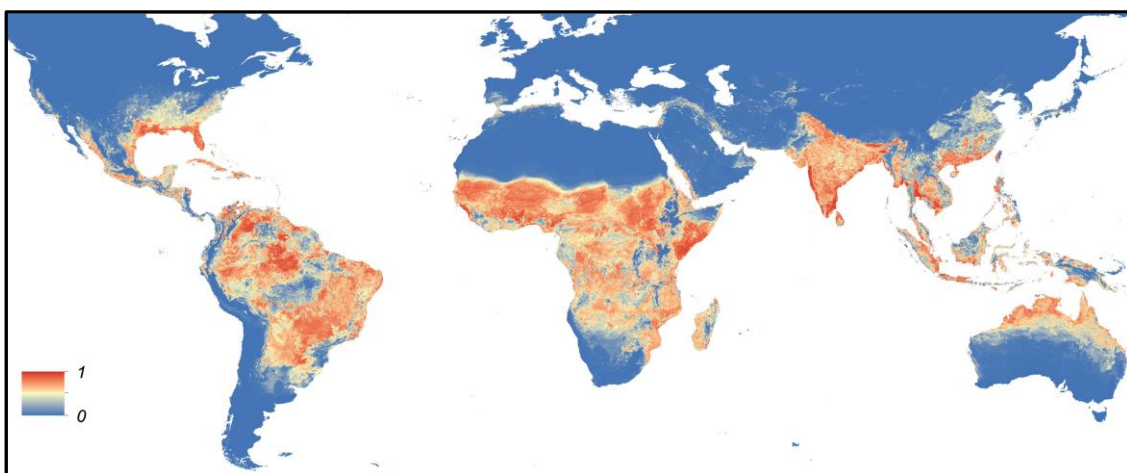
Figura 4. Representação gráfica da divisão das linhagens do *Aedes aegypti* e o tempo estimado dos eventos a partir de dados genéticos. A linha azul representa a introdução no Novo Mundo, a linha vermelha representa a Ásia sendo derivada do Novo Mundo.



Fonte: Powel, Glória-Soria e Kotsakiozi, (2018).

A distribuição geográfica do *A. aegypti* é ampla em resolução espacial e temporal, onde ocorre principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, com concentrações que vão desde a América Central ao sudeste da Ásia, incluindo toda a Índia (Kraemer *et al.*, 2015) (Figura 5).

Figura 5. Mapa global da distribuição prevista para *Aedes aegypti*. O mapa mostra a probabilidade de ocorrência (de 0 azul a 1 vermelho) do vetor em uma resolução espacial de 5 km×5km.



Fonte: Kraemer *et al.* (2015).

A temperatura é um dos fatores abióticos mais importantes na dinâmica populacional de mosquitos que pode afetar tanto no desenvolvimento dos

estágios imaturos (ovos, larvas e pupas), como na reprodução. Os limites de temperatura ideais para a espécie vão de 16°C a 34°C, além disso, a disponibilidade de alimentos e oxigênio são fatores essenciais para o desenvolvimento e sobrevivência da espécie nos estágios imaturos (Reinhold, Lazzari e Lahondère, 2018; Souza-Neto, Powell e Bonizzoni, 2019).

1.2 Importância Epidemiológica do *Aedes aegypti*

A espécie é o principal vetor responsável pela transmissão das arboviroses *Orthoflavivirus denguei* (DENV I, II, III e IV), *Orthoflavivirus zikaense* (ZIKV) e *Alphavirus chikungunya* (CHIKV) para humanos no Brasil e nas Américas (Espinal *et al.*, 2019), que representam continuamente uma ameaça à saúde pública global, bem como ao desenvolvimento socioeconômico nas últimas décadas (Li *et al.*, 2021).

Em 1906 foi demonstrado que o *A. aegypti* é capaz de transmitir a dengue (Souza-Neto, Powell e Bonizzoni, 2019). A espécie tem uma história de expansão por todos os continentes muito bem-sucedida, a evolução dos traços anteriormente silvestres para o urbano a tornou bem adaptada ao ambiente doméstico (Seixas *et al.*, 2013), sendo considerado o culicídeo intimamente mais associado às populações humanas, um fator determinante para a ocorrência de epidemias transmitidas pelo vetor (Fraga *et al.*, 2013).

A febre amarela é endêmica de vários países da África e América do Sul, causou epidemias nas Américas e Europa no final do século XVII, circula na natureza em dois ciclos: um silvestre em macacos e um urbano transmitido ao homem pelo mosquito *A. aegypti* (Reinhold, Lazzari e Lahondère, 2018).

A chikungunya tem como principais sintomas artrite severa, artralguas, mialgias, febre alta e fortes dores de cabeça, essa infecção pode ser fatal, porém as dores nas articulações muitas vezes são graves e debilitantes (Gonzalez *et al.*, 2014). A zika causa uma preocupação substancial em gestantes devido os casos de microcefalia e outras anomalias congênitas associadas a essa infecção durante a gestação (Faria *et al.*, 2017; Slonchak *et al.*, 2020).

A dengue se tornou endêmica em cerca de 129 países com registros de algumas centenas de milhões de casos por ano (Li *et al.*, 2021), é uma das

doenças negligenciadas mais importantes do mundo e a sua incidência aumentou mais de 30 vezes nas últimas décadas, juntamente com a expansão geográfica do seu vetor (Guzmán *et al.*, 2016).

As transmissões das arboviroses ocorre pela picada da fêmea de *A. aegypti* infectada. As fêmeas são contaminadas na ingestão do sangue de uma pessoa infectada no ciclo de transmissão humano – mosquito – humano. As fêmeas podem ainda, transmitir o vírus para a próxima geração através de seus ovos (Pereira *et al.*, 2017).

Nas últimas décadas, o Brasil tem apresentado números expressivos de doenças transmitidas por vetores, com destaque para os casos de dengue. De acordo com dados do Ministério da Saúde, no ano de 2024, foram registrados 6.637.934 casos prováveis de dengue no país (taxa de incidência de 3268,9 casos por 100 mil hab.), com 5.999 óbitos confirmados e 958 mortes sob investigação no Brasil. Na região Nordeste, foram notificados 355.728 (taxa de incidência de 651,0 casos por 100 mil hab.), com 266 mortes confirmadas e 95 sob investigação, enquanto para a região Norte, foram notificados 59.114 casos prováveis de dengue (taxa de incidência de 340,7 casos por 100 mil hab.), com 45 óbitos e 4 mortes sob investigação (Brasil, 2024). A situação epidemiológica no país é caracterizada pela expansão vetorial com ocorrência da dengue em todas as regiões do país.

1. 3 Estudos de variabilidade Genética em Populações de *Aedes aegypti*

A variabilidade genética é um fator importante para a adaptação de um organismo, fatores como mutação, deriva genética, seleção, migração, mecanismos de reprodução mantêm a variação genética entre e dentro das populações de uma espécie. Além disso, compreender os padrões da estrutura genética em populações de insetos vetores e sua dinâmica populacional é de grande importância para elaboração de programas de controle que possam atingir as populações competentes vetorialmente dentro dos limites geográficos necessários para interromper a transmissão de arboviroses (Pereira *et al.*, 2017).

Ao longo das últimas décadas vários estudos utilizando a análise de sequências de DNA vêm fornecendo informações importantes sobre a estrutura

vários estudos que utilizaram exclusivamente o gene ND4. Twerdochlib *et al.*, (2012) no Estado do Paraná. Fraga *et al.*, (2013) na Ilha de São Luís. Lima Júnior e Scarpassa, (2009) na Amazônia brasileira. Sousa *et al.*, (2017) no Estado do Maranhão e Lopes *et al.*, (2021) em um estudo realizado no município de Londrina no Paraná. Essas investigações observaram significativa variabilidade genética nas populações de *A. aegypti* em diferentes regiões do Brasil.

Além dos genes mitocondriais em estudos populacionais, a caracterização do mitogenoma é uma importante ferramenta no desenvolvimento de estudos evolutivos, particularmente de espécies vetores de importância epidemiológica (Demari-Silva *et al.*, 2015; Hao *et al.*, 2017; Lorenz *et al.*, 2019; Nascimento *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2023), por se tratar de um conjunto genômico de herança materna, com ausência de processos de recombinação e altas taxas de acúmulo de mutações em comparação ao genoma nuclear (Avisé, 2004; Boore, 1999). Neste contexto, a caracterização de mitogenomas, bem como, a utilização de genes mitocondriais são essenciais na realização de estudos que visam gerar informações sobre os processos evolutivos e de variabilidade genética em populações de *A. aegypti*.

A constante presença do vetor *A. aegypti* em todas as regiões do país representa um risco para a saúde pública brasileira com potencial para ocorrência de várias epidemias, o que revela a necessidade de estudos que nos permita realizar a caracterização molecular e inferir sobre diversidade genética dessas populações em diferentes regiões do Brasil, bem como, conhecer os efeitos das relações ecológicas em uma escala temporal, o que poderá abrir novas perspectivas de estudos, no que se refere a sua importância como agente transmissor de doenças, e ainda gerar informações que possam subsidiar programas de controle do vetor e de prevenção a epidemias.

2. OBJETIVOS

2. 1 Objetivo Geral

Caracterizar a diversidade genética das populações de *A. aegypti* das regiões norte e nordeste do Brasil.

2. 2 Objetivos Específicos

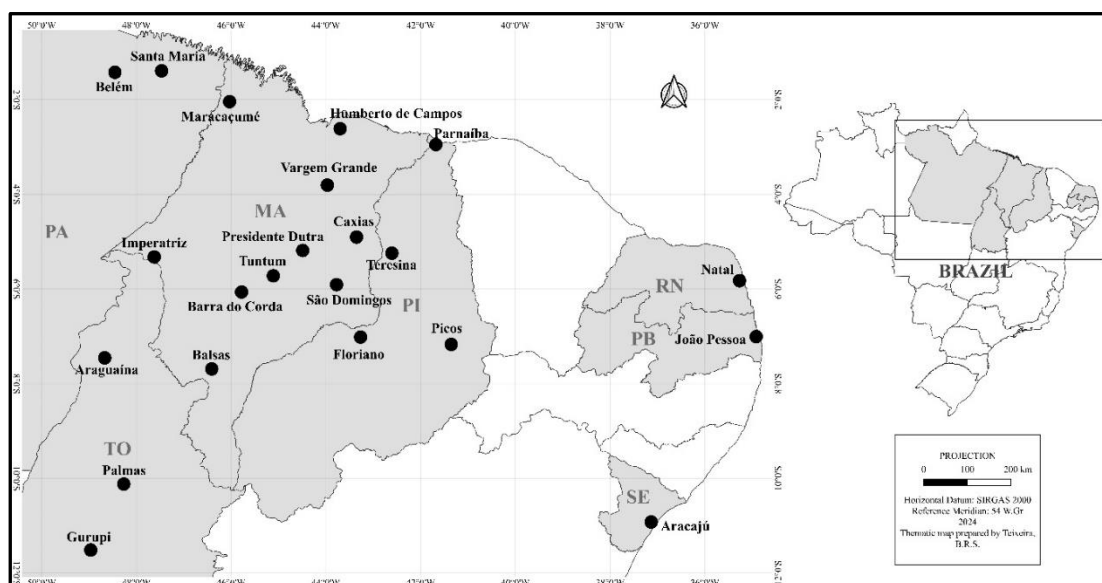
-  Obter o genoma mitocondrial de um representante das populações de *A. aegypti* da região nordeste do Brasil;
-  Apresentar a filogenia do *A. aegypti* identificando as relações evolutivas na subfamília Culicinae;
-  Identificar a distribuição dos haplótipos obtidos na área de estudo;
-  Descrever os níveis de diversidade genética nas populações de *A. aegypti* no norte e nordeste com base nos genes ND4 e COI;
-  Inferir sobre as relações filogenéticas dos haplótipos obtidos e ocorrência de diferentes linhagens mitocondriais nas populações de *A. aegypti* da área amostrada;
-  Estimar os níveis de variação genética intrapopulacional e interpopulacional em *A. aegypti* com base nos genes ND4 e COI;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. 1 Procedência e Obtenção das Amostras

As amostras foram obtidas em sete estados entre as regiões Norte (estados do Pará e Tocantins) e Nordeste (estados do Maranhão, Paraíba, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe) do Brasil (Figura 7).

Figura 7. Área de obtenção das amostras de *Aedes aegypti* em sete estados entre as regiões Norte e Nordeste do Brasil.



Fonte: Teixeira, B.R.S (2024). QGIS Software.

As coletas foram realizadas na companhia de um agente de endemias da vigilância epidemiológica de cada município. Com base em dados do levantamento de índice rápido de *A. aegypti* (LIRAA) foram selecionaram pontos estratégicos (PEs), como: oficinas mecânicas, cemitérios, borracharias e o peridomicílio das residências para a distribuição das armadilhas.

Foram distribuídas 30 armadilhas para ovos (ovitrap) a uma distância mínima de 1km entre as armadilhas, estas foram colocadas em áreas sombreadas, pouco iluminadas, protegidas da chuva, e, recolhidas após seis dias (Reiter *et al.*,1995).

O material coletado foi transportado para Laboratório de Biologia Molecular-LABMOL do Complexo GENBIMOL, UEMA/Campus Caxias. A palhetas contendo ovos foram colocadas em diferentes bacias de plástico

etiquetados e cobertos com um tecido fino e poroso. Após a eclosão dos ovos, as larvas foram alimentadas até o 4º estágio de desenvolvimento, conforme o protocolo de Santos *et al.*, (1981).

As larvas de 4º estágio foram identificadas com o auxílio de chave taxonômica de classificação (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994). Após a identificação, as larvas provenientes de diferentes criadouros artificiais foram acondicionadas em tubos de 1,5ml, etiquetados e congelados em um freezer a -80° C para posterior aplicação das técnicas moleculares.

3. 2. Extração do DNA genômico

A extração do DNA total foi realizada com o kit Wizard Genomic DNA Purification da *PROMEGA*, conforme as instruções do fabricante. A integridade do DNA extraído foi analisada em gel de agarose a 1% e armazenado em freezer -20°C.

As técnicas moleculares realizadas a partir do DNA genômico extraído e as análises dos dados estão descritos nos Capítulos 1 e 2.

Esta pesquisa faz parte de um projeto fomentado pela CAPES (edital 12/2018 – PROCAD/AMAZONIA) que tem como proponente a UEMA por meio do programa de pós-graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde e instituições associadas: a UFPA através do programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular e o IEC por meio do programa de pós-graduação em Virologia.

4. REFERÊNCIAS

Awise, J. C. Molecular markers, natural history and evolution. **Sunderland: Sinauer Associates**. 2nd edition. 684p, 2004.

Ayala, A.M., Vera, N.S., Chiappero, M.B., Almirón, W.R., Gardenal, C.N. Urban Populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) From Central Argentina: Dispersal Patterns Assessed by Bayesian and Multivariate Methods. **J Med Entomol**. Jul 4;57(4):1069-1076. PMID: 32053724. 2020.

Boore, J. L. Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Res** 27, 1767–1780, 1999.

Brady, O. J.; Hay, S. I. The Global Expansion of Dengue: How *Aedes aegypti* Mosquitoes Enabled the First Pandemic Arbovirus. **Annu Rev Entomol**. Jan 7; 65:191-208. 2020.

Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambinete. Fonte: Sistema de Informações de Agravos de Notificações – SINAN e Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/aedes-aegypti/monitoramento-das-arboviroses>. Acessado em 21/12/2024. 2024.

Brown, J.E., Evans, B.R., Zheng, W., Obas, V., Barrera-Martinez, L., Egizi, A., Zhao, H., Caccone, A., Powell, J.R. Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. **Evolution**. Feb;68(2):514-25. Epub 2013 Oct 23. PMID: 24111703; PMCID: PMC3946797. 2014.

Consoli, R. A. G. B.; Lourenço-de-Oliveira, R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. **Fiocruz**, Rio de Janeiro. 225p. 1994.

Delatte, H., Bagny, L., Brengue, C., Bouetard, A., Paupy, C., Fontenille, D. The invaders: phylogeography of dengue and chikungunya viruses *Aedes* vectors, on the South West islands of the Indian Ocean. **Infect Genet Evol**. Oct;11(7):1769-81. Epub 2011 Jul 29. PMID: 21827872. 2011.

Demari-Silva, B. Foster, P.G. De Oliveira, T.M.P. Bergo, E.S. Sanabani, S.S. Pessôa, R. Sallum, M.A.M. Mitochondrial genomes and comparative analyses of *Culex camposi*, *Culex coronator*, *Culex usquatus* and *Culex usquatissimus* (Diptera: Culicidae), members of the *coronator* group. **BMC Genomics**, 16, 1, 2015.

Espinal, M.A., Andrus, J.K., Jauregui, B., Waterman, S.H., Morens, D.M., Santos, J.I., Horstick, O., Francis, L.A., Olson, D. Emerging and Reemerging *Aedes*-Transmitted Arbovirus Infections in the Region of the Americas: Implications for Health Policy. **Am. J. Public Health**, 109, 387–392. 2019.

Faria, N. R. *et al.* Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. **Nature**. 546. 10.1038/nature22401. 2017.

Fernando, H. S. D.; Hapugoda, M.; Perera, R.; Black Iv, W. C.; De Silva, B. G. D. N. K. Mitochondrial metabolic genes provide phylogeographic relationships of global collections of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **PLoS ONE**. 15 (7): e0235430. 2020.

Fraga, E. C.; Oliveira, D. R. S.; Aragão, D. G.; Schneider, H.; Sampaio, I.; Barros, M. C. Genetic Variability and Evidence of Two Distinct Lineages of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) on São Luís Island in Maranhão, Brazil. **The Open Tropical Medicine Journal**. 6, 11–18. 2013. <https://doi.org/10.2174/1874315301306010011>.

Goeldi, E.A. Os mosquitos no Pará. Mem Mus Goeldi **Hist Nat Ethnog** 4. 1905.

Gonzalez, M. J.; Miranda-Massari, J. R.; Berdiel, M. J.; Duconge, J.; Rodrigues-Lopes, J. L.; Hunninghake, R.; Cobas-Rosario, V. J. High Dose Intravenous Vitamin C and Chikungunya Fever: A Case Report. NIH Publis Acess **Journal Orthomology Medical**; v. 29, n. 4, p.154–156. 2014.

Guzman, M. G.; Gubler, D.J.; Izquierdo, A.; Martinez, E.; Halstead, S. B. Dengue infection. **Nat Rev Dis Primers**. Aug 18; 2:16055. 2016.

Hao, Y.J. Zou, Y.L. Ding, Y.R. Xu, W.Y.; Yan, Z.T. Li, X.D. Fu, W.B. Li, T.J.; Chen, B. Complete mitochondrial genomes of *Anopheles stephensi* and *An. dirus* and comparative evolutionary mitochondriomics of 50 mosquitoes. **Sci. Rep**, 7, 1–13, 2017.

Jaimes-Dueñez, J., Arboleda, S., Triana-Chávez, O., Gómez-Palacio, A. Spatio-Temporal Distribution of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Mitochondrial Lineages in Cities with Distinct Dengue Incidence Rates Suggests Complex Population Dynamics of the Dengue Vector in Colombia. **PLoS Negl Trop Dis** 9(4): e0003553. 2015.

Khater, E.I.M., Baig, F., Kamal, H.A., Powell, J.R., Saleh, A.A. Molecular Phylogenetics and Population Genetics of the Dengue Vector *Aedes aegypti* From the Arabian Peninsula. **J Med Entomol**. Nov 9;58(6):2161-2176. doi: 10.1093/jme/tjab112. PMID: 34313761. 2021.

Kraemer, M.U.; Sinka, M.E.; Duda, K.A.; Mylne, A.Q.; Shearer, F.M.; Barker, C.M.; Moore, C.G.; Carvalho, R.G.; Coelho, G.E.; Van Bortel, W.; Hendrickx, G.; Schaffner, F.; Elyazar, I.R.; Teng, H.J.; Brady, O.J.; Messina, J.P.; Pigott, D.M.; Scott, T.W.; Smith, D.L.; Wint, G.R.; Golding, N.; Hay, S.I. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **Elife**. Jun 30;4:e08347. 2015.

Li, Z.; Wang, J.; Cheng, X.; Hu, H.; Guo, C.; Huang, J.; Chen, Z.; Lu, J. The worldwide seroprevalence of DENV, CHIKV and ZIKV infection: A systematic review and meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 15(4): e0009337. 2021.

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. **Gen. Mol. Biol.** 32, 414–422. 2009.

Lopes, T. B. F., Amaro, T. R., Silva, B. P., Zequi, J. A. C., Vilas-Bôas, G. T. V., Silva, M. A. N., Vilas-Boas, B. T., Rosa, R. Genetic study in *Aedes* (*Stegomyia*)

aegypti (Linnaeus, 1762) from Londrina (Paraná State, Brazil): an approach to population structure and pyrethroid resistance. **Rev. Bras de Ent.** 65. 2021.

Lorenz, C. Alves, J.M.P. Foster, P.G. Sallum, M.A.M. Suesdek, L. First record of translocation in Culicidae (Diptera) mitogenomes: evidence from the tribe Sabethini. **BMC Genomics**, 20, 1–8, 2019.

Nascimento, B.L.S. Da Silva, F.S. Nunes-Neto, J.P. De Almeida Medeiros, D.B. Cruz, A.C.R. Da Silva, S.P. Da Silva E Silva, L.H. De Oliveira Monteiro, H.A. Dias, D.D. Vieira, D.B.R. *et al.* First description of the mitogenome and phylogeny of Culicinae species from the Amazon region. **Genes**, **12(12)**, 1983; 2021.

Paduan, K.S., Ribolla, P.E.M. Mitochondrial DNA polymorphism and heteroplasmy in populations of *Aedes aegypti* in Brazil. **J. Med. Entomol.** 45, 59–67. 2008.

Paupy, C.; Le Goff, G.; Brengues, C.; Guerra, M.; Revollo, J.; Barja Simon, Z.; Hervé, J. P.; Fontenille, D. Genetic structure and phylogeography of *Aedes aegypti*, the dengue and yellow-fever mosquito vector in Bolivia. *Infection, Genetics and Evolution*. 12, 1260–1269. 2012.

Pereira, L. P. L. A.; Brito, M. C. A.; Araruna, F. B.; De Andrade, M.S.; Moraes, D. F. C.; Borges, A. C. R.; Do Rêgo Barros Pires Leal, E. R. Molecular studies with *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762), mosquito transmitting the dengue virus. **Parasitology Research**. Aug;116(8):2057-2063. 2017.

Pless, E.; Powell, J. R.; Seger, K. R.; Ellis, B.; Gloria-Soria, A. Evidence for serial founder events during the colonization of North America by the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Ecology and Evolution**, 12, e8896. 2022.

Powell, J.R. Mosquitoes on the move. **Science**, 354, 971-972. 2016.

Powell, J.R., Gloria-Soria, A., Kotsakiozi, P. Recent History of *Aedes aegypti*: Vector Genomics and Epidemiology Records. **Bioscience**. Nov 1;68(11):854-860. Epub 2018 Oct 31. PMID: 30464351; PMCID: PMC6238964. 2018.

Powell, J.R.; Tabachnick, W.J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*-a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 108, 11–17. 2013.

Reiter, P., Amador, M. A., Anderson, R. A., Clark, G. G. Short report: dispersal of *Aedes aegypti* in an urban area after blood feeding as demonstrated by rubidium-marked eggs. **Am J Trop Med Hyg.** Feb;52(2):177-9. PMID: 7872449. 1995.

Santos, J.M.M., Contel, E.P.B., Keer, W.E. Biologia de anofelinos amazônicos. I– Ciclo biológico, postura e estádios de *Anopheles darlingi*, Root, 1926 (Diptera: Culicidae) da Rodovia Manaus/Boa Vista. **Acta Amaz.** 11, 789–797. 1981.

Scarpassa, V.M., Cardoza, T.B., Cardoso, R.P. Population Genetics and Phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 78, 895–903. 2008. doi 10.4269/ajtmh.2008.78.895

Seixas, G.; Patrícia Salgueiro, P.; Silva, A. C.; Campos, M.; Carine Spenassatto, C.; Reyes-Lugo, M.; Novo, M. T.; Ribolla, P. E. M.; Pinto, J. P. S. S.; Sousa, C. A. *Aedes aegypti* on Madeira Island (Portugal): genetic variation of a recently introduced dengue vector. **Mem Inst Osw Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108 (Suppl. I), p. 3-10, 2013.

Shin, S.; Jung, J. Comparative population genetics of the invasive mosquito *Aedes albopictus* and the native mosquito *Aedes flavopictus* in the Korean peninsula, **Parasites Vectors.** 14:377 2021.

Silva, F.S. Cruz, A.C.R. De Almeida Medeiros, D.B. Da Silva, S.P.; Nunes, M.R.T. Martins, L.C. Chiang, J.O. Da Silva Lemos, P. Cunha, G.M. De Araujo, R.F.; *et al.* Mitochondrial genome sequencing and phylogeny of *Haemagogus albomaculatus*, *Haemagogus leucocelaenus*, *Haemagogus spegazzinii*, and *Haemagogus tropicalis* (Diptera: Culicidae). **Sci. Rep.** 10, 1–13, 2020.

Silva, F.S. Do Nascimento, B.L.S. Cruz, A.C.R.; Da Silva, S.P.; Aragão, A. De O. Dias, D.D. Da Silva E Silva, L.H. Reis, L.A.M. Rosa, J.W. Vieira, D.B.R.; *et al.* Sequencing and description of the complete mitochondrial genome of *Limatus durhamii* (Diptera: Culicidae). **Acta Trop.** 239, 1–8, 2023.

Silva, L.H.S. Da Silva, F.S. Medeiros, D.B. De A. Cruz, A.C.R.; Da Silva, S.P. Aragão, A. De O. Dias, D.D. Sena Do Nascimento, B.L. Júnior, J.W.R. Vieira, D.B.R.; *et al.* Description of the mitogenome and phylogeny of *Aedes* spp. (Diptera: Culicidae) from the Amazon region. **Acta Trop.** 232, 2022.

Slonchak A.; Hugo, L. E.; Freney, M.E.; Hall-Mendelin, S.; Amarilla, A. A.; Torres, F. J.; Setoh, Y.X.; Peng, N. Y. G.; Sng, J. D. J.; Hall, R. A.; Van, D. E. N.; Hurk, A. F.; Devine, G. J.; Khromykh, A. A. Zika virus noncoding RNA suppresses apoptosis and is required for virus transmission by mosquitoes. **Nat Commun.** May 5;11(1):2205. 2020.

Sousa, A. A.; Fraga, E.; Sampaio, I.; Schneider, H.; Barros, M. C. Genetic differentiation in populations of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) dengue vector from the Brazilian state of Maranhão. **Rev Bras de Entomol.** 61, p. 51–59. 2017.

Sousa, A.A., Cruz, A.C.R., Silva, F.S., Silva, S.P., Neto, J.P.N., Barros, M.C., Fraga, E.C. Sampaio, I. Sequencing and Analysis of the Mitochondrial Genome of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from the Brazilian Amazon Region. **Insects**, 14, 938. 2023.

Souza-Neto, J. A.; Powell, J.R.; Bonizzoni, M. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. **Infection, Genetics and Evolution.** Jan; 67:191-209. 2019.

Twerdochlib, A. L.; Bona, A. C. D.; Leite, S. S.; Critolina, R. F.; Wetphol, B.; Navarro-Silva, M. A. Genetic variability of a population of *Aedes aegypti* from Paraná, Brazil, using the mitochondrial NADH4 gene. **Rev Bras de Entomol**, v. 56, n. 2, p. 249–256. 2012.

CAPÍTULO 1

Sequencing and Analysis of the Mitochondrial Genome of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from the Brazilian Amazon Region

Sequenciamento e análise do genoma mitocondrial do *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) da Amazônia Brasileira

Artigo publicado no periódico *Insects*

Andrelina Alves de Sousa¹, Ana Cecília Ribeiro Cruz^{2,3}, Fábio Silva da Silva^{2,3}, Sandro Patroca da Silva², Joaquim Pinto Nunes Neto^{2,3}, Maria Claudene Barros⁴, Elmary da Costa Fraga⁴, Iracilda Sampaio⁵.

¹ Post- Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Laboratory of Genetics and Molecular Biology, Federal University of Pará—UFPA, Belém 66075-110, Pará, Brazil;

² Department of Arbovirology and Hemorrhagic Fevers, Evandro Chagas Institute-IEC/SVS/MS, Ananindeua 67030-000, Pará, Brazil;

³ Post-Graduate Program in Parasitary Biology in the Amazon, Center of Biological and Health Sciences, State of Pará University-UEPA, Belém 66095-662, Pará, Brazil;

⁴ Genetics and Molecular Biology Laboratory-GENBIMOL, Caxias Campus, State of Maranhão University - UEMA, Caxias 65604-380, Maranhão, Brazil;

⁵ Evolution Laboratory, Institute of Coastal Studies, Federal University of Pará—UFPA, Bragança, 68600-000, Pará, Brazil.

