

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

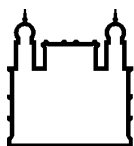
Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Diversidade nucleotídica de fragmentos do gene do canal de sódio regulado por voltagem em populações brasileiras de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894).

Gabriel Joventino do Nascimento

Rio de Janeiro

Julho, 2021.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

*GABRIEL JOVENTINO DO NASCIMENTO*

Diversidade nucleotídica de fragmentos do gene do canal de sódio regulado por voltagem em populações brasileiras de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894).

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária.

Orientador: Dr. Ademir de Jesus Martins Junior

**Rio de Janeiro**

Julho, 2021.

Nascimento, Gabriel Joventino.

Diversidade nucleotídica de fragmentos do gene do canal de sódio regulado por voltagem em populações brasileiras de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894). / Gabriel Joventino Nascimento. - Rio de Janeiro, 2021.

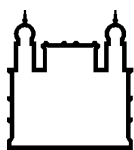
xvii, 87f f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2021.

Orientador: Ademir de Jesus Martins.

Bibliografia: f. 68-87

1. Filogenética Molecular. 2. Mosquito Tigre Asiático. 3. Ecologia de Vetores. 4. Sequenciamento de Nucleotídeos em Larga Escala. 5. Gene Nav. I. Título.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***GABRIEL JOVENTINO DO NASCIMENTO***

DIVERSIDADE NUCLEOTÍDICA DE FRAGMENTOS DO GENE DO CANAL DE SÓDIO REGULADO POR VOLTAGEM EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894).

**ORIENTADOR: Dr. ADEMIR DE JESUS MARTINS**

**Aprovada em: 1º de Julho de 2021**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Rafaela Vieira Bruno - Presidente** (IOC/FIOCRUZ)

**Prof. Dr. Daniel Cardoso Portella Câmara** (IOC/FIOCRUZ)

**Prof. Dr. Marcelo Henrique Santos Paiva** (UFPE/PE)

**Prof. Dr. Mariana Rocha David** (IOC/FIOCRUZ)

**Prof. Dr. Oscar Alexandre Aguirre Obando** (Universidad del Quindío)

Rio de Janeiro, 1º de Julho de 2021



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado em Biologia Parasitária de Gabriel Joventino do Nascimento, sob orientação do Dr. Ademir de Jesus Martins Junior. Ao primeiro dia do mês de julho de dois mil e vinte e um, realizou-se às treze horas, de forma síncrona remota, o exame da dissertação de mestrado intitulada: "**Diversidade nucleotídica de fragmentos do gene do canal de sódio regulado por voltagem em populações brasileiras de *Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse, 1894)***.", no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Ecologia e Epidemiologia, na linha de pesquisa: Epidemiologia de Doenças Infeciosas e Parasitárias e Hospedeiros. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup>. Rafaela Vieira Bruno – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Daniel Cardoso Portela Câmara – IOC/FIOCRUZ, Dr. Marcelo Henrique Santos Paiva – UFPE/PE e como suplentes: Dr<sup>a</sup>. Mariana Rocha David - IOC/FIOCRUZ e Dr. Oscar Alexandre Aguirre Obando - Universidad del Quindío. Após arguir o candidato e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela aprovação da defesa da dissertação de mestrado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, Dr<sup>a</sup>. Rafaela Vieira Bruno a Presidente da Banca atesta a decisão e a participação do aluno e de todos o membros da banca de forma síncrona remota, o Coordenador do Programa Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 01 de julho de 2021.

Dr<sup>a</sup>. Rafaela Vieira Bruno (Presidente da Banca) 

Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa): 

Dedico esta dissertação a todas as vítimas de covid-19, e a todos os profissionais da saúde e cientistas brasileiros que estão arriscando suas vidas para ajudar a salvar a vida de milhões.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Geraldo e Graça, que sempre se esforçaram ao máximo para me proporcionar uma educação de qualidade. Obrigado por todo apoio que me deram para que eu chegasse até aqui. Amo vocês!

Aos meus irmãos Gleyson e Gustavo, por sempre confiarem nas minhas decisões. A toda minha família pelo orgulho e respeito que vocês têm por mim. Em especial ao meu primo Jhonny, por ser um grande amigo com quem eu posso sempre contar e compartilhar as mais diversas situações.

A minha falecida avó Lica, por ter me incentivado e me ensinado tantas coisas. Você foi minha primeira referência de apreciação e cuidado da natureza, assim como de gentileza.

A todos os meus amigos da graduação com quem mantenho laços até hoje, Carol, Andrwey, Tork, Amandinha, Louise, vocês são importantes demais para mim.

Aos amigos que fiz virtualmente em meio a pandemia (*The obsessions*), obrigado por tornarem meus dias de isolamento social mais leves.

A todos os meus colegas de Pós-Graduação, em especial aos Parasitos de esquerda, com quem compartilho parte da árdua caminhada. Vocês são incríveis.

A todos os integrantes do LAFICAVE, por me acolherem tão bem no ambiente de trabalho e por terem me aceitado nessa família. Em especial aos mosquiteiros do Carlos Chagas, Aline, Bárbara, Carlúcio, Dayane, Monique, Luiz, Rafi, Shayene, Ramon, Priscila e Yasmim. Obrigado a todo LAFICAVE por estarem me instruindo a ser um bom profissional.

Às minhas amigas Bárbara e Yasmim, obrigado pela companhia, pela divisão de experiências, pelas ótimas conversas. Yasmim, minha colega de turma e laboratório, obrigado pelo companheirismo e por ter me fortalecido em tantos momentos. Bárbara, minha colega de laboratório e de copo, obrigado pelos melhores porres da vida haha. Certamente com vocês minha trajetória até aqui foi mais feliz.

Aos meus amigos do Alojamento Hélio Fragas, Ramon e Anne, com quem tive o prazer de compartilhar inúmeras alegrias e experiências desde que cheguei no Rio de Janeiro.

Ao Dr. Ademir, meu querido orientador, por ter me ensinado e orientado tanto, sou muito grato por tudo. Obrigado por ter confiado em mim e ter me aceitado em sua equipe, assim como por ter aceitado continuar me orientando no doutorado,



você é uma das minhas referências de excelência profissional. Obrigado também por, junto com a CPG, ter dado tanto suporte em meu estabelecimento na cidade de Rio de Janeiro.

Obrigado a toda equipe de manutenção do Carlos Chagas, vocês são extremamente essenciais. Em especial, gostaria de agradecer a Val e a Ligia, por sempre cuidarem tão bem do nosso laboratório, além de me proporcionarem a primeira dose de serotonina diária ao chegar no laboratório às 7:45 da manhã, com vocês eu começava o dia mais feliz.

À rede de Plataformas Tecnológicas de Fiocruz, em especial, a plataforma NGS. Aline Moreira, Beatriz Muller e Marília, obrigado por toda atenção e suporte dado, este trabalho é nosso, gratidão.

Da mesma forma, ao Dr. Luciano Cosme, por ter contribuído imensamente com sua expertise em Bioinformática, sua colaboração foi essencial para que nosso trabalho fosse concretizado.

À banca examinadora. Primeiramente a Dra. Rafaela Bruno, é imensamente satisfatório ter esta dissertação revisada e avaliada por você, expert em Entomologia Molecular. Guardo carinhosamente sua alegria em ver meu trabalho com *Ae. albopictus*.

Ao Dr. Daniel, que tem vasto conhecimento de biologia e ecologia de *Ae. albopictus*, sendo uma das minhas grandes referências, obrigado por ter me ensinado tanto através dos artigos de sua equipe e ter aceitado participar deste momento importantíssimo da minha formação acadêmica.

Ao Dr. Marcelo, obrigado por aceitar somar seu brilhante conhecimento em genética de vetores a este trabalho. A Dra. Mariana, que junto com a Dra. Rafaela, me acompanhou na qualificação, e é expert em Entomologia Molecular, obrigado por ter aceitado compor a equipe, já aprendi muito em suas aulas.

Ao Dr. Oscar Aguirre, grande referência para mim, aprendi muito com seu trabalho, obrigado por aceitar fazer parte deste. Dito isto, penso que não poderiam ter sido outros, que não fossem vocês, a banca perfeita.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, obrigado pela reciprocidade, eu escolhi vocês e vocês me escolheram. Em especial a CPG, obrigado por me indicarem como bolsista de mestrado FAPERJ Nota 10. Sou muito grato pela oportunidade. Agradeço também a todos que compõem a Secretaria

Acadêmica, em especial a Rita, por sua eficiência e atenção com os alunos do Programa.

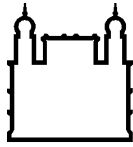
Às agências de fomento à pesquisa, CNPq, FAPERJ, INCT em Entomologia Molecular e CAPES.

À FIOCRUZ, por representar uma Instituição de pesquisa extremamente competente, impactando positivamente na vida de milhões de pessoas no mundo, tenho orgulho de ser um aluno FIOCRUZ.

E finalmente, mas não menos importante, a todos vocês, leitores, obrigado por toda atenção e valorização do conteúdo deste trabalho. Espero que gostem!

Registro estas palavras aqui não só para agradecer no agora, mas para nunca esquecer o quão importante vocês são na minha vida. Obrigado!

“Seja como for, tenhamos uma mente aberta, mas não tão aberta que nossos cérebros desistam.” Richard Dawkins



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

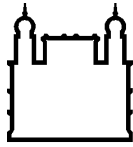
Fundação Oswaldo Cruz

## RESUMO

### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Gabriel Joventino do Nascimento

O mosquito *Aedes albopictus*, originário do continente asiático, é uma das mais bem sucedidas espécies invasoras do mundo, que, embora não seja considerado vetor primário dos principais arbovírus circulantes do Brasil, tem desempenhado um importante papel para a manutenção destes no ambiente, principalmente através da transmissão vertical. Além disto, sua plasticidade ecológica representa um alto fator de risco para a introdução de arbovírus selváticos em áreas urbanas. Atualmente o *Ae. albopictus* se encontra amplamente disseminado no Brasil, apesar de sua introdução recente, criando um cenário interessante e ainda pouco explorado sobre as origens de infestação e a dinâmica evolutiva de suas populações no país. A diversidade no gene do canal de sódio regulado por voltagem ( $Na_V$ ) tem sido muito explorada em insetos vetores, principalmente devido ao interesse sobre alterações relacionadas à resistência a inseticidas piretroides e DDT. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade do gene  $Na_V$  em populações naturais de *Ae. albopictus* de todas as regiões do país. Para tanto, foi organizado um banco de DNA de espécimes de *Ae. albopictus* de 46 populações do Brasil, distribuídas em 20 estados, do qual foram feitos pools de DNA por população, utilizado para amplificar dois fragmentos do gene  $Na_V$  (IIS6 e IIIS6). Estes produtos foram então sequenciados em plataforma Illumina e as sequências resultantes filtradas e organizadas pelo pipeline *SeekDeep*. Foram feitas análises de frequência dos haplótipos observados, alinhamentos entre suas sequências, a fim de se descrever suas peculiaridades, além de inferências filogenéticas para sugerir possíveis relações de origem e derivação entre eles. Ao final, foram utilizadas 2,55 milhões de sequências, gerando uma média de cobertura de 119,5x. Observou-se uma variedade de 20 e 24 diferentes haplótipos para os fragmentos IIS6 e IIIS6, respectivamente, onde apenas substituições sinônimas foram observadas. No geral, a distribuição e as frequências de determinados haplótipos sugeriram uma regionalização. Por exemplo, os haplótipos do segmento IIS6 estão divididos em dois clados, onde um deles está mais concentrado nas populações da região Nordeste do Brasil. Adicionalmente, alguns haplótipos de ambos os segmentos do  $Na_V$  foram encontrados exclusivamente em algumas regiões. Comparações com dados depositados no GenBank, revelaram similaridade de alguns haplótipos encontrados em populações da Malásia. Os resultados desse estudo sugerem ampla diversidade no gene  $Na_V$  em populações de *Ae. albopictus* do Brasil, compatível com múltiplas introduções, além de convergências de variações nucleotídicas em diferentes haplótipos, que podem ser resultantes de algum processo de seleção natural. Análises subsequentes envolvendo marcadores neutros, somadas a este estudo, permitirão melhor definir a dinâmica evolutiva de *Ae. albopictus* do Brasil.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## ABSTRACT

### MASTER THESIS IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

**Gabriel Joventino do Nascimento**

*Aedes albopictus* mosquito, originally from the Asian continent, is one of the most succeeded invasive species in the world, which, although it is not considered a primary vector of the main arboviruses circulating in Brazil, has played an essential role in maintaining these in the environment, primarily through vertical transmission. Furthermore, its ecological plasticity represents a high-risk factor for the introduction of wild arboviruses in urban areas. Currently, *Ae. albopictus* is widely disseminated in Brazil, despite its recent introduction, creating an interesting and still underexplored scenario about the origins of infestation and the evolutionary dynamics of its populations in the country. The Voltage-regulated sodium channel gene ( $Na_V$ ) diversity has been widely explored in vector insects, mainly due to the interest in changes related to resistance to pyrethroid and DDT insecticides. Thus, this study aimed to evaluate the diversity of the  $Na_V$  gene in natural populations of *Ae. albopictus* from all regions of the country. For this purpose, a DNA bank of specimens of *Ae. albopictus* from 46 populations in Brazil, distributed in 20 States, from which DNA pools were made per population, were used to amplify two fragments of the  $Na_V$  gene (IIS6 and IIIS6). These products were then sequenced on an Illumina platform and as filtered sequences organized by the *SeekDeep* pipeline. Frequency and alignment analyses of the observed haplotypes were performed to define their peculiarities, and phylogenetic inferences to suggest possible relationships of origin and derivation among them. In the end, 2.55 million sequences were used, generating an average coverage of 119,5x. A variety of 20 and 24 different haplotypes were observed, for the IIS6 and IIIS6 fragments, respectively, within only synonymous substitutions. The overall haplotypes distribution and frequencies suggested some regionalization. For example, IIS6 haplotypes segments grouped into two clades, with one more distributed in the Northeastern populations. Additionally, some haplotypes of both  $Na_V$  segments were found exclusively in some regions. Comparisons with data deposited in the GenBank revealed similarity of some haplotypes found in Malaysian populations. These research results suggest a broad diversity in the  $Na_V$  gene in Brazilian *Ae. albopictus* populations, compatible with multiple introductions. In addition, the convergences of nucleotide variations in different haplotypes can be the result of natural selection processes. Subsequent analyzes involving neutral markers, added to this study, will allow a better definition of the evolutionary dynamics of *Ae. albopictus* from Brazil.

# ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	3
1.1	<i>Ae. albopictus</i> .....	3
1.2	Dispersão passiva e distribuição de <i>Ae. albopictus</i> .....	5
1.3	Dispersão ativa .....	8
1.4	Plasticidade fenotípica .....	9
1.5	Interações ecológicas.....	10
1.6	Transmissão vertical .....	11
1.7	Controle de <i>Ae. albopictus</i> .....	12
1.7.1	Inseticidas neurotóxicos .....	12
1.8	Resistência a Inseticidas.....	13
1.8.1	Resistência sítio-alvo em piretroides .....	14
1.8.2	Canal de Sódio Regulado por Voltagem (Nav) .....	14
1.9	<i>Knockdown Resistance (kdr)</i> em <i>Ae. albopictus</i> .....	15
2	JUSTIFICATIVA.....	17
3	OBJETIVOS.....	18
3.1	Objetivo Geral .....	18
3.2	Objetivos específicos .....	18
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	19
4.1	Amostragem das populações de <i>Ae. albopictus</i> .....	19
5	Formação do Banco de DNA.....	20
5.1	Amplificação dos fragmentos correspondentes aos segmentos IIS6 e IIS6 do Nav.....	21
5.2	Preparo das bibliotecas e sequenciamento de alto rendimento .....	22
5.3	Análises de dados.....	23
5.3.1	Determinação dos haplótipos para os segmentos IIS6 e IIS6 .....	23
5.3.2	Frequência e distribuição dos haplótipos.....	24

5.3.3	Busca por similaridade .....	25
5.3.4	Análises Filogenéticas .....	25
6	RESULTADOS .....	26
6.1	Criação do banco de DNA de <i>Ae. albopictus</i> do Brasil e formação dos pools de DNA/ população.....	26
6.2	Amplificação de fragmentos correspondentes aos segmentos IIS6 e IIIS6 do Nav e formação dos pools/fragmento/população.....	26
6.3	Sequenciamento: filtragem das sequências e determinação dos haplótipos ...	27
6.4	Diversidade nucleotídica da região IIS6 do Nav .....	28
6.5	Diversidade nucleotídica do segmento IIIS6 do Nav .....	41
6.6	Haplótipos compostos dos segmentos IIS6 e IIIS6 em fase .....	50
7	DISCUSSÃO.....	52
8	PERSPECTIVAS .....	61
9	CONCLUSÕES.....	62
10	ANEXOS.....	63
11	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	68