Autor Correspondente: Iracilda Sampaio, Federal University of Pará—UFPA, Rua Augusto Corrêa, 01- Guamá, Belém 66075-110, Brazil, Telefone: +55 91 980721170, E-mail: ira@ufpa.br

Article

Sequencing and Analysis of the Mitochondrial Genome of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from the Brazilian Amazon Region

Andreolina Alves de Sousa ¹, Ana Cecília Ribeiro Cruz ^{2,3}, Fábio Silva da Silva ^{2,3}, Sandro Patroca da Silva ², Joaquim Pinto Nunes Neto ^{2,3}, Maria Claudene Barros ⁴, Elmary da Costa Fraga ⁴ and Iracilda Sampaio ^{5,*}

- ¹ Post-Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Federal University of Pará, Belém 66075-110, Pará, Brazil; andrelbio@yahoo.com.br
- ² Evandro Chagas Institute (IEC/SVS/MS), Department of Arbovirology and Hemorrhagic Fevers, Ananindeua 67030-000, Pará, Brazil; anacecilia@iec.gov.br (A.C.R.C.); fabiodasilva@iec.gov.br (F.S.d.S.); sandrosilva@iec.gov.br (S.P.d.S.); joaquimneto@iec.gov.br (J.P.N.N.)
- ³ Post-Graduate Program in Parasite Biology in the Amazon, Center of Biological and Health Sciences, Pará State University, Belém 66095-662, Pará, Brazil
- ⁴ Laboratory of Genetics and Molecular Biology (GENBIMOL), Maranhão State University, Caxias 65604-380, Maranhão, Brazil; mbdene@yahoo.com.br (M.C.B.); elmaryfraga@yahoo.com.br (E.d.C.F.)
- ⁵ Laboratory of Evolution, Institute of Coastal Studies, Federal University of Pará, Bragança 68600-000, Pará, Brazil
- * Correspondence: ira@ufpa.br

Simple Summary: Responsible for the transmission of arboviruses, the mosquito *Aedes aegypti* is a major challenge to public health in Brazil, particularly in urban areas located within tropical and subtropical regions. The recent epidemiological bulletins from the Brazilian Health Ministry in the state of Maranhão have reported high levels of urban infestation by this vector, which represents a potential risk for the occurrence of new epidemics. In this context, the present study describes the partial mitochondrial genome of a sample of *Ae. aegypti* from the Brazilian state of Maranhão. Studies of this type provide important insights into the biological evolution of this important species and have the potential to contribute to the development of increasingly effective strategies for the control of this disease vector.



Citation: Sousa, A.A.d.; Cruz, A.C.R.; Silva, F.S.d.; Silva, S.P.d.; Neto, J.P.N.; Barros, M.C.; Fraga, E.d.C.; Sampaio, I. Sequencing and Analysis of the Mitochondrial Genome of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from the Brazilian Amazon Region. *Insects* **2023**, *14*, 938. <https://doi.org/10.3390/insects14120938>

Received: 19 October 2023

Accepted: 3 November 2023

Published: 11 December 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Aedes aegypti* is a mosquito native to the African continent, which is now widespread in the tropical and subtropical regions of the world. In many regions, it represents a major challenge to public health, given its role in the cycle of transmission of important arboviruses, such as Dengue, Zika, and Chikungunya. Considering the epidemiological importance of *Ae. aegypti*, the present study sequenced the partial mitochondrial genome of a sample collected in the municipality of Balsas, in the Brazilian state of Maranhão, followed by High Throughput Sequencing and phylogenetic analyses. The mitochondrial sequence obtained here was 15,863 bp long, and contained 37 functional subunits (thirteen PCGs, twenty-two tRNAs and two rRNAs) in addition to a partial final portion rich in A+T. The data obtained here contribute to the enrichment of our knowledge of the taxonomy and evolutionary biology of this prominent disease vector. These findings represent an important advancement in the understanding of the characteristics of the populations of northeastern Brazil and provide valuable insights into the taxonomy and evolutionary biology of this prominent disease vector.

Keywords: Legal Amazon; Culicidae; mtDNA; phylogeny; population genetics

1. Introduction

Mosquitos (Diptera: Culicidae) have a virtually cosmopolitan distribution, particularly in the world's temperate and tropical regions [1]. While the first mosquito species were

described in the eighteenth century, the link between these insects and the transmission of infectious diseases, such as filariasis and malaria, was only discovered at the end of the nineteenth century. Almost two centuries after the first scientific studies of these organisms, approximately 3600 mosquito species have now been described formally, although many more species are assumed to exist, highlighting the need for extensive revision of the Culicidae and, in particular, studies that provide insights into the evolutionary drivers of the group [1].

In epidemiological terms, *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) is one of the most important mosquito species, not least because of its intimate relationship with human populations, which has allowed it to spread throughout all the world's continents, except Antarctica. The species is often targeted specifically in government campaigns for the control of disease vectors and is often associated with human migrations and unregulated urban development [2]. This mosquito is involved in the transmission cycle of a large number of viruses, including the principal arboviruses that affect human populations [3], that is, *Orthoflavivirus denguei* (DENV serotypes I, II, III and IV), *Orthoflavivirus flavi* (YFV), *Orthoflavivirus zikaense* (ZIKV), and *Chikungunya virus* (CHIKV).

Aedes aegypti has a complex evolutionary history, with studies indicating an initial major dispersal from Africa to the Americas, and, subsequently, to Asia, although there is also evidence of the parallel dispersal of two distinct lineages that originated in eastern and western Africa [4]. The species was almost certainly introduced into the Americas during the Age of Discovery, between the sixteenth and eighteenth centuries, when it expanded rapidly throughout most of tropical South and Central America [5,6].

In recent decades, a number of studies have investigated the genetic variability of *Ae. aegypti* populations, mainly using molecular markers extracted from regions of the nuclear [7,8] and mitochondrial genomes [5,9–12]. These studies have revealed significant differences among populations, which have led to the hypothesis that two principal *Ae. aegypti* lineages are found in Brazil, and worldwide. In this context, the mitochondrial (mtDNA) genome is an important tool for evolutionary studies, given its uniparental inheritance, lack of recombination and high mutation rates, in comparison with the nuclear genome [13–16]. Mitochondrial markers are especially useful for the study of vectors of medical and epidemiological importance [17–25].

The state of Maranhão is located in the northeast region of Brazil, and coincides with the transition zone between the Amazon, Cerrado and Caatinga biomes. Recent epidemiological bulletins of the Brazilian Health Ministry, Maranhão have revealed high levels of urban infestation by *Ae. aegypti*, which represents a potential risk for public health. Given the epidemiological importance of this vector and its high population densities in the state, it is necessary to understand the genetic variability of *Ae. aegypti* and its population structure, in order to support the development of effective strategies of population control, adapted to the characteristics of the populations found in northeastern Brazil.

Given the global epidemiological importance of this species, the present study provides the first description of the mitochondrial genome of a representative sample of *Ae. aegypti* population from the state of Maranhão, in northeastern Brazil, using High Throughput Sequencing for the first time.

2. Materials and Methods

2.1. Collection of the Biological Samples and the Extraction of the Total DNA

The biological samples of *Ae. aegypti* analysed in the present study were collected during expeditions to the municipality of Balsas, in the state of Maranhão (−7.53'29.17" S, −46.03'74.56" W), in the mid-north region of Brazil (Figure 1). This region is a subdivision of the Brazilian Northeast, which coincides with the transition zone between the Amazon and Cerrado biomes, and also includes the western half of the state of Piauí [26]. The samples were collected using 30 ovitraps, which were distributed in different neighbourhoods of the municipality at intervals of at least 1 km. The traps were set in shady and poorly lit areas protected from the rain in the vicinity of residential infrastructure. The sites were

selected previously during the rapid index surveys of *Ae. aegypti* (LIRAA) conducted in the municipality. The traps were retrieved after six days and transported to the Genetics and Molecular Biology Laboratory at the Caxias campus of Maranhão State University (UEMA).

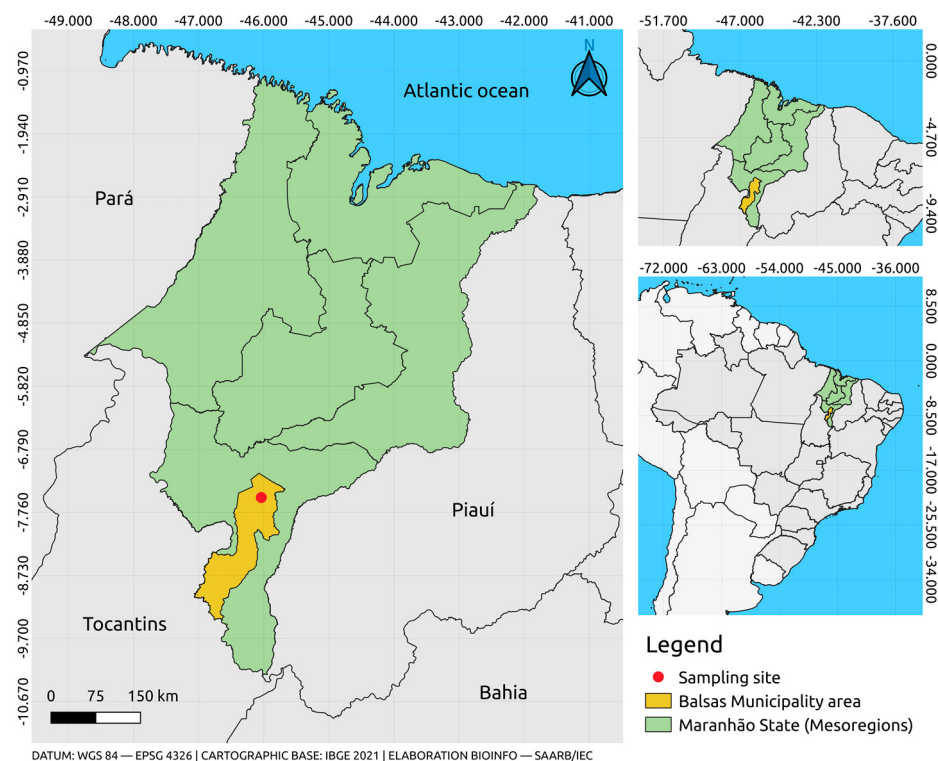


Figure 1. Location of the municipality of Balsas, in Maranhão state, showing the site from which the biological samples were collected.

The ovitraps contained small (12 cm × 2.8 cm) palettes on which the mosquitos laid their eggs during the trapping period. In the laboratory, the palettes were immersed in water to allow for the eclosion of the larvae, which were then kept in artificial nurseries until the emergence of the adults, which were identified using stereoscopic loupes and the dichotomous classification key, developed by Consoli and Lourenço-de-Oliveira [27], which is based on specific features of the external morphology of the adult specimens. Adults of the study species (*Ae. aegypti*) were transferred to entomological cages designed for breeding, where they were maintained with a 10% saccharose solution.

After two feeding cycles, a total of 20 females were isolated to lay eggs, which were isolated in individual artificial incubators until the eclosion of the larvae, which were fed until the fourth development stage (L4), following the protocol established by Santos et al. [28]. Once the larvae reached stage L4, they were transferred to 1.5 mL Eppendorf micro-tubes containing 70% alcohol as a preserver and stored in a freezer at −80 °C until the extraction of the total DNA.

The total DNA of each sample was extracted using the Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega, Madison, WI, USA), following the manufacturer's recommendations. The products extracted from each sample were quantified using a Qubit 2.0 fluorometer (Invitrogen, Waltham, MA, USA), together with a dsDNA Hs Assay kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA).

2.2. Genomic Sequencing

The genomic sequencing, computer analyses and compilation of the results were all conducted at the Arbovirology and Hemorrhagic Fevers Section of the Evandro Chagas Institute (SAARB-IEC/MS/SVSA) in Ananindeua. The genomic library was compiled from a single sample, which had been quantified previously and standardised to a concentration

of 0.2 ng/μL, and then fragmented and marked with two adapter sequences (i7 and i5) using the Nextera XT DNA Library Preparation kit (Illumina, San Diego, CA, USA) following the manufacturer's protocol. The sample was then quantified using a Qubit 2.0 fluorometer (Invitrogen) and the fragment size was evaluated using a High Sensitivity DNA analysis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) in a BioAnalyzer (Agilent Technologies). The final product was used for genomic sequencing using a NextSeq 500/550 High Output kit (Illumina) for 300 cycles (2 × 150) on a NextSeq 500 System platform.

2.3. Data Processing and Description of the Genome

The raw reads were initially evaluated qualitatively using Fastp v. 0.23.2 [29], configured to remove the adapter sequences, reads with a PHRED quality score of less than 20, and reads of less than 50 nt in length. To better isolate the reads that correspond to those of the study species, the data were mapped against a reference genome (*Aedes aegypti* L5.0, mtDNA GenBank ID: NC_035159) using a combination of Bowtie2 v.2.5.1 [30] and Samtools v.1.17 [31]. The filtered data were then used to mount the genome using the De Novo method. The contig was assembled using the MEGAHIT v.1.2.9 software [32], with the default mounting configurations (in k-mer lengths of 21, 29, 39, 59, 79, 99, 119 and 141 nt). The mitochondrial contigs obtained here were identified using the DIAMOND v.2.1.6.160 [33] in BlastX alignment mode, considering an e-value of 10^{-5} , and inspected manually in Geneious v.11.1.5 [34].

The final mitochondrial sequence was annotated using the online MITOchondrial genome annotation Server tool (MITOS) [35] and fitted to a circular configuration, based on the identification of overlaps using Blastn v.2.14.0 [36], and was also used as a reference for the remapping of the mitochondrial reads in Bowtie2, to obtain their coverage metrics. The linear structure of the sequence was determined using CGview [37], and its composition and nucleotide parameters and the relative synonymous codon usage (RSCU) were obtained using MEGA X v.10.2.6 [38] and Geneious v.11.1.5 [34], respectively. Skews in the nucleotide composition were calculated using the formulas $AT\text{-skew} = (A - T)/(A + T)$ and $GC\text{-skew} = (G - C)/(G + C)$ [39]. To evaluate the selection pressure affecting the PCGs of the study species of the tribe Aedini, the ratios of non-synonymous (dN) to synonymous (dS) substitutions were calculated in CodeML, available in the PAML package [40]. All the graphs presented here were produced using the R software v.4.2.3 (available at: <https://www.r-project.org> accessed on 23 June 2023), together with the *ggplot2*, *reshape2* and *pheatmap* packages.

2.4. Phylogenetic Analysis

The phylogeny of the mosquitoes was reconstructed based on all 13 protein coding regions of the *Ae. aegypti* sequence obtained here, together with those of the other 28 mtDNAs available in the public databases (Supplementary Table S1). The regions corresponding to each PCG of the target sequences were extracted in parts, aligned using MAFFT v.7.520 [41], inspected manually in Aliview v.1.28 [42], and concatenated using Seqkit v.2.4.0 [43]. The nucleotide distances between the study taxa were obtained using MEGA X (based on the maximum likelihood composition model). The phylogeny was reconstructed using the maximum likelihood method, with the prior definition of the best nucleotide substitution model (GTR+F+I+G4) based on the Akaike information criterion (AIC), using the IQ-TREE v.1.6.12 software [44], with the bootstrapping (BPP) set to 1000 repetitions. The topology obtained from these analyses was visualized in FigTree v.1.4.4 (available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree> accessed on 26 June 2023) and edited with Inkscape v.0.92 (available at: <https://inkscape.org/pt-br> accessed on 30 June 2023).

3. Results

The genomic sequencing generated a total of 75.5 million reads, with 94% approval, following the quality control, and after the exclusion of the adapters and the bases with

PHRED quality scores of less than 20. A contig of 15,863 bp was also obtained (Figure 2A,B) with a mean coverage depth of $217.4\times$, which corresponds to 28,539 of the total number of reads generated, being composed with 37 functional subunits (13 PCGs, 22 tRNAs and 2 rRNAs) with a partial portion of the control region rich in adenine and thymine (A+T) (Supplementary Table S2).

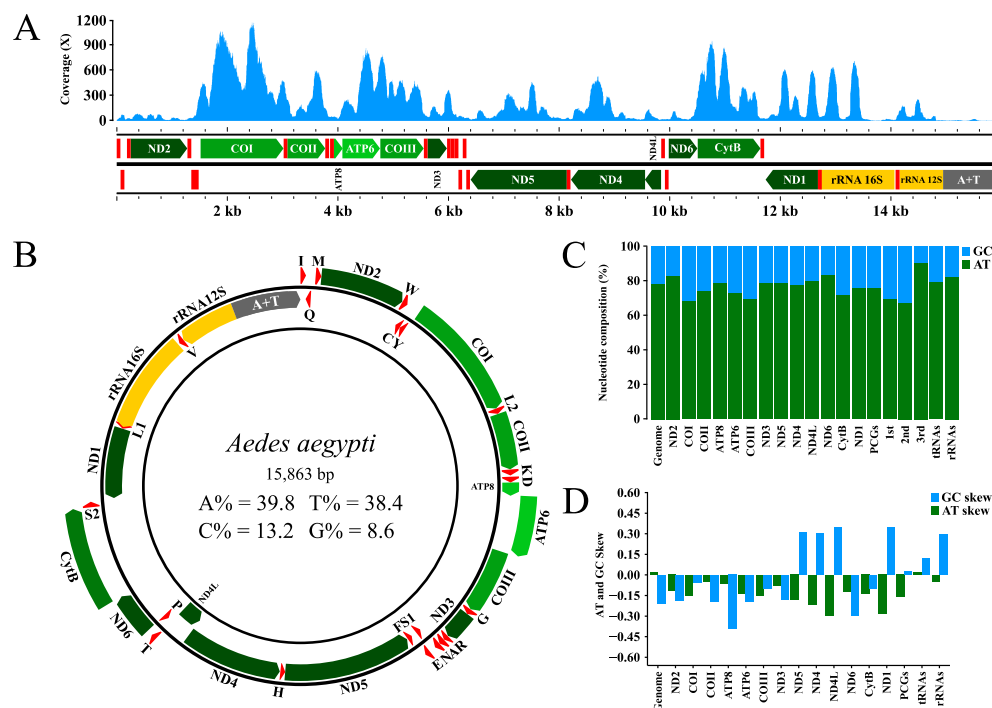


Figure 2. (A) Genomic coverage and structural organisation of the sequence obtained in the present study, showing the 37 functional subunits (13 PCGs, 22 tRNAs and 2 rRNAs), and the partial portion control region rich in adenine and thymine (A+T), (B) circular configuration of the genome, (C) AT% and GC% nucleotide composition and (D) AT/GC skews.

The overall AT content of the sequence obtained here is 78.2% (Figure 2C), with a generally positive AT skew (which indicates a greater adenine content in comparison with thymine) and a negative GC skew (indicating a relatively greater cytosine content versus guanine) (Supplementary Table S2), although with inversions, depending on the different arrangements of the subunits and regions evaluated (Figure 2D). An additional 22 small intergenic regions were also identified between the annotated subunits, ranging in length from 1 to 45 bp.

A typical secondary structure of the cloverleaf type was observed in 21 of the 22 tRNA subunits annotated here, which had lengths varying from 64 bp (tRNA^{Arg}) to 72 bp (tRNA^{Val}) with a mean AT content of 77.9% (Supplementary Table S2). This structure has four arms (amino acid acceptor (AA), dihydrouridine (DHU), TΨC and anticodon acceptor (AC)) and four loops (AA, DHU, TΨC and Variable (V)). The only variation was observed in the tRNA^{Ser1} subunit, in which the dihydrouridine (DHU) arm has been substituted by a DHU loop (Supplementary Figure S1).

The 13 PCGs annotated from the sequence obtained here vary in length from 159 (ATP8) to 1740 bp (ND5), with an AT content ranging from 72.5% (ND2) to 83.6% (CytB). The most frequent start codons were of two types (ATG and ATT), with complete stop codons of the TAA types. Excluding stop codons, a total of 3719 amino acid triplets were recorded, with a significant AT skew in the third position of the amino acids expressed in the codifying regions of the sequence. The relative synonymous codon usage (RSCU) indicates that only the triplet AGG (tRNA^{Ser1}) was not present in the PCGs, and that a majority of the codons terminating with adenine or uracil (thymine) were expressed signifi-

cantly ($RSCU > 1$) more often than those terminating with cytosine or guanine. Overall, the amino acid expressed most frequently in the sequence was UUA ($tRNA^{Leu1}$), with 484 occurrences ($RSCU = 4.93$), while the least expressed was ACG ($tRNA^{Tyr}$), with only a single occurrence, with $RSCU = 0.02$ (Figure 3A).

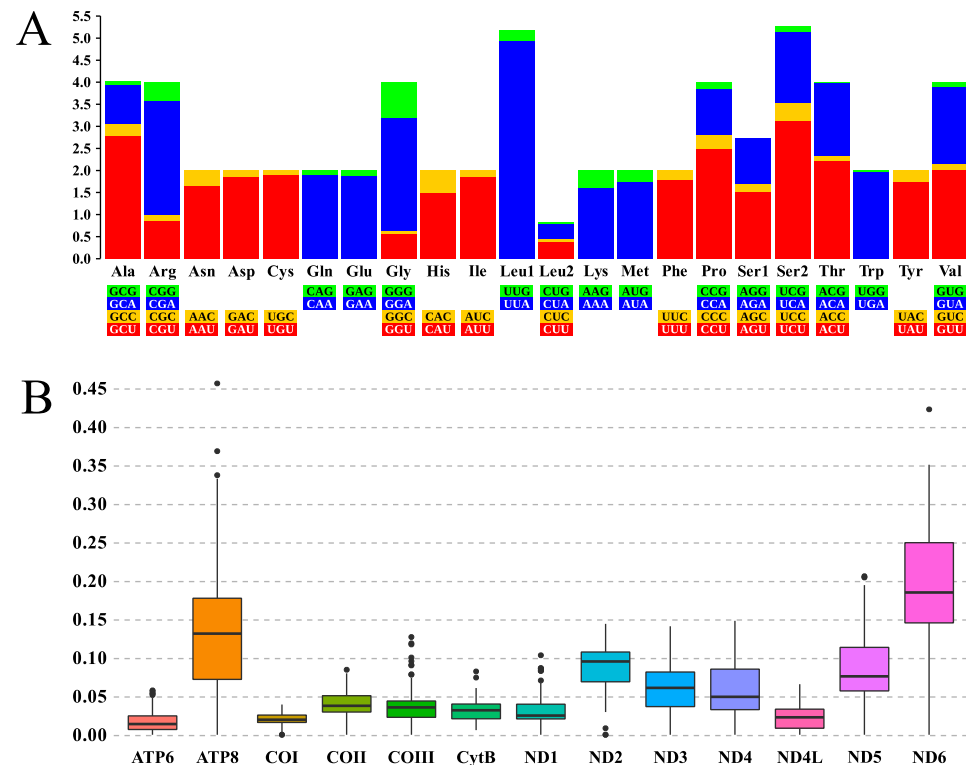


Figure 3. (A) Relative synonymous codon usage (RSCU) of the mtDNA of *Ae. aegypti*. The RSCU values are shown on the y axis, while the families of synonymous codons and their respective codifying triplets are shown on the x axis. (B) Boxplot of the mean evolutionary pressure that affects the PCGs identified in the present study, based on the ratio of non-synonymous (dN) to synonymous (dS) substitutions (dN/dS) recorded in the set of taxa closed related to the genus *Aedes*, including the sequence obtained here. The dN/dS ratios are shown on the y axis, and the PCGs, on the x axis.

The evaluation of the parameters of the evolutionary pressures that influence the PCGs was based on the ratio of non-synonymous to synonymous substitutions (dN/dS) and the comparison of the sequence obtained here with those of other taxa related closely to the genus *Aedes*. This analysis indicated that the different codifying regions have evolved globally under the influence of purifying pressure ($dN/dS > 1$), with mean ratios ranging from 0.001 ± 0.0586 in *ATP6* to 0.001 ± 0.4573 in *ATP8* (Figure 3B).

The sequence obtained in the present study was most similar to those of other *Ae. aegypti* specimens, in particular, sequences with the Genbank IDs MK575476 and NC_035159, with the latter used as a reference for mapping and annotating the DNA structure of the sample analysed here. Based on the analysis of nucleotide distances, the mean pairwise distance recorded among the 29 taxa used to reconstruct the phylogeny, including the sequence obtained here, was 0.09, with values ranging from 0.0005 to 0.1874 (Supplementary Table S3). In accordance with the results of the distance matrix, the phylogeny reconstructed by the maximum likelihood method identified a well-structured monophyletic group with two principal clades, which include representatives of the sub-families Anophelinae and Culicinae (tribe Aedini), rooted externally by *Dixella aestivalis* (Figure 4). The Culicinae clade is formed four principal sub-clades (*Haemagogus*, *Ochlerotatus*, *Stegomyia* and *Psorophora*), with BPP = 100%, highlighting the taxa most closely related

to genus *Aedes* (mean distance of 0.1). The sequence obtained here aligned with the other *Ae. aegypti* (BPP = 100%), as part of the sub-clade of the subgenus *Stegomyia*.

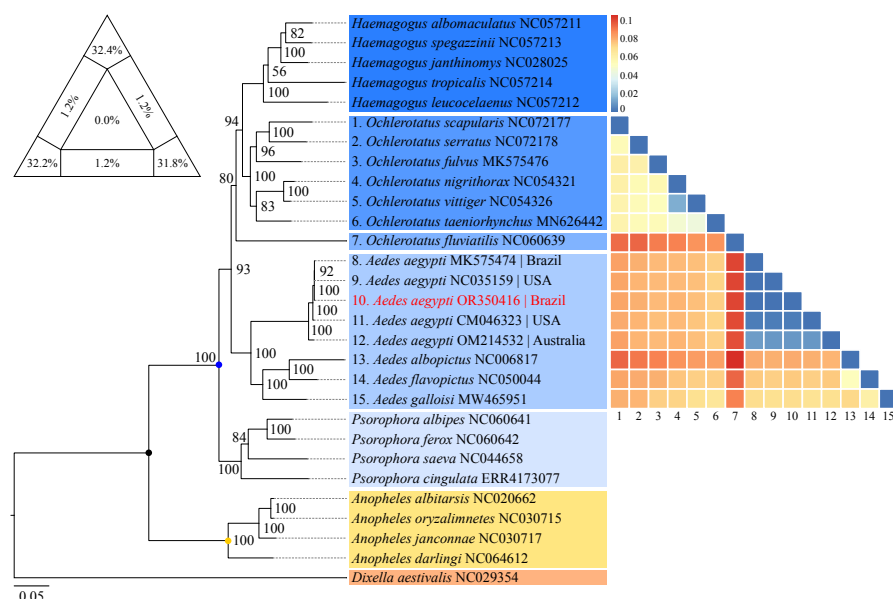


Figure 4. Reconstruction of the phylogeny using the maximum likelihood method of the mosquitoes analysed in the present study, based on the 13 concatenated PCGs of the *Ae. aegypti* obtained in this study and 28 other taxa available in public databases. Support values (BPP) are shown at each node. The coloured dots indicate the taxonomic groups formed in the analysis (the black dot indicates the clade of the Culicidae family; the yellow dot indicates the common ancestor of the Anophelinae subfamily; and the blue circle indicates the common ancestor of the Aedini tribe). The heat map on the right demonstrates the nucleotide distances, based on the maximum composite likelihood method, between taxa related to the genus *Aedes*, where the distances are color coded, ranging from most similar (blue) to most divergent (red). The triangle of values in the upper left corner presents a percentage representation of the quality of the phylogenetic signal for reconstructing the topology based on the set of sequences used. The sum of the sides (96.4%) indicates the percentage of high reliability topologies generated during the analysis.

4. Discussion

Ae. aegypti is now well established as one of the world's primary vectors of arboviruses, a role favoured by its highly synanthropic behaviour, its desiccation-resistant eggs and its ecological adaptability, which confers a degree of resistance to pesticides, and hamper the implementation of effective control measures [45–47]. These traits also contribute to the dispersal capacity of the species and its current worldwide distribution [48,49]. In the 1950s, the implementation of radical measures to control the species in Brazil and other South American countries led to its apparent eradication from the region until its reintroduction in 1970. Since this time, *Ae. aegypti* has become the disease vector with the greatest impact in the region for the transmission of the infectious agents responsible for diseases such as Dengue, Zika and Chikungunya, with thousands of cases being recorded annually, particularly in urban environments [50]. It is in these urban environments that the investigation of the genetic structure of the vector populations can contribute most to the development of the most effective strategies of control. These data not only contribute to the understanding of the adaptive capacity of the vector to different environments, in particular anthropogenic habitats, but also improve the scientific comprehension of the molecular interactions at the pathogen–host level [46,50,51].

The use of molecular markers in studies of the evolutionary biology of mosquitoes, in particular those derived from genomic regions such as the mitochondrial (mtDNA) and nuclear DNA (nDNA), have provided important insights into the evolutionary biology of these insects, as well as the genetic diversity of their populations, in particular in Brazil [46].

In this context, a series of previous studies have concluded that the *Ae. aegypti* populations of Brazil encompass two principal genetic groups, separated approximately by the transition zone at the limit of the Amazon forest [52–56]. The previous studies on populations from Maranhão, in particular, found high levels of intra-population differentiation, which were consistent with the coexistence of two *Ae. aegypti* genetic lineages in this state, which coincides with the ecological transition to the Amazon forest [8,11,57].

The present study describes the complete mitochondrial sequence of an *Ae. aegypti* specimen sampled from one of the populations found in the municipality of Balsas, in the Brazilian state of Maranhão. The sequence obtained is subdivided into 37 functional subunits, in addition to a partial portion of the control region rich in adenine and thymine (A+T), with the characteristic arrangement and disposition of the genes along the two strands of transcription, as observed in all the previous description of the mitochondrial genomes of mosquitoes, in particular, those of the tribe Aedini [20,22–24,58]. The nucleotide sequence obtained here share a high level of identity with a reference genome (GenBank ID: NC_035159), which was obtained in a study that also described the three chromosomes of the species [58].

In comparison with the reference genome, the sequence obtained in the present study had a general AT content higher than that of GC, with a positive global skew in AT and negative skew in GC, which is consistent with the larger proportions of adenine and cytosine found throughout the principal sequence. Despite these major similarities, the most obvious difference is the relative lack of polymorphisms, which are most concentrated between the *ND5* and *ND6* regions, in addition to a lack of coverage for the central part of the final portion of the sequence obtained here, which is rich in A+T. In metazoans, this region is associated with the replicative processes of the mtDNA, in particular, a large number of homopolymeric repetitions, considering the presence of significant variations in the length of this region due to the high nucleotide substitution and insertion/deletion rates, which result in clear differences in its length in the different culicid species [14,59,60]. However, in some of the studies that have described mitochondrial sequences by High Throughput Sequencing, certain difficulties arose in the sequencing of this region, possibly related to the problems associated with the recovery of the homopolymeric portions. Given this, the use of selective amplification methods for this region, such as conventional PCR and Sanger sequencing, have been considered to be a potentially valuable alternative, with satisfactory results in some similar studies [61–64].

The *Ae. aegypti* sequence obtained in the present study contained all 22 tRNAs predicted for the mtDNA, as observed in both other mosquitoes and other organisms, as well as their typical secondary structures, including the substitution of the dihydrouridine (DHU) arm by a DHU loop in tRNA^{Ser1} gene. With the exception of the 920 bp final portion, in fact, the sequence obtained here includes only 204 non-coding base pairs, divided among the 22 small intergenic regions, of which the largest was 45 bp, and was located between the tRNA^{Gln} and tRNA^{Met} genes, highlighting their compact structure. This has also been observed in other genomes of other mosquitoes, including a degree of overlap between some open read frames (ORFs), in particular those associated with regions involved in the codification of proteins, where, with the exception of only the *ND1* and *ND5* subunits, the start codons are all ATN, while all the stop codons are TAA, in addition to a high AT content in the third codon position in the expressed amino acid triplets. The considerable increase in the AT content at this position may be related to a less intense level of purifying selection against deleterious mutations in these regions [19,65].

In the specific case of the type of selection pressure affecting the PCGs of the sequence obtained in the present study, there was a clear global tendency for the purifying selection ($dN/dS < 1$), which was reflected in the much higher rates of synonymous substitutions, in comparison with non-synonymous substitutions, within the regions analysed. As observed in other studies, in addition, including those of the genus *Aedes* [22,24,65], the purifying selection was more intense in mitochondrial complexes III (cytochrome b) and IV (cytochrome oxidase c), in contrast with complex I (NADH) and the *ATP8* subunit,

in particular. While the mean dN/dS ratio recorded in the present study, considering all the taxa analysed, was relatively low in *ATP6*, the *COI* subunit presented the lowest proportions recorded in the present study, which reinforces the widespread use of this subunit as a molecular marker for the determination of phylogenetic relationships at a given taxonomic level [65–67], given its high rates of synonymous mutation in comparison with the regions of complexes I and V (in particular *ATP8*). While the dN/dS ratio of these regions is still below one, they have less conservative evolutionary restrictions.

Based on the whole concatenated sequence used for the phylogenetic reconstruction, the representatives of the tribe Aedini formed a well-structured monophyletic group that included five sub-clades, of which, two correspond to the genera *Haemagogus* and *Psorophora*, while the other three contain taxa closely related to the genus *Aedes*. It is important to note here that both the arrangement of the taxa and the classification of some of the *Aedes* subgenera have been the subject of intense revision and constant debate, particularly in relation to certain features of the external morphology. In this context, taxa previously considered to be subgenera of *Aedes*, such as *Ochlerotatus* and *Stegomyia*, have been treated as independent groups within the tribe Aedini by some authors, based on the polyphyletic relationships found by studies such as those of Reinert [68] and Reinert et al. [69,70]. However, these reclassifications are not supported universally, given that other studies [71] have not found sufficient support for the independence of the lineages.

The sequence obtained here was most similar to those of the other *Ae. aegypti*, with the clear formation of a sub-clade in *Stegomyia*. The relationships observed here among the *Aedes* sub-clades, considering *Ochlerotatus* and *Stegomyia*, together with *Oc. fluviatilis* (which was classified here as *Georgecraigius fluviatilis* in accordance with the proposal of Reinert [68]), are consistent with the polyphyletic arrangement proposed by this author based on morphological features. These findings also align with those of other studies based on the application of molecular markers to the taxonomy of the tribe Aedini [23,24,72,73].

Three thousand cases of Dengue were recorded in the state of Maranhão in the first half of 2023 alone, with an increase of 30% in the number of probable cases in comparison with the same period of the previous year [74]. This preoccupying trend may be related in particular to the intrinsic deficiencies of the measures adopted for the control and eradication of the populations of *Ae. aegypti*, the principal vector found in urban environments. In this context, it will be necessary for local research groups to evaluate the presence of different lineages of the species, associating this information with the mechanisms of dispersal of the mosquito and the spatial distribution of the outbreaks of Dengue in the state. The first genomic studies in the state of Maranhão focused on the use of mitochondrial (especially *ND4*) and nuclear (microsatellites) molecular markers to describe the genetic structuring of local populations [8,11,12]. Until recently, however, *High Throughput Sequencing* had not been used to determine these genomic features. In this case, through the definition of the complete mitochondrial sequence of *Ae. aegypti*, the present study intended to contribute to the understanding of the evolutionary dynamics of the species, as well as providing resources for its more reliable taxonomic identification, based on molecular features. These advances represent valuable insights for the establishment of guidelines for the development of innovative strategies for the control of this important disease vector.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/insects14120938/s1>, Figure S1—Secondary structures of tRNAs and rRNAs of *Aedes aegypti* OR350416; Table S1—Taxa used in the evolutionary analyses; Table S2—*Aedes aegypti* OR350416 nucleotide composition metrics; Table S3—Nucleotide distances by maximum likelihood composition.

Author Contributions: Conceptualisation, A.A.d.S., F.S.d.S. and A.C.R.C.; methods, A.A.d.S., F.S.d.S. and S.P.d.S.; validation, F.S.d.S., S.P.d.S. and A.C.R.C.; formal analysis, A.A.d.S., F.S.d.S. and S.P.d.S.; investigation, A.A.d.S. and F.S.d.S.; data curation, F.S.d.S. and S.P.d.S.; writing—original draft, A.A.d.S. and F.S.d.S.; writing—review and editing, A.A.d.S., F.S.d.S., S.P.d.S., M.C.B., J.P.N.N., E.d.C.F.,

A.C.R.C. and I.S.; visualisation, F.S.d.S., S.P.d.S. and A.C.R.C.; resources, J.P.N.N., A.C.R.C. and I.S.; supervision, M.C.B., E.d.C.F., A.C.R.C. and I.S.; project administration, M.C.B., E.d.C.F., A.C.R.C. and I.S.; funding acquisition, M.C.B., E.d.C.F., A.C.R.C. and I.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the National Programme for Academic Cooperation in Amazonia (public notice number 21/2018 PROCAD/AMAZONIA), process number 23038.005350/2018-78 and benefited from funding provided by the Brazilian Coordination for Higher Education Personnel Training (CAPES), grant number 88887.761304/2022-00, and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), grant numbers 314522/2021-2 to A.C.R.C. and 309916/2021-6 to I.S. This study was supported by the Maranhão State Foundation for Research and Scientific and Technological Development (FAPEMA: public notice number: 002/2019–Universal) through the acquisition of laboratory infrastructure. Publication of the manuscript was financed by PROPESP/UFGA (PAPQ).

Data Availability Statement: All the data obtained during this study are available in the tables and figures included in the text, and in the Supplementary Material. The mitochondrial sequence obtained here was deposited in the GenBank database under accession code OR350416.

Acknowledgments: Brazilian Coordination for Higher Education Personnel Training (CAPES) for providing a doctoral scholarship, process number 88887.639719/2021-00.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Harbach, R. The Culicidae (Diptera): A Review of Taxonomy, Classification and Phylogeny. *Zootaxa* **2007**, *1668*, 591–638. [\[CrossRef\]](#)
2. Escobar, D.; Ortiz, B.; Urrutia, O.; Fontecha, G. Genetic Diversity among Four Populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Honduras as Revealed by Mitochondrial DNA Cytochrome Oxidase I. *Pathogens* **2022**, *11*, 620. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Espinal, M.A.; Andrus, J.K.; Jauregui, B.; Waterman, S.H.; Morens, D.M.; Santos, J.I.; Horstick, O.; Francis, L.A.; Olson, D. Emerging and Reemerging *Aedes*-Transmitted Arbovirus Infections in the Region of the Americas: Implications for Health Policy. *Am. J. Public Health* **2019**, *109*, 387–392. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Joyce, A.L.; Torres, M.M.; Torres, R.; Moreno, M. Genetic Variability of the *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Mosquito in El Salvador, Vector of Dengue, Yellow Fever, Chikungunya and Zika. *Parasites Vectors* **2018**, *11*, 637. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Paupy, C.; Le Goff, G.; Brengues, C.; Guerra, M.; Revollo, J.; Barja Simon, Z.; Hervé, J.P.; Fontenille, D. Genetic Structure and Phylogeography of *Aedes aegypti*, the Dengue and Yellow-Fever Mosquito Vector in Bolivia. *Infect. Genet. Evol.* **2012**, *12*, 1260–1269. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Pless, E.; Powell, J.R.; Seger, K.R.; Ellis, B.; Gloria-Soria, A. Evidence for Serial Founder Events during the Colonization of North America by the Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. *Ecol. Evol.* **2022**, *12*, e8896. [\[CrossRef\]](#)
7. Maitra, A.; Cunha-Machado, A.S.; de Souza Leandro, A.; da Costa, F.M.; Scarpassa, V.M. Exploring Deeper Genetic Structures: *Aedes aegypti* in Brazil. *Acta Trop.* **2019**, *195*, 68–77. [\[CrossRef\]](#)
8. Rodrigues, L.F.; de Sousa, A.A.; Mendes Júnior, W.P.; Cardoso e Silva, A.C.; do Nascimento, M.H.S.; Barros, M.C.; Sampaio, I.; Fraga, E. da C. Genetic Differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Areas with High Rates of Infestation in Mid-North Region of Brazil. *Insects* **2023**, *14*, 530. [\[CrossRef\]](#)
9. Abuelmaali, S.A.; Jamaluddin, J.A.F.; Noaman, K.; Allam, M.; Abushama, H.M.; Elnaïem, D.E.; Ishak, I.H.; Wajidi, M.F.F.; Jaal, Z.; Kassim, N.F.A. Distribution and Genetic Diversity of *Aedes aegypti* Subspecies across the Sahelian Belt in Sudan. *Pathogens* **2021**, *10*, 78. [\[CrossRef\]](#)
10. Eskildsen, G.A.; Rovira, J.R.; Smith, O.; Miller, M.J.; Bennett, K.L.; McMillan, W.O.; Loaiza, J. Maternal Invasion History of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* into the Isthmus of Panama: Implications for the Control of Emergent Viral Disease Agents. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0194874. [\[CrossRef\]](#)
11. Fraga, E.C.; Oliveira, D.R.S.; Aragão, D.G.; Sampaio, H.S.; Barros, M.C. Genetic Variability and Evidence of Two Distinct Lineages of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) on São Luís Island in Maranhão, Brazil. *Open Trop. Med. J.* **2013**, *6*, 11–18. [\[CrossRef\]](#)
12. Sousa, A.A.; Fraga, E.; Sampaio, I.; Schneider, H.; Barros, M.C. Genetic Differentiation in Populations of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) Dengue Vector from the Brazilian State of Maranhão. *Rev. Bras. Entomol.* **2017**, *61*, 51–59. [\[CrossRef\]](#)
13. Avise, J.C. Phylogeography: Retrospect and Prospect. *J. Biogeogr.* **2009**, *36*, 3–15. [\[CrossRef\]](#)
14. Boore, J.L. Animal Mitochondrial Genomes. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 1767–1780. [\[CrossRef\]](#)
15. Brown, W.M.; George, M.; Wilson, A.C. Rapid Evolution of Animal Mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*, 1967–1971. [\[CrossRef\]](#)
16. Moritz, C.; Dowling, T.; Brown, W. Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **1987**, *18*, 269–292. [\[CrossRef\]](#)

17. de Oliveira Aragão, A.; da Silva, F.S.; Cruz, A.C.; da Silva, S.P.; de Almeida Medeiros, D.B.; Dias, D.D.; do Nascimento, B.L.; Júnior, J.W.; de Oliveira Monteiro, H.A.; Neto, J.P. Description of Mitochondrial Genome and Phylogenetic Considerations of *Sabethes bipartites*, *Sabethes cyaneus*, *Sabethes quasicyaneus*, and *Sabethes tarsopus* (Diptera: Culicidae). *Acta Trop.* **2022**, *232*, 106493. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Demari-Silva, B.; Foster, P.G.; de Oliveira, T.M.P.; Bergo, E.S.; Sanabani, S.S.; Pessôa, R.; Sallum, M.A.M. Mitochondrial Genomes and Comparative Analyses of *Culex camposi*, *Culex coronator*, *Culex usquatus* and *Culex usquatissimus* (Diptera: Culicidae), Members of the Coronator Group. *BMC Genom.* **2015**, *16*, 1. [[CrossRef](#)]
19. Hao, Y.J.; Zou, Y.L.; Ding, Y.R.; Xu, W.Y.; Yan, Z.T.; Li, X.D.; Fu, W.B.; Li, T.J.; Chen, B. Complete Mitochondrial Genomes of *Anopheles stephensi* and *An. dirus* and Comparative Evolutionary Mitochondriomics of 50 Mosquitoes. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 7666. [[CrossRef](#)]
20. Lemos, P.D.; Monteiro, H.A.; Castro, F.C.; Lima, C.P.; Silva, D.E.; Vasconcelos, J.M.; Oliveira, L.F.; Silva, S.P.; Cardoso, J.F.; Vianez Júnior, J.L.; et al. Characterization of Mitochondrial Genome of *Haemagogus Janthinomys* (Diptera: Culicidae). *Mitochondrial DNA Part A* **2017**, *28*, 50–51. [[CrossRef](#)]
21. Lorenz, C.; Alves, J.M.P.; Foster, P.G.; Sallum, M.A.M.; Suesdek, L. First Record of Translocation in Culicidae (Diptera) Mitogenomes: Evidence from the Tribe Sabethini. *BMC Genom.* **2019**, *20*, 721. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. do Nascimento, B.L.; da Silva, F.S.; Nunes-Neto, J.P.; de Almeida Medeiros, D.B.; Cruz, A.C.; da Silva, S.P.; da Silva e Silva, L.H.; de Oliveira Monteiro, H.A.; Dias, D.D.; Vieira, D.B.; et al. First Description of the Mitogenome and Phylogeny of Culicinae Species from the Amazon Region. *Genes* **2021**, *12*, 1983. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. da Silva, F.S.; Cruz, A.C.; de Almeida Medeiros, D.B.; da Silva, S.P.; Nunes, M.R.; Martins, L.C.; Chiang, J.O.; da Silva Lemos, P.; Cunha, G.M.; de Araujo, R.F.; et al. Mitochondrial Genome Sequencing and Phylogeny of *Haemagogus albomaculatus*, *Haemagogus leucocelaenus*, *Haemagogus spegazzinii*, and *Haemagogus tropicalis* (Diptera: Culicidae). *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 16948. [[CrossRef](#)]
24. Silva, L.H.S.; Silva, F.S.; de Medeiros, D.B.A.; Cruz, A.C.R.; Silva, S.P.; de Aragão, A.O.; Dias, D.D.; Nascimento, B.L.S.; Rosa, J.W., Jr.; Vieira, D.B.R.; et al. Description of the Mitogenome and Phylogeny of *Aedes* spp. (Diptera: Culicidae) from the Amazon Region. *Acta Trop.* **2022**, *232*, 106500. [[CrossRef](#)]
25. Silva, F.S.; Nascimento, B.L.S.; Cruz, A.C.R.; Silva, S.P.; de Aragão, A.O.; Dias, D.D.; da Silva, L.H.S.; Reis, L.A.M.; Rosa, J.W.; Vieira, D.B.R.; et al. Sequencing and Description of the Complete Mitochondrial Genome of *Limatus durhamii* (Diptera: Culicidae). *Acta Trop.* **2023**, *239*, 106805. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Rebouças, A. Água Na Região Nordeste: Desperdício e Escassez. *Estud. Avançados* **1997**, *11*, 127–154. [[CrossRef](#)]
27. Consoli, R.A.G.; Oliveira, R. *Principais Mosquitos de Importância Sanitária No Brasil*; Editora Fiocruz: Rio de Janeiro, Brazil, 1994.
28. Santos, J.M.M.; Contel, E.P.B.; Kerr, W.E. Biologia de Anofelinos Amazônicos 1—Ciclo Biológico, Postura e Estádios Larvais De. *Acta Amaz.* **1981**, *11*, 789–797. [[CrossRef](#)]
29. Chen, S.; Zhou, Y.; Chen, Y.; Gu, J. Fastp: An Ultra-Fast All-in-One FASTQ Preprocessor. *Bioinformatics* **2018**, *34*, i884–i890. [[CrossRef](#)]
30. Langmead, B.; Salzberg, S.L. Fast Gapped-Read Alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 357–359. [[CrossRef](#)]
31. Li, H.; Handsaker, B.; Wysoker, A.; Fennell, T.; Ruan, J.; Homer, N.; Marth, G.; Abecasis, G.; Durbin, R. The Sequence Alignment/Map Format and SAMtools. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 2078–2079. [[CrossRef](#)]
32. Li, D.; Liu, C.M.; Luo, R.; Sadakane, K.; Lam, T.W. MEGAHIT: An Ultra-Fast Single-Node Solution for Large and Complex Metagenomics Assembly via Succinct de Bruijn Graph. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 1674–1676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Buchfink, B.; Xie, C.; Huson, D.H. Fast and Sensitive Protein Alignment Using DIAMOND. *Nat. Methods* **2014**, *12*, 59–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kearse, M.; Moir, R.; Wilson, A.; Stones-Havas, S.; Cheung, M.; Sturrock, S.; Buxton, S.; Cooper, A.; Markowitz, S.; Duran, C.; et al. Geneious Basic: An Integrated and Extendable Desktop Software Platform for the Organization and Analysis of Sequence Data. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 1647–1649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Bernt, M.; Donath, A.; Jühling, F.; Externbrink, F.; Florentz, C.; Fritzsch, G.; Pütz, J.; Middendorf, M.; Stadler, P.F. MITOS: Improved de Novo Metazoan Mitochondrial Genome Annotation. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2013**, *69*, 313–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Altschul, S.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410. [[CrossRef](#)]
37. Stothard, P.; Wishart, D.S. Circular Genome Visualization and Exploration Using CGView. *Bioinformatics* **2005**, *21*, 537–539. [[CrossRef](#)]
38. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 1547–1549. [[CrossRef](#)]
39. Perna, N.T.; Kocher, T.D. Patterns of Nucleotide Composition at Fourfold Degenerate Sites of Animal Mitochondrial Genomes. *J. Mol. Evol.* **1995**, *41*, 353–358. [[CrossRef](#)]
40. Yang, Z. User Guide PAML: Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood. *Mol. Biol. Evol.* **2007**, *4*, 1–70.
41. Katoh, K.; Misawa, K.; Kuma, K.I.; Miyata, T. MAFFT: A Novel Method for Rapid Multiple Sequence Alignment Based on Fast Fourier Transform. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 3059–3066. [[CrossRef](#)]
42. Larsson, A. AliView: A Fast and Lightweight Alignment Viewer and Editor for Large Datasets. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 3276–3278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

43. Shen, W.; Le, S.; Li, Y.; Hu, F. SeqKit: A Cross-Platform and Ultrafast Toolkit for FASTA/Q File Manipulation. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0163962. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Nguyen, L.T.; Schmidt, H.A.; Von Haeseler, A.; Minh, B.Q. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **2015**, *32*, 268–274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Soares-da-Silva, J.; Ibiapina, S.S.; Bezerra, J.M.T.; Tadei, W.P.; Pinheiro, V.C.S. Variation in *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera, Culicidae) Infestation in Artificial Containers in Caxias, State of Maranhão, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2012**, *45*, 174–179. [[CrossRef](#)]
46. Kotsakiozi, P.; Gloria-Soria, A.; Caccone, A.; Evans, B.; Schama, R.; Martins, A.J.; Powell, J.R. Tracking the Return of *Aedes aegypti* to Brazil, the Major Vector of the Dengue, Chikungunya and Zika Viruses. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0005653. [[CrossRef](#)]
47. Vargas, L.D.L.; Ferreira, S.M.B.; Souza, M.D.; da Silva, C.A.L.; Shimoya-bittencourt, W. Resistência Das Populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Insecta, Diptera, Culicidae) Aos Inseticidas Utilizados Para o Controle. *Rev. Cienc. Méd. Biol.* **2022**, *21*, 98–116. [[CrossRef](#)]
48. Lima-Camara, T.N. Emerging Arboviruses and Public Health Challenges in Brazil. *Rev. Saude Publica* **2016**, *50*, 36. [[CrossRef](#)]
49. Powell, J.R. Perspective Piece Mosquito-Borne Human Viral Diseases: Why *Aedes aegypti*? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2018**, *98*, 1563–1565. [[CrossRef](#)]
50. Sinclair, J.B.; Asgari, S. Ross River Virus Provokes Differentially Expressed MicroRNA and RNA Interference Responses in *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Viruses* **2020**, *12*, 695. [[CrossRef](#)]
51. Sevenson, D.W.; Behura, S.K. Genome Investigations of Vector Competence in *Aedes aegypti* to Inform Novel Arbovirus Disease Control Approaches. *Insects* **2016**, *7*, 58. [[CrossRef](#)]
52. dos Paduan, K.S.; Araújo, J.P.; Ribolla, P.E.M. Genetic Variability in Geographical Populations of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in Brazil Elucidated by Molecular Markers. *Genet. Mol. Biol.* **2006**, *29*, 391–395. [[CrossRef](#)]
53. Bracco, J.E.; Capurro, M.L.; Lourenço-de-Oliveira, R.; Sallum, M.A.M. Genetic Variability of *Aedes aegypti* in the Americas Using a Mitochondrial Gene: Evidence of Multiple Introductions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2007**, *102*, 572–579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. dos Paduan, K.S.; Ribolla, P.E.M. Mitochondrial DNA Polymorphism and Heteroplasmy in Populations of *Aedes aegypti* in Brazil. *J. Med. Entomol.* **2008**, *45*, 59–67. [[CrossRef](#)]
55. Scarpassa, V.M.; Cardoza, T.B.; Cardoso, R.P. Population Genetics and Phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2008**, *78*, 895–903. [[CrossRef](#)]
56. Monteiro, F.A.; Shama, R.; Martins, A.J.; Gloria-Soria, A.; Brown, J.E.; Powell, J.R. Genetic Diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: Patterns Following an Eradication Program. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e3167. [[CrossRef](#)]
57. Matthews, B.J.; Dudchenko, O.; Kingan, S.B.; Koren, S.; Antoshechkin, I.; Crawford, J.E.; Glassford, W.J.; Herre, M.; Redmond, S.N.; Rose, N.H.; et al. Improved Reference Genome of *Aedes aegypti* Informs Arbovirus Vector Control. *Nature* **2018**, *563*, 501–507. [[CrossRef](#)]
58. Wolstenholme, D.R. Animal Mitochondrial DNA: Structure and Evolution. *Int. Rev. Cytol.* **1992**, *141*, 173–216. [[CrossRef](#)]
59. Zhang, D.X.; Hewitt, G.M. Insect Mitochondrial Control Region: A Review of Its Structure, Evolution and Usefulness in Evolutionary Studies. *Biochem. Syst. Ecol.* **1997**, *25*, 99–120. [[CrossRef](#)]
60. Makhawi, A.M.; Liu, X.B.; Yang, S.R.; Liu, Q.Y. Genetic Variations of ND5 Gene of MtDNA in Populations of Anopheles Sinensis (Diptera: Culicidae) Malaria Vector in China. *Parasites Vectors* **2013**, *6*, 290. [[CrossRef](#)]
61. Wang, G.; Li, C.; Guo, X.; Xing, D.; Dong, Y.; Wang, Z.; Zhang, Y.; Liu, M.; Zheng, Z.; Zhang, H.; et al. Identifying the Main Mosquito Species in China Based on DNA Barcoding. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e047051. [[CrossRef](#)]
62. Xu, J.; Fonseca, D.M. One-Way Sequencing of Multiple Amplicons from Tandem Repetitive Mitochondrial DNA Control Region. *Mitochondrial DNA* **2011**, *22*, 155–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Kambhampati, S.; Smith, P.T. PCR Primers for the Amplification of Four Insect Mitochondrial Gene Fragments. *Insect Mol. Biol.* **1995**, *4*, 233–236. [[CrossRef](#)]
64. Lorenz, C.; Alves, J.M.P.; Foster, P.G.; Suesdek, L.; Sallum, M.A.M. Phylogeny and Temporal Diversification of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) with an Emphasis on the Neotropical Fauna. *Syst. Entomol.* **2021**, *46*, 798–811. [[CrossRef](#)]
65. Hebert, P.D.N.; Cywinska, A.; Ball, S.L.; DeWaard, J.R. Biological Identifications through DNA Barcodes. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2003**, *270*, 313–321. [[CrossRef](#)]
66. Chan, A.; Chiang, L.P.; Hapuarachchi, H.C.; Tan, C.H.; Pang, S.C.; Lee, R.; Lee, K.S.; Ng, L.C.; Lam-Phua, S.G. DNA Barcoding: Complementing Morphological Identification of Mosquito Species in Singapore. *Parasites Vectors* **2014**, *7*, 569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Reinert, J. Comparative Anatomy of the Female Genitalia of Genera and Subgenera in Tribe Aedini (Diptera: Culicidae). Part V. Genus *Aedes* Meigen. *Contrib. Am. Entomol. Inst.* **2000**, *32*, 1–102.
68. Reinert, J. Comparative Anatomy of the Female Genitalia of Generic-Level Taxa in Tribe Aedini (Diptera: Culicidae). Part XV. Genus *Georgecraigius* Reinert, Harbach and Kitching. *Contrib. Am. Entomol. Inst.* **2008**, *35*, 1–10.
69. Reinert, J.F.; Harbach, R.E.; Kitching, I.J. Phylogeny and Classification of Tribe Aedini (Diptera: Culicidae). *Zool. J. Linn. Soc.* **2009**, *157*, 700–794. [[CrossRef](#)]
70. Wilkerson, R.C.; Linton, Y.M.; Fonseca, D.M.; Schultz, T.R.; Price, D.C.; Strickman, D.A. Making Mosquito Taxonomy Useful: A Stable Classification of Tribe Aedini That Balances Utility with Current Knowledge of Evolutionary Relationships. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0133602. [[CrossRef](#)]

71. Ma, X.X.; Wang, F.F.; Wu, T.T.; Li, Y.; Sun, X.J.; Wang, C.R.; Chang, Q.C. First Description of the Mitogenome and Phylogeny: *Aedes Vexans* and *Ochlerotatus Caspius* of the Tribe Aedini (Diptera: Culicidae). *Infect. Genet. Evol.* **2022**, *102*, 105311. [CrossRef]
72. Zadra, N.; Rizzoli, A.; Rota-Stabelli, O. Chronological Incongruences between Mitochondrial and Nuclear Phylogenies of *Aedes* Mosquitoes. *Life* **2021**, *11*, 181. [CrossRef] [PubMed]
73. da Brasil, M.S. Maranhão Registrou Mais de 3,1 Mil Casos Prováveis de Dengue Este Ano. Available online: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias-para-os-estados/maranhao/2023/maio/maranhao-registrou-mais-de-3-1-mil-casos-provaveis-de-dengue-este-ano> (accessed on 26 July 2023).
74. Silva, A.G.; Cunha, I.C.L.; Santos, W.S.; Luz, S.L.B.; Ribolla, P.E.M.; Abad-Franch, F. Gene Flow Networks among American *Aedes aegypti* Populations. *Evol. Appl.* **2012**, *5*, 664–676. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Supplementary Table 1. Taxa used in the evolutionary analyzes.