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo do ciclo de vida do mosquito <i>Ae. albopictus</i> .....	4
Figura 2: O mosquito <i>Ae. albopictus</i> . A. Larvas de terceiro (à direita) e quarto estágio (à esquerda). B. Mosquito fêmea adulto .....	5
Figura 3: Distribuição mundial de <i>Ae. albopictus</i> até o ano de 2015.....	6
Figura 4: Mapa do Brasil indicando o período do primeiro registro de <i>Ae. albopictus</i> nos estados.....	8
Figura 5: Esquema geral representativo do canal de sódio regulado por voltagem ( $Nav$ ), contendo seus quatro domínios (I-IV), cada um com seis segmentos (S1-S6). .....	15
Figura 6: Esquema representando o canal de sódio regulado por voltagem ( $Nav$ ), contendo três dos seus quatro domínios (I-III), cada um com seis segmentos, comparativamente em <i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i> . E = exon. Em vermelho estão as mutações já relacionadas a resistência a piretroides .....	16
Figura 7: Localidades das populações de <i>Ae. albopictus</i> do Brasil utilizadas neste estudo. ....	20
Figura 8: Esquema do canal de sódio regulado por voltagem, com seus quatro domínios (I-IV) e segmentos (S1-S6). Os locais referentes às regiões de amplificação estão indicados com seus respectivos primers (ver tabela 1) .....	22
Figura 9: Esquema representativo do processamento de dados brutos de sequenciamento.....	24
Figura 10: Exemplo de revelação de eletroforese em gel de agarose (1%) corado com Nancy-520 (50x) .....	27
Figura 11: Árvore filogenética da região IIS6 do $Nav$ construída pelo método de máxima verossimilhança, com o modelo de substituição nucleotídica Kimura 2 parâmetros (K2P+I).....	31
Figura 12: Rede de haplótipos da região IIS6 do $Nav$ de <i>Ae. albopictus</i> do Brasil. A rede é baseada na genealogia calculada pelo método TCS .....	32



Figura 13: Frequência de haplótipos do segmento IIS6 do $Na_v$ em populações de <i>Ae. albopictus</i> agrupadas por região do Brasil. ....	36
Figura 14: Distribuição de haplótipos do fragmento IIS6 do gene do canal de sódio de <i>Ae. albopictus</i> do Brasil, classificados em clados A e B.....	38
Figura 15: Distribuição de haplótipos do segmento IIS6 do $Na_v$ em populações de <i>Ae. albopictus</i> do Brasil.....	40
Figura 16: Árvore filogenética da região IIS6 do $Na_v$ construída pelo método de máxima verossimilhança, com o modelo de substituição nucleotídica Kimura 2 parâmetros (K2P+I).....	46
Figura 17: Rede de haplótipos da região IIS6 do $Na_v$ de <i>Ae. albopictus</i> baseada na genealogia calculada pelo método TCS.....	47
Figura 18: Frequência de haplótipos do segmento IIS6 do $Na_v$ em populações de <i>Ae. albopictus</i> agrupadas por região do Brasil. ....	48
Figura 19: Distribuição de haplótipos do segmento IIS6 do $Na_v$ em populações de <i>Ae. albopictus</i> do Brasil. Cada círculo representa uma população avaliada e cada cor representa a frequência de haplótipos na população.....	49
Figura 20: Esquema representando a composição dos haplótipos compostos dos fragmentos dos segmentos IIS6 e IIS6 do $Na_v$ de <i>Ae. albopictus</i> do Brasil, em fase .....	51

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1: Dados das populações de <i>Ae. albopictus</i> avaliadas: localização geográfica, total de sequências obtidas e utilizadas, e identificação na biblioteca NGS. ....	28
Tabela 1: <i>Primers</i> utilizados para amplificação de fragmentos do gene <i>Nav</i> de <i>Ae. albopictus</i> por meio de PCR.....	21
Tabela 2: Dados das populações de <i>Ae. albopictus</i> avaliadas: localização geográfica, total de sequências obtidas e utilizadas, e identificação na biblioteca NGS .....	28
Tabela 3: Diversidade de haplótipos do segmento IIS6 do <i>Nav</i> de <i>Ae. albopictus</i> do Brasil. ....	29
Tabela 4: Frequência dos haplótipos referentes ao segmento IIS6 do <i>Nav</i> de populações Brasileiras de <i>Ae. albopictus</i> .....	34
Tabela 5: Diversidade de haplótipos da região IIIS6 de <i>Ae. albopictus</i> do Brasil.....	42
Tabela 6: Frequência dos haplótipos referentes ao segmento IIIS6 do <i>Nav</i> de populações brasileiras de <i>Ae. albopictus</i> .....	43

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar
ABC	<i>Approximate Bayesian computation</i>
ACh	Acetilcolina
AChE	Enzima acetilcolinaesterase
AS-PCR	Reação em cadeia de polimerase alelo-específica
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CHIKV	Vírus chikungunya
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DENV	Vírus dengue
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	cido desoxirribonucleico
IIIS6	Sexto segmento do terceiro domínio do Nav
IIS6	Sexto segmento do segundo domínio do Nav
Kdr	<i>Knockdown resistance</i>
L1	Primeiro estdio larval
L4	Quarto estdio larval
LACV	Vírus encefalite de La Crosse
LAFICAVE	Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
Na <sup>+</sup>	ns de sódio
Nav	Canal de sódio regulado por voltagem
Nav	Gene do canal de sódio regulado por voltagem
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia de Polymerase
SE	Semana Epidemiológica
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo nico
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
ZIKV	Vírus Zika

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Ae. albopictus*

*Aedes [Stegomyia] albopictus* (Skuse, 1894) é uma espécie de mosquito que pertence à família Culicidae, subgênero *Stegomyia*, do Grupo Scutellaris. Popularmente é conhecido como tigre asiático, porque é originário da Ásia e estava presente em toda região oriental do continente, além de possuir coloração escura e listras brancas nas pernas, cabeça e na região dorsal (1). *Ae. albopictus* possui hábitos diurnos, podendo se alimentar mais de uma vez do mesmo hospedeiro. Seus ovos são resistentes ao calor e à dessecação, e seu ciclo de vida é semelhante ao de *Aedes aegypti* (Figura 1). A fêmea de *Ae. albopictus*, após realizar o repasto sanguíneo, necessário para maturação de seus oócitos, pode ovipor em criadouros naturais ou artificiais (2,3).

Os ovos de *Ae. albopictus* são internamente revestidos por uma cutícula serosa quitinosa formada na embriogênese, que é crucial para a resistência à dessecação dos ovos, sendo a quitina um fator chave para sua impermeabilidade (4,5). A resistência à dessecação é determinada pela taxa de perda de água e tolerância à desidratação, sendo relacionada como uma das características determinantes da expansão de populações de *Aedes* no mundo, mediada pelo processo de urbanização (6–9). Quando os ovos são submersos em água, as larvas eclodem, se alimentando de matéria orgânica e se desenvolvendo por quatro estádios (L1-L4) (Figura 2.A).

Na fase de pupa, o mosquito passa por transformações para a formação da fase adulta. Após dois ou três dias, o mosquito adulto emerge. O tempo total da eclosão do ovo até a fase adulta, em temperatura média de 32 °C, leva em média 7 a 8 dias. A temperatura é um dos principais fatores ambientais determinantes do tempo de duração de cada fase. Por exemplo, em temperaturas de 12 °C, a fase pupal pode durar entre sete e 12 dias, e o período de desenvolvimento completo pode durar até 28 dias. Após a emergência do mosquito adulto (Figura 2.B), ao menos em condições de laboratório, seu período de vida pode variar de 16 a 100 dias (5,10).

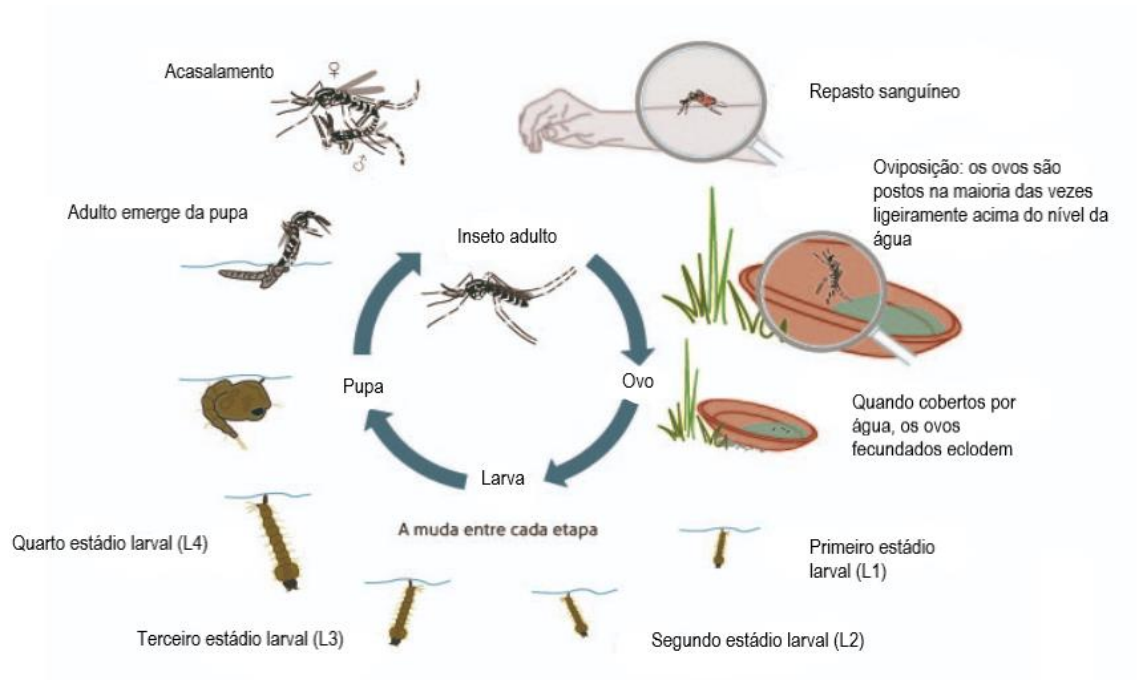


Figura 1: Esquema representativo do ciclo de vida do mosquito *Ae. albopictus*. Fonte: adaptado de (11)

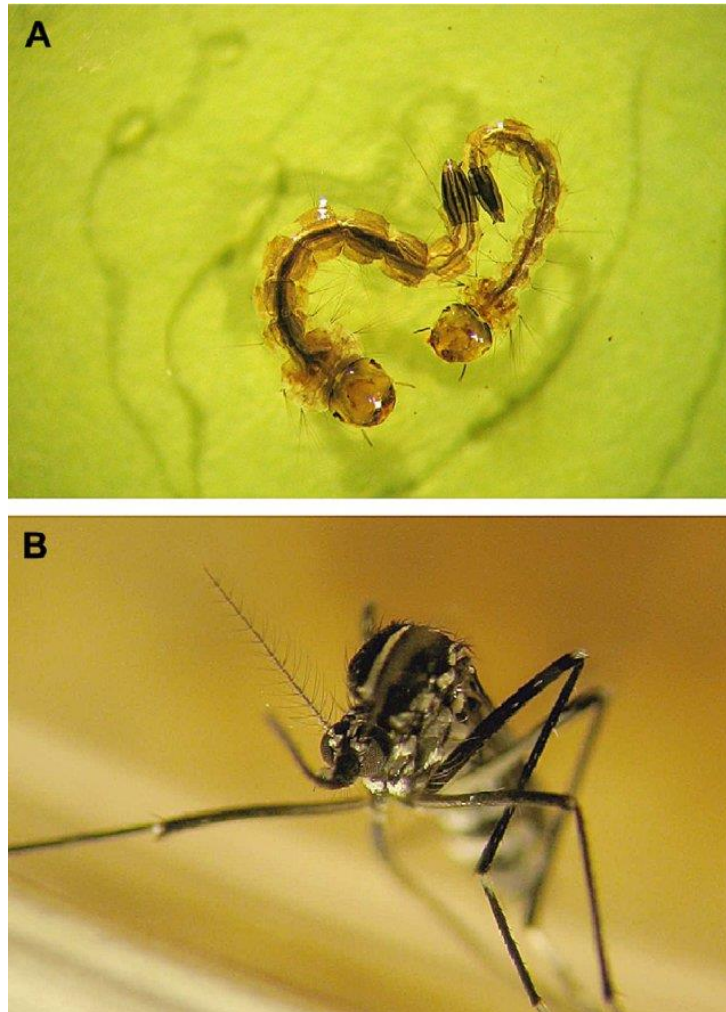


Figura 2: O mosquito *Ae. albopictus*. A. Larvas de terceiro (à direita) e quarto estágio (à esquerda). B. Mosquito fêmea adulto Fonte: (12)

### **1.2 Dispersão passiva e distribuição de *Ae. albopictus***

Nas últimas duas décadas o *Ae. albopictus* se alastrou do sudeste da Ásia para a Europa, África, Oriente Médio, América do Norte e do Sul e atualmente está presente em todos os continentes do mundo, exceto na Antártida (Figura 3). De acordo com análises genéticas, as populações chinesas seriam as mais antigas dentre os países do sudeste asiático (13). *Ae. albopictus* ocupa o 4º lugar na lista das 100 espécies invasoras mais bem sucedidas do mundo, que considerou mais de 10.000 espécies invasoras dos maiores bancos de dados mundiais, quanto à capacidade de propagação e ao potencial impacto ecológico ou econômico (14). A sua introdução em países onde não eram previamente encontrados é considerada

uma ameaça grave, dada sua importância epidemiológica, abordada mais à frente.

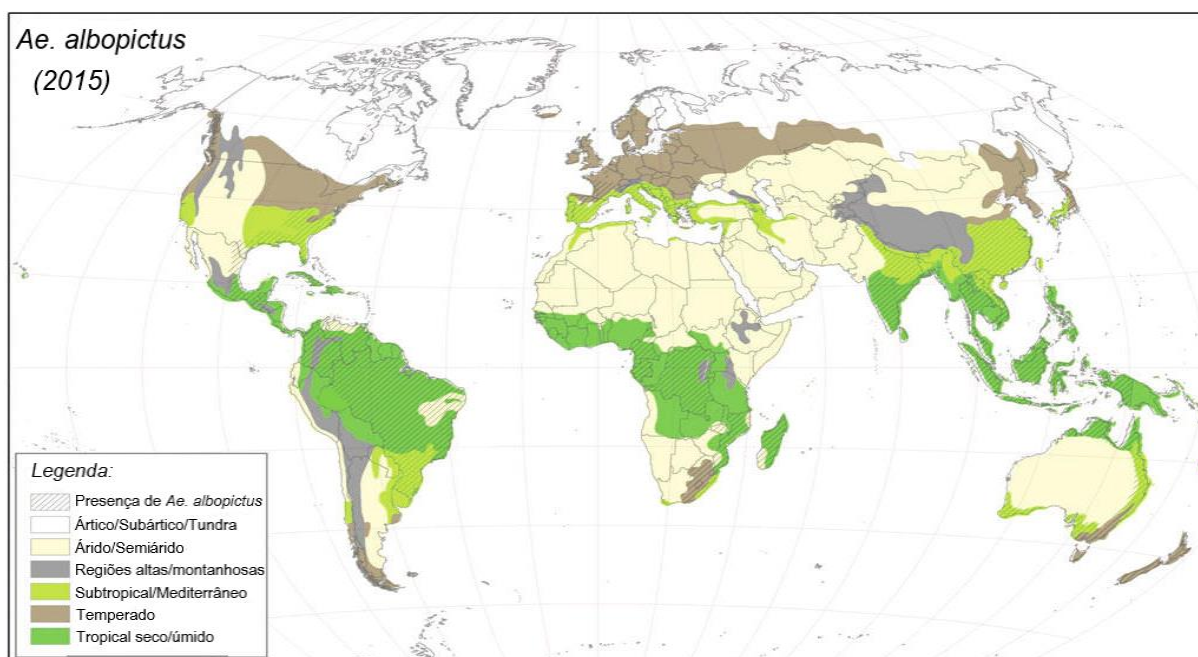


Figura 3: Distribuição mundial de *Ae. albopictus* até o ano de 2015. Fonte: adaptado de (9)

O perfil de dispersão observado em *Ae. albopictus*, assim como em muitos insetos, engloba diferentes métodos. A dispersão entre longas distâncias (intercontinental, por exemplo) ocorre passivamente por meio do transporte em massa de ovos, viabilizados por sua resistência à dessecação. O primeiro registro oficial deste mosquito nos EUA, por exemplo, ocorreu em 1986, em um navio que ancorou no Texas (15). Entretanto, há relatos de que entre 1945 e 1946, navios que chegaram em Los Angeles transportando materiais usados, como pneus, continham espécies de mosquito alóctones, e dentre eles o *Ae. albopictus* (16). Além das vias marítimas, a dispersão de mosquito entre países pode ser facilitada por meio de transportes aéreos, como a já relatada presença de anofelinos e *Aedes taeniorhynchus* em aviões e aeroportos (17,18). Após a chegada de *Ae. albopictus* no Brasil, supõe-se que sua dispersão em média escala tenha ocorrido por meio de ferrovias (5). Estima-se também que a dispersão do mosquito entre cidades seja facilitada pelo fluxo de carros. No entanto, as evidências mostram que esta dispersão depende majoritariamente da densidade de mosquitos em cada região (19).