Specie	Size (bp)	GenBank ID	Country
<i>Aedes aegypti</i>	16.790	NC035159	USA
<i>Aedes aegypti</i>	16.660	OM214532	Australia
<i>Aedes aegypti</i>	15.863	OR350416	Brazil
<i>Aedes albopictus</i>	16.665	NC006817	Taiwan
<i>Aedes flavopictus</i>	16.060	NC050044	-
<i>Aedes galloisi</i>	16.065	MW465951	-
<i>Anopheles albitarsis</i>	15.413	NC020662	-
<i>Anopheles darlingi</i>	15.395	NC064612	-
<i>Anopheles janconnae</i>	15.425	NC030717	-
<i>Anopheles oryzalimnetes</i>	15.422	NC030715	-
<i>Dixella aestivalis</i>	16.465	NC029354	-
<i>Haemagogus albomaculatus</i>	15.097	NC057211	Brazil
<i>Haemagogus janthinomys</i>	15.698	NC028025	Brazil
<i>Haemagogus leucocelaenus</i>	15.056	NC057212	Brazil
<i>Haemagogus spegazzinii</i>	15.081	NC057213	Brazil
<i>Haemagogus tropicalis</i>	14.917	NC057214	Brazil
<i>Ochlerotatus fluviatilis</i>	14.910	NC060639	Brazil
<i>Ochlerotatus fulvus</i>	15.428	MK575476	Brazil
<i>Ochlerotatus nigrithorax</i>	15.943	NC054321	Australia
<i>Ochlerotatus scapularis</i>	14.868	NC072177	Brazil
<i>Ochlerotatus serratus</i>	14.907	NC072178	Brazil
<i>Ochlerotatus taeniorhynchus</i>	15.913	MN626442	-
<i>Ochlerotatus vittiger</i>	16.027	NC054326	Australia
<i>Psorophora albipes</i>	15.137	NC060641	Brazil
<i>Psorophora cingulata</i>	14.969	ERR4173077	Brazil
<i>Psorophora ferox</i>	15.307	NC060642	Brazil
<i>Psorophora saeva</i>	15.049	NC044658	Brazil

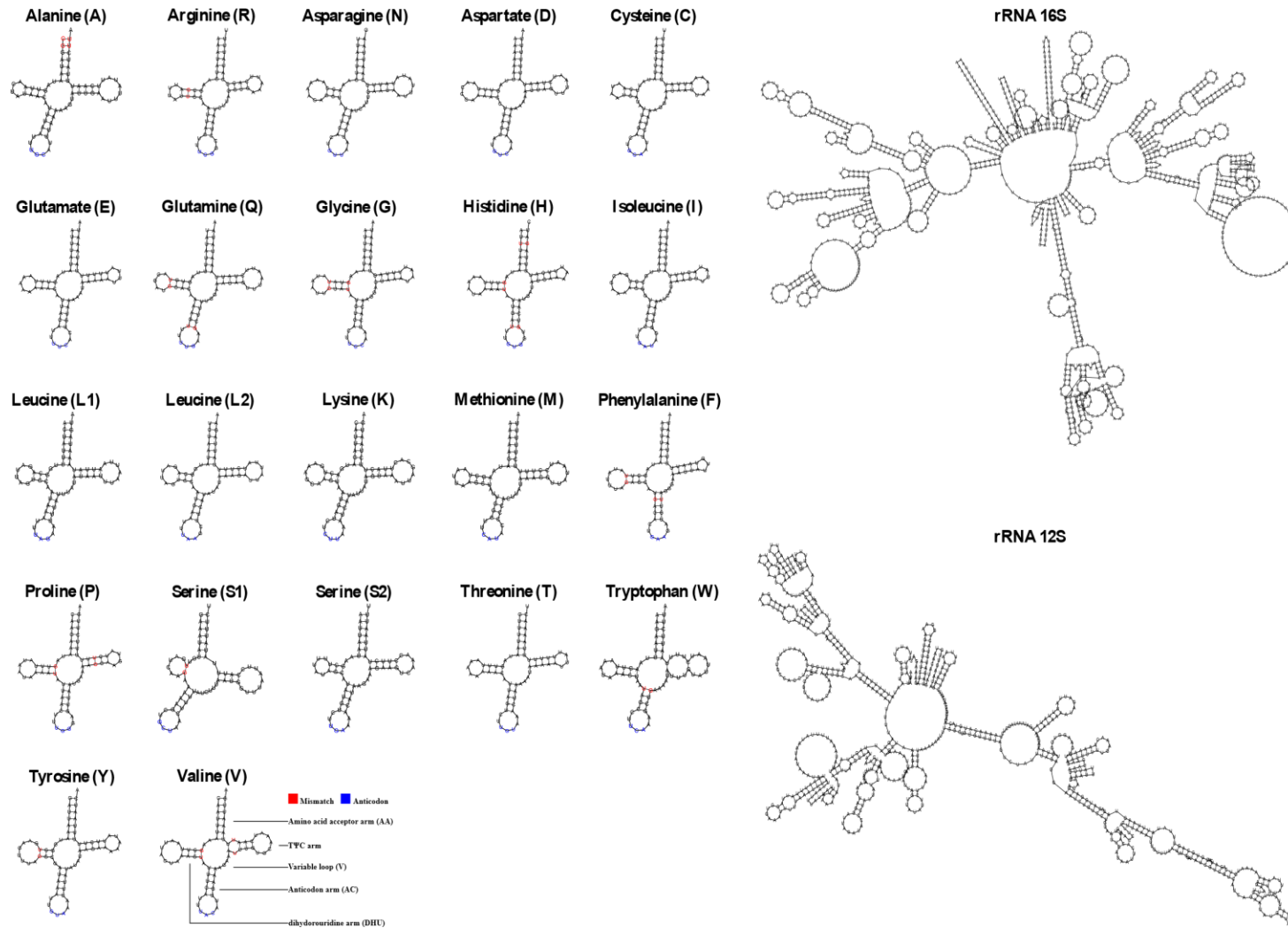
Supplementary Table 2. *Aedes aegypti* OR350416 nucleotide composition metrics.

Gene	Strand	Start	End	Size (nt)	IGN	Anticodon	Start/Stop	T%	C%	A%	G%	AT%	GC%	ATs	GCs
Genome	-	1	15.863	15.863	-	-	-	38,4	13,2	39,8	8,6	78,2	21,8	0,0179	-0,2110
Ile	forward	1	67	67	0	GAU	-	34,3	11,9	35,8	17,9	70,1	29,9	0,0213	0,2000
Gln	reverse	70	138	69	2	UUG	-	42,0	7,2	36,2	14,5	78,3	21,7	-0,0741	0,3333
Met	forward	184	252	69	45	CAU	-	37,7	15,9	34,8	11,6	72,5	27,5	-0,0400	-0,1579
ND2	forward	253	1.275	1.023	0	-	ATT/TAA	46,2	10,2	36,7	6,9	82,9	17,1	-0,1156	-0,1886
Trp	forward	1.280	1.348	69	4	UCA	-	39,1	10,1	42,0	8,7	81,2	18,8	0,0357	-0,0769
Cys	reverse	1.348	1.414	67	-1	GCA	-	37,3	7,5	46,3	9,0	83,6	16,4	0,1071	0,0909
Tyr	reverse	1.415	1.482	68	0	GUA	-	38,2	5,9	41,2	14,7	79,4	20,6	0,0370	0,4286
COI	forward	1.517	3.016	1.500	34	-	ATT/TAA	39,5	16,5	29,1	14,9	68,6	31,4	-0,1506	-0,0531
Leu2	forward	3.018	3.084	67	1	UAA	-	40,3	9,0	37,3	13,4	77,6	22,4	-0,0385	0,2000
COII	forward	3.086	3.769	684	1	-	ATG/TAA	38,9	15,4	35,4	10,4	74,3	25,7	-0,0472	-0,1932
Lys	forward	3.771	3.841	71	1	CUU	-	33,8	14,1	39,4	12,7	73,2	26,8	0,0769	-0,0526
Asp	forward	3.858	3.926	69	16	GUC	-	36,2	11,6	46,4	5,8	82,6	17,4	0,1228	-0,3333
ATP8	forward	3.927	4.085	159	0	-	ATT/TAA	42,1	14,5	37,1	6,3	79,2	20,8	-0,0635	-0,3939
ATP6	forward	4.082	4.759	678	-4	-	ATG/TAA	41,3	16,2	31,6	10,9	72,9	27,1	-0,1336	-0,1957
COIII	forward	4.766	5.551	786	6	-	ATG/TAA	40,1	16,5	29,8	13,6	69,8	30,2	-0,1475	-0,0970
Gly	forward	5.554	5.620	67	2	UCC	-	37,3	9,0	43,3	10,4	80,6	19,4	0,0741	0,0769
ND3	forward	5.621	5.971	351	0	-	ATT/TAA	42,7	12,3	36,5	8,5	79,2	20,8	-0,0791	-0,1781
Arg	forward	5.974	6.037	64	2	UCG	-	37,5	15,6	31,3	15,6	68,8	31,3	-0,0909	0,0000
Ala	forward	6.038	6.106	69	0	UGC	-	43,5	7,2	39,1	10,1	82,6	17,4	-0,0526	0,1667
Asn	forward	6.108	6.177	70	1	GUU	-	35,7	10,0	42,9	11,4	78,6	21,4	0,0909	0,0667
Ser1	reverse	6.179	6.245	67	1	GCU	-	43,3	11,9	32,8	11,9	76,1	23,9	-0,1373	0,0000
Glu	forward	6.258	6.323	66	12	UUC	-	42,4	6,1	48,5	3,0	90,9	9,1	0,0667	-0,3333
Phe	reverse	6.322	6.388	67	-2	GAA	-	38,8	6,0	38,8	16,4	77,6	22,4	0,0000	0,4667
ND5	reverse	6.399	8.138	1.740	10	-	GTG/TAA	46,6	7,3	32,2	14,0	78,7	21,3	-0,1825	0,3135
His	reverse	8.139	8.204	66	0	GUG	-	42,4	4,5	39,4	13,6	81,8	18,2	-0,0370	0,5000
ND4	reverse	8.213	9.553	1.341	8	-	ATG/TAA	47,4	7,7	30,6	14,3	78,0	22,0	-0,2161	0,3017
ND4L	reverse	9.550	9.843	294	-4	-	ATG/TAA	52,0	6,5	28,2	13,3	80,3	19,7	-0,2966	0,3448
Thr	forward	9.846	9.911	66	2	UGU	-	40,9	6,1	47,0	6,1	87,9	12,1	0,0690	0,0000
Pro	reverse	9.912	9.978	67	0	UGG	-	37,3	6,0	40,3	16,4	77,6	22,4	0,0385	0,4667
ND6	forward	9.981	10.499	519	2	-	ATT/TAA	46,8	10,6	36,8	5,8	83,6	16,4	-0,1198	-0,2941
CytB	forward	10.506	11.639	1.134	6	-	ATG/TAA	41,0	15,3	31,0	12,6	72,0	28,0	-0,1383	-0,0978
Ser2	forward	11.641	11.706	66	1	UGA	-	34,8	12,1	42,4	10,6	77,3	22,7	0,0980	-0,0667
ND1	reverse	11.733	12.680	948	26	-	TTG/TAA	48,9	7,8	27,2	16,0	76,2	23,8	-0,2853	0,3451
Leu1	reverse	12.681	12.748	68	0	UAG	-	44,1	4,4	41,2	10,3	85,3	14,7	-0,0345	0,4000
rRNA16S	reverse	12.707	14.063	1.357	-42	-	-	43,6	5,9	39,3	11,2	82,9	17,1	-0,0524	0,3103
Val	reverse	14.085	14.156	72	21	UAC	-	37,5	8,3	43,1	11,1	80,6	19,4	0,0690	0,1429
rRNA12S	reverse	14.156	14.943	788	-1	-	-	42,4	6,7	39,0	11,9	81,3	18,7	-0,0421	0,2789
A+T	-	14.944	15.863	920	-	-	-	47,8	4,8	45,7	1,7	93,5	6,5	-0,0225	-0,4769
PCGs	-	-	-	11.157	-	-	-	44,0	11,8	31,8	12,4	75,8	24,2	-0,1621	0,0259
1st	-	-	-	-	-	-	-	37,1	11,2	32,6	19,1	69,7	30,3	-0,0644	0,2593
2nd	-	-	-	-	-	-	-	46,4	18,8	20,8	14,0	67,2	32,8	-0,3810	-0,1461
3rd	-	-	-	-	-	-	-	48,6	5,4	41,8	4,2	90,4	9,6	-0,0746	-0,1236
tRNAs	-	-	-	1.491	-	-	-	38,8	9,1	40,4	11,6	79,2	20,7	0,0202	0,1208
rRNAs	-	-	-	2.145	-	-	-	43,2	6,2	39,2	11,5	82,4	17,7	-0,0485	0,2994

Supplementary Table 3. Nucleotide distances by Maximum Likelihood Composition

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
<i>Haemagogus albomaculatus</i> NC057211																										
<i>Haemagogus spegazzinii</i> NC057213	0.0524																									
<i>Haemagogus janthinomys</i> NC028025	0.0551	0.0569																								
<i>Haemagogus tropicalis</i> NC057214	0.0982	0.0986	0.0996																							
<i>Haemagogus leucocelaenus</i> NC057212	0.0928	0.0948	0.0946	0.1139																						
<i>Ochlerotatus scapularis</i> NC072177	0.1128	0.1079	0.1106	0.1326		0.1217																				
<i>Ochlerotatus serratus</i> NC072178	0.1084	0.1046	0.1026	0.1282	0.1214	0.0811																				
<i>Ochlerotatus fulvus</i> MK575476	0.1041	0.1005	0.1005	0.1237	0.1167	0.0935	0.0890																			
<i>Ochlerotatus nigrithorax</i> NC054321	0.0974	0.0936	0.0953	0.1211	0.1150	0.0812	0.0839	0.0852																		
<i>Ochlerotatus vittiger</i> NC054326	0.0926	0.0904	0.0900	0.1157	0.1091	0.0876	0.0817	0.0801	0.0208																	
<i>Ochlerotatus taeniorhynchus</i> MN626442	0.0899	0.0846	0.0882	0.1095	0.1076	0.0880	0.0820	0.0809	0.0702	0.0661																
<i>Ochlerotatus fluviatilis</i> NC060639	0.1340	0.1358	0.1345	0.1471	0.1436	0.1414	0.1443	0.1367	0.1345	0.1307	0.1298															
<i>Aedes albopictus</i> NC06817	0.1341	0.1331	0.1299	0.1481	0.1431	0.1432	0.1389	0.1348	0.1310	0.1268	0.1259	0.1613														
<i>Aedes flavopictus</i> NC050044	0.1242	0.1239	0.1208	0.1384	0.1319	0.1236	0.1229	0.1211	0.1132	0.1103	0.1116	0.1441	0.0803													
<i>Aedes galloisi</i> MW465951	0.1094	0.1114	0.1102	0.1269	0.1208	0.1199	0.1193	0.1110	0.1091	0.1049	0.0994	0.1354	0.1083	0.0915												
<i>Aedes aegypti</i> NC035159	0.1258	0.1203	0.1213	0.1441	0.1371	0.1239	0.1197	0.1168	0.1173	0.1153	0.1096	0.1530	0.1212	0.1112	0.1048											
<i>Aedes aegypti</i>	0.1260	0.1208	0.1215	0.1442	0.1378	0.1245	0.1203	0.1175	0.1183	0.1161	0.1105	0.1542	0.1222	0.1123	0.1058	0.0009										
<i>Aedes aegypti</i> OM214532	0.1258	0.1212	0.1204	0.1433	0.1431	0.1247	0.1191	0.1167	0.1185	0.1160	0.1103	0.1511	0.1197	0.1117	0.1037	0.0134	0.0140									
<i>Psorophora albipes</i> NC060641	0.1255	0.1218	0.1238	0.1423	0.1339	0.1256	0.1169	0.1227	0.1147	0.1100	0.1075	0.1515	0.1447	0.1330	0.1239	0.1315	0.1324	0.1308								
<i>Psorophora ferox</i> NC060642	0.1283	0.1260	0.1270	0.1462	0.1360	0.1264	0.1164	0.1227	0.1137	0.1109	0.1079	0.1519	0.1479	0.1372	0.1256	0.1317	0.1324	0.1317	0.0566							
<i>Psorophora saeva</i> NC044658	0.1204	0.1208	0.1228	0.1415	0.1364	0.1353	0.1255	0.1233	0.1167	0.1135	0.1128	0.1515	0.1457	0.1325	0.1241	0.1371	0.1374	0.1371	0.0927	0.0958						
<i>Psorophora cingulata</i> FRR4173077	0.1344	0.1325	0.1355	0.1497	0.1450	0.1401	0.1346	0.1351	0.1319	0.1282	0.1223	0.1597	0.1559	0.1447	0.1353	0.1480	0.1482	0.1468	0.1047	0.1081	0.1135					
<i>Anopheles albistarsis</i> NC020662	0.1826	0.1846	0.1829	0.1900	0.1937	0.1953	0.1906	0.1857	0.1862	0.1813	0.1778	0.2040	0.1974	0.1920	0.1822	0.1909	0.1928	0.1909	0.1867	0.1893	0.1903	0.1927				
<i>Anopheles gyzalimnetes</i> NC030715	0.1814	0.1820	0.1805	0.1882	0.1924	0.1934	0.1886	0.1841	0.1854	0.1807	0.1767	0.2020	0.1958	0.1906	0.1812	0.1888	0.1905	0.1889	0.1857	0.1876	0.1881	0.1914	0.0079			
<i>Anopheles jonconnae</i> NC030717	0.1847	0.1850	0.1834	0.1913	0.1933	0.1965	0.1924	0.1880	0.1894	0.1850	0.1793	0.2049	0.1956	0.1938	0.1855	0.1903	0.1925	0.1905	0.1888	0.1915	0.1892	0.1940	0.0357	0.0356		
<i>Anopheles darlingi</i> NC064612	0.1835	0.1807	0.1797	0.1883	0.1905	0.1925	0.1882	0.1824	0.1818	0.1760	0.1745	0.2024	0.1897	0.1880	0.1824	0.1870	0.1889	0.1883	0.1823	0.1871	0.1863	0.1983	0.0860	0.0843	0.0873	
<i>Dixella aestivalis</i> NC029354	0.2857	0.2893	0.2876	0.2929	0.2966	0.2914	0.2943	0.2917	0.2918	0.2883	0.2883	0.3006	0.3022	0.2981	0.2921	0.2959	0.2981	0.2950	0.2937	0.2957	0.2992	0.2939	0.2906	0.2880	0.2908	0.2923

Supplementary figure 1 - Secondary structures of tRNAs and rRNAs of *Aedes aegypti* OR350416



CAPÍTULO 2

Molecular analysis of the mitochondrial lineages of Brazilian populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): insights into the local occurrence of the wild type

Análise Molecular de linhagens mitocondriais de populações de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): Insights sobre a ocorrência da forma silvestre no Brasil

Artigo Submetido ao periódico *Journal of Medical Entomology*

Andreлина Alves de Sousa^{1,5}, Paulo Bryguel da Cunha², Alessandra Maria Silva Vidigal², Walter Pinheiro Mendes Júnior³, Maria Histelle Sousa do Nascimento⁴, Maria Claudene Barros^{2,3,5}, Elmary da Costa Fraga^{2,3,6}, Iracilda Sampaio^{1,7}.

¹ Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular-PPGBM. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Pará-UFPA. Campus Universitário do Guamá. Rua Augusto Corrêa, 01, Guamá. CEP 66.075-110. Belém, PA, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal-PPGCA. Centro de Ciências Agrárias. Universidade Estadual do Maranhão-UEMA. Cidade Universitária Paulo VI. Avenida Lourenço Vieira da Silva, 1000, São Cristovão. CEP 55.055-310. São Luís, MA, Brasil.

³ Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde-PPGBAS. Universidade Estadual do Maranhão-UEMA. Campus Caxias. Praça Duque de Caxias, S/N, Morro do Alecrim. CEP 65.604-380. Caxias, MA, Brasil.

⁴ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão. MA 349, Km 1,524/1,525 ao Km 3,424/3,425, Gleba Buriti do Paraíso, Povoado Lamego, Zona Rural. CEP 65604-500, Caxias, MA, Brasil.

⁵ Laboratório de Genética-LABGEN. Departamento de Química e Biologia. Universidade Estadual do Maranhão-UEMA. Campus Caxias. Praça Duque de Caxias, S/N, Morro do Alecrim. CEP 65.604-380. Caxias, MA, Brasil.

⁶ Laboratório de Biologia Molecular-LABMOL. Departamento de Química e Biologia. Universidade Estadual do Maranhão-UEMA. Campus Caxias. Praça Duque de Caxias, S/N, Morro do Alecrim. CEP 65.604-380. Caxias, MA, Brasil.

⁷ Laboratório de Evolução, Universidade Federal do Pará, Instituto de Estudos Costeiros. Alameda Leandro Ribeiro, Aldeia, CEP 68.600-000. Bragança, PA, Brasil.

Autor correspondente: Andrelina Alves de Sousa, Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular-PPGBM. Universidade Federal do Pará-UFPA. Belém, PA, Brasil. Celular: +55 9998114 6939

Email: andrelbio@yahoo.com.br

Resumo

O *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1972), é o principal transmissor da febre amarela, dengue, chikungunya e zika no contexto mundial. O estudo da variabilidade genética é fundamental para a melhoria das estratégias de controle do vetor e prevenção de epidemias. Neste contexto, os altos índices de notificações da dengue no país revelam a necessidade de um monitoramento genético das populações que nos permita inferir sobre a dinâmica populacional do vetor. No presente estudo, realizamos uma análise genética populacional com base em sequências de DNA de genes mitocondriais em 22 populações de *A. aegypti* distribuídas em sete estados nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Os nossos resultados revelaram altos índices de diversidade genética e a ocorrência de duas linhagens mitocondriais provenientes de diferentes introduções ao longo da colonização humana nas américas. Curiosamente, haplótipos de uma das linhagens mitocondriais, inclusive o mais frequente e amplamente distribuído, mostrou-se idêntico a haplótipos da subespécie Aaf do continente africano. Portanto, os dados genéticos confirmam a circulação da subespécie Aaf no país e reforça a importância da implementação de controles de vetores mais efetivos, para um melhor manejo da espécie, uma vez que as consequências epidemiológicas da circulação das duas subespécies e da mistura genética são desconhecidas e podem ter impacto direto na saúde pública do Brasil.

Palavras-chave: Amazonia, Arboviroses, COI, Dengue, ND4.

Introdução

O mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1972) é uma espécie de grande importância médico-epidemiológica com uma história de expansão por todos os continentes muito bem-sucedida ([Paupy et al. 2012](#), [Glória-Soria et al. 2016](#), [Bennett et al. 2016](#), [Ayala et al. 2020](#)). No continente africano, região de origem da espécie, o *A. aegypti* é diferenciado em dois morfotipos, ou subespécies, a partir de diferenças morfológicas, ecológicas, de variação genética e de suscetibilidade viral ([Delatte et al. 2011](#), [Khater et al. 2021](#)).

O *Aedes aegypti formosus* (Aaf) é a forma silvestre, reside em florestas e é mais zoofílico, de acordo com a literatura sua ocorrência supostamente está restrita à África subsaariana, apesar de ter sido relatado na Argentina ([Glória-Soria et al. 2016](#), [Powell 2016](#), [Powell et al. 2018](#)). O *Aedes aegypti aegypti* (Aaa) é a forma domesticada, amplamente difundida nas regiões tropicais e subtropicais, vive em ambientes urbanos, deposita seus ovos em criadouros artificiais e é mais antropofílica ([Jaimes-Dueñez et al. 2015](#), [Joyce et al. 2018](#), [Abuelmaali et al. 2021](#)). Conhecer a distribuição, ocorrência e bionomia das subespécies é importante para compreendermos como atuam na transmissão dos arbovírus circulantes ([Abuelmaali et al. 2021](#)).

O *A. aegypti* é o principal vetor envolvido no ciclo de transmissão dos arbovírus *Orthoflavivirus denguei*, *Orthoflavivirus flavi* (YFV) em áreas urbanas, *Orthoflavivirus zikaense* (ZIKV), *Alphavirus chikungunya* (CHIKV) ([Espinal et al. 2019](#), [Sousa et al. 2023](#)), que afetam particularmente humanos, representando uma constante ameaça à saúde pública mundial ([Li et al. 2021](#)).

Entre as arboviroses transmitidas pelo *A. aegypti*, a dengue é uma das doenças mais importantes do mundo, sua incidência aumentou mais de 30 vezes nas últimas décadas, juntamente com a expansão geográfica do vetor ([Kraemer et al. 2015](#), [Guzmán et al. 2016](#)). O Brasil é um dos países endêmicos que registra anualmente os maiores números de notificações de zika, chikungunya, e principalmente dengue ([Kotsakiozi et al. 2017](#)), com milhares de casos e vários surtos da doença em diferentes regiões do país ([Brasil, 2024](#)).

O primeiro registro do vetor nas regiões Norte e Nordeste foi na epidemia de Febre Amarela (1928-1929), nos estados da Bahia, Pará e Pernambuco ([Njaime 2022](#)). Em 2024 até a semana epidemiológica (SE) 28 já foram notificados 335.130 casos prováveis de dengue com uma taxa de incidência de 613,3 por 100.000 habitantes e 182 óbitos para a região Nordeste e para a região Norte 49.772 casos prováveis de dengue com uma taxa de incidência de 286,9 por 100.000 habitantes e 28 óbitos ([Brasil, 2024](#)).

Nas últimas décadas vários estudos analisaram a estrutura populacional do *A. aegypti* utilizando marcadores moleculares nucleares de evolução neutra, como os microsatélites ([Maitra et al. 2019](#), [Rodrigues et al. 2023](#), [Abuelmaali et al. 2024](#)) e os genes mitocondriais, para uma maior compreensão das relações filogenéticas, da estrutura populacional e evolução molecular da espécie ([Fraga et al. 2013](#), [Sousa et al. 2017](#)). Os estudos realizados com populações brasileiras têm fornecido importantes informações acerca dos níveis de diversidades genética, o que é fundamental para melhorar as estratégias de prevenção de arboviroses em países endêmicos ([Jaimes-Dueñez et al. 2015](#)).

Os altos índices de caos de dengue nas regiões Norte e Nordeste do Brasil revelam a necessidade de um monitoramento genético nas populações do vetor nessas regiões, uma vez que a variação genética pode influenciar na competência vetorial da espécie em transmitir diferentes tipos de vírus a humanos, devido as interações moleculares complexas do hospedeiro com os patógenos ([Sim et al. 2013](#), [Sousa et al. 2023](#)).

Com base nessas informações, realizamos uma análise genética em populações de *A. aegypti* de 22 localidades distribuídas em sete estados das regiões Norte e Nordeste do Brasil, com base em sequencias de DNA dos genes mitocondriais ND4 e COI, e assim, gerar novas percepções que possam trazer luz na implementação de estratégias efetivas para o controle e manejo do vetor.

Material e Métodos

Procedência e Obtenção das Amostras

As amostras de *A. aegypti* foram obtidas em expedições realizadas em 22 localidades distribuídas entre as regiões Norte e Nordeste do Brasil ([Tabela 1](#)).

Tabela 1. Municípios de obtenção das amostras de *A. aegypti* nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, coordenadas geográficas e tamanho amostral para cada gene (ND4 e COI).

MUNICÍPIOS	CÓDIGO	LOCALIZAÇÃO	TAMANHO	
		Latitude/Longitude	ND4	COI
Aracajú-SE	ARAC	10°55'35.39"S/ 37° 4'22.24"W	10	03
Araguaína-TO	ARA	7°11'30.44"S/ 48°12'31.70"W	30	30
Balsas-MA	BAL	7°33'44.75"S/ 46° 3'12.41"W	20	07
Barra do Corda-MA	BCO	5°30'9.49"S/ 45°14'48.33"W	07	08
Belém-PA	BEL	1°27'23.23"S/ 48°30'3.46"W	30	30
Caxias-MA	CAX	4°52'2.15"S/ 43°21'34.93"W	12	07
Floriano-PI	FLO	6°46'52.57"S/ 43° 1'24.10"W	30	30
Gurupi-TO	GUR	11°43'28.00"S/ 49° 3'40.98"W	31	31
Humberto de Campos-MA	HCA	2°35'55.16"S/ 43°27'52.87"W	30	30
Imperatriz-MA	IMP	5°31'25.55"S/ 47°28'34.30"W	32	32
João Pessoa-PB	JPE	7° 7'7.81"S/ 34°52'53.16"W	25	11
Maracaçumé-MA	MAR	2° 2'51.63"S/ 45°57'41.35"W	30	30
Natal-RN	NAT	5°47'3.01"S/ 35°11'59.89"W	18	11
Palmas-TO	PAL	10°14'57.85"S/ 48°19'27.99"W	30	30
Parnaíba-PI	PAR	2°54'34.59"S/ 41°45'13.38"W	31	31
Picos-PI	PIC	7° 5'3.16"S/ 41°28'14.87"W	31	31
Presidente Dutra-MA	PDU	5°17'31.11"S/ 44°29'34.97"W	30	30
São Domingos-MA	SDO	5°34'42.71"S/ 44°23'4.30"W	13	13
Santa Maria-PA	SMA	1°21'0.44"S/ 47°34'31.66"W	30	30
Teresina-PI	TER	5° 5'46.05"S/ 42°48'8.30"W	18	10
Tuntum-MA	TUN	5°15'36.15"S/ 44°38'40.23"W	11	07
Vargem Grande-MA	VGR	3°32'52.84"S/ 43°54'59.21"W	15	10

As coletas foram realizadas na companhia de um agente de endemias. Com base em dados do levantamento de índice rápido (LIRAA), foram selecionados pontos estratégicos (PEs), tais como: cemitérios, borracharias e o peridomicílio das residências. Foram distribuídas 30 armadilhas para ovos (ovitrap) nos PEs, a uma

distância mínima de 1km entre cada uma, as armadilhas foram colocadas em áreas sombreadas, protegidas da chuva, e, recolhidas após seis dias ([Reiter et al.1995](#)).

O material coletado foi transportado para o Laboratório de Biologia Molecular (LABMOL) do Complexo GENBIMOL da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Campus Caxias. As palhetas com ovos foram colocadas em diferentes criadouros artificiais, etiquetados e cobertos com tecido.

Após a eclosão dos ovos, as larvas foram alimentadas até o 4º estágio conforme o protocolo de [Santos et al. \(1981\)](#), identificadas com auxílio de chave taxonômica de classificação ([Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994](#)), armazenadas individualmente em microtubos contendo álcool 70% e mantidas em freezer -80°C para posterior extração do DNA genômico.

Extração de DNA, amplificação e sequenciamento dos genes mitocondriais

Para a extração do DNA genômico foram selecionadas larvas de diferentes criadouros para evitar a ocorrência de irmãos na amostragem. A extração do DNA total foi realizada com o kit Wizard Genomic DNA Purification da PROMEGA (Promega, Madison, WI, USA), conforme as instruções do fabricante. A integridade do DNA extraído foi verificada em gel de agarose a 1% e armazenado em freezer -20°C.

Os genes mitocondriais ND4 e COI foram isolados do DNA total através da reação em cadeia da polimerase (PCR), seguindo o protocolo de [Schuelke \(2000\)](#). As PCRs foram realizadas com volume final de 25 µl contendo 15,8µl de H₂O ultrapura; 1µL de DNA genômico (50ng/µl); 4µL de dNTP's (0.2mM); 2,5µl do tampão de reação 10X; 1µl de MgCl₂ (50 mM); 0,25µl de primer forward (200 µM/µl); 0,25µl de primer reverse (200 µM/ µl); 0,2µl de taq DNA polimerase (5 U/µl) (Thermo Fisher Scientific).

Foram utilizados os iniciadores ND4L 5'-ATTGCCTAAGGCTCATGTAG-3' (forward) e ND4H 5'-TCGGCTTCCTAGTCGTTTCAT-3' (reverse), de acordo com [Costa-da-Silva et al. \(2005\)](#) e COIF: 5'-TGTAATTGTAACAGCTCATGCA-3' (forward) e COIR: 5'-AATGATCATAGAAGGGCTGGAC-3' (reverse), publicado por [Paupy et al. \(2012\)](#). As amplificações foram realizadas em termociclador automatizado (Applied

Biosystems) com os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 94°C por 2 min, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 56°C (ND4) / 54°C (COI) por 30 s, 72°C por 1 min e uma extensão final de 72°C por 7 min (ND4) / 5 min (COI).

Os produtos da PCR foram purificados com a enzima “ExoSap-IT” (USB Corporation), conforme orientações do fabricante, e submetidos à reação de sequenciamento de DNA usando-se o método didesoxiterminal ([Sanger et al. 1977](#)), com o Kit “Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems). As amostras foram sequenciadas no sequenciador automático de DNA ABI PRISM 3500 (Life Technologies).

Análises de caracterização e diversidade genética para os genes ND4 e COI

As sequências obtidas foram examinadas e editadas no programa BIOEDIT, v. 7.2.5, ([Hall 2011](#)), alinhadas com o auxílio do algoritmo Clustal W ([Thompson et al. 1994](#)), e, submetidas ao BlastN no Genbank para a verificação da ocorrência de contaminação ([Altschul et al. 1990](#)), a saturação das sequências foi examinada no Programa DAMBE ([Xia e Xie 2001](#)).

A presença de picos duplos ou códons de parada que pudessem indicar inserções de pseudogenes nucleares nas sequências obtidas (NUMTS) ([Behura et al. 2011](#)), foi verificada em inspeção individual de rastreamento de alinhamento no programa UGENE ([Okonechnikov, et al. 2012](#)). As sequências obtidas foram depositadas no Genbank sob os números de acesso (ND4 # PQ157447 a PQ157479) e (COI # PQ137601 a PQ137628).

A caracterização genética das sequências foi estimada para as populações individuais e globais. O número de haplótipos (h), frequência e distribuição dos haplótipos, as diversidades haplotípica (Hd) e nucleotídica (π) foram implementadas no programa DNAsp v. 6.0 ([Rozas et al. 2017](#)).

Foi realizada a comparação dos haplótipos obtidos nesse estudo com haplótipos depositados no Genbank, observados em outros estudos do Brasil e do

mundo para verificarmos a ancestralidades das populações. As sequências utilizadas na comparação estão identificadas nas [tabelas S1 e S2](#).

Os testes de D ([Tajima 1989](#)) e F_s ([Fu 1997](#)) que geram informações quanto à neutralidade seletiva em populações naturais foram obtidos no Programa Arlequin v. 3.5 ([Excoffier e Lischer 2010](#)), calculadas com 10.000 permutações aleatórias. A composição nucleotídica, o número de sítios variáveis, sítios informativos para parcimônia foram estimados no MEGA 11 ([Tamura et al. 2021](#)). A relação genética entre os haplótipos foi avaliada por meio da construção de rede haplótipos pelo método TCS ([Clement et al. 2002](#)) obtida no programa PopART v. 1.7 ([Leigh e Bryant 2015](#)).

Estrutura genética populacional

A análise molecular de variância (AMOVA) ([Excoffier et al. 1992](#)) avaliou os níveis de diferenciação genética interpopulacional e intrapopulacional, em duas hierarquias, na primeira todos os indivíduos foram considerados um único grupo e na segunda os indivíduos foram subdivididos em dois grupos com base no resultado do Structure, as análises foram realizadas a partir de 10.000 permutações aleatórias para ambos os genes no Programa Arlequin v. 3.5 ([Excoffier e Lischer 2010](#)).

A distância genética par a par (F_{ST}) ([Neigel 2002](#)) entre todas as localidades, o teste de Mantel ([Mantel 1967](#)) que correlaciona uma matriz de distância genética (linearizada), ([Rousset 1997](#)), e uma matriz de distância geográfica (em escala logarítmica) foram realizadas no Programa Arlequin v. 3.5 ([Excoffier e Lischer 2010](#)), com base em 10.000 permutações aleatórias.

A análise para atribuir indivíduos a populações, e, identificar indivíduos misturados foi simulada no método de agrupamentos Bayesiano no programa Structure v. 2.3.4 ([Pritchard et al. 2000](#)). A formatação dos dados foi realizada no programa Fasta2Structure ([Bessa-Silva 2024](#)) que utiliza recursos das bibliotecas Tkinter ([Python Software Foundation](#)) e Biopython ([Cock et al. 2009](#)) no processamento dos arquivos no formato FASTA, identificando os sítios variáveis e convertendo as sequências em formatos binários.

No programa Structure a determinação dos agrupamentos genéticos (K) foi realizada a partir da inferência dos valores para K = 1 a 22 com 20 repetições, cada uma com 500.000 interações por Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC; burn-in de 50.000). Foi aplicado a análise estrutural usando frequências alélicas correlacionadas para cada marcador (ND4 e COI) assumindo o modelo de mistura de ancestralidade.

Para encontrarmos o melhor valor de K, utilizamos o Structure Selector (<https://imme.ac.cn/StructureSelector/>) baseado no método de Puechmaille (2016). Os padrões de agrupamento em cada K foram determinados no Clumpak (Kopelman et al. 2015). A partir do padrão do método de agrupamento bayesiano apresentado comparamos cada indivíduo do gráfico de barras com os haplótipos obtidos para uma melhor compreensão da distribuição dos haplótipos entre os grupos genéticos.

Análises Filogenéticas

A escolha do melhor modelo evolutivo para a construção da árvore de Inferência Bayesiana (IB) foi gerada no JModelTest2 (Darriba et al. 2012). Os modelos evolutivos selecionados foram GTR+G e HKY+I+G para os dados de ND4 e COI, respectivamente. As árvores de IB foram geradas no software BEAST v.1.10.4 (Drummond et al. 2012, Suchard et al. 2018), utilizando um relógio stricto e processo de especiação de nascimento e morte em uma árvore enraizada, na qual foi utilizado como grupo externo as espécies *Aedes albopictus* (Genbank # OM275428) e *Anopheles marajoara* (Genbank # MF381593).

A análise foi realizada com 100.000.000 de gerações em que os parâmetros foram registrados a cada 10.000 gerações e os arquivos de log verificados no Tracer v1.6 (Rambaut et al. 2014) para avaliar a convergência e o comprimento adequado do burn-in, os primeiros 10% das árvores foram descartadas (burn-in) e as árvores restantes foram usadas para construir uma árvore de consenso com distribuição de probabilidade posterior.

A convergência foi considerada adequada quando os parâmetros ESS (Effective Sample Size) foram superiores a 200. As árvores geradas no BEAST foram

sumarizadas no TreeAnnotator v.10.4 (Suchard et al. 2018) para obtenção da árvore consenso, posteriormente visualizadas e editadas no Fig Tree v1.4.2 (Rambaut 2014) e *Inkscape* v.0.92 (disponível em <https://inkscape.org/pt-br/>).

Quatro haplótipos deste estudo apresentaram homologia com haplótipos das subespécies Aaa e Aaf do Sudão (Abuelmaali et al. 2021), por esse motivo, as sequências (Genbank # MT193027, MT193050, MT193062 MT193069) do Sudão e a sequência (Genbank # AY056597) referente a uma cepa laboratorial da subespécie Aaf da África Ocidental (Morlais e Severson 2002) foram incluídas na análise das relações filogenéticas e na rede de haplótipos do gene COI.

Resultados

Análises de caracterização e diversidade genética para os genes ND4 e COI

Para as 22 localidades obtivemos 514 sequências de DNA com 343 pares de bases, 33 haplótipos, 19 sítios polimórficos, dos quais 16 foram informativos para parcimônia para o gene ND4, e 452 sequências de DNA com 801 pares de bases, 28 haplótipos, 23 sítios polimórficos, dos quais 18 foram informativos para parcimônia para o gene COI.

As figuras 1 e 2 resumam a distribuição geográfica dos haplótipos para os genes ND4 e COI respectivamente, os gráficos apresentam a proporção dos haplótipos obtidos por localidade. No conjunto de dados obtidos não foram observados inserções, deleções, sítios heterozigotos ou códons de parada na tradução das sequências para aminoácidos indicando ausência de NUMTS nas amostras analisadas.

Para o gene ND4 os dois haplótipos de maior frequência, o Hap 1 ($f = 225/514$) ocorreu em todas as localidades, exceto em Gurupi-TO e Santa Maria-PA e o Hap 3 ($f = 208/452$) ocorreu em 16 das localidades, exceto em Aracajú-SE, Araguaína-TO, Humberto de Campos-MA, São Domingos-MA, Tuntum-MA e Vargem Grande-MA. Além disso, observamos a ocorrência de 18 haplótipos únicos (54,54%) (ver, tabela 2).

Para o gene COI os dois haplótipos de maior frequência, o Hap 1 ($f = 188/452$) ocorreu em todas as localidades, exceto em Gurupi-TO e Picos-PI e o Hap 3 ($f = 191/452$) ocorreu em 15 das localidades estudadas, exceto em Aracajú-SE, Araguaína-TO, Humberto de Campos-MA, Natal-RN, São Domingos-MA, Tuntum-MA e Vargem Grande-MA. Também foram registrados 18 haplótipos únicos (64,28%) ([ver, tabela 3](#)).

Figura 1. Distribuição geográfica dos haplótipos para o gene ND4 por localidade onde foram obtidas as amostras de *A. aegypti* nas regiões Norte e Nordeste do Brasil.

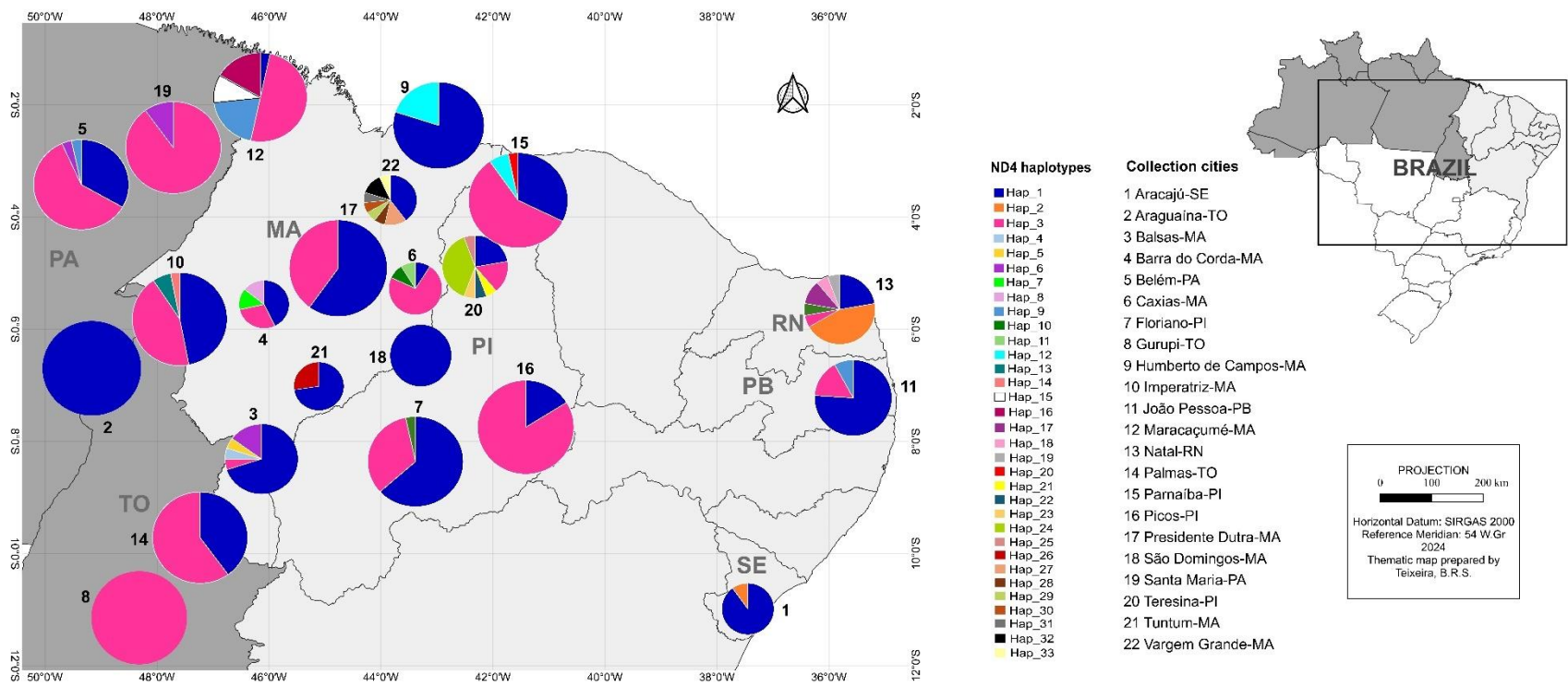


Figura 2. Distribuição geográfica dos haplótipos para o gene COI por localidade onde foram obtidas as amostras de *A. aegypti* nas regiões Norte e Nordeste do Brasil.

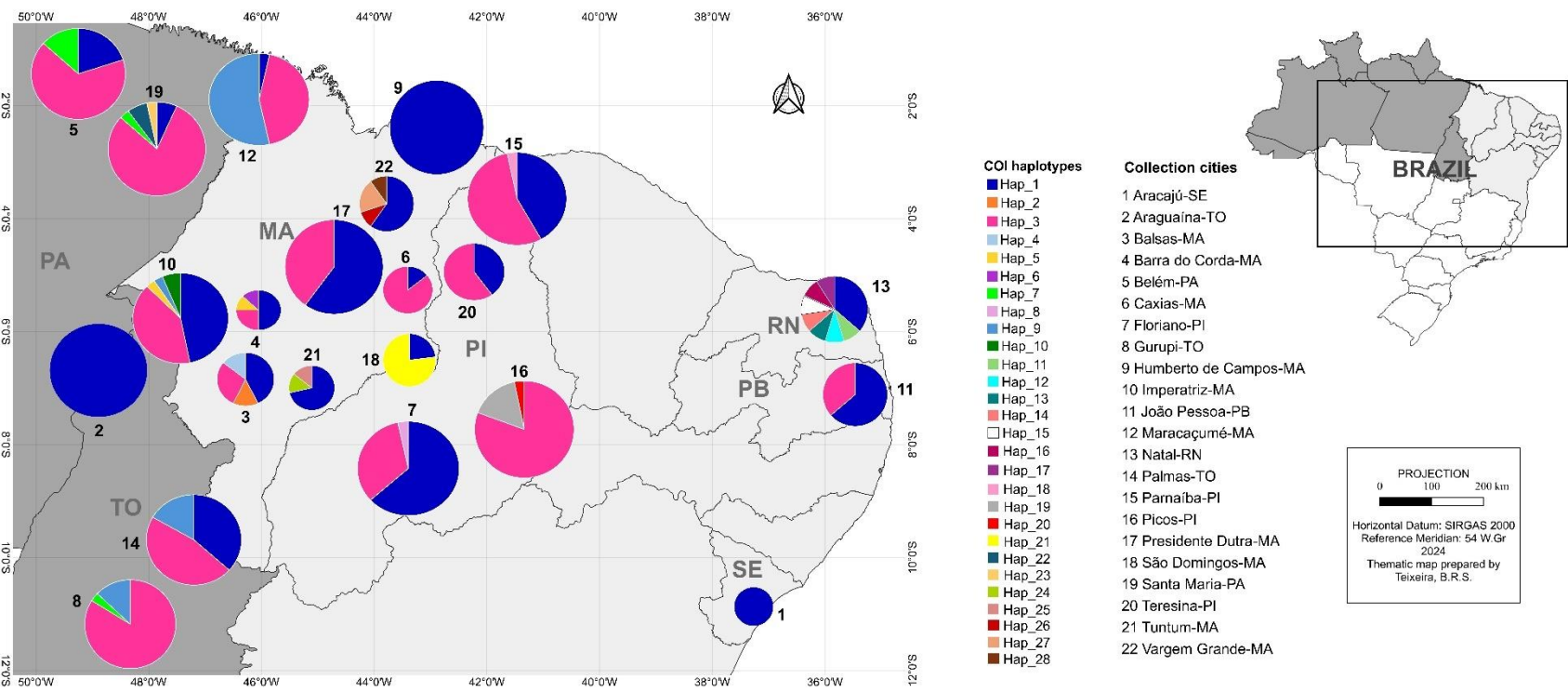


Tabela 2. Descrição dos haplótipos identificados para o gene ND4 a partir das amostras de *A. aegypti* obtidas nas regiões Norte e Nordeste do Brasil.

¹ NH	SÍTIOS POLIMÓRFICOS		Número de acesso do GB	FREQ.	LOCAIS DE COLETAS
	11111	111122222			
	2458901123	556914458			
	7867380767	495203688			
Hap_1	ACGATTGCGT	TACGCGAGT	PQ157447	225	ARAC, ARA, BAL, BCO, BEL, CAX, FLO, HCA, IMP, JPE, MAR, NAT, PAL, PAR, PIC, PDU, SDO, TER, TUN, VGR.
Hap_2	A....		PQ157448	9	ARAC, NAT.
Hap_3	.T.G.C.TA.	..T.TATAC	PQ157449	208	BAL, BCO, BEL, CAX, FLO, GUR, IMP, JPE, MAR, NAT, PAL, PAR, PIC, PDU, SMA, TER.
Hap_4	.T.....	...T..AC	PQ157450	1	BAL.
Hap_5	.T.....TA.	..T.T..A.	PQ157451	1	BAL.
Hap_6	.T...C.TA.	..T.TATAC	PQ157452	7	BAL, BEL, SMA.
Hap_7		..T....A.	PQ157453	1	BCO.
Hap_8	.T.....A.	..T.T..AC	PQ157454	1	BCO
Hap_9	.T...C.TA.	..TATATAC	PQ157455	9	BEL, JPE, MAR.
Hap_10		C	PQ157456	4	CAX, FLO, NAT.
Hap_11	.T.G.C.TA.	..CT.TATAC	PQ157457	1	CAX.
Hap_12	C...		PQ157458	8	HCA, PAR.
Hap_13	.T...C.TA.	..T.TA.A.	PQ157459	2	IMP.
Hap_14	.T.G...T..	T..	PQ157460	1	IMP.
Hap_15	.T...C.TA.	..TAT..AC	PQ157461	3	MAR.
Hap_16	.T.G.C.TA.	..T.T..AC	PQ157462	5	MAR.
Hap_17	..C.A....		PQ157463	2	NAT.
Hap_18	.TC....TA.	T..AC	PQ157464	1	NAT.
Hap_19	..C.....A.	T..AC	PQ157465	1	NAT.
Hap_20	.T...C.T..	..T.TATAC	PQ157466	1	PAR.
Hap_21	GTCGAC.TA.	..T.TATAC	PQ157467	1	TER.
Hap_22	...G.C.TA.	A.T.TATAC	PQ157468	1	TER.
Hap_23	...G.C.TAC	A.T.TATAC	PQ157469	1	TER.
Hap_24	...G.C.TA.	..T.TATAC	PQ157470	7	TER.
Hap_25	C.TA.	A.T.TATAC	PQ157471	1	TER.
Hap_26	TA.	T..A.	PQ157472	3	TUN.
Hap_27	.T.....T..	T..A.	PQ157473	2	VGR.
Hap_28	.T...C..A.	T..AC	PQ157474	1	VGR.
Hap_29	.T.....TA.	AC	PQ157475	1	VGR.
Hap_30	.T.....TA.	T..A.	PQ157476	1	VGR.
Hap_31	.T...C.TA.	TA.AC	PQ157477	1	VGR.
Hap_32	.T.....TA.	T..AC	PQ157478	2	VGR.
Hap_33	.T...C.TA.	..T.TA.AC	PQ157479	1	VGR.

NH = nome dos haplótipos, GB = GenBank, FREQ. = frequência.

Tabela 3. Descrição dos haplótipos identificados para o gene COI a partir das amostras de *A. aegypti* obtidas nas regiões Norte e Nordeste do Brasil.

¹ NH	SÍTIOS POLIMÓRFICOS				Número de acesso do GB	FREQ.	LOCAIS DE COLETAS
	11112	2334444555	666	5667934588	9030568777	367	
	6365677908	7908959029	328				
Hap_1	ATCGATGGCG	GGCAGCTCGG	ATC	PQ137601	188		ARAC, ARA, BAL, BCO, BEL, CAX, FLO, HCA, IMP, JPE, MAR, NAT, PAL, PAR, PDU, SDO, SMA, TER, TUN, VGR.
Hap_2	.CTA.....A	AA..A.CT..	G..	PQ137602	1		BAL.
Hap_3	.CTA.....A	AATGATCT..	G..	PQ137603	191		BAL, BCO, BEL, CAX, FLO, GUR, IMP, JPE, MAR, PAL, PAR, PIC, PDU, SMA, TER.
Hap_4	..T.....	AA.....	G..	PQ137604	1		BAL.
Hap_5			G..	PQ137605	2		BCO, IMP.
Hap_6	...A.....	AA.GA..T..	...	PQ137606	1		BCO.
Hap_7	.CT.....		...	PQ137607	6		BEL, GUR, SMA.
Hap_8		A	...	PQ137608	1		FLO.
Hap_9	...A.....A	AATGATCT..	G..	PQ137609	26		GUR, MAR, PAL.
Hap_10	.CTA..A..A	AA.GATCT..	G..	PQ137610	2		IMP.
Hap_11	.CT.....A	AA..A..T..	G..	PQ137611	1		NAT.
Hap_12	T.....		...	PQ137612	1		NAT.
Hap_13	.CT.....A	A...A.CT..	G..	PQ137613	1		NAT.
Hap_14	..T....ATA	A.....T..	G.T	PQ137614	1		NAT.
Hap_15	.CT.....A	AA.GA..T..	G..	PQ137615	1		NAT.
Hap_16	AA.A	AA.GA..T..	G.T	PQ137616	1		NAT.
Hap_17	ATA	A.....T..	..T	PQ137617	1		NAT.
Hap_18	.CTA.G...A	AATGATCTA.	G..	PQ137618	1		PAR.
Hap_19	G....		...	PQ137619	5		PIC.
Hap_20	.CTA.....A	AATGATCT..	GA.	PQ137620	1		PIC.
Hap_21	A...		...	PQ137621	10		SDO.
Hap_22	.CTA.G...A	AATGATCT..	G..	PQ137622	2		SMA.
Hap_23	.CTA.G...A	AAT.ATCT..	G..	PQ137623	1		SMA.
Hap_24		...GATCT..	G..	PQ137624	1		TUN.
Hap_25	.CTA.....	...GATCT..	G..	PQ137625	1		TUN.
Hap_26	.CTA.....A	A...ATCT..	G..	PQ137626	1		VGR.
Hap_27	.CT.....A	A...ATCT..	G..	PQ137627	2		VGR.
Hap_28	T.....		...	PQ137628	1		VGR.

NH = nome dos haplótipos, GB = GenBank, FREQ. = frequência.

A comparação dos haplótipos para o gene ND4 revelou que os haplótipos Hap 1, Hap 3, Hap 5, Hap 6, Hap 9, Hap 10, Hap 12, Hap 13 e Hap 33 tem ampla distribuição em outras regiões do Brasil e países da África, América do Sul, América do Norte e Ásia (tabela S1). Para o gene COI essa mesma análise mostrou que os haplótipos Hap 1, Hap 3, Hap 5, Hap 10, Hap 11 e Hap 15 também tem ocorrência em outros países da África, América do Sul, América do Norte e Ásia (tabela S2).

Na pesquisa nas bases de dados verificamos que 24 dos 33 haplótipos obtidos para o gene ND4 e 23 dos 28 haplótipos obtidos para o gene COI não foram recuperados em outros estudos. Foram observadas altas diversidades haplotípica e moderadas diversidades nucleotídica para todas as amostras agrupadas (ND4: $Hd = 0.644$ e $\pi = 0.01690$, ver tabela 4; COI: $Hd = 0.646$ e $\pi = 0.00831$, ver tabela 4 e 5).

Tabela 4. Caracterização genética para o gene ND4 a partir de amostras de *A. aegypti* obtidas nas regiões Norte e Nordeste do Brasil.