No Brasil, a primeira notificação de aparição de *Ae. albopictus* foi realizada no estado do Rio de Janeiro, onde cinco espécimes machos e seis fêmeas foram coletados aos 47 km da Rodovia RIO-SP (20). Em 17 de setembro de 1986, três

larvas foram coletadas em um criadouro artificial (vaso de plantas) no município de Areias, em São Paulo (21). No mesmo ano, sua presença também foi registrada em Minas Gerais. No ano seguinte, foi encontrado no Espírito Santo, onde hipoteticamente teria sido a porta de entrada do *Ae. albopictus* no país, chegando com navios que exportam ferro para o Japão (5). Após uma década, no ano de 1996, um exemplar fêmea foi capturado em Curitiba (PR), sendo os primeiros vistos na região Sul (22). No ano seguinte, no mês de dezembro, foram encontradas formas imaturas (três larvas no 4º estágio e cinco pupas) em Vila Cruz Altina, município de Douradina, sendo o primeiro registro do mosquito no Mato Grosso do Sul. O local de coleta dos espécimes foi em um ponto de parada de veículos de grandes cargas, por onde provavelmente a espécie chegou no local (23).

Nas demais regiões do Brasil, os primeiros registros se deram em Recife (PE), no Nordeste do país, entre os anos de 1998 e 1999 (23). Em Sergipe, *Ae. albopictus* foi registrado pela primeira vez em 2011, a 36 km de Aracaju, capital do estado (24). Logo em seguida foi sendo encontrado em quase todos os estados do país (25) (Figura 4). Seu registro mais recente se deu no estado do Amapá, onde a espécie provavelmente foi introduzida pelo porto de Santana, sendo detectada em 2018 a 50 m da borda da floresta e a 500 m do perímetro urbano (26). Assim, até o momento, o Acre é o único estado brasileiro onde *Ae. albopictus* ainda não foi identificado (27–29).



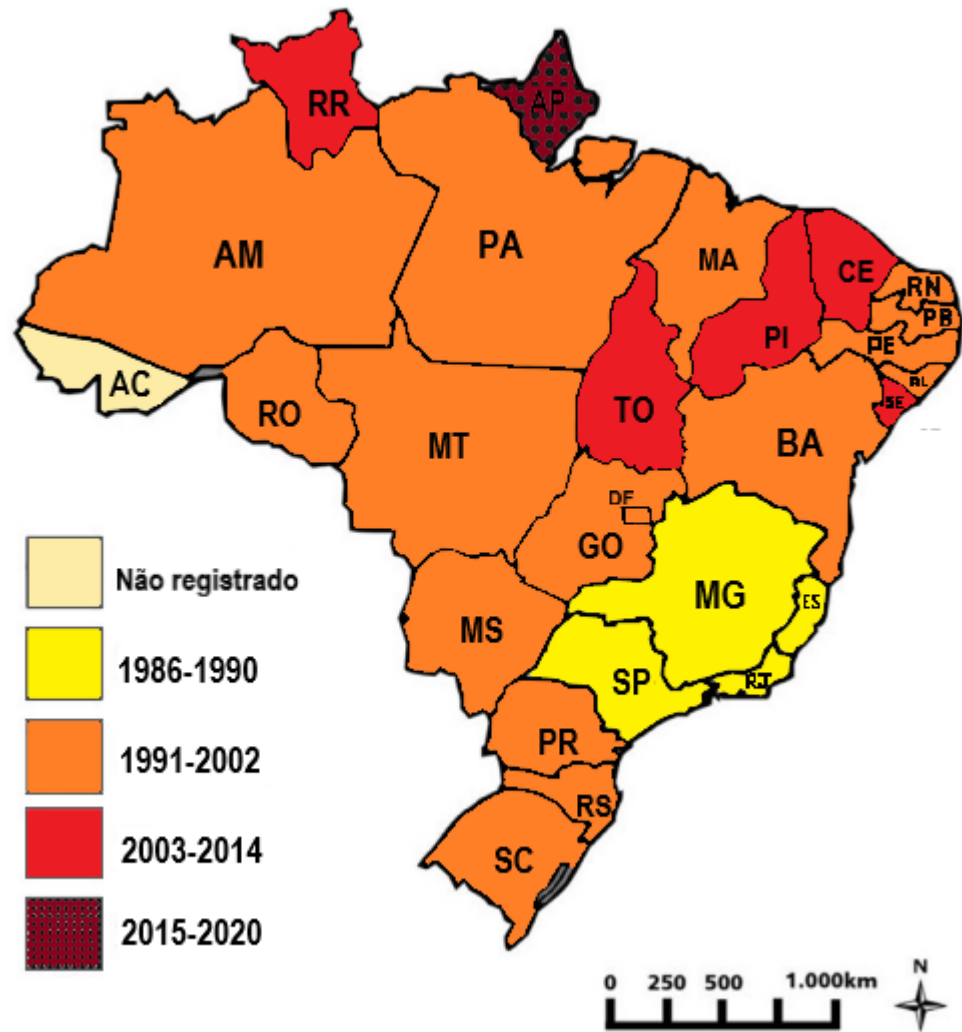


Figura 4: Mapa do Brasil indicando o período do primeiro registro de *Aedes albopictus* nos estados. Fonte: adaptado de (30).

### 1.3 Dispersão ativa

A dispersão de *Ae. albopictus* ao redor do mundo ocorreu de forma passiva, majoritariamente através do transporte de pneus usados e plantas ornamentais (31,32). Entretanto, a dispersão ativa representa um fator de grande importância para sobrevivência local da espécie. O alcance do voo, mesmo que limitado a poucas centenas de metros, influencia diretamente na capacidade de busca de hospedeiro, na fonte de alimentação e na capacidade vetorial, sendo um aspecto importante no processo de domiciliação do vetor e refletindo no direcionamento das estratégias de controle da espécie (33). O voo de mosquitos pode ser influenciado por fatores intrínsecos da espécie, disponibilidade de locais de oviposição, aspectos climáticos (por exemplo, chuva, temperatura, vento e umidade), terreno, vegetação,

características de habitação e fonte de sangue (34). Na Europa, estudos de liberação de espécimes marcados e recaptura estimaram que a dispersão ativa de populações locais acontece rapidamente, e em um raio aproximado de 250 m (35,36). Já na Ásia, estudos similares indicaram que as populações locais (Singapura), se dispersam em cerca de um raio de 320 m do ponto de soltura, em até três dias. Resultados obtidos em estudo semelhante no Brasil, indicaram que fêmeas de *Ae. albopictus* podem voar até pelo menos 800 m em seis dias. Porém, ovos marcados também foram encontrados em áreas até o limite de 1,6 km (37). Esses resultados são significativos para diretrizes de controle vetorial local, onde o raio de dispersão era subestimado a aproximadamente 100 m. Além disso, os autores (35) destacaram a necessidade de abordagens eficazes de vigilância e resposta rápida para conter os riscos associados aos casos virêmicos importados.

#### **1.4 Plasticidade fenotípica**

*Ae. albopictus* é considerado usualmente exofágico, se alimentando preferencialmente fora das casas, e de humanos de forma oportunística (12). Entretanto, estudos mais recentes mostram que a espécie tem exibido comportamento altamente antropofílico, com atividades alimentares diárias bimodais, apresentando comportamento endofílico e exofílico, escolhendo majoritariamente hospedeiros humanos em ocasiões de igual disponibilidade com outros hospedeiros mamíferos (3,33,38,39). Outra importante questão a ser mencionada são os numerosos relatos de alimentação múltipla, onde espécimes são identificadas com repasto sanguíneo de diferentes fontes animais (38,40,41). A plasticidade alimentar relatada em populações de *Ae. albopictus*, apesar do seu antropofilismo, é preocupante. Uma vez que *Ae. albopictus* possui o hábito de se alimentar do hospedeiro que estiver à disposição, desde répteis a mamíferos como o ser humano, suas populações, principalmente em ambientes periurbanos rodeados de mata, podem atuar como porta de entrada de patógenos silvestres em grandes centros urbanos (41–43).

Outro aspecto importante de plasticidade do *Ae. albopictus* é o fenômeno de diapausa, observado principalmente em populações de regiões de clima temperado, permitindo a sobrevivência da prole em locais que passam por invernos vigorosos anualmente. A diapausa é uma resposta fisiológica complexa e dinâmica que

representa uma via de desenvolvimento alternativa composta por um conjunto altamente coordenado de mudanças comportamentais, morfológicas e fisiológicas (44). De fato, a habilidade de realizar diapausa nesta espécie é um importante fator para seu processo de estabelecimento em locais de clima temperado, como já foi observado em locais de temperaturas de até -5 °C (44,45).

### **1.5 Interações ecológicas**

As interações ecológicas que resultam em competição interespecífica entre *Ae. albopictus* e várias espécies, principalmente do mesmo gênero, são dependentes do ambiente, sendo influenciada por diversos fatores. Em populações dos EUA, relações competitivas já foram observadas entre *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti*, *Aedes triseriatus*, *Aedes atropalpus*, *Aedes japonicus* e *Aedes sierrensis* (46–52). Na Itália, a sua co-ocorrência com *Culex pipiens* também é relatada. O *Ae. albopictus* deslocou populações de *Ae. aegypti* nos EUA e é considerado um ótimo competidor, por apresentar vantagens sobre outras espécies em contextos gerais de competição, porém as vantagens que sobretudo são relacionadas à densidade dos vetores, dependem da ecologia e do clima local (28,33,53). As interações de competição ocorrem tanto nos estágios larvais, onde *Ae. albopictus* se destaca por sua capacidade de converter alimento em biomassa, quanto na fase adulta, onde pode ocorrer a chamada satirização. Este fenômeno ocorre quando os machos de *Ae. albopictus* inseminam fêmeas de *Ae. aegypti*, que por sua vez colocam ovos inférteis, o que conseqüentemente contribui para uma provável redução populacional de *Ae. aegypti* (49,51,53–57). Por outro lado, o oposto é pouco observado, sendo inclusive, a origem do macho de *Ae. albopictus* que determina o sucesso da satirização (58). No Brasil, *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* coocorrem em diversos lugares (52,59). No geral, *Ae. albopictus* é considerado um ótimo competidor e apresenta vantagem em relação a todas as espécies citadas, normalmente sua densidade populacional não é afetada negativamente por fatores limitantes para as demais espécies, como a quantidade de alimento. Efeitos complexos podem surgir na vida do mosquito decorrente de competição interespecífica na fase larval. Por exemplo, na co-ocorrência de *Ae. triseriatus* e *Ae. albopictus*, observa-se redução das taxas de longevidade dos mosquitos adultos de *Ae. triseriatus* que se desenvolveram nesse espaço competitivo. Os sobreviventes desta última espécie

são mais susceptíveis à infecção por La Crosse encephalitis vírus (LACV), que causa doença neuro invasiva, endêmica nos EUA (50,51).

### **1.6 Transmissão vertical**

A transmissão de arbovírus que ocorre entre as espécies de hospedeiros vertebrado e artrópode é classificada como transmissão horizontal, enquanto a transmissão de arbovírus do artrópode, como o *Ae. albopictus*, infectado para sua prole é chamada de transmissão vertical (60). Nas estações de secas em áreas tropicais, nas estações frias das regiões temperadas e durante as campanhas de pulverização de inseticidas, condições desfavoráveis são presentes para a expansão de populações de vetores, afetando diretamente a transmissão horizontal de arbovírus entre os vetores e reservatórios. Adicionalmente, a imunidade em rebanho adquirida pelos hospedeiros vertebrados após às epidemias representa um fator limitante para manter altas taxas de transmissão horizontal dos arbovírus no ambiente (60,61). Portanto, devido à necessidade de estudos que mensurem com precisão o impacto da manutenção de arbovírus durante períodos interepidêmicos às epidemias de arbovirose, o número de estudos relacionados ao tema vem aumentando (62). No mais, as hipóteses levantadas estão relacionadas à reintrodução do vírus no ambiente, à circulação deste em espécies hospedeiras desconhecidas (reservatórios) e outros mecanismos de transmissão.

A transmissão vertical, ou transovariana, pode ser o principal fator para a reemergência de dengue e outras arbovirose após períodos não-epidêmicos, como por exemplo no inverno, onde as taxas de transmissão vertical em *Ae. albopictus* costumam ser elevadas e os surtos epidêmicos são menos comuns (7,63). Em outro caso, a ampla disponibilidade de criadouros durante o verão, também pode favorecer a transmissão vertical, seguido de surtos epidêmicos na próxima estação chuvosa (64). No Brasil, o primeiro relato de transmissão vertical em populações naturais de *Ae. albopictus* ocorreu em abril de 1993, quando DENV-1 foi detectado em dois *pools* de larvas de populações de Campos Altos (MG), durante uma ação de vigilância epidemiológica (65). Recentemente, DENV-3 foi detectado em *pools* de machos de *Ae. albopictus*, coletados em diferentes estações, de uma área verde de São Paulo (Parque do Piqueri), uma das cinco cidades mais populosas do mundo. É importante ressaltar que a cidade não teve casos autóctones de DENV-3 nos últimos

anos, evidenciando ainda mais o papel do tigre asiático na manutenção silenciosa do DENV nos ambientes (30). Além de outros casos de infecção natural por arboviroses (66), populações de *Ae. albopictus* também têm demonstrado a habilidade em condições de laboratório. Adicionalmente, há relatos de transmissão vertical de outros arbovírus, como CHIKV (67,68), ZIKV (69–71) e Mayaro (72).

### **1.7 Controle de *Ae. albopictus***

O controle vetorial tem sido priorizado como medida mais eficaz no bloqueio da transmissão de arboviroses, principalmente em períodos epidêmicos ou quando surtos em iminência são detectados (73). As principais formas de controle vetorial baseiam-se em métodos mecânicos, biológicos e químicos, sendo este último o mais utilizado nas últimas décadas. O controle integrado, apresentado pela OMS em 2004, consiste na expansão e utilização de métodos de controle em conjunto, visando melhorar a eficácia, custo-efetividade, solidez ecológica e sustentabilidade do controle de vetores de doenças. Entretanto, por causa da baixa adequabilidade e as limitações operacionais quanto ao uso do controle integrado, o controle é majoritariamente concentrado no uso de inseticidas neurotóxicos. Adicionalmente, a emergência de populações de *Aedes* resistentes a inseticidas no mundo, estimulou a busca por novas tecnologias de controle, como por exemplo: a indução de refratariedade viral por *Wolbachia*; expressão de genes exógenos e modificação dos genes próprios; manipulação genética; técnicas de esterilização de insetos (TEI) (74–77). Portanto, embora o *Ae. aegypti* seja a principal espécie modelo nos estudos que desenvolvem novas tecnologias, existem algumas inovações aplicáveis também ao tigre asiático. Controlar populações de *Ae. albopictus*, particularmente, é um grande desafio. A plasticidade ecológica do vetor, que é refletida na diversidade de possíveis criadouros disponíveis no ambiente peridomiciliar, limita o potencial de ação dos métodos de controle usuais em momentos de epidemia, como a aplicação direta de inseticidas nos criadouros (78). Dessa forma, técnicas de controle estudadas mais recentemente, como o uso da auto disseminação de inseticidas dos mosquitos para os criadouros, podem facilitar nesses casos (79).

#### **1.7.1 Inseticidas neurotóxicos**

Os inseticidas químicos que causam perturbação no funcionamento das sinapses após atingir o sistema nervoso central dos insetos são denominados

neurotóxicos (80). Os principais grupos destes inseticidas, utilizados no contexto de saúde pública, variam em sua composição química e mecanismo de ação, sendo classificados como carbamatos, organoclorados, organofosforados e piretroides (80). Os inseticidas pertencentes à classe dos carbamatos e organofosforados atuam de formas diferentes sobre a enzima acetilcolinesterase (AChE), que é responsável pela hidrólise de acetilcolina (ACh), no contexto da manutenção, ou mais especificamente, da interrupção do impulso nervoso. Os organoclorados são compostos de carbono, hidrogênio e cloro, que atuam sobre o canal de sódio regulado por voltagem (Nav) ou sob o receptor GABA. Os piretroides que são compostos sintéticos derivados do piretro, encontrado em crisântemos, atuam sobre o Nav causando hiperexcitabilidade contínua, seguida de paralisia e morte do inseto, devido à abertura permanente do canal (81).

### **1.8 Resistência a Inseticidas**

A OMS define resistência a inseticidas como a capacidade de uma determinada linhagem de insetos sobreviver a uma dose que normalmente mataria uma população susceptível. Populações resistentes são resultado da pressão seletiva causada pela aplicação dos inseticidas no ambiente, selecionando indivíduos resistentes por gerações sucessivas (80). Os fenótipos resistentes a inseticidas são favorecidos quando os mosquitos são expostos a doses subletais do inseticida. Nessas condições, os indivíduos resistentes têm melhores chances de sobreviver e se reproduzir, devido a alterações de caráter comportamental ou fisiológico.

A resistência dita comportamental se resume praticamente ao inseto evitar o contato com o inseticida, seja pela maior habilidade do inseto em identificar a substância tóxica, gerando uma resposta de fuga, ou ainda pela seleção do hábito de se evitar locais impregnados com inseticida (80). Com relação às alterações fisiológicas, podem ser selecionados um ou mais mecanismos, incluindo i) alterações na cutícula, ii) incremento na detoxificação dos xenobióticos e iii) mudança na estrutura do sítio alvo do inseticida (82). Aspectos moleculares relacionados ao espessamento da cutícula, impedindo que o inseticida entre no organismo do inseto são pouco conhecidos. Por não se tratar de um mecanismo específico, pode afetar uma ampla variedade de compostos (83,84). Já a resistência

metabólica é caracterizada por amplificação, super-expressão ou aumento na especificidade de enzimas detoxificantes, especialmente as das classes glutationa-S-transferases (GST), esterases e oxidases de função mista (ou monooxigenases P450), que são produtos de superfamílias gênicas (85). Desta forma, é permitido ao inseto resistente metabolizar ou degradar os inseticidas antes que eles sejam capazes de exercer seu efeito tóxico (84).

### **1.8.1 Resistência sítio-alvo em piretroides**

Os piretroides são os compostos inseticidas mais utilizados no mundo, principalmente devido a rápida eficácia, a sua biodegradabilidade e sua baixa toxicidade para os humanos. São classificados em tipo I ou II, de acordo com sua estrutura química e seus efeitos perturbadores das sinapses nervosas (81). No entanto, como consequência por seu uso ter se popularizado nas últimas décadas, principalmente em saúde pública, populações de mosquitos resistentes vêm sendo selecionadas. A emergência de populações de vetores resistentes a piretroides inviabiliza o controle (que antes era facilitado) pelo uso dos mesmos (82,86).

### **1.8.2 Canal de Sódio Regulado por Voltagem ( $Na_v$ )**

O  $Na_v$  é uma proteína de membrana composta por quatro domínios, cada um com seis segmentos hidrofóbicos (Figura 5) e possui importante função fisiológica, controlando o influxo de íons de  $Na^+$  nas células, que é fundamental para alterar o potencial elétrico de repouso da membrana celular. O potencial de ação acionado, em parte, pelo influxo de sódio, é essencial para o funcionamento de mecanismos básicos do funcionamento celular, como a transmissão de impulso nervoso. Portanto, os genes dos canais de sódio regulados por voltagem ( $Na_v$ ) são muito conservados ao longo da evolução (81).

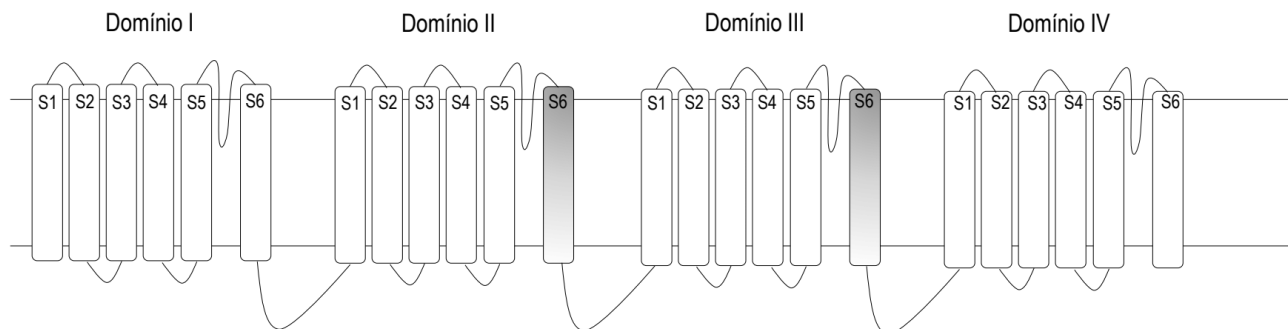


Figura 5: Esquema geral representativo do canal de sódio regulado por voltagem (*Nav*), contendo seus quatro domínios (I-IV), cada um com seis segmentos (S1-S6). Fonte: adaptado de (87).

### 1.9 Knockdown Resistance (*kdr*) em *Ae. albopictus*

No geral, a genotipagem dos sítios *kdr* é feita tendo como referência as principais mutações mais bem relacionadas à resistência a piretroides que ocorrem em *Ae. aegypti*, nos códons 989, 1011, 1016, 1532 e 1534 (Figura 6) (88). A primeira detecção de uma mutação relacionada ao efeito *knockdown* dos piretróides (mutação *kdr*) em *Ae. albopictus* ocorreu a partir da genotipagem de amostras coletadas no ano de 2009 em uma área urbana e arborizada localizada na região central de Singapura, país do sudeste asiático, onde um total de 26 mosquitos foram genotipados para diferentes mutações *kdr* (I1014F, S989P, I1011M ou V, V1016G ou I e F1534C). Dentre os 26 mosquitos, 92,3% apresentaram o polimorfismo F1534C (TTC para TGC), sendo 14 (53,8%) deles homozigotos. A frequência do alelo 1534Cys registrada foi de 71,3 % (89). Alguns anos depois, larvas coletadas nas cidades chinesas de Longtang e Shishan, e então utilizadas em bioensaios com DDT (4%) e deltametrina (0,1%), apresentaram o alelo *kdr* 1534Ser. Os pesquisadores relacionaram a resistência a deltametrina (0,1%), com a presença do alelo *kdr* 1534Ser em homozigose, também sendo verificada uma alta frequência de alelos mutantes (60,53%) em 19 mosquitos vivos após o bioensaio com DDT (4%), correlacionando assim mutações *kdr* com o fenótipo de resistência a deltametrina ou DDT (90).

Em outro exemplo, o programa de vigilância entomológica grego realizou coletas entre os meses de junho e setembro em quatro campos de refugiados localizados na Macedônia Central, em 2017. Entre os insetos coletados, os



espécimes de *Ae. albopictus* foram genotipados para marcadores para *kdr*. As análises incluíram os códons 1532, 1534 e 1016, sendo o alelo 1534Cys detectado em amostras de um dos campos, na frequência de 28,0%. Pools de DNA de ovos também evidenciaram este mesmo alelo *kdr* (78).

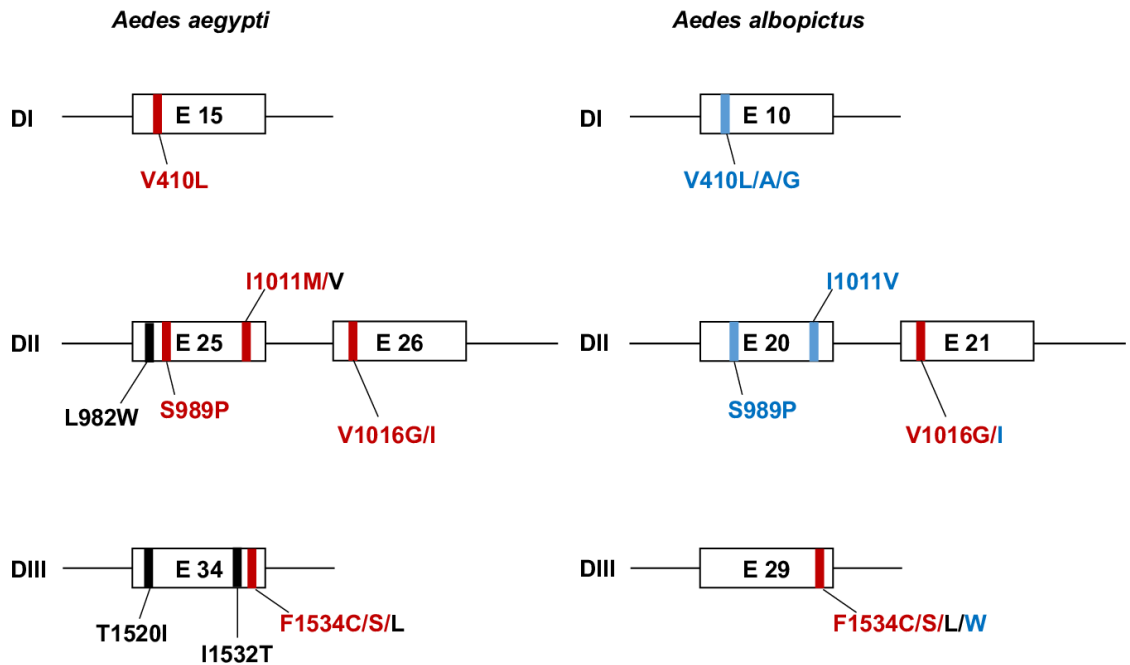


Figura 6: Esquema representando o canal de sódio regulado por voltagem (*Nav*), contendo três dos seus quatro domínios (I-III), cada um com seis segmentos, comparativamente em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. E = exon. Em vermelho estão as mutações já relacionadas a resistência a piretroides. Fonte: (91)

## 2 JUSTIFICATIVA

Embora *Ae. albopictus* seja considerado um vetor de arbovírus menos eficiente em comparação a *Ae. aegypti* (92), o tigre-asiático tem desempenhado um papel significativo nos surtos de Zika na África Central (93) e de Chikungunya na África Central, Ásia e Europa (94–96). Mesmo não tendo sido vinculado à transmissão dos vírus DENV, CHIKV e ZIKV nas Américas, ainda que exista uma evidência limitada, de sua participação em um surto de dengue e Zika em uma área rural do Espírito Santo, no Brasil (97), essa espécie é considerada um potencial vetor na região devido à alta competência vetorial das populações locais para esses arbovírus (52,56,98–102). Apesar de ter sido demonstrado que populações brasileiras de *Ae. albopictus* são competentes para a transmissão de arbovírus, como dengue, Zika, Chikungunya e febre amarela (52,103), não se tem ainda uma definição consensual sobre a real importância de *Ae. albopictus* nas epidemias de arboviroses no país. Portanto, investigar aspectos genéticos relacionados à eficiência do controle químico sobre *Ae. albopictus* é uma forma prudente de se antecipar a uma eventual necessidade de controle emergencial desta espécie. Além disto, a introdução de *Ae. albopictus* no Brasil é recente (menos que quatro décadas), de modo que os estudos envolvendo esta espécie são escassos, quando comparado a *Ae. aegypti*. Nesse sentido, é importante que se conheça com maior detalhamento a diversidade do gene *Nav* em variadas populações de *Ae. albopictus* (visto que a estruturação genética das populações do Brasil é pouco explorada) onde diferentes mutações *kdr* podem ocorrer. A identificação de marcadores genéticos fortemente relacionados à resistência facilita a verificação de populações resistentes por meio de ensaios moleculares, além de contribuir para o conhecimento da dinâmica evolutiva entre diferentes populações. A organização de um banco de DNA criopreservado em laboratório com amostras de populações de *Ae. albopictus* de todas as regiões do Brasil será extremamente útil para qualquer estudo futuro envolvendo genética de populações ou avaliação de marcadores genômicos, tendo em vista que o tigre asiático é um vetor em iminência. Em conjunto, o estudo aqui apresentado, se justifica à medida que contribui para o conhecimento da genética evolutiva, diversidade genética e direcionamentos sobre a introdução e dispersão de populações de *Ae. albopictus* do Brasil.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a diversidade de fragmentos do gene do canal de sódio regulado por voltagem em populações de *Ae. albopictus* do Brasil.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Estabelecimento de um banco de DNA de 50 populações de *Ae. albopictus* do Brasil
- Amplificação e sequenciamento de fragmentos correspondentes aos segmentos IIS6 e IIS6 do Nav de populações de *Ae. albopictus*
- Determinação de haplótipos, inferências filogenéticas e caracterização da diversidade nucleotídica de fragmentos correspondentes aos segmentos IIS6 e IIS6 do Nav de populações de *Ae. albopictus*

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Amostragem das populações de *Ae. albopictus*

As coletas foram realizadas no contexto do programa brasileiro de monitoramento de resistência a inseticidas em *Ae. aegypti*, que ocorreu entre 2017 e 2018, coordenado pelo Ministério da Saúde em parceria com o Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes e Vetores (LAFICAVE), Instituto Oswaldo Cruz (IOC) no Rio de Janeiro (RJ). Os agentes de campo de cada município foram responsáveis pela instalação de armadilhas, que variaram em seus números de acordo com a quantidade de casas em cada município, com a seguinte regra: 100, 150, 200 ou 300 armadilhas para respectivamente, <50, 50-200, 200-500, >500 mil casas.

Os locais de instalação das armadilhas foram estrategicamente escolhidos para que houvesse uma cobertura total do ambiente urbano, a fim de englobar áreas com diferentes níveis de infestação. Uma solução de extrato de levedura a 0,04 % foi usada como um atrativo para fêmeas fecundadas. Os demais detalhes da coleta são bem descritos em outro estudo (104). As palhetas de ovos foram enviadas ao LAFICAVE.

As populações foram rotuladas com códigos e metade de cada população permaneceu no LAFICAVE, enquanto a outra metade foi enviada ao Laboratório de Entomologia Aplicada (LEnA), na Superintendência de Controle de Endemia (SUCEN), em Marília (SP). Em ambos os laboratórios, os ovos foram postos a eclodir para criação das larvas até emergência de adultos, quando então foi feita a triagem das espécies *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. A primeira seguiu para a formação de colônias F1 ver (104), enquanto *Ae. albopictus* foi criopreservada para futura extração de DNA.

Importante destacar que as coletas foram realizadas em centros urbanos. Entre as mais de 140 localidades de coleta (veja (104)), obtivemos amostras de *Ae. albopictus* de pelo menos 50 delas, das quais utilizadas neste estudo foram: Floriano, Parnaíba e Teresina (PI), Salvador e Brumado (BA), Natal (RN), Maceió (AL), Recife e Palmares (PE), Aracaju e Nossa Senhora da Glória (SE), da região Nordeste. Parintins (AM), Jaru, Porto Velho, Cacoal e Boa Vista (RO), Tucuruí,

Itaituba e Santarém (PA), Araguaína e Palmas (TO), Altamira e Redenção (PA), da região Norte. Campos dos Goytacazes, Volta Redonda, Angra dos Reis e Rio de Janeiro (RJ), São Sebastião (SP), Teófilo Otoni (MG), Vitória, Cachoeiro de Itapemirim e Nova Venécia (ES), Governador Valadares e Belo Horizonte (MG), do Sudeste. Brasília (DF), Coxim, Três Lagoas e Dourados (MS), Barra do Garças, Alta Floresta, Água Boa e Confresa (MT), Goiânia, Iporá e Posse (GO) do Centro-Oeste. Londrina (PR), Chapecó (SC), Santa Maria (RS) do Sul do país (Figura 7).



Figura 7: Localidades das populações de *Ae. albopictus* do Brasil utilizadas neste estudo.

## 5 Formação do Banco de DNA

As extrações e purificações de DNA genômico foram realizadas individualmente nos espécimes com kits DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) e, alternativamente, o ZR Tissue & Insect DNA MiniPrep (Zymo Research), de acordo com orientações do fabricante. Após a extração, as amostras foram dosadas no espectrofotômetro NanoDrop™ One da Thermofisher. As amostras foram codificadas e organizadas por população e armazenadas em freezer -20 °C.

Adicionalmente, foram preparadas alíquotas de cada amostra a 20 ng/ $\mu$ L em H<sub>2</sub>O ultrapura para as análises deste estudo.

### 5.1 Amplificação dos fragmentos correspondentes aos segmentos IIS6 e IIIS6 do *Nav*

Primeiramente, obtivemos *pools* (contendo entre dois e 30 mosquitos) de DNA para cada população, a partir de uma alíquota de 20 ng das amostras de suas respectivas localidades. Para as amplificações dos fragmentos pretendidos, foram desenhados *primers* específicos a partir da sequência XM\_029865132.1 (GenBank, NCBI), utilizando o software Geneious 2020.1.2 (105) (<https://www.geneious.com>), a fim de gerarmos um fragmento com aproximadamente 500 pb para ambos os segmentos. À extremidade 5' dos *primers* adicionamos a sequência para inclusão de adaptadores (*hangers*) aos *amplicons*, que em seguida seriam úteis para constituição de biblioteca para sequenciamento em Illumina, como indicado no método *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation* (versão 15044223-B). As sequências dos *primers* se encontram na Tabela 1 e o local representativo dos segmentos do *Nav*, correspondente aos fragmentos amplificados estão indicados na Figura 8.

Tabela 1: *Primers* utilizados para amplificação de fragmentos do gene *Nav* de *Ae. albopictus* por meio de PCR.

<i>Primer</i>	Sequência 5'-3'	Segmento do <i>Nav</i>	Direção
Hang_4,723F	<u>TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTTTC</u> AAGGGCTGGATCCAGA	IIIS6	<i>Forward</i>
Hang_5,198R	<u>GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTTC</u> GAATACTATTGCTTGTGGTCCG	IIIS6	<i>Reverse</i>
Hang_5'para3	<u>TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGACAA</u> TGTGGATCGCTTCCC	IIS6	<i>Forward</i>
Hang_3,398R	<u>GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCG</u> CGATCTTGTTTCGTTTCG	IIS6	<i>Reverse</i>

As ampliações para os fragmentos IIS6 e IIS6 ocorreram em reações independentes e para cada *pool*, utilizando-se o kit contendo DNA Polimerase de alta fidelidade, *Phusion Hot Start Flex DNA Polymerase*. Para cada reação, foram utilizados 60 ng de DNA genômico, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1x do tampão *Phusion HF*, 200 μM de dNTPs, 0,5 ou 1 μM (respectivamente para IIS6 e IIS6) de cada *primer*, 1 U da polimerase (0,25 μL), 3 % de DMSO e água ultrapura tipo I, em um volume suficiente para atingir total de 25 μL de reação. As condições da PCR foram as seguintes: 98 °C durante 30 segundos, seguido de 35 ciclos de 98 °C por 10 segundos, 56 ou 60 °C (respectivamente para IIS6 e IIS6) por 15 segundos e 72 °C por 30 segundos, com uma extensão final a 72 °C durante 7 minutos.