LOCAIS DE COLETAS	N	h	DIVERSIDADE GENÉTICA		Tajima's D	Fu's Fs
			Hd	π		
ARAC	10	02	0.200	0.00058	-1.11173	-0.33931
ARA	30	01	0.000	0.00000	0.00000	0.00000
BAL	20	05	0.505	0.01171	1.04689	3.00572
BCO	07	04	0.810	0.01694	1.58979	2.06921
BEL	30	04	0.545	0.01505	2.29666*	7.48669**
CAX	12	04	0.561	0.01290	0.47634	3.20811
FLO	30	03	0.503	0.01481	2.66768**	9.62906***
GUR	31	01	0.000	0.00000	0.00000	0.00000
HCA	30	02	0.331	0.00097	0.485443	0.89148
IMP	32	04	0.603	0.01651	3.40483***	8.50583***
JPE	25	03	0.407	0.01234	1.12840	7.51935**
MAR	30	05	0.694	0.00670	-0.78907	1.78721
NAT	18	07	0.771	0.00907	-0.65969	-0.12937
PAL	30	02	0.497	0.01592	3.11267***	13.36838
PAR	31	04	0.572	0.01616	2.74048**	8.18646**
PIC	31	02	0.280	0.00897	0.37350	8.77337
PDU	30	02	0.497	0.01592	3.11267***	13.36838
SDO	13	01	0.000	0.00000	0.00000	0.00000
SMA	30	02	0.186	0.00056	-0.40885	0.03747
TER	18	07	0.804	0.01406	0.14097	1.20429
TUN	11	02	0.436	0.00509	1.01828	3.74763
VGR	15	08	0.838	0.01127	1.48851	-0.92179
Total Agrupado	514	33	0.644	0.01690	2.50777*	-2.45200

N= tamanho amostral, h = número de haplótipos, Hd = diversidade haplotípica, π = diversidade nucleotídica. Nível de significância para os testes de neutralidade: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Tabela 5. Caracterização genética para o gene COI a partir de amostras de *A. aegypti* obtidas nas regiões Norte e Nordeste do Brasil.

LOCAIS DE COLETAS	N	h	DIVERSIDADE GENÉTICA		Tajima's D	Fu's Fs
			Hd	π		
ARAC	03	01	0.000	0.00000	0.00000	0.00000
ARA	30	01	0.000	0.00000	0.00000	0.00000
BAL	07	04	0.810	0.00892	1.89567	2.56204
BCO	08	04	0.750	0.00789	1.32068	2.82057
BEL	30	03	0.515	0.00714	2.45357*	10.65527*
CAX	07	02	0.286	0.00464	-1.64292	5.09407
FLO	30	03	0.503	0.00755	2.37007*	11.15727
GUR	31	03	0.288	0.00147	-2.09635	2.09771
HCA	30	01	0.000	0.00000	0.00000	0.00000
IMP	32	05	0.629	0.00851	3.16461***	8.07151***
JPE	11	02	0.509	0.00826	2.14953*	9.54647*
MAR	30	03	0.545	0.00218	-1.54177	3.39317
NAT	11	08	0.891	0.00767	0.88667	-0.92203
PAL	30	03	0.641	0.00827	3.36507***	12.03228***
PAR	31	03	0.540	0.00833	2.59880**	12.29238
PIC	31	03	0.333	0.00497	0.19943	7.87339
PDU	30	02	0.497	0.00806	3.19388	0.68913
SDO	13	02	0.385	0.00048	-9.3399	2.15832
SMA	30	05	0.361	0.00318	-0.93399	2.15832
TER	10	02	0.533	0.00866	2.31519	9.29029
TUN	07	03	0.524	0.00464	0.05905	2.72411
VGR	10	04	0.644	0.00574	0.81954	2.73064
Total agrupado	452	28	0.646	0.00831	2.37727*	0.37000

N= tamanho amostral, h = número de haplótipos, Hd = diversidade haplotípica, π = diversidade nucleotídica. Nível de significância para os testes de neutralidade: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Na análise isolada por localidade as diversidades haplotípicas para o gene ND4 variou de $Hd = 0.838$ (Vargem Grande-MA) a $Hd = 0.186$ (Santa Maria-PA) e para o gene COI variou de $Hd = 0.891$ (Natal-RN) a $Hd = 0.286$ (Caxias-MA). As diversidades nucleotídicas para o gene ND4 variou de $\pi = 0.01694$ (Barra do Corda-MA) e $\pi = 0.00058$ (Aracajú-SE) e para o gene COI variou de $\pi = 0.00892$ (Balsas-MA) a $\pi = 0.00048$ (São Domingos-MA). As amostras de Araguaína-TO, Gurupi-TO e São Domingos-MA para o gene ND4 e Aracajú-SE, Araguaína-TO e Humberto de Campos-MA para o gene COI não apresentaram polimorfismo genético.

Os testes de neutralidade D e F_s apresentaram valores significativos ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$.) para as amostras de Belém-PA, Florianópolis-PI, Imperatriz-MA, João Pessoa-PB, Palmas-PA, Parnaíba-PI e Presidente Dutra-MA, no entanto, as estimativas não foram significativas nas demais localidades analisadas. O teste D

estimado para as localidades agrupadas foi significativo para ambos os genes ($P < 0,05$) indicando que o polimorfismo está desviando do modelo neutro de mutações, porém os valores F_s calculado para as localidades agrupadas não foram significativos em ambos os genes (Tabelas 4 e 5).

Nas redes de haplótipos, os haplótipos mais frequentes (Hap 1 e Hap 3) estão cercados por outras variantes de haplótipos em menor frequência ou de ocorrência única. Na rede de haplótipos do gene COI destacamos os haplótipos Hap 3, Hap 5, Hap 10 e Hap 15 que foram idênticos a haplótipos das subespécies Aaa e Aaf do Sudão (Figuras 3A e 4A).

As figuras 3B e 4B apresentam a distribuição das amostras em dois grupos genéticos para os dois genes ($K=2$), cada cor corresponde a um cluster baseado nas semelhanças genotípicas das amostras, o cluster 1 (laranja) e o cluster 2 (azul), as amostras com a composição genética dos dois clusteres (laranja e azul), estão destacados nas redes de haplótipos com a verde e foram denominadas mistura (Figuras 3 e 4).

A

Haplotype network showing 33 haplotypes (Hap_1 to Hap_33) and their frequencies. The network is rooted at Hap_1 (orange circle, 20 samples). Haplotypes are color-coded: orange for Pop_1, blue for Pop_2, and green for Mixture. The network shows a central cluster of haplotypes (Hap_1, Hap_2, Hap_12, Hap_17, Hap_7, Hap_10, Hap_4, Hap_5, Hap_27, Hap_28, Hap_13, Hap_8, Hap_15, Hap_16, Hap_9, Hap_6, Hap_20, Hap_21, Hap_11, Hap_3) and several peripheral haplotypes (Hap_14, Hap_26, Hap_30, Hap_19, Hap_18, Hap_32, Hap_29, Hap_31, Hap_33, Hap_22, Hap_24, Hap_25, Hap_23, Hap_17, Hap_7, Hap_10, Hap_4, Hap_5, Hap_27, Hap_28, Hap_13, Hap_8, Hap_15, Hap_16, Hap_9, Hap_6, Hap_20, Hap_21, Hap_11, Hap_3).

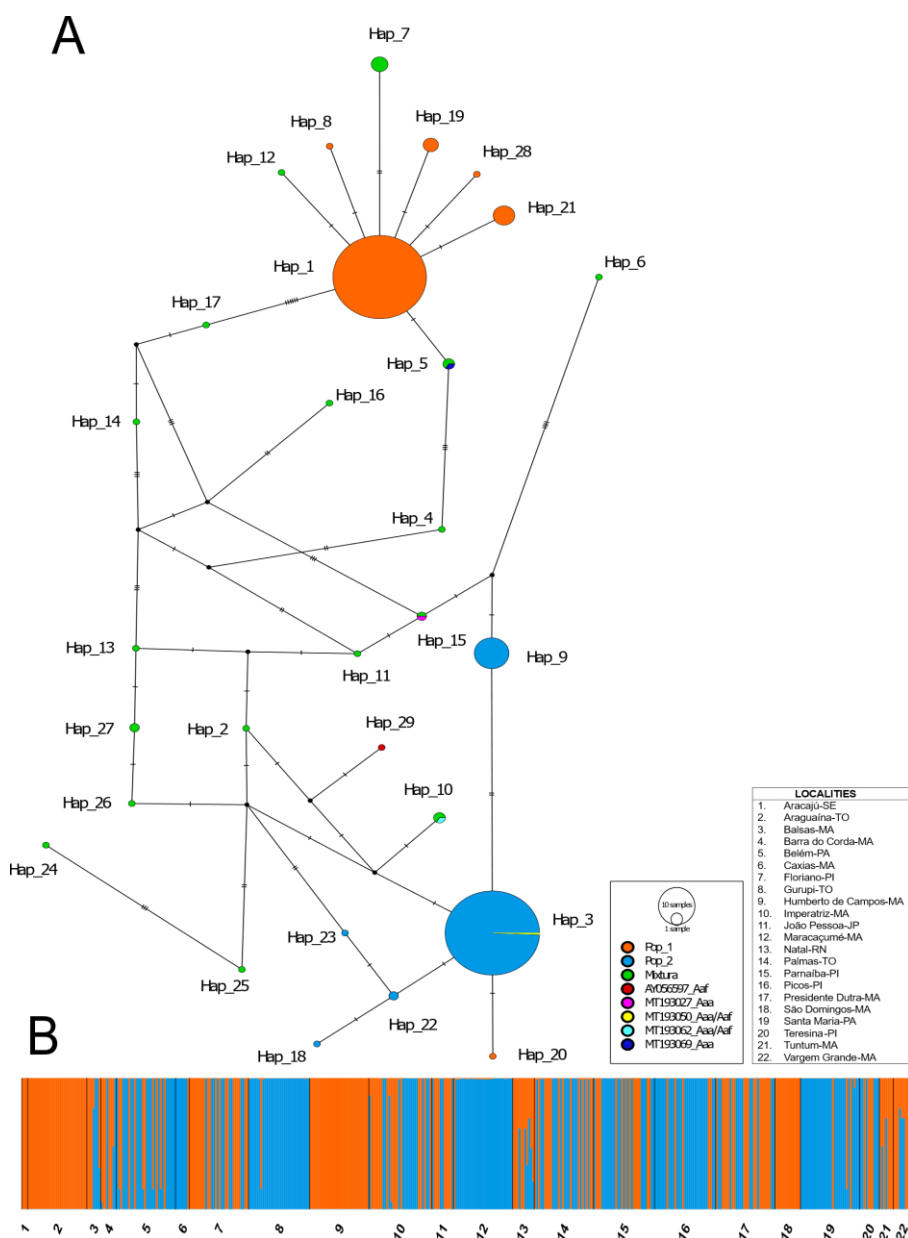
B

Genetic structure of 22 samples. The bar chart shows the proportion of each sample belonging to Pop_1 (orange), Pop_2 (blue), or Mixture (green). The samples are numbered 1 to 22. The legend indicates: 1 sample (orange circle), 2 samples (blue circle), 3 samples (green circle).

LOCALITIES

1. Aracaju-SE
2. Angulima-TO
3. Balsas-MA
4. Barra do Corda-MA
5. Belém-PA
6. Caxias-MA
7. Florianópolis-PI
8. Gurupi-TO
9. Humberto de Campos-MA
10. Imperatriz-MA
11. João Pessoa-JP
12. Maracáçumé-MA
13. Natal-RN
14. Palmas-TO
15. Parnaíba-PI
16. Picos-PI
17. Presidente Dutra-MA
18. São Domingos-MA
19. Santa Maria-PA
20. Teresina-PI
21. Tuntum-MA
22. Vargem Grande-MA

Figura 4. (A) Rede de haplótipos das relações genéticas entre 28 haplótipos de *A. aegypti* para o gene COI. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência dos haplótipos. Em destaque os haplótipos Hap 3, Hap 5, Hap 10 e Hap 15 que são idênticos a amostras das subespécies Aaa e Aaf do Sudão. O haplótipo Hap 29 corresponde a cepa laboratorial da subespécie Aaf da África Ocidental. Em laranja os haplótipos da população genética 1, em azul os haplótipos da população genética 2, e em verde, os haplótipos formados por indivíduos que apresentam a composição genética dos dois clusteres com base na análise do Structure. (B) Estrutura genética do gene COI para as 452 amostras de *A. aegypti* nas 22 localidades amostradas nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Cada indivíduo é representado por uma barra vertical, a altura de cada barra representa a probabilidade de atribuição a cada um dos clusters, K = 2, conforme determinado no método Delta K.



Estrutura genética populacional

A AMOVA apresentou resultados bem similares nas duas hierarquias testadas. Quando todas as amostras foram consideradas um único grupo, a maior variação foi dentro das populações para os dois genes (ND4= 56.17%, $F_{ST}=0.43834$, $p=0.0000\pm0.0000$ - COI= 60.76%, $F_{ST}=0.39242$, $p=0.0000\pm0.0000$). Nas amostras agrupadas com base na distribuição dos grupos genéticos, a maior variação para o gene ND4 foi entre grupos (47.99%, $F_{CT}=0.47788$, $p=0.0000\pm0.0000$) e para o gene COI foi dentro das populações (48.60%, $F_{ST}=0.51399$, $p=0.0000\pm0.0000$). (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para o gene ND4 a partir das amostras de *A. aegypti* obtidas nas regiões Norte e Nordeste do Brasil.

Grupo de amostras	Fonte de variação	Componentes da variação	Porcentagem da variação (%)	Índice de fixação
Todos	Entre as populações	1.26830	43.83	$*F_{ST} = 0.43834$
	Dentro das populações	1.62512	56.17	
Dois grupos: Linhagem1 Linhagem 2	Entre grupos	1.78928	47.99	$*F_{CT} = 0.47788$
	Entre populações dentro dos grupos	0.32978	8.81	$*F_{SC} = 0.16869$
	Dentro das populações	1.62512	43.40	$*F_{ST} = 0.56596$

A significância da análise foi testada em 10.000 permutações aleatórias. Os índices de fixação (F_{ST}) nas populações, (F_{CT}) entre grupos, (F_{SC}) entre populações dentro dos grupos. $*P = 0.00000 \pm 0.00000$.

Tabela 7. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para o gene COI a partir das amostras de *A. aegypti* obtidas nas regiões Norte e Nordeste do Brasil.

Grupo de amostras	Fonte de variação	Componentes da variação	Porcentagem da variação (%)	Índice de fixação
Todos	Entre as populações	1.33587	39.24	$*F_{ST} = 0.39242$
	Dentro das populações	2.06832	60.76	
Dois grupos: Linhagem1 Linhagem 2	Entre grupos	1.76496	41.47	$*F_{CT} = 0.41473$
	Entre populações dentro dos grupos	0.42241	9.93	$*F_{SC} = 0.16959$
	Dentro das populações	2.06832	48.60	$*F_{ST} = 0.51399$

A significância da análise foi testada em 10.000 permutações aleatórias. Os índices de fixação (F_{ST}) nas populações, (F_{CT}) entre grupos, (F_{SC}) entre populações dentro dos grupos. $*P = 0.00000 \pm 0.00000$.

Nas distâncias genéticas (F_{ST}) par a par, a maioria das comparações foram estatisticamente significativas ($P < 0.05$), os valores variaram de moderados a altos. Para o gene ND4 os valores variaram de 0.095 (Parnaíba-PI /Picos-PI) a 1.000 (Araguaína-TO/Grurupi-TO e Gurupi-TO/São Domingos-TO) e para o gene COI os valores variaram de 0.106 (Belém-PA/Santa Maria-PA) a 0.951 (Araguaína-TO/Grurupi-TO) ([ver tabela 8](#)).

Os valores de migrantes por geração (Nm) para o gene ND4 variou $Nm=0.000$ (Araguaína-TO/Gurupi-TO) ao infinito entre várias localidades e para o gene COI variou $Nm=0.033$ (Araguaína-TO/Caxias-MA e Caxias-MA/Humberto de Campos-MA) ao infinito entre várias localidades ([ver tabela 9](#)). O isolamento genético por distância (IBD) realizado com base no teste de Mantel não foi significativo entre as localidades das amostras de *A. aegypti* nos dois genes analisados (ND4, $r= 0.0151$ $P=0.114$ - COI, $r= 0.0005$ $P=0.415$).

Tabela 8. Distância genética par a par (F_{ST}) para as 22 localidades onde foram obtidas amostras de *A. aegypti* nas regiões Norte e Nordeste. Os valores para o gene ND4 estão na diagonal abaixo e os valores para o gene COI estão na diagonal acima.

Populações	ARAC	ARA	BAL	BCO	BEL	CAX	FLO	GUR	HCA	IMP	JPE	MAR	NAT	PAL	PAR	PIC	PDU	SDO	SMA	TER	TUN	VGR
ARAC		0.000	0.204	0.045	0.492	0.761	0.067	0.913	0.000	0.237	0.090	0.863	0.115	0.267	0.341	0.694	0.138	0.613	0.810	0.378	-0.04	0.003
ARA	0.126		0.675	0.506	0.679	0.937	0.307	0.951	0.000	0.464	0.487	0.923	0.512	0.498	0.557	0.818	0.379	0.838	0.892	0.735	0.437	0.410
BAL	0.137	0.266		-0.09	0.064	0.231	-0.04	0.611	0.675	-0.06	-0.09	0.536	0.016	-0.04	-0.02	0.290	-0.06	0.528	0.441	-0.05	0.104	0.039
BCO	0.381	0.631	-0.01		0.197	0.381	-0.07	0.704	0.506	-0.01	-0.10	0.623	0.004	0.000	0.061	0.424	-0.06	0.396	0.565	0.048	-0.03	-0.02
BEL	0.533	0.646	0.283	0.080		-0.01	0.199	0.208	0.679	0.051	0.146	0.232	0.303	0.055	-0.003	0.039	0.128	0.611	0.106	-0.04	0.381	0.334
CAX	0.712	0.840	0.412	0.188	-0.02		0.352	-0.003	0.937	0.158	0.313	0.128	0.459	0.151	0.068	-0.08	0.267	0.869	-0.07	0.029	0.613	0.544
FLO	0.202	0.313	-0.004	-0.06	0.162	0.264		0.578	0.307	0.020	-0.06	0.524	0.061	0.035	0.084	0.389	-0.02	0.290	0.487	0.075	0.012	0.005
GUR	0.995	1.000	0.806	0.810	0.319	0.324	0.656		0.951	0.395	0.633	0.187	0.729	0.389	0.301	0.047	0.506	0.928	0.007	0.369	0.835	0.785
HCA	0.090	0.172	0.253	0.575	0.633	0.815	0.306	0.985		0.464	0.487	0.923	0.512	0.498	0.557	0.812	0.379	0.838	0.892	0.735	0.437	0.410
IMP	0.352	0.470	0.105	-0.04	0.024	0.094	0.020	0.486	0.460		-0.02	0.344	0.116	-0.02	-0.01	0.207	-0.01	0.403	0.302	-0.04	0.139	0.112
JPE	0.112	0.219	-0.03	-0.005	0.279	0.402	-0.008	0.773	0.213	0.104		0.560	0.037	-0.01	0.029	0.365	-0.06	0.388	0.498	0.011	0.011	-0.004
MAR	0.831	0.886	0.618	0.484	0.152	0.086	0.488	0.238	0.872	0.313	0.603		0.671	0.316	0.266	0.132	0.453	0.892	0.186	0.309	0.774	0.729
NAT	0.112	0.294	0.092	0.196	0.444	0.571	0.147	0.889	0.273	0.276	0.091	0.733		0.142	0.187	0.501	0.076	0.393	0.616	0.181	0.098	0.028
PAL	0.466	0.586	0.214	0.022	-0.02	0.005	0.100	0.383	0.574	-0.008	0.211	0.214	0.380		-0.01	0.200	-0.003	0.437	0.298	-0.04	0.165	0.143
PAR	0.467	0.584	0.219	0.027	-0.02	0.001	0.107	0.368	0.571	-0.004	0.217	0.204	0.383	-0.03		0.118	0.031	0.491	0.205	-0.06	0.235	0.200
PIC	0.758	0.830	0.535	0.365	0.050	-0.03	0.394	0.133	0.817	0.210	0.522	0.069	0.663	0.102	0.095		0.312	0.764	-0.01	0.089	0.595	0.549
PDU	0.261	0.379	0.031	-0.06	0.097	0.187	-0.02	0.590	0.370	-0.01	0.027	0.417	0.194	0.045	0.051	0.317		0.340	0.411	0.012	0.061	0.042
SDO	0.027	0.000	0.164	0.449	0.557	0.748	0.225	1.000	0.103	0.377	0.135	0.845	0.183	0.492	0.492	0.776	0.285		0.852	0.609	0.395	0.359
SMA	0.982	0.991	0.787	0.776	0.293	0.277	0.637	0.071	0.976	0.465	0.756	0.190	0.874	0.361	0.345	0.112	0.570	0.987		0.212	0.719	0.669
TER	0.642	0.770	0.392	0.189	0.027	0.005	0.257	0.384	0.751	0.115	0.380	0.199	0.531	0.045	0.043	0.075	0.190	0.674	0.353		0.259	0.214
TUN	0.172	0.376	0.033	0.191	0.441	0.606	0.115	0.954	0.297	0.253	0.041	0.765	0.104	0.371	0.374	0.687	0.167	0.225	0.938	0.543		-0.04
VGR	0.387	0.569	0.055	0.019	0.250	0.374	0.071	0.819	0.533	0.108	0.093	0.576	0.231	0.195	0.198	0.503	0.077	0.431	0.796	0.379	0.173	

Em preto estão os valores de F_{ST} que apresentaram o valor significativo ($P < 0.05$) entre as comparações. Em negrito estão as variações do menor e maior valor de F_{ST} significativo observados entre as localidades.

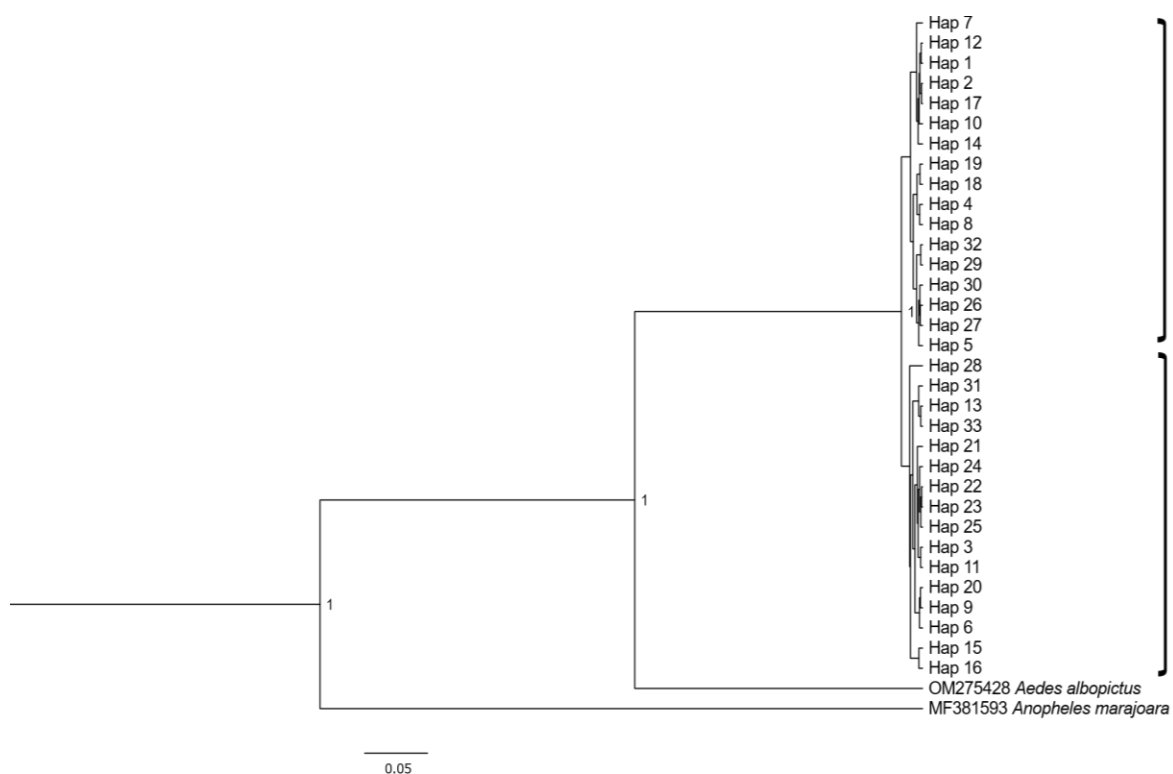
Tabela 9. Número efetivo de migrantes por geração (Nm) entre as localidades das regiões Norte e Nordeste onde foram obtidas as amostras de *A. aegypti*. Os valores para o gene ND4 estão na diagonal abaixo e os valores para o gene COI estão na diagonal acima.