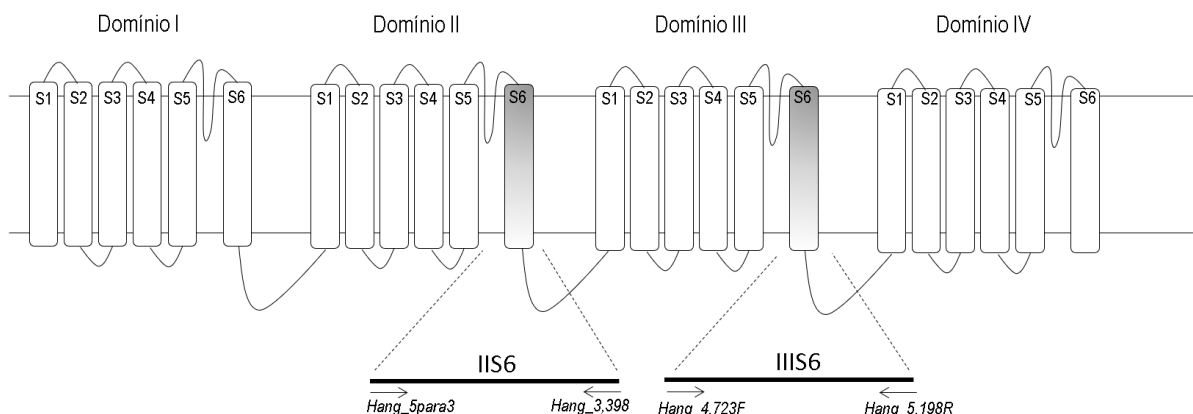


Figura 8: Esquema do canal de sódio regulado por voltagem, com seus quatro domínios (I-IV) e segmentos (S1-S6). Os locais referentes às regiões de amplificação estão indicados com seus respectivos primers (ver tabela 1). Fonte: adaptado de (87)

## 5.2 Preparo das bibliotecas e sequenciamento de alto rendimento

Os amplicons de ambas as regiões foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1%) e em seguida as bandas de DNA correspondentes aos fragmentos amplificados (aproximadamente 500 pb) foram excisadas e purificadas com o kit GeneJET Gel Extraction (Thermo Scientific), seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, quantidades equimolares do DNA extraído e purificado das bandas de ambas as reações IIS6 e IIS6 foram adicionadas para compor o *pool* de cada população. Estes pools foram enviados para a Plataforma de Sequenciamento de Nova Geração - RPT01J, que deu prosseguimento à preparação das bibliotecas e ao sequenciamento. De acordo com os procedimentos da Plataforma, a qualidade

e a concentração dos *amplicons* na mistura 'IIS6 + IIS6' das 46 populações foram analisadas pelo sistema Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent). Para preparação das bibliotecas, ao material referente a cada população foi adicionada uma sequência de DNA específica (*barcode*), com uso do kit *Nextera XT indexes* (Illumina), em uma reação de PCR com o kit *KAPA HiFi HotStart ReadyMix* (Roche), seguindo as recomendações do fabricante. O sequenciamento de alta vazão foi feito no sistema MiSeq (Illumina), utilizando o MiSeq Reagent Kit v2, 500 ciclos (tipo *paired-end*, 2 x 250 pb), ideal para uma cobertura mínima de 2X/*amplicon*, caso houvesse a máxima diversidade de sequências possíveis, das regiões sequenciadas, podendo gerar cerca de 8.5 Gb de dados com 75% dos pares de bases apresentando o mínimo de Q30% (99,9% de acurácia).

### **5.3 Análises de dados**

#### **5.3.1 Determinação dos haplótipos para os segmentos IIS6 e IIS6**

Para a determinação de haplótipos a partir das sequências brutas obtidas utilizamos uma estratégia com as seguintes etapas: 1) Separação dos fragmentos IIS6 e IIS6, a partir da identificação das sequências dos *primers*, 2) identificação da população, de acordo com a sequência do *barcode*, 3) resolução dos haplótipos de ambos os segmentos, a partir de uma série de filtragens para eliminar erros comuns de sequenciamento. Para tanto, utilizamos a ferramenta *SeekDeep* (106), originalmente idealizada para determinação de sequências de diferentes cepas de *Plasmodium* em pacientes humanos, de uma população de distintos pacientes. Este método foi também utilizado por nosso grupo para objetivo semelhante a este, porém com a espécie *Ae. aegypti* e com sequenciamento pelo método IonTorrent (ThermoFisher) (87).

O *SeekDeep* é um pacote construído em torno do algoritmo *qluster* (106), capaz de construir com precisão grupos de sequências genéticas que representam haplótipos biológicos. O processo para a estimativa de frequência de haplótipos de múltiplas populações foi realizado da seguinte maneira: as sequências foram inicialmente tratadas pelo extrator (Figura 9), que realizou a etapa de leitura e filtragem, removendo os *primers* (Tabela 1) e *barcodes*.



Adicionalmente, foram removidas sequências drasticamente distintas, por uma filtragem para remover possíveis produtos de contaminação. O algoritmo *qluster* foi então aplicado para realizar o agrupamento das sequências, a partir de parâmetros importantes para minimizar ao máximo os erros comuns de acontecer em um NGS de amplicons. Primeiramente, para a filtragem de qualidade, mantivemos as sequências com uma qualidade média (Q) mínima *Phred* de 20, dentro de um *sliding window* de 50 nucleotídeos. O pacote *FastQC* (107) foi utilizado para monitorar a qualidade das sequências antes e depois da filtragem. Em seguida, apenas as amostras que apresentavam o mínimo de 100 *reads* foram mantidas, e então suas frequências haplotípicas foram estimadas. A última etapa consistiu na comparação dos haplótipos entre todas as amostras sequenciadas, onde um novo filtro foi utilizado para remoção dos haplótipos em baixa frequência (<1%), e daqueles que, além de estarem em baixa frequência, diferissem em um único nucleotídeo de um haplótipo em alta frequência.

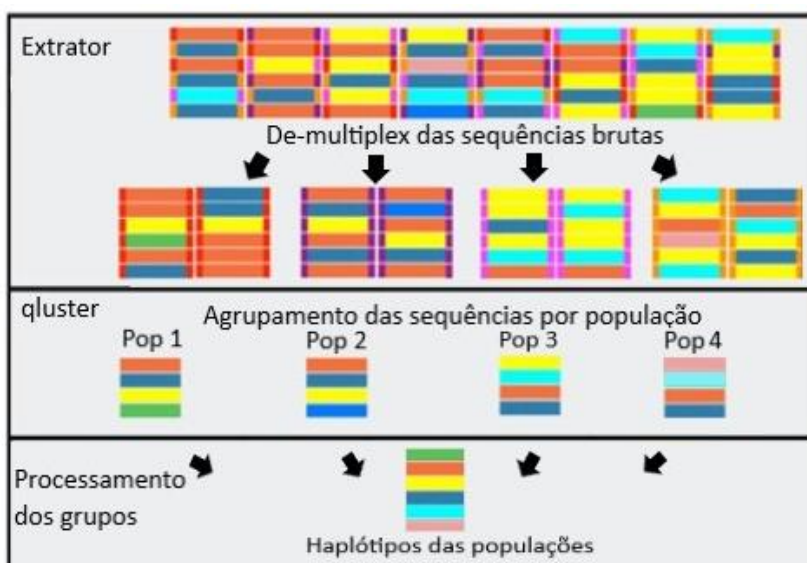


Figura 9: Esquema representativo do processamento de dados brutos de sequenciamento (Adaptado de (106)). Cada barra representa um read gerado no sequenciamento, e cada cor representa uma sequência diferente. As cores anexadas às extremidades das barras representam os diferentes barcodes utilizados, que são removidos entre a primeira e segunda etapa do processo.

### 5.3.2 Frequência e distribuição dos haplótipos

Foram determinadas as frequências de cada haplótipo, por população, como o total de sequências daquele haplótipo pelo total de sequências filtradas na respectiva população, para ambos os segmentos IIS6 e IIS6. Gráficos de

frequência em barra e tipo pizza foram preparados com o software *GraphPad Prism*, versão 9.0.2 (*GraphPad Software San Diego, CA*). A ocorrência e frequência de cada haplótipo em suas respectivas localidades foi identificada em um mapa. Os haplótipos foram nomeados de acordo com o segmento IIS6 (2s6) ou IIIS6 (3s6), seguido de um número e, no caso dos haplótipos do IIS6, adicionou-se A ou B, de acordo com o clado a que pertencesse o haplótipo, de acordo com as inferências genealógicas. A composição dos haplótipos IIS6 + IIIS6 em fase só foi possível se obter das populações em que pelo menos um dos segmentos fosse monomórfico, ou seja, apresentando apenas um haplótipo.

### **5.3.3 Busca por similaridade**

Para avaliar a origem possível dos haplótipos, foi realizada uma busca por similaridade de nucleotídeos, com a ferramenta BLAST, no GenBank. O critério de comparação adotado considerou, além da sequência com maior *Bit-Score* encontrada para cada haplótipo, apenas aquelas que cobrissem 100% de extensão dos haplótipos e com taxa de identidade acima de 99%.

### **5.3.4 Análises Filogenéticas**

Os alinhamentos das sequências dos haplótipos de cada segmento foram realizados com o programa *Geneious*, versão 2020.1.2x (105), e então submetidos ao programa *PopArt* (108) para construção de redes de haplótipos, pelo método TCS (109), a fim de inferirmos as linhagens genealógicas entre os haplótipos de cada segmento. Para reconstrução da árvore filogenética, foi utilizado o software *IQ-TREE* 1.6.12 (110,111), onde as análises complementares consistiram primeiramente na utilização do *Model Finder* para determinação do melhor modelo de substituição a ser utilizado (112), e o *Ultrafast bootstrap* (1000 replicatas), que estima suporte estatístico para os ramos da árvore filogenética inferida ao alinhamento das múltiplas sequências haplotípicas, para cada segmento do Nav (113). As árvores foram geradas para visualização no software *FigTree* v1.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Criação do banco de DNA de *Ae. albopictus* do Brasil e formação dos pools de DNA/população

Ao todo, foi extraído o DNA de 998 amostras de *Ae. albopictus* de geração F<sub>0</sub>, originais de 46 cidades, contemplando as cinco macro-regiões brasileiras. O número de amostras por população consta na

. A quantidade de amostras por população variou entre 2 e 30. O rendimento de DNA foi de  $1,1 \pm 0,1$  (média  $\pm$  desvio padrão)  $\mu\text{g}$ / amostra. Uma alíquota de cada amostra foi utilizada para diluição a  $20 \text{ ng}/\mu\text{L}$  em  $20 \mu\text{L}$  para as análises deste estudo. O DNA não diluído foi catalogado e estocado em ultra-freezer, compondo o banco de DNA de *Ae. albopictus* do Brasil, coletados entre 2017/2018. Para a formação dos pools de DNA foram adicionados  $20 \text{ ng}$  de DNA diluído de cada amostra ao pool de sua respectiva população.

### 6.2 Amplificação de fragmentos correspondentes aos segmentos IIS6 e IIIS6 do Nav e formação dos pools/fragmento/população.

As amplificações dos fragmentos IIS6 e IIIS6 de cada pool renderam um produto de aproximadamente  $500 \text{ pb}$ , conforme esperado (Figura 3). O produto de cada segmento (IIS6 e IIIS6) de cada pool de população, após purificado, foi homogeneizado em concentrações equimolares ( $0,5 - 5 \text{ ng}$  de DNA do produto purificado de cada segmento) para a formação do pool IIS6 + IIIS6/ população.

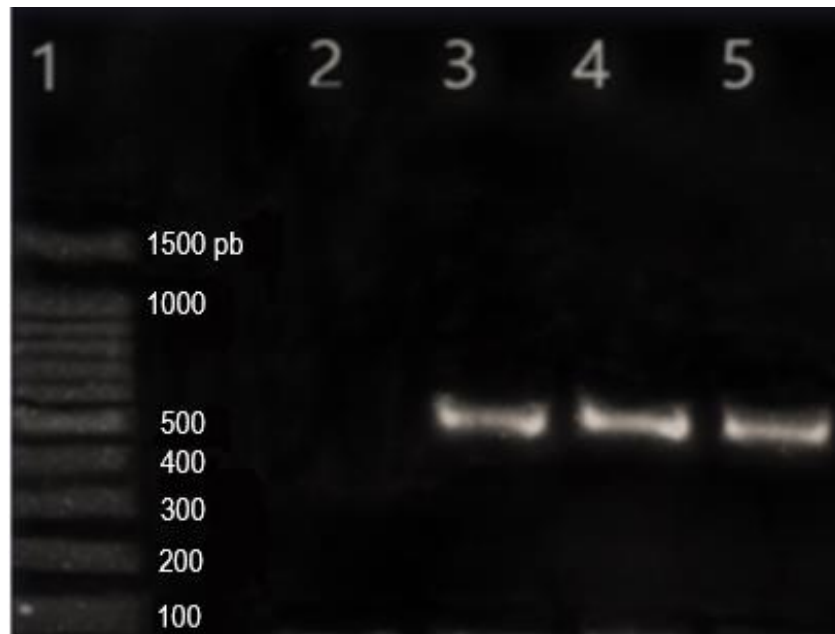


Figura 10: Exemplo de revelação de eletroforese em gel de agarose (1%) corado com Nancy-520 (50x) Do 1 ao 5 temos: 1. Marcador de peso molecular (Promega - 2  $\mu$ L, DNA ladder 100 pb), 2. Controle negativo da reação, 3-5 produtos de PCR de aproximadamente 500 pb da região IIS6 do  $Na_v$  de pools de DNA de *Aedes albopictus*.

### 6.3 Sequenciamento: filtragem das sequências e determinação dos haplótipos

Foram obtidas cerca de 14,8 milhões de sequências referentes as regiões IIS6 e IIS6 do  $Na_v$  de populações de *Ae. albopictus* de 46 municípios brasileiros, alocadas em 8,95 Gbp. A porcentagem de dados gerados com Q30%, probabilidade de 1 erro a cada 1000 pb (99,9 % de acurácia), foi de 79,1%. Portanto, após filtragem de qualidade o total utilizado de sequências para próxima etapa de análise foi de 13,5 milhões de sequências.

A partir da filtragem das sequências, utilizando o pacote SeekDeep, mais sequências foram retiradas, restando 10,05 milhões de sequências para as análises de determinação dos haplótipos. Os dados geopolíticos de localização, número de sequências obtidas, descartadas e utilizadas, e a identificação de barcode na biblioteca NGS das localidades estão listadas no Quadro 1.

. Foi observado uma alta cobertura de sequenciamento mesmo em Jarú (RO), população com o menor número de *reads* (88 mil), onde se obteve uma cobertura aproximada de 10,18x/*amplicon*. Enquanto em Santarém, população com o maior número de *reads* (1,17 milhões), a cobertura foi de aproximadamente 121x/*amplicon*.

Ao todo, foram analisadas sequências de 11 populações da região Nordeste, 11 da região Norte, nove da região Centro-oeste, 11 da região Sudeste e três populações da região Sul. O fragmento IIS6 da população de Posse não foi sequenciado, totalizando 45 populações.