Populações	ARAC	ARA	BAL	BCO	BEL	CAX	FLO	GUR	HCA	IMP	JPE	MAR	NAT	PAL	PAR	PIC	PDU	SDO	SMA	TER	TUN	VGR
ARAC		inf	1.94	10.5	0.51	0.156	6.91	0.04	inf	1.60	5.02	0.07	3.84	1.37	0.96	0.21	3.10	0.31	0.11	0.82	inf	129.3
ARA	3.46		0.24	0.48	0.23	0.033	1.12	0.02	inf	0.57	0.52	0.04	0.47	0.50	0.39	0.11	0.81	0.09	0.06	0.17	0.64	0.71
BAL	3.14	1.37		inf	7.25	1.662	inf	0.31	0.24	inf	inf	0.43	29.4	inf	inf	1.22	inf	0.44	0.63	inf	4.29	12.2
BCO	0.80	0.29	inf		2.03	0.811	inf	0.20	0.48	inf	inf	0.30	99.9	821.	7.59	0.67	inf	0.76	0.38	9.81	inf	inf
BEL	0.43	0.27	1.26	5.72		0.156	2.01	1.90	0.23	9.21	2.91	1.64	1.14	8.44	inf	12.2	3.38	0.31	4.19	inf	0.81	0.99
CAX	0.20	0.09	0.71	2.15	inf		0.91	inf	0.03	2.66	1.09	3.39	0.58	2.79	6.78	inf	1.36	0.07	inf	16.2	0.31	0.41
FLO	1.97	1.09	inf	inf	2.58	1.39		0.36	1.12	24.1	inf	0.45	7.65	13.6	5.39	0.78	inf	1.22	0.52	6.14	39.8	99.0
GUR	0.00	0.00	0.12	0.11	1.06	1.04	0.26		0.02	0.76	0.28	2.17	0.18	0.78	1.15	9.97	0.48	0.03	69.5	0.85	0.09	0.13
HCA	5.00	2.40	1.47	0.36	0.28	0.11	1.13	0.00		0.57	0.52	0.04	0.47	0.50	0.39	0.11	0.81	0.09	0.06	0.17	0.64	0.71
IMP	0.91	0.56	4.22	inf	19.5	4.76	23.8	0.52	0.58		inf	0.95	3.79	inf	inf	1.90	inf	0.74	1.15	inf	3.07	3.94
JPE	3.92	1.78	inf	inf	1.28	0.74	inf	0.14	1.83	4.27		0.39	12.9	inf	16.2	0.86	inf	0.78	0.50	42.1	42.3	inf
MAR	0.10	0.06	0.30	0.53	2.76	5.29	0.52	1.59	0.07	1.09	0.32		0.24	1.08	1.37	3.26	0.60	0.06	2.17	1.11	0.14	0.18
NAT	3.95	1.19	4.88	2.04	0.62	0.37	2.88	0.06	1.33	1.30	4.94	0.18		3.01	2.16	0.49	6.05	0.76	0.31	2.25	4.55	17.3
PAL	0.57	0.35	1.82	21.8	inf	85.5	4.46	0.80	0.37	inf	1.86	1.82	0.81		inf	1.99	inf	0.64	1.17	inf	2.51	2.97
PAR	0.56	0.35	1.77	17.6	inf	325.8	4.16	0.85	0.37	inf	1.80	1.94	0.80	inf		3.73	15.5	0.51	1.92	inf	1.62	1.99
PIC	0.15	0.10	0.43	0.86	9.33	inf	0.76	3.25	0.11	1.87	0.45	6.70	0.25	4.35	4.71		1.10	0.15	inf	5.06	0.34	0.40
PDU	1.41	0.81	15.3	inf	4.61	2.16	inf	0.34	0.85	inf	17.5	0.69	2.07	10.5	9.26	1.07		0.96	0.71	40.0	7.68	11.1
SDO	17.7	inf	2.53	0.61	0.39	0.16	1.71	0.00	4.32	0.82	3.18	0.09	2.22	0.51	0.51	0.14	1.24		0.08	0.31	0.76	0.89
SMA	0.00	0.00	0.13	0.14	1.20	1.29	0.28	6.53	0.01	0.57	0.16	2.12	0.07	0.88	0.94	3.94	0.37	0.00		1.85	0.19	0.24
TER	0.27	0.14	0.77	2.13	17.8	84.0	1.43	0.80	0.16	3.82	0.81	2.00	0.44	10.4	10.9	6.09	2.12	0.24	0.91		1.42	1.83
TUN	2.40	0.82	14.4	2.10	0.63	0.32	3.81	0.02	1.17	1.47	11.4	0.15	4.28	0.84	0.83	0.22	2.49	1.71	0.03	0.41		inf
VGR	0.79	0.37	8.43	25.5	1.49	0.83	6.54	0.10	0.43	4.11	4.85	0.36	1.65	2.05	2.02	0.49	5.95	0.65	0.12	0.81	2.37	

Análises Filogenéticas

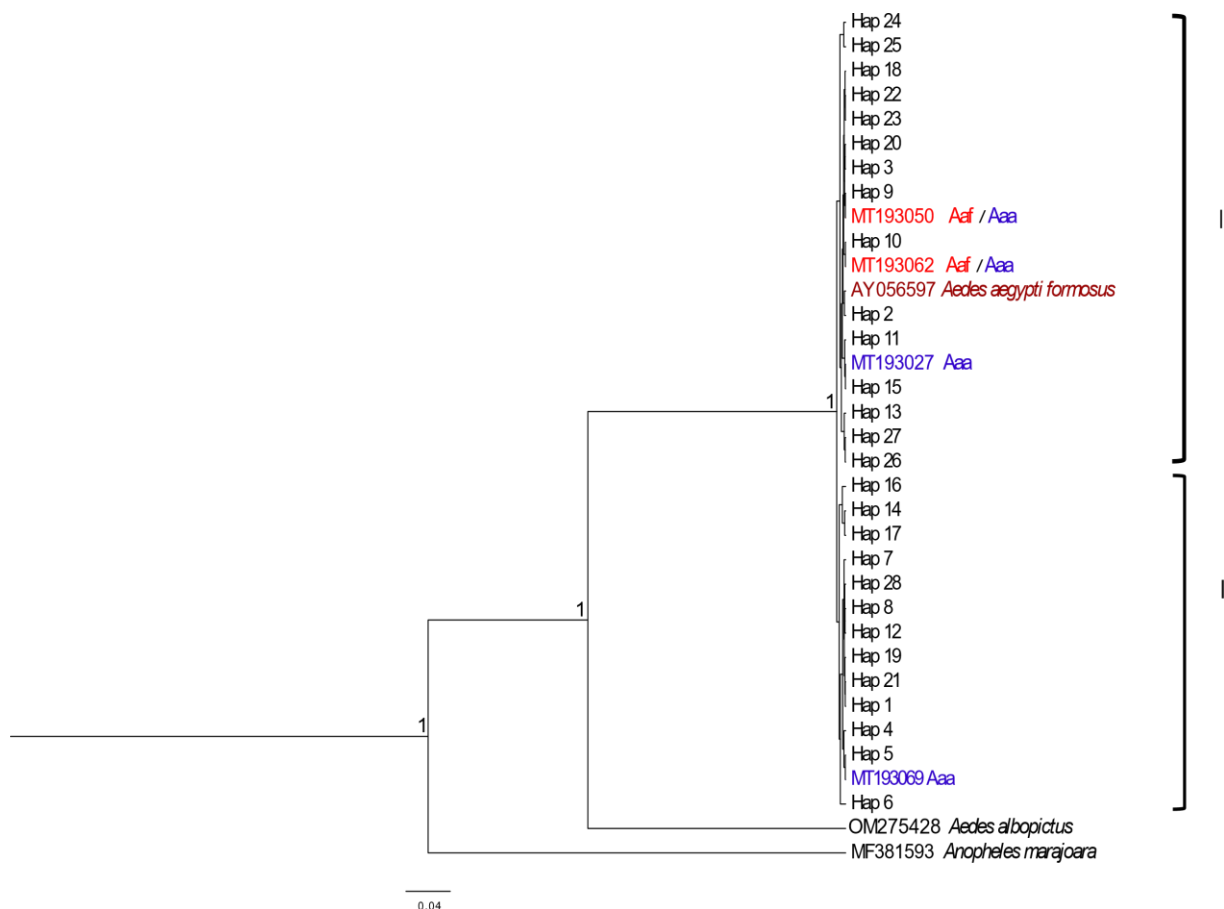
A árvore filogenética para o gene ND4 apresentou dois clados com um alto suporte (BPP=1), o clado I agrupou 16 haplótipos e o clado II agrupou 17 haplótipos (Figura 5), e para o gene COI também apresentou dois clados com um alto suporte (BPP=1), o clado I agrupou 13 haplótipos e o clado II agrupou 15 haplótipos dos nossos haplótipos.

Figura 5. Árvore Inferência Bayesiana com base em 33 haplótipos para o gene mitocondrial ND4 a partir de amostras de *A. aegypti* obtidos nas regiões Norte e Nordeste do Brasil.



Na árvore filogenética do gene COI, as sequências incluídas ficaram distribuídas nos dois clados. Os dois haplótipos referentes a subespécie Aaa agruparam separadamente nos clados I e II, enquanto os dois haplótipos compartilhados pelas subespécies (Aaf/Aaa) e a sequência de Aaf da África Ocidental agruparam no clado II (Figura 6).

Figura 6. Árvore Inferência Bayesiana com base em 28 haplótipos para o gene mitocondrial COI a partir de amostras de *A. aegypti* obtidos nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. As sequências de MT193027, MT193050, MT193062 MT193069 são haplótipos de amostras naturais do Sudão a sequência AY056597 é uma cepa de laboratório da forma florestal originária da África Ocidental.



Discussão

A globalização possibilitou a dispersão de espécies exóticas como é caso de insetos vetores (Bennett et al. 2016), e somado a isso, a modificação da paisagem pelo homem criou nichos nos quais outras espécies puderam se adaptar (Brown et al. 2014). Com isso, a adaptação de insetos vetores de doenças a habitats humanos é um dos fenômenos mais importantes da entomologia médica (Powell e Tabachnick 2013), especialmente o *A. aegypti*, transmissor de muitas arboviroses que se tornou um problema de saúde pública mundial.

O presente estudo revelou um elevado número de haplótipos, altos índices de diversidade genética com a presença de duas linhagens mitocondriais nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Esses resultados são consistentes com os de outros estudos realizados no Brasil ([Scarpassa et al. 2008](#), [Lima Junior e Scarpassa 2009](#), [Twerdochlib et al. 2012](#), [Fraga et al. 2013](#), [Sousa et al. 2017](#), [Rodrigues et al. 2023](#)). Além disso, os nossos achados confirmam a circulação da subespécie Aaf no Brasil. A dinâmica dessas populações no país pode ter consequência na competência do vetor em transmitir novas arboviroses.

Análises de caracterização e diversidade genética para os genes ND4 e COI

Este estudo registra um número maior de haplótipos para os dois genes em relação a outros estudos realizados no Brasil ([Paduan e Ribolla 2008](#), [Scarpassa et al. 2008](#), [Lima Júnior e Scarpassa 2009](#), [Twerdochlib et al. 2012](#), [Fraga et al. 2013](#), [Sousa et al. 2017](#), [Lopes et al. 2021](#)), o grande número de haplótipos é explicado pela ocorrência de vários haplótipos únicos, que pode ser resultado de muitos eventos de colonização e ter consequência direta nos mecanismos de resistência da espécie.

Os genes mitocondriais ND4 e COI são de herança materna, eficazes em análises filogenéticas, eventos de colonização e de evolução molecular ([Aguirre-Obando et al. 2015](#), [Fernado et al. 2020](#)), portanto, ainda que as análises tenham sido separadas, os resultados foram semelhantes como pode ser observado na distribuição espacial e frequência dos haplótipos obtidos ([ver, figuras 1 e 2](#)).

Nos dois genes estudados, os haplótipos Hap 1 e Hap 3 são representantes das duas linhagens genéticas encontradas com uma frequência de cerca de 40% nas amostras analisadas e ampla distribuição na área de estudo. Essas linhagens genéticas estão dispersas em outras regiões do Brasil e do mundo. Portanto são haplótipos de ocorrência global, descendentes de linhagens ancestrais que foram introduzidos nessas regiões em diferentes momentos ao longo da colonização das américas e fixaram alelos que resistiram as campanhas de erradicação ([Powell e Tabachnick 2013](#), [Joyce et al. 2018](#), [Escobar et al. 2022](#), [Sousa et al. 2023](#)).

No gene ND4, o Hap 1 foi observado no Pará por [Lima Júnior e Scarpassa \(2009\)](#), na Bolívia por [Paupy et al. \(2012\)](#), em Alagoas, Ceará, Mato Grosso do Sul, Rondônia e São Paulo por [Paduan e Ribolla \(2008\)](#), e no estado do Paraná por [Twerdochlib et al. \(2012\)](#), além de ter sido recuperado em amostras de Fernando de Noronha e da Colômbia que estão depositadas no Genbank ([Tabela S1](#)).

O haplótipo Hap 3 para o gene ND4 ocorreu na maioria das localidades deste estudo ([ver, figura 1 e tabela 2](#)), e foi observado no Amazonas, Acre, Pará e Roraima por [Lima Júnior e Scarpassa \(2009\)](#), em São Paulo por [Bracco et al. \(2007\)](#) e [Paduan e Ribolla \(2008\)](#), no Paraná por [Twerdochlib et al. \(2012\)](#) e na Colômbia por [Atencia et al. \(2018\)](#).

Os haplótipos Hap 5, Hap 6, Hap 9, Hap 10, Hap 12, Hap 13 e Hap 33 do gene ND4 apesar de terem ocorrido com uma baixa frequência ([ver tabela 2](#)), foram observados nos estudos da Amazônia ([Lima Júnior e Scarpassa, 2009](#)), do Paraná ([Twerdochlib et al. 2012](#)), de várias regiões do Brasil ([Paduan e Ribolla, 2008](#)), da Bolívia ([Paupy et al. 2012](#)), da Colômbia ([Aguirre-Obando et al. 2015](#), [Atencia et al. 2018](#)), de países da América, Ásia e África ([Bracco et al. 2007](#)), da China ([Liu et al. 2019](#)), da Península Arábica ([Khater et al. 2021](#)), da África ([Moore et al. 2013](#)) e do Sri Lanka ([Fernando et al. 2020](#), [Nirmani et al. 2022](#)).

A ampla distribuição desses haplótipos no mundo pode ser explicada pelo transporte passivo de mosquitos mediadas pelo homem a partir de vários países. Esses mosquitos conservaram características mais basais que poderão resistir e conduzir esses haplótipos de baixa frequência a um processo de recolonização no futuro.

O Hap 1 do gene COI foi recuperado na Bolívia por [Paupy et al. \(2012\)](#), já o haplótipo Hap 3 está amplamente distribuído nas regiões estudadas ([ver, figura 1 e tabela 2](#)), e em outros países da África, América do Sul, América do Norte e Ásia ([Paupy et al. 2012](#), [Jaimes-Dueñez et al. 2015](#), [Abuelmaali et al. 2021](#)), os haplótipos Hap 5, Hap 10 e Hap 15 foram observados no Sudão ([Abuelmaali et al. 2021](#)) e Kenia, dados do Genbank ([ver, Tabela S2](#)).

Entre os haplótipos deste estudo que foram idênticos aos haplótipos da subespécie Aaf do continente africano para o gene COI, o Hap 3 foi recuperado em diversas partes do mundo e está amplamente distribuído na área estudada, portanto é um haplótipo remanescente de programas de erradicação, e apesar do surgimento de mutações, as variações desse haplótipo presentes na mesma linhagem genética (Hap 10 e Hap 15) conservaram características genéticas da subespécie silvestre.

O agrupamento da cepa Aaf da África Ocidental ao clado II da árvore filogenética do gene COI, relaciona os haplótipos desse clado a linhagem genética da África Ocidental, corroborando [Scarpassa et al. \(2008\)](#), [Delatte et al \(2011\)](#), [Moore et al. \(2013\)](#) e [Khater et al. \(2021\)](#) que conseguiram associar geneticamente amostras de Aaf com amostras naturais de Aaa em suas investigações.

[Brown et al. \(2014\)](#) em um estudo em larga escala com SNPs observaram introgressões entre as duas subespécies em áreas urbanas da África Ocidental e Central, outros estudos apoiam a evidência de mistura genética das subespécies já que não existem isolamento reprodutivo em condições naturais ([Brown et al. 2011](#), [Brown et al. 2014](#), [Kather et al. 2021](#), [Abuelmaali et al. 2022](#)).

A subespécie Aaf foi registrada na Argentina com possível extensão e região da Bolívia e Paraguai, a proximidade desses países com o Brasil pode justificar a ocorrência da subespécie Aaf em nossa área de estudo. Os autores sugeriram que o comercio e a migração humana pode ter introduzido recentemente o Aaf do continente africano para a Argentina e regiões adjacentes, o que é oportuno, uma vez que o comercio intercontinental e a dispersão de pessoas não ficou limitado a séculos passados, principalmente com o processo de globalização mundial ([Glória-Soria et al. 2016](#)).

As diversidades genéticas para os dois genes são bem similares aos registrados em vários outros estudos ([Bracco et al. 2007](#), [Lima Júnior e Scarpassa 2009](#), [Twerdochlib et al. 2012](#), [Fraga et al. 2013](#), [Sousa et al. 2017](#)), os valores moderados das diversidades nucleotídicas foram influenciados por algumas populações que não apresentaram diversidade genética, ainda assim, os valores apresentados reflete a adaptabilidade da espécie, apesar da pressão seletiva sobre as

populações pelo uso de inseticidas no controle de vetores ([Lima Júnior e Scarpassa 2009](#), [Fraga et al. 2013](#)).

As populações que não apresentaram diversidade genética em suas amostras ([ver tabela 4 e 5](#)), pode ser explicada pelo baixo N amostral em algumas dessas populações ou pelo fato de algumas localidades estarem mais afastadas, isoladas, o que reduz as rotas de dispersão dos mosquitos, e consequentemente, o fluxo gênico ([Maynard et al. 2020](#)).

Os valores significativos dos testes *D* e *F_s* de algumas populações e do teste *D* das populações agrupadas indicaram que essas populações passaram recentemente por uma retração populacional que pode ser decorrente de gargalos genéticos resultantes das campanhas de erradicação ([Sousa et al. 2017](#)). Entretanto, os valores dos testes indicam que as demais populações evoluíram de acordo com o modelo neutro de mutações, e, apesar do elevado número de haplótipos únicos não apresentaram expansão populacional.

[Brady e Hay \(2020\)](#), relatam que misturas genéticas em escala macrogeográfica é frequente, no entanto, eles destacam que em escalas menores, como as cidades, o registro da diversidade genética e até morfológica em populações de *A. aegypti* indica características epidemiológicas importantes, o que é corroborado por nossos resultados, o padrão de diferentes grupos genéticos apresentados em nosso dados reforça a importância de entendermos como as variações locais podem impactar na bionomia da espécie.

A formação de dois grupos genéticos para os genes ND4 e COI ([Figuras S4 e S5](#)), também foi observado em outras investigações ([Calvez et al. 2016](#), [Kotsakiozi et al. 2017](#), [Rodrigues et al. 2023](#), [Abuelmaali et al. 2024](#)), o que reforça que as atividades econômicas intercontinentais e as migrações humanas nos últimos séculos foram cruciais para a dispersão das linhagens genéticas de origem africana. As migrações humanas vêm promovendo a mistura de populações adaptadas até os dias atuais com impacto direto no controle de vetores e na transmissão de doenças ([Eskildsen et al. 2018](#), [Abuelmaali et al. 2024](#)).

Estrutura genética populacional

A maior variação genética dentro das populações é consequência da ampla ocorrência de haplótipos únicos, da mistura genética nas populações estudadas e da introdução contínua de mosquitos de *A. aegypti* nas localidades amostradas como consequência do fluxo gênico ([Sousa et al. 2017](#), [Khater et al. 2021](#), [Rodrigues et al. 2023](#)).

A diversidade genética observada não está relacionada ao modelo de IBD, o que pode ser justificado pelo transporte passivo do vetor com colonização distante, o fato da espécie apresentar um comportamento antropofílico pode potencializar os eventos de dispersão através da migração humana e promover o fluxo gênico ([Khater et al. 2021](#)) como foi observado na maioria das localidades estudadas.

Os valores das distâncias genéticas par a par exibem a complexidade das forças microevolutivas apresentadas neste estudo, as amostras de Araguaína-TO e Gurupi-TO exibiram os maiores índices de distância genética para os dois genes estudados a uma distância de 553Km ([ver Tabela S3](#)), e ausência de migrantes. No entanto, apesar da distância geográfica, observamos uma menor distância genética entre populações de Belém-PA e João Pessoa-PB para os dois genes estudados a uma distância de 1.636Km ([ver Tabela S3](#)), com migrantes ao infinito indicando fluxo gênico contínuo.

O fluxo gênico a longas distâncias foi observado em outras localidades deste estudo, várias atividades do homem contribuem para este fato, as migrações humanas, o transporte de cargas por vias marítima, aérea e terrestre favorecem a dispersão de mosquitos a exemplo do que ocorreu ao longo da colonização das américas. ([Joyce et al. 2018](#), [Maynard et al. 2020](#)). Além das rotas de dispersão outros fatores como urbanização não planejada, uso de inseticidas e variáveis climáticas são condições que dinamizam o mecanismo de resistência, adaptação e fluxo gênico do *A. aegypti* em cada localidade ([Ayala et al. 2020](#), [Khater et al. 2021](#)).

Nas árvores de IB, as duas linhagens mitocondriais foram apresentadas para os dois genes. De acordo com a árvore filogenética do gene COI, as subespécies

Aaf e Aaa formaram subtaxons, interagiram uma com a outra e constituíram o mesmo agrupamento, o que pode corresponder a alguma incongruência biológico-genético como a introgressão entre as subespécies observada por [Kather et al. \(2021\)](#) no estudo das populações da Península Arábica.

Ao longo dos séculos ocorreram eventos adicionais de domesticação da espécie na África decorrentes do processo de urbanização, as populações de *A. aegypti* em muitas regiões urbanizadas são geneticamente mais semelhantes a forma silvestre (Aaf), típicas de florestas, do que a forma domesticada (Aaa) fora da África ([Glória-Soria et al. 2016](#)), como foi observado nos haplótipos do clado II da árvore filogenética do gene COI deste estudo.

A dispersão da forma silvestre fora do continente africano acende um alerta, a introdução de novos patógenos junto com o vetor terá consequências epidemiológicas desconhecidas com impacto direto na saúde das populações locais, além de que, a domesticação e adaptação da forma silvestre no país poderá contribuir para a transmissão de novas arboviroses. Portanto, os nossos dados apontam que estudos dessa natureza são imprescindíveis, pois um monitoramento genético das populações revela como a dinâmica populacional e alta adaptabilidade do vetor pode contribuir na disseminação de doenças a humanos.

Em conclusão, a circulação das duas subespécies incrementou a diversidade genética observada nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, além disso, a dinâmica dessas populações poderá favorecer a circulação de novas arboviroses com impacto direto na saúde da população local. Essas informações são essenciais, pois a implementação de diferentes estratégias de controle de vetores com base nas características genéticas das populações em níveis regionais pode ser mais efetiva no manejo da espécie, e assim, combater de forma mais eficaz a disseminação de arboviroses.

Agradecimentos

A Coordenação Nacional de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de doutorado, processo nº 88887.639719/2021-00. Ao Laboratório de Biologia Molecular (LABMOL) que constitui o Complexo GENBIMOL da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Campus Caxias por todo o suporte durante todas as etapas de desenvolvimento da pesquisa.

Contribuições dos autores

Andreлина Alves de Sousa (conceitualização, curadoria de dados, análise formal, investigação, metodologia, visualização, escrita - rascunho original, escrita - revisão e edição, Paulo Bryguel da Cunha, conceitualização, curadoria de dados, análise formal, investigação, metodologia, visualização, escrita - rascunho original, escrita - revisão e edição, Alessandra Maria Silva Vidigal, conceitualização, curadoria de dados, análise formal, investigação, metodologia, visualização, escrita - rascunho original, escrita - revisão e edição, Walter Pinheiro Mendes Júnior, conceitualização, curadoria de dados, análise formal, investigação, metodologia, visualização, escrita - rascunho original, escrita - revisão e edição, Maria Histelle Sousa do Nascimento, conceitualização, curadoria de dados, análise formal, investigação, metodologia, visualização, escrita - rascunho original, escrita - revisão e edição, Maria Claudene Barros, conceitualização, curadoria de dados, aquisição de financiamento, administração de projetos, recursos, supervisão, visualização, redação - rascunho original, redação - revisão e edição, Elmary da Costa Fraga, conceitualização, curadoria de dados, aquisição de financiamento, administração de projetos, recursos, supervisão, visualização, redação - rascunho original, redação - revisão e edição, Iracilda Sampaio, conceitualização, curadoria de dados, aquisição de financiamento, administração de projetos, recursos, supervisão, visualização, redação - rascunho original, redação - revisão e edição).

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver nenhum conflito de interesse.

Referências

Abuelmaali SA, Jamaluddin JAF, Noaman K, Allam M, Abushama HM, Elnaiem DE, Ishak IH, Wajidi MFF, Jaal Z, Kassim NFA. 2021. Distribution and Genetic Diversity of *Aedes aegypti* Subspecies across the Sahelian Belt in Sudan. *Pathogens*. 10, 78. <https://doi.org/10.3390/pathogens10010078>

Abuelmaali SA, Jamaluddin JAF, Noaman K, Allam M, Abushama HM, Elnaiem DE, Noaman K, Avicor SW, Ishak IH, Wajidi MFF, Jaal Z, Kassim NFA. 2022. Genetic Polymorphism and Phylogenetics of *Aedes aegypti* from Sudan Based on ND4 Mitochondrial Gene Variations. *Insects*, 13, 1144. <https://doi.org/10.3390/insects13121144>

Abuelmaali SA, Mashlawi AM, Ishak IH, Wajidi MFF, Jaal Z, Avicor SW, Kassim NFA. 2024. Population genetic structure of *Aedes aegypti* subspecies in selected geographical locations in Sudan. *Sci Rep* 14, 2978. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-52591-6>

Aguirre-Obando OA, Bona ACD, Duque LJE, Navarro-Silva MA. 2015. Insecticide resistance and genetic variability in natural populations of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) from Colombia. *Zoologia (Curitiba Impresso)*. 32. 14-22. <https://doi.org/10.1590/S1984-46702015000100003>

Altschul S, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.*, 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

Atencia MC, Pérez MJ, Caldera SM, Jaramillo MC, Bejarano EE. 2018. Variabilidad genética de *Aedes aegypti* en el departamento de Sucre, Colombia, mediante el análisis de la secuencia de nucleótidos del gen mitocondrial ND4. *Biomédica [online]*, vol.38, n.2, pp.267-276. ISSN 0120-4157. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3728>

Ayala AM, Vera NS, Chiappero MB, Almirón WR, Gardenal CN. 2020. Urban Populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) From Central Argentina: Dispersal Patterns Assessed by Bayesian and Multivariate Methods. J Med Entomol. Jul 4;57(4):1069-1076. <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa017>

Behura SK, Lobo NF, Haas B, de Bruyn B, Lovin DD, Shumway MF, Puiu D, Romero-Severson J, Nene V, Severson DW. 2011. Complete sequences of mitochondria genomes of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* and comparative analysis of mitochondrial DNA fragments inserted in the nuclear genomes. Insect Biochem. Mol. Biol., 41, 770–777. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.05.006>

Bennett KL, Shija F, Linton YM, Misinzo G, Kaddumukasa M, Djouaka R, Anyaele O, Harris A, Irish S, Hlaing T, Prakash A, Lutwama J, Walton C. 2016. Historical environmental change in Africa drives divergence and admixture of *Aedes aegypti* mosquitoes: a precursor to successful worldwide colonization? Mol Ecol. Sep;25(17):4337-54. doi: 10.1111/mec.13762. Epub 2016 Aug 10. PMID: 27439067.

<https://doi.org/10.1111/mec.13762>

Bessa-Silva, Adam. 2024. Fasta2Structure: a user-friendly tool for converting multiple aligned FASTA files to STRU CTU RE format. BMC Bioinformatics. 25. <https://doi.org/10.1186/s12859-024-05697-7>

Bracco JE, Capurro ML, Lourenço-de-Oliveira R, Sallum MAM. 2007. Genetic Variability of *Aedes aegypti* in the Americas Using a Mitochondrial Gene: Evidence of Multiple Introductions. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 102, 572–579. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007005000062>

Brady OJ, Hay SI. 2020. The Global Expansion of Dengue: How *Aedes aegypti* Mosquitoes Enabled the First Pandemic Arbovirus. Annu Rev Entomol. Jan 7; 65:191-208. Epub 2019 Oct 8. PMID: 31594415. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-024918>

Brasil, 2024. Centro de Operações de Emergências em Saúde Pública e outras Arboviroses – COE. Atualização de Casos de Arboviroses-Dengue. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/aedes-aegypti/monitoramento-das-arboviroses>. Acesso em: 4 jun. 2024.

Brown JE, McBride CS, Johnson P, Ritchie S, Paupy C, Bossin H, Lutomiah J, Fernandez-Salas I, Ponlawat A, Cornel AJ, Black WC, Gorrochotegui-Escalante N, Urdaneta-Marquez L, Sylla M, Slotman M, Murray KO, Walker C, Powell JR. 2011. Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple ‘domestications’ of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. Proc. R. Soc. Lond. B; 278:2446–2454. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.2469>

Brown JE, Evans BR, Zheng W, Obas V, Barrera-Martinez L, Egizi A, Zhao H, Caccone A, Powell JR. 2014. Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. Evolution. Feb;68(2):514-25. Epub 2013 Oct 23. PMID: 24111703; PMCID: PMC3946797. <https://doi.org/10.1111/evo.12281>

Calvez E, Guillaumot L, Millet L, Marie J, Bossin H, Rama V, Faamoe A, Kilama S, Teurlai M, Mathieu-Daudé F, Dupont-Rouzeyrol M. 2016. Genetic Diversity and Phylogeny of *Aedes aegypti*, the Main Arbovirus Vector in the Pacific. PLoS Negl Trop Dis. Jan 22;10(1): e0004374. PMID: 26799213; PMCID: PMC4723151. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004374>

Clement M, Snell Q, Walke P, Posada D. Crandall, K. 2002. TCS: estimating gene genealogies. Proceeding 16th International Parallel Distributed Processing Symposium, p. 184. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x>

Cock PJ, Antao T, Chang JT, Chapman BA, Cox CJ, Dalke A, Friedberg I, Hamelryck T, Kauff F, Wilczynski B, de Hoon MJ. 2009. Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. Bioinformatics. 25(11):1422–3. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp163>

Consoli RAG, Oliveira R. 1994. Principais Mosquitos de Importância Sanitária No Brasil; Editora Fiocruz: Rio de Janeiro, Brazil.

Costa-da-Silva AL, Capurro ML, Bracco JE. 2005. Genetic lineages in the yellow fever mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) from Peru. Mem.Inst. Oswaldo Cruz 100, 539–544. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000600007>

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. JModelTest2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods, 9,772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>

Delatte H, Bagny L, Brengue C, Bouetard A, Paupy C, Fontenille D. 2011. The invaders: phylogeography of dengue and chikungunya viruses *Aedes* vectors, on the South West islands of the Indian Ocean. Infect Genet Evol. Oct;11(7):1769-81. Epub 2011 Jul 29. PMID: 21827872. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.07.016>

Drummond AJ, Suchard AM, Xie D, Rambaut A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. Molecular Biology and Evolution, 29: 8, 1969–1973, 2012. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss075>

Escobar D, Ortiz B, Urrutia O, Fontecha G. 2022. Genetic Diversity among Four Populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Honduras as Revealed by Mitochondrial DNA Cytochrome Oxidase I. Pathogens, 11, 620. <https://doi.org/10.3390/pathogens11060620>

Eskildsen GA, Rovira JR, Smith O, Miller MJ, Bennett KL, McMillan WO, Loaiza J. 2018. Maternal Invasion History of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* into the Isthmus of Panama: Implications for the Control of Emergent Viral Disease Agents. PLoS ONE, 13, e0194874. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194874>

Espinal MA, Andrus JK, Jauregui B, Waterman SH, Morens DM, Santos JI, Horstick, O, Francis LA, Olson D. 2019. Emerging and Reemerging Aedes-Transmitted Arbovirus Infections in the Region of the Americas: Implications for Health Policy. *Am. J. Public Health*, 109, 387–392. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2018.304849>

Excoffier L, Smouse P, Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genet.* 131, 479–491. <https://doi.org/10.1093/genetics/131.2.479>

Excoffier L, Lischer HEL. 2010. Arlequin Suite Ver 3.5: A New Series of Programs to Perform Population Genetics Analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>

Fernando HSD, Hapugoda M, Perera R, Black IV WC, De Silva BGDNK. 2020. Mitochondrial metabolic genes provide phylogeographic relationships of global collections of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *PLoS ONE*. 15 (7): e0235430. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235430>.