*Quadro 1: Dados das populações de Ae. albopictus avaliadas: localização geográfica, total de sequências obtidas e utilizadas, e identificação na biblioteca NGS.*

Região	Estado	Cidade	Latitude	Longitude	Mosquitos	Sequências (n total)	Sequências excluídas	Sequências utilizadas	Index	Index 2
Norte	Amazonas	Parintins	-2.637	-56.729	16	357.156	124.488	232.668	AGGCAGAA	AAGGAGTA
Norte	Pará	Altamira	-3.198	-52.210	16	375.569	146.262	229.307	AGGCAGAA	CTAAGCCT
Norte	Pará	Itaituba	-4.267	-55.993	30	150.987	46.991	103.996	TAGGCATG	AGAGTAGA
Norte	Pará	Redenção	-8.025	-50.032	2	334.903	70.910	263.993	TCCTGAGC	GCCTAAGA
Norte	Pará	Santarém	-2.450	-54.700	30	1.173.273	360.217	813.056	TAAGGCCG	CTAAGCCT
Norte	Pará	Tucuruí	-3.767	-49.670	30	144.941	83.311	61.630	TAAGGCCG	AGAGTAGA
Norte	Rondônia	Cacoal	-11.434	-61.456	30	329.150	91.838	237.312	TAAGGCCG	AAGGAGTA
Norte	Rondônia	Jaru	-10.432	-62.479	30	88.791	36.328	52.463	TAAGGCCG	GTAAGGAG
Norte	Rondônia	Porto Velho	-8.761	-63.900	30	455.272	144.529	310.743	TAAGGCCG	ACTGCATA
Norte	Tocantins	Araguaína	-7.192	-48.204	30	200.061	39.360	160.701	TCCTGAGC	CTCTCTAT
Norte	Tocantins	Palmas	-10.249	-48.324	10	227.453	76.559	150.894	TCCTGAGC	TATCTCTT
Nordeste	Alagoas	Maceió	-9.649	-35.708	30	348.754	57.431	291.323	TAGGCATG	CTCTCTAT
Nordeste	Bahia	Brumado	-14.196	-41.680	2	226.469	121.876	104.593	AGGCAGAA	GCCTAAGA
Nordeste	Bahia	Salvador	-12.977	-38.501	16	212.126	81.018	131.108	CGTACTAG	GTAAGGAG
Nordeste	Pernambuco	Palmares	-8.676	-35.582	30	267.363	93.095	174.268	CGTACTAG	CTCTCTAT
Nordeste	Pernambuco	Recife	-8.052	-34.928	30	214.380	77.288	137.092	CGTACTAG	GCCTAAGA
Nordeste	Piauí	Florianópolis	6.776	-43.022	30	965.424	363.386	602.038	TAAGGCCG	GCCTAAGA
Nordeste	Piauí	Parnaíba	-2.905	-41.773	30	771.700	252.935	518.765	TAAGGCCG	CTCTCTAT
Nordeste	Piauí	Teresina	-5.044	-42.766	30	434.179	179.967	254.212	TAAGGCCG	TATCTCTT
Nordeste	Rio Grande do Norte	Natal	-5.779	-35.200	14	211.954	70.171	141.783	CGTACTAG	ACTGCATA
Nordeste	Sergipe	Aracaju	-10.947	-37.073	26	302.816	129.080	173.736	AGGCAGAA	CTCTCTAT
Nordeste	Sergipe	Nossa Senhora da Glória	-10.215	-37.421	7	348.335	129.606	218.729	AGGCAGAA	TATCTCTT
Centro-oeste	Distrito Federal	Brasília	-15.826	-47.921	9	127.378	31.663	95.715	TCCTGAGC	AGAGTAGA
Centro-oeste	Goiás	Goiânia	-16.687	-49.262	29	211.966	38.809	173.157	GGACTCCT	AAGGAGTA
Centro-oeste	Goiás	Iporá	-16.440	-51.117	8	387.315	59.474	327.841	GGACTCCT	CTAAGCCT
Centro-oeste	Goiás	Posse	-14.084	-46.366	30	303.610	96.816	206.794	TAGGCATG	GTAAGGAG
Centro-oeste	Mato Grosso	Água Boa	-14.047	-52.159	10	319.929	85.325	234.604	GGACTCCT	AGAGTAGA
Centro-oeste	Mato Grosso	Alta Floresta	-9.867	-56.087	30	516.523	121.414	395.109	GGACTCCT	TATCTCTT
Centro-oeste	Mato Grosso	Barra do Garças	-15.889	-52.263	13	377.153	129.279	247.874	AGGCAGAA	GTAAGGAG
Centro-oeste	Mato Grosso	Confresa	-10.657	-51.570	30	555.926	149.825	406.101	GGACTCCT	GTAAGGAG
Centro-oeste	Mato Grosso do Sul	Coxim	-18.503	-54.683	8	147.391	57.535	89.856	CGTACTAG	AGAGTAGA
Centro-oeste	Mato Grosso do Sul	Dourados	-22.129	-54.826	8	119.763	52.166	67.597	CGTACTAG	AAGGAGTA
Sudeste	Espírito Santo	Cachoeiro de Itapemirim	-20.846	-41.120	30	257.207	43.983	213.224	TCCTGAGC	CTAAGCCT
Sudeste	Espírito Santo	Nova Venécia	-18.707	-40.395	29	229.690	57.664	172.026	GGACTCCT	GCCTAAGA
Sudeste	Espírito Santo	Vitória	-20.295	-40.295	12	115.843	48.485	67.358	TCCTGAGC	AAGGAGTA
Sudeste	Minas Gerais	Belo Horizonte	-19.916	-43.934	30	307.905	58.167	249.738	GGACTCCT	CTCTCTAT
Sudeste	Minas Gerais	Governador Valadares	-18.855	-41.956	27	474.355	89.281	385.074	GGACTCCT	ACTGCATA
Sudeste	Minas Gerais	Teófilo Otoni	-17.885	-41.521	30	143.596	95.006	48.590	AGGCAGAA	AGAGTAGA
Sudeste	Rio de Janeiro	Angra dos Reis	-23.006	-44.318	30	245.290	55.104	190.186	TCCTGAGC	ACTGCATA
Sudeste	Rio de Janeiro	Campos dos Goytacazes	-21.758	-41.326	17	238.006	79.594	158.412	CGTACTAG	TATCTCTT
Sudeste	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro	-22.906	-43.172	30	252.873	70.622	182.251	TCCTGAGC	GTAAGGAG
Sudeste	Rio de Janeiro	Volta Redonda	-22.487	-44.077	30	351.322	112.237	239.085	TAGGCATG	GCCTAAGA
Sudeste	São Paulo	São Sebastião	-23.806	-45.401	11	209.275	133.474	75.801	CGTACTAG	CTAAGCCT
Sul	Paraná	Londrina	-23.304	-51.169	16	333.223	153.548	179.675	AGGCAGAA	ACTGCATA
Sul	Rio Grande do Sul	Santa Maria	-29.687	-53.812	2	293.058	65.797	227.261	TAGGCATG	ACTGCATA
Sul	Santa Catarina	Chapécó	-27.100	-52.615	30	228.009	172.527	55.482	TAGGCATG	TATCTCTT
Total:					998	14.885.662	4.834.441	10.051.221		

#### 6.4 Diversidade nucleotídica da região IIS6 do Nav

As análises do segmento IIS6 resultaram na detecção de 20 haplótipos, variando entre 314 pb e 334 pb (Tabela 2). O alinhamento múltiplo evidenciou a presença de um total de 60 sítios polimórficos nas sequências, dentre os quais 27 sítios são parcimoniosamente informativos. Oito sítios polimórficos estão no éxon 20, e quatro deles estão no éxon 21. Nenhuma substituição não-sinônima foi encontrada entre os 12 sítios polimórficos nos éxons 20 e 21, ou seja, nenhum sinal de alguma

mutação *kdr* no segmento IIS6. O íntron 20 apresentou 48 sítios variáveis, com inserções e deleções (*indels*).

Tabela 2: Diversidade de haplótipos do segmento IIS6 do *Na*, de *Ae. albopictus* do Brasil. (Nome de identificação, frequência ao final das análises, quantidade de populações em que foram encontrados, número de leituras no NGS e tamanho da sequência).

Haplótipos	Frequência	Populações	Reads	Tamanho (pb)
2s6.00	35,97%	37	580564	314
2s6.01	9,64%	32	145155	331
2s6.02	20,46%	25	355901	334
2s6.03	7,66%	17	134723	325
2s6.04	4,63%	17	66466	326
2s6.05	3,64%	13	66494	334
2s6.06	3,02%	11	48794	331
2s6.07	1,15%	11	18372	333
2s6.08	2,54%	7	30845	334
2s6.09	0,76%	7	12118	334
2s6.10	1,81%	6	26102	331
2s6.11	1,39%	5	24935	325
2s6.12	0,53%	5	8857	334
2s6.13	1,59%	4	29951	325
2s6.14	1,35%	3	24705	317
2s6.15	1,13%	3	19311	332
2s6.16	1,10%	3	20223	314
2s6.17	0,26%	3	4695	326
2s6.18	0,94%	2	15973	330
2s6.19	0,43%	2	8057	328

A reconstrução da árvore filogenética, considerada o melhor modelo de substituição [escolhido a partir do Critério Bayesiano de Schwarz (BIC) através do *ModelFinder* (112), foi o K2P+I (114), cuja árvore de máxima verossimilhança agrupou os haplótipos em dois grupos, clado A (n = 12) e clado B (n = 8) (Figura 11) ainda que com um *bootstrap* baixo, de 76%. Uma das principais diferenças entre os dois cladogramas se deve a variações no tamanho do íntron 20, similar ao ocorrente na região homóloga em *Ae. aegypti* (115). Os haplótipos do clado B apresentam sequência de tamanho inferior a 330 pb (Tabela 2), enquanto os haplótipos do clado A apresentam sequências de tamanho maior que 330 pb, com exceção do haplótipo 2s6.14\_A, que possui 317 pb e é o mais próximo do clado B, como pode ser observado na rede de haplótipos (Figura 12). Os haplótipos 2s6.02\_B e 2s6.09\_B, pertencentes ao clado B, diferem em apenas um nucleotídeo do íntron 20, de modo

que foram agrupados como uma sequência única na rede de haplótipos (Figura 12). Adicionalmente, compartilham o mesmo ramo na árvore de verossimilhança (Figura 11).

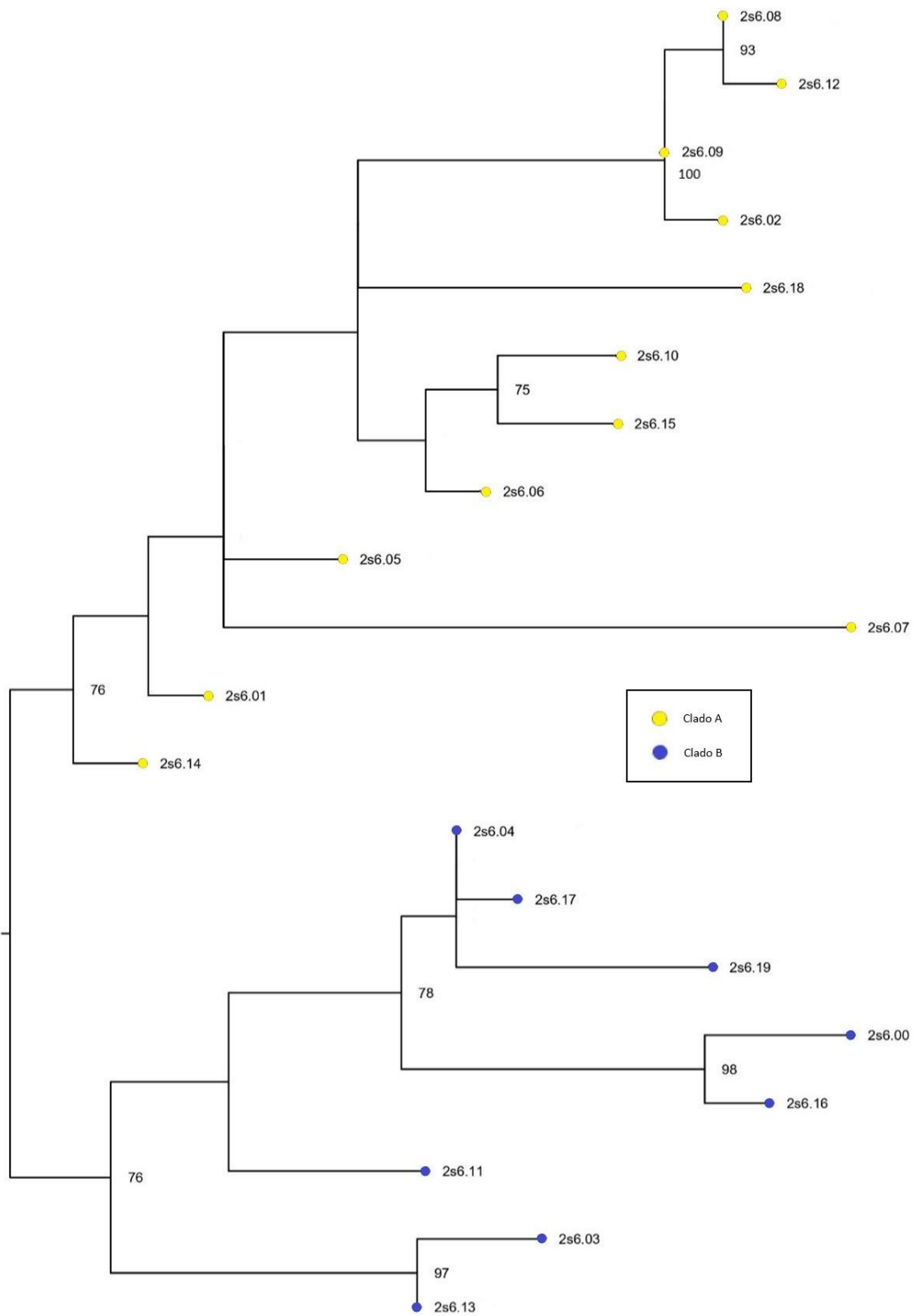


Figura 11: Árvore filogenética da região IIS6 do  $Na_v$  construída pelo método de máxima verossimilhança, com o modelo de substituição nucleotídica Kimura 2 parâmetros (K2P+I). A árvore é um consenso construído a partir de 1000 replicatas bootstrap. Os valores de bootstrap maiores que 75 %, obtidos mediante 1000 permutações estão indicados em parênteses (%).



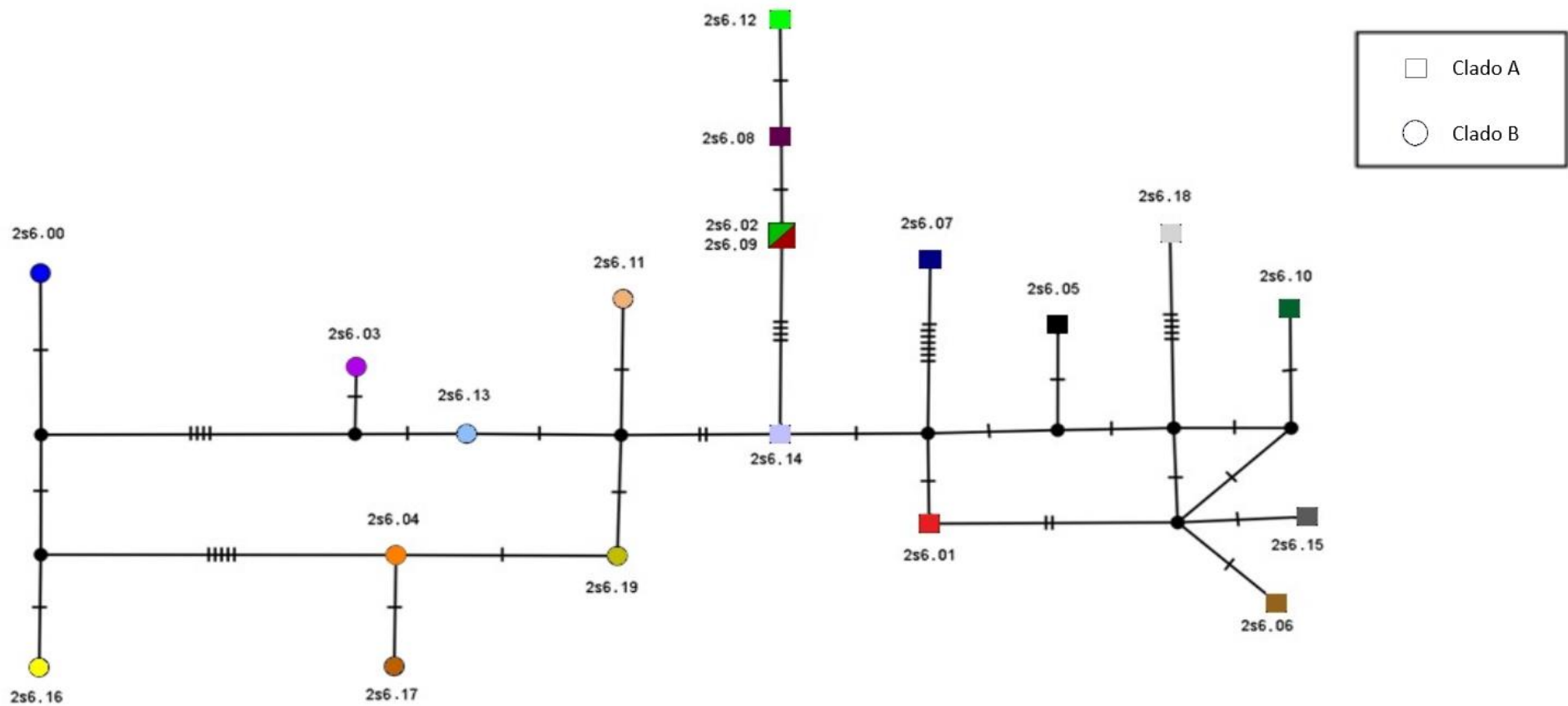


Figura 12: Rede de haplótipos da região IIS6 do  $Na_v$  de *Ae. albopictus* do Brasil. A rede é baseada na genealogia calculada pelo método TCS (109). Os haplótipos estão representados por pontos amarelo (clado A) ou azul (clado B) e indicados por seu respectivo nome. As linhas tracejadas entre os pontos representam eventos mutacionais entre os haplótipos conectados. \*Os haplótipos 2s6.02 e 2s6.09 estão representados como um único haplótipo, visto que diferem em apenas um nucleotídeo em uma região do alinhamento que contém gap (os sítios que contém gaps no alinhamento não são considerados na rede de haplótipos TCS)

O haplótipo 2s6.00\_B foi o encontrado em maior frequência, com o total de 35,97% e lido cerca de 580 mil vezes no processo de sequenciamento (Tabela 2), sendo identificado em 37 das 45 populações analisadas, variando, entre as localidades onde apareceu, de 2,9 (Recife, PE) a 98,7% (Redenção, PA) (Tabela 2 e Figura 13). Já o haplótipo com menor frequência média foi o 2s6.17\_B (0,26%), lido cerca de 4,6 mil vezes e identificado em três populações, todas do Espírito Santo (Vitória, Cachoeiro do Itapemirim e Nova Venécia), no Sudeste do país (Figura 15). Assim como o 2s6.17\_B, o haplótipo 2s6.16\_B também é exclusivo de populações do Espírito Santo. Isto sugere que i) os haplótipos 2s6.17\_B e 2s6.16\_B tenham emergido em populações desta região, ou que ii) uma invasão recente de uma população distinta de *Ae. albopictus* na região do Espírito Santo tenha trazido novos haplótipos para o *pool* gênico dessas populações. Seja como for, a rede de haplótipos sugere que o haplótipo 2s6.17\_A tenha derivado a partir do haplótipo 2s6.04\_B, sendo o haplótipo 2s6.00\_B o mais próximo ao 2s6.16\_A (Figura 12). Esses haplótipos 2s6.04\_B e 2s6.00\_B, por sua vez, estão amplamente distribuídos (Tabela 2 e Figura 15).