Fraga EC, Oliveira DRS, Aragão DG, Schneider H, Sampaio I, Barros, M.C. 2013. Genetic Variability and Evidence of Two Distinct Lineages of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) on São Luís Island in Maranhão, Brazil. *Open Trop. Med. J.*, 6, 11–18. doi. 10.2174/1874315301306010011.

Fu YX. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147, 915–925. <https://doi.org/10.1093/genetics/147.2.915>

Gloria-Soria A, Ayala D, Bheecarry A, Calderon-Arguedas O, Chadee DD, Chiappero M, Coetzee M, Elahee KB, Fernandez-Salas I, Kamal HA, Kamgang B, Khater EI, Kramer LD, Kramer V, Lopez-Solis A, Lutomiah J, Martins A Jr, Micieli MV, Paupy C, Ponlawat A, Rahola N, Rasheed SB, Richardson JB, Saleh AA, Sanchez-Casas RM, Seixas G, Sousa CA, Tabachnick WJ, Troyo A, Powell JR. 2016. Global genetic

diversity of *Aedes aegypti*. Mol Ecol. Nov;25(21):5377-5395. Epub 2016 Oct 14. PMID: 27671732; PMCID: PMC5123671. <https://doi.org/10.1111/mec.13866>

Guzman MG, Gubler DJ, Izquierdo A, Martinez E, Halstead SB. 2016. Dengue infection. Nat Rev Dis Primers. Aug 18; 2: 16055. PMID: 27534439. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.55>

Hall T. 2011. BioEdit: An important software for molecular biology. GEF Bulletin of Biosciences, 2, 60–61. <https://doi.org/10.1002/prot.24632>.

Jaimes-Dueñez J, Arboleda S, Triana-Chávez O, Gómez-Palacio A. 2015. Spatio-Temporal Distribution of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Mitochondrial Lineages in Cities with Distinct Dengue Incidence Rates Suggests Complex Population Dynamics of the Dengue Vector in Colombia. PLoS Negl Trop Dis 9(4): e0003553. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003553>

Joyce AL, Torres MM, Torres R, Moreno M. 2018. Genetic Variability of the *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Mosquito in El Salvador, Vector of Dengue, Yellow Fever, Chikungunya and Zika. Parasites Vectors, 11, 637. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3226-5>

Khater EIM, Baig F, Kamal HA, Powell JR, Saleh AA. 2021. Molecular Phylogenetics and Population Genetics of the Dengue Vector *Aedes aegypti* From the Arabian Peninsula. J Med Entomol. Nov 9;58(6):2161-2176. PMID: 34313761. <https://doi.org/10.1093/jme/tjab112>

Kopelman NM, Mayzel J, Jakobsson M, Rosenberg NA, Mayrose I. 2015. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. Mol Ecol Resour. Sep;15(5):1179-91. Epub. Feb 27. PMID: 25684545; PMCID: PMC4534335. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12387>

Kotsakiozi P, Gloria-Soria A, Caccone A, Evans B, Schama R, Martins AJ, Powell JR. 2017. Tracking the Return of *Aedes aegypti* to Brazil, the Major Vector of the Dengue,

Chikungunya and Zika Viruses. PLoS Negl. Trop. Dis., Jul 25;11(7):e0005653. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005653>

Kraemer MUG, Reiner RC, Brady OJ. et al. 2019. Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. Nat Microbiol 4, 854–863. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0376-y>

Leigh JW, Bryant D. 2015. POPART: Full-feature software for haplotype network construction. Methods in Ecology and Evolution, 6(9), 1110–1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>

Li Z, Wang J, Cheng X, Hu H, Guo C, Huang J, Chen Z, Lu J. 2021. The worldwide seroprevalence of DENV, CHIKV and ZIKV infection: A systematic review and meta-analysis. PLoS Negl Trop Dis 15(4): e0009337. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009337>

Lima Júnior RS, Scarpassa VM. 2009. Evidence of two lineages of the dengue vector *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon, based on mitochondrial DNA ND4 gene sequences. Gen. Mol. Biol. 32, 414–422. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572009005000036>

Liu, P., Lu, L., Jiang, J., Guo, Y., Yang, M., Liu, Q. 2019. The expanding pattern of *Aedes aegypti* in southern Yunnan, China: insights from microsatellite and mitochondrial DNA markers. Parasit Vectors. Nov 27;12(1):561. PMID: 31775906; PMCID: PMC6880496. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3818-8>

Lopes TBF, Amaro TR, Silva BP, Zequi JAC, Vilas-Bôas GTV, Silva MAN, Vilas-Boas BT, RosanR. 2021. Genetic study in *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) from Londrina (Paraná State, Brazil): an approach to population structure and pyrethroid resistance. Revista Brasileira de Entomologia. 65. <https://doi.org/10.1590/1806-9665-RBENT-2020-0088>

Maitra A, Cunha-Machado AS, de Souza Leandro A, da Costa FM, Scarpassa VM. 2019. Exploring Deeper Genetic Structures: *Aedes aegypti* in Brazil. *Acta Trop*, 195, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.04.027>

Mantel N, 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27, 209–220.7.

Maynard AJ, Ambrose L, Bangs MJ, Ahmad R, Butafa C, Beebe NW. 2023. Population structure and invasion history of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Southeast Asia and Australasia. *Evol Appl.* Mar 25;16(4):849-862. PMID: 37124090; PMCID: PMC10130559. <https://doi.org/10.1111/eva.13541>

Moore M, Massamba S, Goss L, Burugu MW, Sang R, Kamau LW, Kenya EU, Bosio C, Munoz ML, Sharakova M, Black WC. 2013. Dual African origins of global *Aedes aegypti* s.l. populations revealed by mitochondrial DNA. *PLOS Negl.Trop. Dis.* 7, 2175. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002175>

Morlais I, Severson DW. 2002. Complete mitochondrial DNA sequence and amino acid analysis of the cytochrome C oxidase subunit I (COI) from *Aedes aegypti*. *DNA Seq.* Apr;13(2):123-7. PMID: 12180346. <https://doi.org/10.1080/10425170290030051>

Neigel J. 2002. Is Fst obsolete?. *Conservation Genetics.* 3. 167-173. doi.10.1023/A:1015213626922.

Nirmanani MD, Madushani NWKD, Perera NS, Dangalle CD, Galhena GH. 2022. Population genetic and phylogeographic relationships of the dengue vector *Aedes aegypti* inferred from three localities of Sri Lanka. *Sri Lankan Journal of Biology.* 7. 8 - 25. 10.4038/sljb.v7i2.98.

Njaime, FCBFP 2022. Revisão dos manuais do Ministério da Saúde visando o controle de *Aedes aegypti*: levantamento de lacunas técnicas, sugestão de atualização de conteúdos e proposta de uso racional de metodologias e/ou tecnologias em planos de contingência para controle de mosquitos vetores de arboviroses urbanas. Dissertação

(Mestrado Profissional) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Vigilância e Controle de Vetores, 106f.

Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, 2012. UGENE team. Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 28(8), 1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>

Paduan KS, Ribolla PEM, 2008. Mitochondrial DNA polymorphism and hetero-plasmy in populations of *Aedes aegypti* in Brazil. *J. Med. Entomol.* 45, 59–67.

Paupy C, Le Goff G, Brengues C, Guerra M. Revollo J, Barja Simon Z, Hervé JP, Fontenille D. 2012. Genetic Structure and Phylogeography of *Aedes aegypti*, the Dengue and Yellow-Fever Mosquito Vector in Bolivia. *Infect. Genet. Evol.*, 12, 1260–1269. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.04.012>

Powell JR, Tabachnick WJ 2013. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*;108 Suppl :11-7. PMID: 24473798; PMCID: PMC4109175. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130395>

Powell JR. 2016. Mosquitoes on the move. *Science*, 354, 971-972. doi [10.1126/science.aal1717](https://doi.org/10.1126/science.aal1717)

Powell JR, Gloria-Soria A, Kotsakiozi P. 2018. Recent History of *Aedes aegypti*: Vector Genomics and Epidemiology Records. *Bioscience*. Nov 1;68(11):854-860. Epub 2018 Oct 31. PMID: 30464351; PMCID: PMC6238964. <https://doi.org/10.1093/biosci/biy119>

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>

Puechmaille SJ. 2016. The program structure does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: subsampling and new estimators

alleviate the problem. *Mol Ecol Resour* 16: 608–627. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12512>.

Python Software Foundation. Tkinter—GUI Programming in Python. Documentation. Python 3.5. <https://docs.python.org/3/library/tkinter.html>

Rambaut A. 2014. FigTree v1.4.2. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (acessado em 10 de junho de 2024).

Rambaut A, Suchard MA, Xie D, Drummond AJ. 2014. Tracer v1.6, Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer> (acessado em 10 de junho de 2024).

Reiter P, Amador MA, Anderson RA, Clark GG. 1995. Short report: dispersal of *Aedes aegypti* in an urban area after blood feeding as demonstrated by rubidium-marked eggs. *Am J Trop Med Hyg.* Feb;52(2):177-9. PMID: 7872449. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1995.52.177>

Rodrigues LF, Sousa AA, Mendes Júnior WP, Cardoso e Silva AC, Nascimento, MHS, Barros MC, Sampaio I, Fraga EC. 2023. Genetic Differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Areas with High Rates of Infestation in Mid-North Region of Brazil. *Insects*, 14, 530. <https://doi.org/10.3390/insects14060530>

Rousset F. 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics.* 145: 1219–1228. <https://doi.org/10.1093/genetics/145.4.1219>

Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-Delbarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., Sánchez-Gracia, A. 2017. DnaSP v6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Molecular Biology Evolution.* 34: 3299-3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>

Sanger, F., Nichlen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain terminationinhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 5463–5468.
<https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>

Santos, J.M.M., Contel, E.P.B., Keer, W.E., 1981. Biologia de anofelinos amazônicos. I– Ciclo biológico, postura e estádios de *Anopheles darlingi*, Root, 1926 (Diptera:Culicidae) da Rodovia Manaus/Boa Vista. Acta Amaz. 11, 789–797.
<https://doi.org/10.1590/1809-43921981114789>

Scarpassa VM, Cardoza TB, Cardoso RP. 2008. Population Genetics and Phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg., 78, 895–903. doi 10.4269/ajtmh.2008.78.895

Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. Nature Biotech. v. 18, p. 233-234. <https://doi.org/10.1038/72708>

Sim S, Jupatanakul N, Ramirez JL, Kang S, Romero-Vivas CM, Mohammed H, Dimopoulos G. 2013. Transcriptomic profiling of diverse *Aedes aegypti* strains reveals increased basal-level immune activation in dengue virus-refractory populations and identifies novel virus-vector molecular interactions. PLoS Negl Trop Dis. Jul 4;7(7):e2295. PMID: 23861987; PMCID: PMC3701703.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002295>

Sousa AA, Fraga E, Sampaio I, Schneider H, Barros MC. 2017. Genetic Differentiation in Populations of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) Dengue Vector from the Brazilian State of Maranhão. Revista Brasileira de Entomologia., 61, 51–59.
<https://doi.org/10.1016/j.rbe.2016.10.003>

Sousa AA, Cruz ACR, Silva FS, Silva SP, Neto JPN, Barros MC, Fraga EC, Sampaio, I. 2023. Sequencing and Analysis of the Mitochondrial Genome of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from the Brazilian Amazon Region. Insects, 14, 938.
<https://doi.org/10.3390/insects14120938>

Suchard MA, Lemey P, Baele G, Ayres DL, Drummond AJ, Rambaut A. 2018. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10 Virus Evolution. 4, vey016. <https://doi.org/10.1093/ve/vey016>

Tajima F, 1989. The effect of change in population size on DNA polymorphism. Genetics, 123, 597–601. <https://doi.org/10.1093/genetics/123.3.597>

Tamura K, Stecher G, Kumar S. 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. Molecular Biology and Evolution, 38, 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. Clustal W, improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research hitchhiking and background selection. Genetics 147, 915–925. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>

Twerdochlib A L, Bonna ACD, Leite SS, Chitolina RF, Betina W, Navarro-Silva MA 2012. Genetic variability of a population of *Aedes aegypti* from Paraná, Brazil, using the mitochondrial ND4 gene. Revista Brasileira de Entomologia. 56. 249-256. <https://doi.org/10.1590/S0085-56262012005000030>

Xia X, Xie Z. 2001. Dambe: Data analysis in molecular biology and evolution. Journal of Heredity, 92: 371-373. <https://doi.org/10.1093/jhered/92.4.371>

Tabela Suplementar S1. Haplótipos obtidos nas amostras de *A. aegypti* das regiões Norte e Nordeste do Brasil compartilhados com haplótipos de outros estudos do Brasil e de outros países com base no marcador molecular ND4. Destaque apenas para os haplótipos compartilhados com outros estudos.

HAPLÓTIPOS										
	LOCAL	Hap 1	Hap 3	Hap 5	Hap 6	Hap 9	Hap 10	Hap 12	Hap 13	Hap 33
I	ARAC	09	-	-	-	-	-	-	-	-
	ARA	30	-	-	-	-	-	-	-	-
	BAL	14	01	01	03	-	-	-	-	-
	BCO	03	02	-	-	-	-	-	-	-
	BEL	10	18	-	01	01	-	-	-	-
	CAX	01	08	-	-	-	02	-	-	-
	FLO	19	10	-	-	-	01	-	-	-
	GUR	-	31	-	-	-	-	-	-	-
	HCA	24	-	-	-	-	-	06	-	-
	IMP	15	14	-	-	-	-	-	02	-
	JPE	19	04	-	-	02	-	-	-	-
	MAR	01	15	-	-	06	-	-	-	-
	NAT	04	01	-	-	-	01	-	-	-
	PAL	12	18	-	-	-	-	-	-	-
	PAR	10	18	-	-	-	-	02	-	-
	PIC	05	26	-	-	-	-	-	-	-
	PDU	18	12	-	-	-	-	-	-	-
	SDO	13	-	-	-	-	-	-	-	-
	SMA	-	27	-	03	-	-	-	-	-
	TER	04	03	-	-	-	-	-	-	-
	TUN	08	-	-	-	-	-	-	-	-
	VGR	06	-	-	-	-	-	-	-	01
II	AM	EU650414	EU650410	-	EU650407	EU650409	-	-	EU650405	-
	BO	JQ926718	-	-	-	-	-	-	-	-
	BR 1	AY906835	AY906848	-	AY906850	AY906851	AY906836	-	AY906845	AY906847
	BR 2	EF153744	EF153747	-	-	-	EF153751	-	-	-
	BR 3	KF279680	KF279678	-	-	-	-	-	-	-
	BR 4	-	DQ176847	-	DQ176839	DQ176848	DQ176831	-	-	-
	CH	-	-	-	MK986405	MK986221	-	-	-	-
	CO 1	KM042188	KM042192	-	-	-	-	KM042197	-	-
	CO 2	-	KX580045	-	-	KX580042	-	-	KX580043	-
	CO 3	-	KF241757	-	-	KF241755	-	-	-	-
	FE	MH382105	-	-	-	-	-	-	-	-
	PA	-	-	MW267643	MW267639	-	-	-	MW267642	-
	PR	JN089751	JN089750	-	-	-	JN089749	-	JN089748	-
	SN	-	-	-	-	-	-	-	-	JX427524
	SL 1	-	-	-	KY476396	-	-	-	-	-
	SL 2	-	-	-	MW239047	-	-	-	-	-

I = frequência dos haplótipos obtidos no presente estudo distribuídos nas 22 localidades amostradas para as regiões Norte e Nordeste do Brasil (ARAC=Aracajú-SE, ARA=Araguaína-TO, BAL=Balsas-MA, BCO=Barra do Corda-MA, BEL=Belém-PA, CAX=Caxias-MA, FLO=Floriano-PI, GUR=Gurupi-TO, HCA=Humberto de Campos-MA, IMP=Imperatriz-MA, JPE=João Pessoa-JP, MAR=Maracaçumé-MA, NAT=Natal-RN, PAL=Palmas-TO, PAR=Parnaíba-PI, PIC=Picos-PI, PDU=Presidente Dutra-MA, SDO=São Domingos-MA, SMA=Santa Maria-PA, TER=Teresina-PI, TUN=Tuntum-MA, VGR=Vargem Grande-MA); (-) ausência do haplotipo na referida localidade; II = haplotipos de outros estudos que foram observados no presente estudo (AM=Amazonia, Brasil (Lima Júnior and Scarpassa, 2009); BO=Bolívia (Paupy et al. 2012); BR1=Brasil (Paduan and Ribolla, 2008); BR2=Brasil (GenBank); BR3=Brasil (GenBank); BR4=Brasil (Bracco et al. 2007); CH=China (Liu et al. 2019); CO1=Colombia (GenBank); CO2=Colombia (Atencia et al. 2018); CO3=Colombia (Aguirre-Obando

et al. 2015); FE=Fernando de Noronha, PE, Brasil (GenBank); PA=Península Arábica (Khater et al. 2021); PR = Paraná, Brasil (Twerdochlib et al. 2012); SN=Senegal, África (Moore et al. 2013); SL1=Sri Lanka (Fernando et al. 2020); SL2=Sri Lanka (Nirmani et al. 2022).

Tabela Suplementar S2. Haplótipos obtidos nas amostras de *A. aegypti* das regiões Norte e Nordeste do Brasil compartilhados com haplótipos de outros estudos do Brasil e de outros países com base no marcador molecular COI. Destaque apenas para os haplótipos compartilhados com outros estudos.

HAPLÓTIPOS						
	LOCAL	Hap 1	Hap 3	Hap 5	Hap 10	Hap 15
I	ARAC	03	-	-	-	-
	ARA	30	-	-	-	-
	BAL	03	02	-	-	-
	BCO	04	02	01	-	-
	BEL	06	20	-	-	-
	CAX	01	06	-	-	-
	FLO	19	10	-	-	-
	GUR	-	26	-	-	-
	HCA	30	-	-	-	-
	IMP	15	13	01	02	-
	JPE	07	04	-	-	-
	MAR	01	13	-	-	-
	NAT	04	-	-	-	01
	PAL	14	11	-	-	-
	PAR	13	17	-	-	-
	PIC	-	25	-	-	-
	PDU	18	12	-	-	-
	SDO	03	-	-	-	-
	SMA	02	24	-	-	-
	TER	04	06	-	-	-
	TUN	05	-	-	-	-
	VGR	06	-	-	-	-
II	BO	JQ926703	-	-	JQ926682	-
	BR	JQ926703	-	-	-	-
	CO	-	KM203151	-	-	-
	KE	-	-	-	MW255841	-
	SU	-	MT193050	MT193069	MT193062	MT193027
	TA	-	JQ926691	-	-	-
	USA	-	JQ926684	-	-	-
	VE	-	JQ926701	-	-	-
	VI	-	JQ926685	-	-	-

I = frequência dos haplótipos obtidos no presente estudo distribuídos nas 22 localidades amostradas para as regiões Norte e Nordeste do Brasil (ARAC=Aracaju-SE, ARA=Araguaína-TO, BAL=Balsas-MA, BCO=Barra do Corda-MA, BEL=Belém-PA, CAX=Caxias-MA, FLO=Florianópolis-PI, GUR=Gurupi-TO, HCA=Humberto de Campos-MA, IMP=Imperatriz-MA, JPE=João Pessoa-JP, MAR=Maracaçumé-MA, NAT=Natal-RN, PAL=Palmas-TO, PAR=Parnaíba-PI, PIC=Picos-PI, PDU=Presidente Dutra-MA, SDO=São Domingos-MA, SMA=Santa Maria-PA, TER=Teresina-PI, TUN=Tuntum-MA, VGR=Vargem Grande-MA); (-) ausência do haplotipo na referida localidade; II = haplotipos de outros estudos que foram observados no presente estudo (BO=Bolívia, BR=Brasil, TA=Tailândia, USA=Estados Unidos, VE=Venezuela, VI=Vietnã (Paupy et al. 2012); ; CO=Colômbia (Jaimes-Dueñez et al. 2015); KE=Kenia (GenBank); SU=Sudão (Abuelmaali et al. 2021).

Tabela Suplementar S3. Distância em quilômetros entre as 22 localidades das regiões Norte e Nordeste onde foram obtidas as amostras de *A. aegypti*.

POP	ARAC	ARA	BAL	BCO	BEL	CAX	FLO	GUR	HCA	IMP	JPE	MAR	NAT	PAL	PAR	PIC	PDU	SDO	SMA	TER	TUN	VGR
ARAC	0																					
ARA	1.289	0																				
BAL	1.051	239	0																			
BCO	1.081	376	240	0																		
BEL	1.643	649	737	581	0																	
CAX	956	594	418	219	680	0																
FLO	794	573	343	284	849	215	0															
GUR	1.309	514	571	807	1158	987	860	0														
HCA	1.158	731	617	378	571	251	465	1.185	0													
IMP	1.286	204	271	243	474	458	505	713	546	0												
JPE	478	1468	1231	1157	1636	970	899	1634	1074	1397	0											
MAR	1.387	622	610	392	285	425	616	1128	285	418	1350	0										
NAT	594	1.440	1207	1109	1545	906	868	1655	979	1350	151	1260	0									
PAL	1.235	342	393	620	985	812	699	184	1.005	538	1513	948	1524	0								
PAR	1.022	860	695	479	766	277	450	1264	190	691	890	475	789	1088	0							
PIC	636	752	503	453	1002	323	178	981	544	685	723	751	696	835	459	0						
PDU	1.024	461	299	89	620	133	229	873	320	325	1080	397	1024	694	404	388	0					
SDO	995	458	285	96	652	138	198	855	346	338	1062	431	1011	676	413	362	34	0				
SMA	1.568	652	705	528	94	607	785	1164	478	462	1545	195	1455	991	666	929	556	589	0			
TER	894	633	443	278	750	66	189	1013	284	515	895	490	834	839	264	264	188	182	673	0		
TUN	1.039	447	293	73	608	148	244	867	323	313	1096	386	1042	685	411	406	19	46	544	205	0	
VGR	1.112	621	497	262	559	157	370	1071	117	449	1073	283	993	888	248	476	205	231	473	210	207	0

Norte (Estados: PA=Pará, TO=Tocantins), Nordeste (Estados: MA=Maranhão, PI=Piauí, RN=Rio Grande do Norte, SE=Sergipe).

Figura Suplementar S1. Estimativa de ΔK para as amostras das 22 localidades das regiões Norte e Nordeste do Brasil com base no gene ND4 (número putativo de populações).

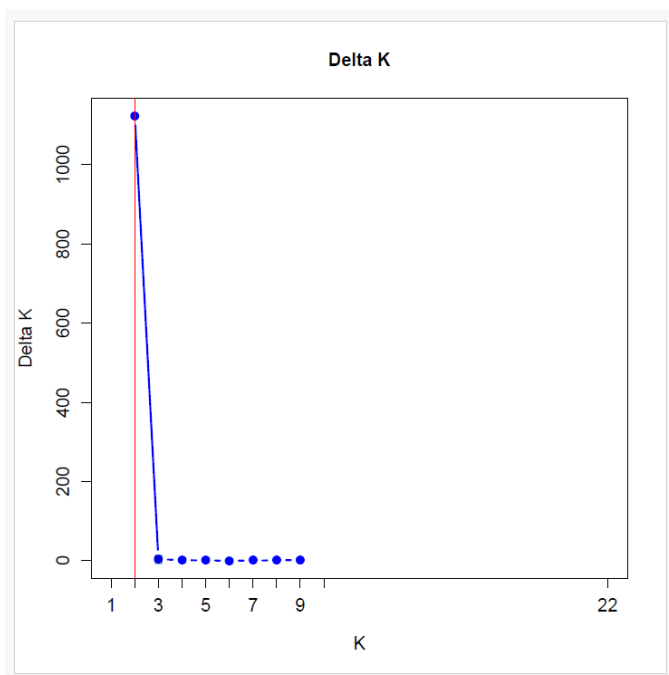
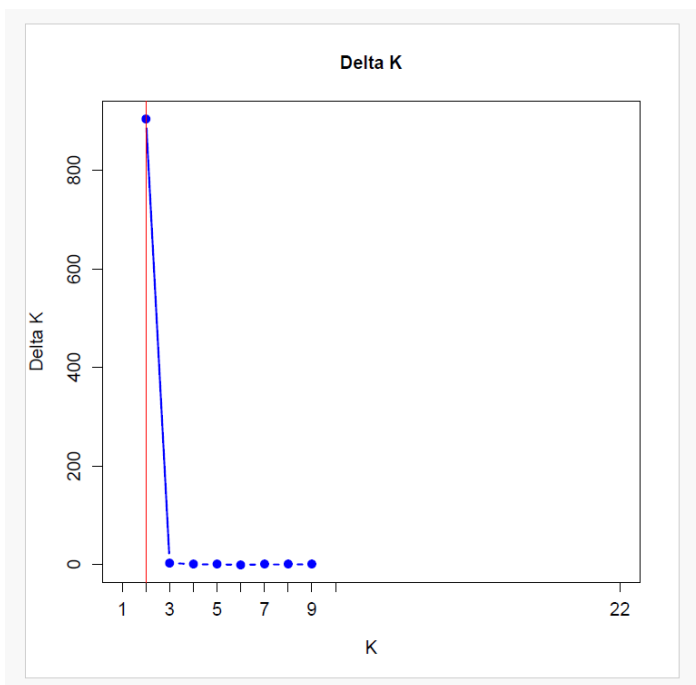


Figura Suplementar S2. Estimativa de ΔK para as amostras das 22 localidades das regiões Norte e Nordeste do Brasil com base no gene COI (número putativo de populações).



[Home](#)[Author](#)[Review](#)

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to

Journal of Medical Entomology

Manuscript ID

JME-2024-0310

Title

Molecular analysis of the mitochondrial lineages of Brazilian populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): insights into the local occurrence of the wild type

Authors

Sousa, Andreлина
Bryguel-da-Cunha, Paulo
Vidigal, Alessandra
Mendes Júnior, Walter
Nascimento, Maria Histelle
Barros, Maria
Fraga, Elmary
Sampaio, Iracilda

Date Submitted

13-Oct-2024

[Author Dashboard](#)

© Clarivate | © ScholarOne, Inc., 2024. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.

ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

 @Clarivate for Academia & Government |  System Requirements |  Privacy Statement | 
Terms of Use | Definições de cookies | Accessibility

CONCLUSÕES FINAIS

Os resultados da caracterização do genoma mitocondrial parcial de um espécime de *A. aegypti* da região nordeste e da diversidade genética de 22 populações de *A. aegypti* provenientes de sete estados das regiões norte e nordeste nos permitem concluir que:

- 🦟 Foi obtido pela primeira vez, o genoma mitocondrial de um representante do *A. aegypti* do nordeste brasileiro, o que representa um avanço importante nas discussões a cerca da taxonomia e da biologia evolutiva da espécie;
- 🦟 A tendência global de seleção purificadora forte, ($dN/dS < 1$), no genoma mitocondrial analisado, sugere que é menos provável que a população evolua rapidamente em resposta a novos tratamentos, uma vez que quaisquer mutações que perturbem funções essenciais serão fortemente selecionadas.
- 🦟 A filogenia do *A. aegypti* construída com 29 mitogenomas de outros táxons identificou um grupo monofilético com representantes da subfamília Culicinae;
- 🦟 Foram recuperados 33 haplótipos para o gene ND4 e 28 haplótipos para o gene COI, representando o maior registro de haplótipos para cada gene em um único trabalho realizado exclusivamente com amostras brasileiras;
- 🦟 Os haplótipos Hap 1 e Hap 3 foram os mais frequentes com ampla distribuição na área de estudo e ainda foram registrados 18 haplótipos únicos para ambos os genes;
- 🦟 Nos dois genes estudados as populações apresentaram altas diversidades haplotípicas e moderadas diversidades nucleotídicas;
- 🦟 A maior variação genética em *A. aegypti* foi dentro das populações para os genes ND4 e COI;
- 🦟 A correlação dos haplótipos obtidos neste estudo com haplótipos do Sudão no continente africano confirmam a ocorrência da subespécie Aaf na América do Sul.
- 🦟 Nas áreas estudadas as populações de *A. aegypti* estão distribuídas em duas linhagens mitocondriais para os genes ND4 e COI.

✈ A circulação das subespécies Aaa e Aaf contribuiu para a diversidade genética observada nas regiões norte e nordeste do Brasil.