Tabela 3: Frequência dos haplótipos referentes ao segmento IIS6 do Na<sub>v</sub> de populações Brasileiras de *Ae. albopictus*

Região	Estado	Localidade	Clado A														Clado B						Clado A	Clado B	
			2s6.1	2s6.2	2s6.5	2s6.6	2s6.7	2s6.8	2s6.9	2s6.10	2s6.12	2s6.14	2s6.15	2s6.18	2s6.00	2s6.3	2s6.4	2s6.11	2s6.13	2s6.16	2s6.17	2s6.19			
Norte	AM	Parintins	0.036	0.067	0.019	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.071	0.362	0	0.270	0.175	0	0	0	0	0.122	0.878
	PA	Altamira	0	0.570	0	0	0.017	0	0	0	0.064	0	0	0	0.301	0.048	0	0	0	0	0	0	0	0.651	0.349
	PA	Itaituba	0	0.112	0.044	0	0	0.093	0	0	0	0	0	0	0.201	0.405	0	0.144	0	0	0	0	0	0.249	0.751
	PA	Redenção	0.013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.987	0	0	0	0	0	0	0	0	0.013	0.987
	PA	Santarém	0	0	0.082	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.287	0.549	0	0.082	0	0	0	0	0	0.082	0.918
	PA	Tucuruí	0.053	0.199	0.062	0.172	0.122	0	0	0	0	0	0	0	0.392	0	0	0	0	0	0	0	0	0.608	0.392
	RO	Jaru	0.013	0	0	0	0	0	0	0	0.059	0	0	0	0.570	0.331	0	0	0.028	0	0	0	0	0.072	0.928
	RO	Porto Velho	0.013	0.244	0.045	0	0	0	0.057	0	0	0	0	0	0.260	0.249	0.017	0.115	0	0	0	0	0	0.358	0.642
	RO	Cacoal	0.132	0.201	0	0	0	0	0.062	0	0.087	0	0	0	0.039	0	0	0.012	0.467	0	0	0	0	0.482	0.518
	TO	Araguaina	0	0.344	0.132	0.051	0.026	0.218	0	0	0	0	0	0	0.206	0.022	0	0	0	0	0	0	0	0.771	0.229
	TO	Palmas	0.664	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.336	0	0	0	0	0	0	0.664	0.336
		<i>média</i>	<i>0.084</i>	<i>0.158</i>	<i>0.035</i>	<i>0.020</i>	<i>0.015</i>	<i>0.028</i>	<i>0.011</i>	<i>0</i>	<i>0.019</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0.301</i>	<i>0.179</i>	<i>0.032</i>	<i>0.057</i>	<i>0.061</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0.370</i>	<i>0.630</i>	
Nordeste	AL	Maceió	0	1.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.000	0.000
	BA	Salvador	0.134	0.327	0	0.085	0.041	0	0	0.109	0	0	0.042	0	0.141	0	0.120	0	0	0	0	0	0	0.739	0.261
	BA	Brumado	0	0	0	0	0	0	0	0.501	0	0	0	0	0	0	0.499	0	0	0	0	0	0	0.501	0.499
	PI	Floriano	0.065	0.608	0.031	0	0	0.117	0	0	0	0	0	0	0.120	0.059	0	0	0	0	0	0	0	0.820	0.180
	PI	Parnaíba	0.083	0.677	0.130	0	0.038	0	0	0	0	0	0	0	0.038	0	0.034	0	0	0	0	0	0	0.928	0.072
	PI	Teresina	0.074	0.609	0.015	0.036	0.073	0	0	0	0	0	0	0	0.170	0.022	0	0	0	0	0	0	0	0.808	0.192
	PE	Palmares	0	0.825	0	0.097	0.061	0	0	0	0.017	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.000	0.000
	PE	Recife	0	0.697	0	0.240	0.021	0	0	0	0.013	0	0	0	0.029	0	0	0	0	0	0	0	0	0.971	0.029
	RN	Natal	0.014	0.706	0	0.122	0	0	0	0	0	0	0	0.158	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.000	0.000
	SE	Araçajú	0	0.501	0	0.358	0	0	0	0	0	0	0	0	0.141	0	0	0	0	0	0	0	0	0.859	0.141
	SE	NSra da Glória	0.654	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.185	0	0	0	0	0.161	0.654	0.346	
		<i>média</i>	<i>0.093</i>	<i>0.541</i>	<i>0.016</i>	<i>0.085</i>	<i>0.021</i>	<i>0.011</i>	<i>0</i>	<i>0.055</i>	<i>0.003</i>	<i>0</i>	<i>0.004</i>	<i>0.014</i>	<i>0.058</i>	<i>0.007</i>	<i>0.076</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0.015</i>	<i>0.844</i>	<i>0.156</i>	
Centro-Oeste	DF	Brasília	0	0.047	0	0	0.017	0	0	0	0	0	0	0.532	0.404	0	0	0	0	0	0	0	0.064	0.936	
	GO	Goiania	0.019	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.981	0	0	0	0	0	0	0	0	0.019	0.981	
	GO	Iporá	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.985	0	0.015	0	0	0	0	0	0	0.000	1.000	
	MS	Coxim	0.016	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.984	0	0	0	0	0	0	0	0	0.016	0.984	
	MS	Dourados	0.034	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.938	0	0.028	0	0	0	0	0	0	0.034	0.966	
	MT	B. das Garças	0.054	0.762	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.184	0	0	0	0	0	0	0	0	0.816	0.184	
	MT	Alta Floresta	0.017	0.076	0.082	0.048	0	0.116	0	0	0	0	0.267	0.393	0	0	0	0	0	0	0	0	0.607	0.393	
	MT	Água Boa	0.030	0	0.863	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.107	0	0	0	0	0	0	0	0.893	0.107	
	MT	Confresa	0.032	0.217	0.099	0	0.067	0.142	0	0	0	0	0	0	0.443	0	0	0	0	0	0	0	0.557	0.443	
		<i>média</i>	<i>0.023</i>	<i>0.122</i>	<i>0.116</i>	<i>0.005</i>	<i>0.009</i>	<i>0.029</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0.030</i>	<i>0.605</i>	<i>0.057</i>	<i>0.005</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0.334</i>	<i>0.666</i>		
Sudeste	ES	Cach. do Itapemirim	0.103	0	0	0	0	0	0.020	0	0	0	0	0.256	0.359	0.053	0	0	0.171	0.039	0	0	0.123	0.877	
	ES	Nova Venécia	0.153	0	0	0	0	0	0.019	0	0.178	0	0	0.442	0	0.046	0	0	0.130	0.034	0	0	0.349	0.651	
	ES	Vitória	0.174	0.012	0	0	0	0	0	0	0.387	0	0	0.055	0.132	0	0	0	0.196	0.042	0	0	0.574	0.426	
	MG	Belo Horizonte	0.045	0.132	0	0	0	0	0.066	0.000	0	0	0	0.737	0	0.020	0	0	0	0	0	0	0.243	0.757	
	MG	Gov. Valadares	0.155	0	0	0	0	0	0	0.138	0	0	0	0.471	0	0.161	0	0.045	0	0	0.030	0	0.294	0.706	
	MG	Teófilo Otoni	0.381	0.097	0	0	0	0	0.068	0.029	0	0.042	0	0	0.325	0	0.059	0	0	0	0	0	0.616	0.384	
	RJ	Angra dos Reis	0.029	0	0	0	0	0.034	0	0	0	0	0	0.908	0	0.029	0	0	0	0	0	0	0.063	0.937	
	RJ	Cps dos Goytacazes	0.062	0.035	0.033	0.056	0.034	0	0	0	0	0	0	0.675	0.104	0	0	0	0	0	0	0	0.220	0.780	
	RJ	Rio de Janeiro	0.026	0.140	0	0.095	0	0	0.039	0	0	0	0.276	0	0.310	0.113	0	0	0	0	0	0	0.577	0.423	
	RJ	Volta Redonda	0	0	0	0	0	0	0.013	0	0	0	0.192	0	0.628	0.167	0.000	0	0	0	0	0	0.205	0.795	
	SP	São Sebastião	0.090	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.000	0	0.822	0.014	0.074	0	0	0	0	0	0.090	0.910	
		<i>média</i>	<i>0.111</i>	<i>0.038</i>	<i>0.003</i>	<i>0.014</i>	<i>0.003</i>	<i>0.003</i>	<i>0.017</i>	<i>0.019</i>	<i>0</i>	<i>0.055</i>	<i>0.043</i>	<i>0</i>	<i>0.512</i>	<i>0.081</i>	<i>0.040</i>	<i>0</i>	<i>0.004</i>	<i>0.045</i>	<i>0.010</i>	<i>0.003</i>	<i>0.305</i>	<i>0.695</i>	
Sul	PR	Londrina	0.302	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.586	0	0.074	0	0	0	0	0	0	0.340	0.660	
	RS	Santa Maria	0.664	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.336	0	0	0	0	0	0	0.664	0.336	
	SC	Chapécó	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.576	0	0	0	0	0	0	0	0	0.424	0.576	
		<i>média</i>	<i>0.322</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0.141</i>	<i>0.012</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0.387</i>	<i>0</i>	<i>0.137</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0.476</i>	<i>0.524</i>	
<i>média total</i>			<i>0.096</i>	<i>0.205</i>	<i>0.036</i>	<i>0.030</i>	<i>0.012</i>	<i>0.025</i>	<i>0.008</i>	<i>0.018</i>	<i>0.005</i>	<i>0.013</i>	<i>0.011</i>	<i>0.009</i>	<i>0.360</i>	<i>0.077</i>	<i>0.046</i>	<i>0.014</i>	<i>0.016</i>	<i>0.011</i>	<i>0.003</i>	<i>0.004</i>	<i>0.470</i>	<i>0.530</i>	

A numeração do códon segue aquela apresentada para o Nav de *Musca domestica*, como de praxe. Assim sendo, as substituições sinônimas identificadas no éxon 20 nos códons 962 (GAC/GTA, 2s6.07\_A), 968 (TTC/TTT, haplótipo 2s6.16\_B), 980 (GTG/GTA, 2s6.15\_A), 993 (TGC/TGT, 2s6.07\_A) e 1001 (TGT/TGC, 2s6.05\_A) foram encontradas, cada uma, em um único haplótipo. Outras substituições foram compartilhadas por haplótipos distintos: códons 981 (CGG/CGA, 2s6.00\_B e 2s6.03\_B), 1006 (TTG/TTA, 2s6.08\_A e 2s6.12\_A) e 993 (TGC/TGT, haplótipos 2s6.00\_B, 2s6.03\_B, 2s6.16\_B e 2s6.07\_A). Conforme sugerido pela análise da rede de haplótipos (Figura 12), a substituição no códon 1006 (compartilhada por 2s6.08\_A e 2s6.12\_A) deve ter tido origem única, assim como a do códon 981, entre os haplótipos 2s6.00\_B e 2s6.03\_B, e no códon 993 entre 2s6.00\_B, 2s6.03\_B e 2s6.16\_B. No entanto, a substituição neste códon 993 provavelmente tem origem distinta e convergente entre a que se encontra nestes haplótipos do clado B, com relação e ao 2s6.07\_A.



No éxon 21, foi identificada uma mutação sinônima no códon 1016 (GTA/GTG, haplótipo 2s6.05\_A) (Anexo 1). Vale destacar que o códon 1016 é um sítio convergente de mutações *kdr* em *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti*. Adicionalmente, mutações nos códons 1026 (TCC/TCT), 1031 (TCG/TCA) e 1041 (CCG/CCA) foram identificadas nos haplótipos 2s6.11\_A, 2s6.17\_B e 2s6.12\_A, respectivamente.

As populações de *Ae. albopictus* das cidades de Salvador (BA) e Porto Velho (RO) apresentaram a maior variedade de haplótipos (n = 8) em sua amostragem. A menor variedade (n = 2) foi encontrada nas populações de Brumado (BA), Redenção (PA) e Santa Maria (RS), justamente as populações com menor quantidade de amostras. Curiosamente, a população de Maceió (AL, n = 30) apresentou um único haplótipo (2s6.02\_A), sugerindo que esta população deve ser altamente homogênea. População de Aracaju, capital do estado vizinho, também apresentou baixa diversidade haplotípica, onde apenas três haplótipos (2s6.00\_B; 02\_A e 06\_A) foram encontrados no *pool* de 28 mosquitos.

De forma geral, embora tenhamos observado uma alta diversidade de haplótipos, observamos uma certa tendência à regionalização (Figura 15). Por exemplo, considerando todas as populações, a frequência média de haplótipos do clado B foi ligeiramente maior (53 e 47% de haplótipos dos clados B e A, respectivamente), apesar deste clado ter menos haplótipos. Contudo, a frequência média das populações da região Nordeste foi maior para os haplótipos do clado A (85,4 e 14,6% para os clados A e B, respectivamente (Tabela 3 e Figura 14).

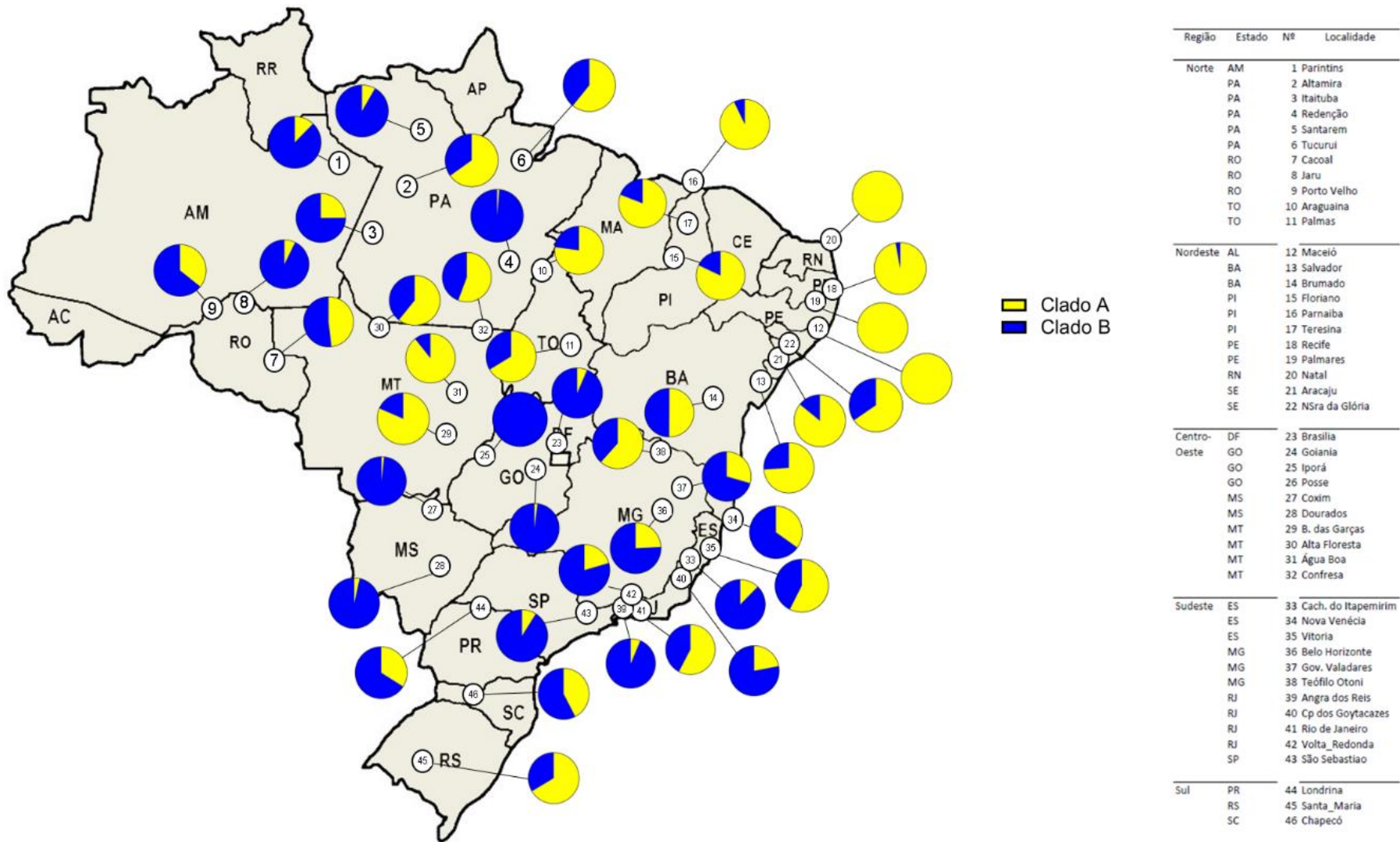


Figura 14: Distribuição de haplótipos do fragmento IIS6 do gene do canal de sódio de *Ae. albopictus* do Brasil, classificados em clados A e B.

O haplótipo 2s6.02\_A\_ teve sua maior frequência média entre as populações de *Ae. albopictus* da região nordeste (56,2%), enquanto as médias regionais deste haplótipo ficaram abaixo de 25% (e ausente na região sul) nas populações das demais regiões. Os haplótipos 2s6.11\_B e 2s6.13\_B são exclusivos das populações da região Norte, com exceção da população de Governador Valadares, no Sudeste do país, que apresentou o haplótipo 2s6.13\_B. Interessantemente, o haplótipo 2s6.19\_B foi exclusivamente encontrado nas populações de Nossa Senhora da Glória (Nordeste) e Governador Valadares. Por outro lado, o haplótipo 2s6.9\_A foi observado em populações do Norte (PA e RO) e do Sudeste (RJ e MG).



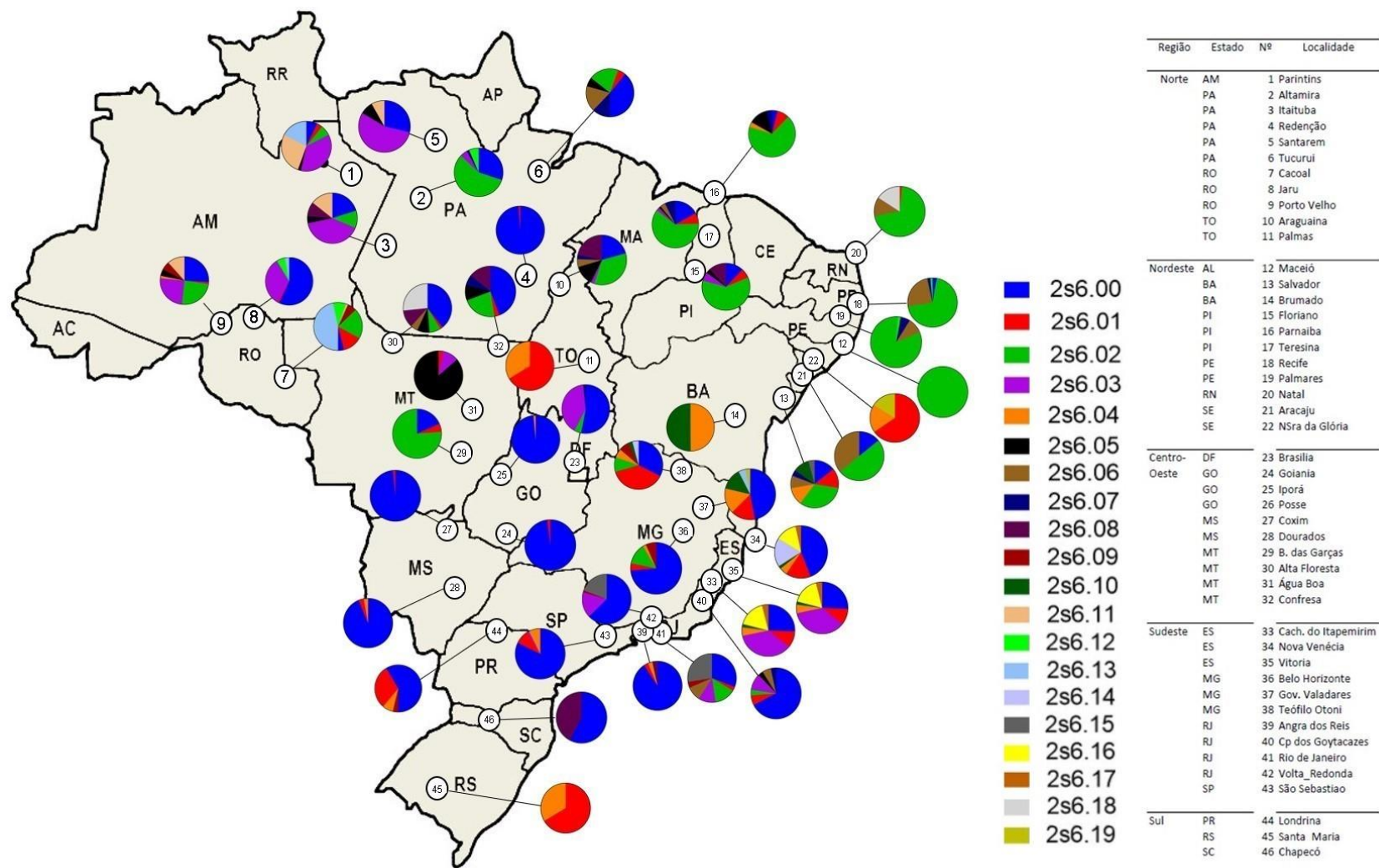


Figura 15: Distribuição de haplótipos do segmento IIS6 do *Na<sub>v</sub>* em populações de *Ae. albopictus* do Brasil. Cada círculo corresponde a uma localidade analisada neste estudo, as diferentes cores representam os diferentes haplótipos encontrados e suas respectivas frequências

## 6.5 *Diversidade nucleotídica do segmento IIIS6 do Nav*

Ao todo, consideramos em nossas análises 24 haplótipos distintos referentes ao segmento IIIS6 do Nav de populações de *Ae. albopictus* do Brasil. Havia ainda dois haplótipos adicionais, que eram altamente distintos dos demais, presentes nas populações de Natal, Dourado, São Sebastião, Aracaju, Parintins e Chapecó. Uma busca no GenBank, utilizando a ferramenta BLAST, evidenciou uma maior similaridade destes haplótipos com sequências de *Ae. aegypti*, o que nos apontou evidência de alguma contaminação com esta espécie. Sendo assim, amplificamos e sequenciamos (Sanger) fragmento do gene mitocondrial *citocromo C oxidase I* [(COI) utilizado como marcador para identificação de espécie] e o fragmento do IIIS6 do Nav dos indivíduos das populações onde aqueles haplótipos foram encontrados. Em alguns indivíduos, de fato, os haplótipos diferenciados foram confirmados, paralelamente à comprovação de se tratar de *Ae. aegypti*, como indicado pelas sequências do COI dessas mesmas amostras (dados não mostrados). Desta forma, os haplótipos foram excluídos da análise. Provavelmente a filtragem do *SeekDeep* deve ter excluído as sequências de *Ae. aegypti* para o segmento IIIS6, mas não foi restrigente o suficiente para excluir as do IIIS6. Como em Chapecó só foram observados aqueles dois haplótipos, esta população foi retirada da análise para determinação dos haplótipos do segmento IIIS6 (Anexo 2).

As populações apresentaram diferentes perfis haplotípicos (Tabela 4), desde, desde Santa Maria, única população homogênea onde foi encontrado apenas um haplótipo (3s6.00) a Posse, em Goiás, onde foram encontrados nove haplótipos diferentes. Nas localidades de Salvador, Porto Velho, Confresa, Araguaína e Porto Velho, foram encontrados oito haplótipos distintos. As populações de Parnaíba, Cacoal e Itaituba apresentaram sete haplótipos. Outras 23 populações apresentaram entre quatro e seis haplótipos.

Tabela 4: Diversidade de haplótipos da região IIS6 de *Ae. albopictus* do Brasil. (Nome de identificação, frequência ao final das análises, quantidade de populações em que foram encontrados, número de leituras no NGS e tamanho da sequência).

Haplótipos	Frequência	Populações	Reads	Tamanho (pb)
3s6.00	67,77%	44	626082	415
3s6.01	9,51%	31	91610	416
3s6.02	4,52%	29	42791	431
3s6.03	5,76%	20	47730	415
3s6.04	2,24%	11	13915	430
3s6.05	1,81%	10	15748	433
3s6.06	2,67%	9	26081	430
3s6.07	0,87%	6	8490	417
3s6.08	0,57%	6	4523	431
3s6.09	0,53%	5	3362	431
3s6.10	0,47%	5	4490	416
3s6.11	0,36%	5	2860	415
3s6.12	0,26%	4	2810	433
3s6.13	0,22%	4	2353	415
3s6.14	0,36%	3	4169	428
3s6.15	0,36%	3	2297	431
3s6.16	0,34%	3	1969	422
3s6.17	0,24%	3	1927	416
3s6.18	0,17%	3	1200	418
3s6.19	0,32%	2	3078	416
3s6.20	0,20%	2	2286	418
3s6.21	0,19%	2	1852	415
3s6.22	0,17%	2	2042	431
3s6.23	0,09%	2	1068	431

Tabela 5: Frequência dos haplótipos referentes ao segmento IIIS6 do Na<sub>V</sub> de populações Brasileiras de Ae. albopictus

Região	Estado	Localidade	Frequência dos haplótipos																									
			3s6.00	3s6.01	3s6.02	3s6.03	3s6.04	3s6.05	3s6.06	3s6.07	3s6.08	3s6.09	3s6.10	3s6.11	3s6.12	3s6.13	3s6.14	3s6.15	3s6.16	3s6.17	3s6.18	3s6.19	3s6.20	3s6.21	3s6.22	3s6.23		
Norte	AM	Parintins	0,960	0	0,040	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	PA	Altamira	0,765	0,130	0,035	0,048	0	0,023	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	PA	Itaituba	0,805	0	0,024	0,056	0,036	0	0	0	0	0,024	0,021	0,035	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	PA	Redenção	0,944	0	0,056	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	PA	Santarém	0,442	0,024	0,155	0	0,289	0	0	0	0	0,041	0	0	0,049	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	PA	Tucuruí	0,901	0,025	0,021	0,039	0	0	0	0,015	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	RO	Cacoal	0,715	0	0	0,026	0,053	0	0	0	0,057	0	0	0,034	0	0	0,069	0	0,045	0	0	0	0	0	0	0	0	
	RO	Jaru	0,639	0	0,210	0	0,132	0	0	0	0,019	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	RO	Porto Velho	0,360	0,110	0,084	0,260	0,093	0	0	0	0	0,048	0	0	0	0,022	0,023	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	TO	Araguaína	0,677	0,024	0,059	0,070	0	0,058	0	0,023	0,076	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,013	0	0	0	0	0	0	
	TO	Palmas	0,548	0,241	0,088	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,123	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		<i>média</i>	0,705	0,050	0,070	0,045	0,055	0,007	0,000	0,003	0,014	0,010	0,002	0,006	0,004	0,000	0,015	0,008	0,000	0,004	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
Nordeste	AL	Maceió	0,277	0,114	0	0,509	0	0,100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	BA	Salvador	0,645	0,126	0,096	0	0,013	0	0,120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	BA	Brumado	0	0,521	0	0	0	0	0,479	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	PI	Floriano	0,719	0	0,013	0,268	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	PI	Parnaíba	0,746	0,016	0	0,108	0,050	0,018	0,025	0	0	0	0,036	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	PI	Teresina	0,739	0	0	0,197	0	0,037	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,026	0	0	0	0	0	0	
	PE	Recife	0,532	0,080	0	0,240	0	0,025	0	0,122	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	PE	Palmares	0,295	0,056	0	0,082	0	0,451	0	0,083	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,033	0	0	0	0	0	0	0	
	RN	Natal	0,434	0,106	0	0,279	0	0,041	0,019	0,060	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,061	0	0	
	SE	Aracaju	0,627	0,084	0,029	0,141	0	0	0	0,106	0	0	0	0	0	0,013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	SE	NSra da Glória	0,854	0,087	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,059	0	0	0	0	
		<i>média</i>	0,533	0,108	0,013	0,166	0,006	0,061	0,058	0,034	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,005	0,000	0,005	0,000	0,000	0,006	0,000	
Centro-Oeste	DF	Brasília	0,672	0,328	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	GO	Goiânia	0,670	0,105	0	0	0	0	0	0	0	0,036	0	0	0	0	0	0	0	0	0,119	0,070	0	0	0	0	0	
	GO	Iporá	0,493	0,420	0,022	0	0	0,039	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,027	0	0	0	0	0	
	GO	Posse	0,678	0	0,041	0,059	0,066	0	0	0,021	0,045	0,038	0,040	0,012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	MS	Coxim	0,730	0,119	0,078	0	0	0,073	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	MS	Dourados	0,423	0,249	0,293	0	0	0	0	0	0	0	0,016	0,019	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	MT	B. do Garças	0,883	0,019	0,012	0,073	0	0,013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	MT	Alta Floresta	0,812	0	0,027	0	0	0	0	0	0	0,060	0	0	0,056	0	0	0	0	0	0	0	0,015	0,030	0	0	0	
	MT	Água Boa	0,989	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,011	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	MT	Confresa	0,717	0,037	0,069	0,052	0	0	0	0,022	0	0,050	0	0	0	0	0	0	0	0,030	0	0,023	0	0	0	0	0	0
			<i>média</i>	0,707	0,128	0,054	0,018	0,007	0,001	0,011	0,000	0,004	0,004	0,019	0,006	0,003	0,007	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,014	0,003	0,008	0,003	0,000	
Sudeste	ES	Cach. do Itapemirim	0,853	0,086	0,021	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,040	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	ES	Nova Venécia	0,770	0,100	0,031	0	0	0,029	0	0	0	0	0	0	0	0	0,071	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	ES	Vitória	0,806	0	0	0,074	0	0	0,055	0	0	0	0	0	0	0	0,036	0,030	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	MG	Belo Horizonte	0,604	0,147	0,189	0,060	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	MG	Gov. Valadares	0,455	0,283	0,023	0	0	0,239	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	MG	Teófilo Otoni	0,940	0,031	0	0,017	0	0	0	0	0	0	0	0	0,011	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	RJ	Angra dos Reis	0,755	0,167	0,057	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,021		
	RJ	Cp dos Goytacazes	0,856	0	0,054	0	0,033	0	0	0	0	0	0	0,037	0,020	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	RJ	Rio de Janeiro	0,756	0,174	0,051	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,018		
	RJ	Volta_Redonda	0,670	0,000	0,154	0	0	0,031	0,144	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	SP	São Sebastião	0,490	0,477	0,032	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		<i>média</i>	0,723	0,133	0,056	0,007	0,010	0,003	0,038	0,000	0,005	0,000	0,000	0,000	0,003	0,003	0,000	0,000	0,013	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004		
Sul	PR	Londrina	0,691	0,020	0	0,015	0,138	0	0	0	0,072	0	0	0	0	0,064	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	RS	Santa_Maria	1,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		<i>média</i>	0,845	0,010	0,000	0,008	0,069	0,000	0,000	0,000	0,000	0,036	0,000	0,000	0,000	0,000	0,032	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
		<i>média total</i>	0,672	0,101	0,045	0,059	0,021	0,018	0,027	0,009	0,005	0,005	0,004	0,003	0,003	0,002	0,003	0,003	0,003	0,002	0,002	0,003	0,002	0,002	0,002	0,001		

O melhor modelo de substituição escolhido para a reconstrução da árvore filogenética do segmento IIS6, também foi baseado no Critério Bayesiano de Schwarz (BIC) no *ModelFinder* (112), sendo o K2P+I escolhido por apresentar o melhor BIC. Embora a árvore de verossimilhança reconstruída, à semelhança do que ocorreu com os haplótipos do segmento IIS6, tenha dividido os haplótipos IIS6 em dois grupos (Figura 16), estes não tiveram um bom suporte de *bootstrap* (36), e portanto, essa divisão em clados não foi considerada nas nossas análises. Já a rede de haplótipos, pelo método TCS, determinou uma estrutura bastante complexa (

Figura 17).

Não foi observada nenhuma substituição não-sinônima, ou seja, com alteração de aminoácido. Portanto, sem sinal de mutações *kdr* também no segmento IIS6. No entanto, foram encontradas oito alterações sinônimas. Os haplótipos 3s6.07, 3s6.16 e 3s6.18 apresentaram um polimorfismo (GAT/GAC) convergente no códon 1506, no éxon 30. O haplótipo 3s6.20, que aparece mais distante dos demais nas análises filogenéticas, apresentou um polimorfismo no códon 1516 (CCG/CCA), no éxon 31, convergente com os haplótipos 3s6.06, 3s6.08, 3s6.12, 3s6.16 e 3s6.23. Ainda no éxon 31, outros dois polimorfismos sinônimos foram observados: um no códon 1514 (AAG/AAA) no haplótipo 3s6.02, detectado em 29 das populações analisadas e distribuído entre todas as regiões do país; e outro no códon 1528 (TTC/TTT), convergente entre os haplótipos 3s6.01, 3s6.02, 3s6.07, 3s6.09, 3s6.14 e 3s6.21. Ainda no éxon 31, outros dois polimorfismos sinônimos foram observados: um no códon 1514 (AAG/AAA) no haplótipo 3s6.02, detectado em 29 das populações analisadas e distribuído entre todas as regiões do país; e outro no códon 1528 (TTC/TTT), convergente entre os haplótipos 3s6.01, 3s6.02, 3s6.07, 3s6.09, 3s6.14 e 3s6.21.

O haplótipo IIS6 mais distribuído foi o 3s6.00, encontrado em uma frequência de 67,8% das sequências (Tabela 5) e distribuído entre 44 populações, sendo o haplótipo com frequência média mais alta em todas as regiões do país, e com uma frequência cerca de 6x superior ao segundo haplótipo mais frequente (3s6.01). A frequência do haplótipo 3s6.00 foi ainda superior ao haplótipo mais frequente da região IIS6 (2s6.00/36,0%), sendo lido cerca de 626 mil vezes. O haplótipo 3s6.01 (9,5%) foi encontrado em 31 populações. O haplótipo 3s6.02 (4,52%), quarto haplótipo de maior frequência, foi identificado em 29 populações. A maioria dos haplótipos observados (17 dentre os 24), apresentaram frequências abaixo de 1%. O

haplótipo menos frequente, 3s6.23 (0,09%), foi encontrado apenas em duas populações: Angra dos Reis e Rio de Janeiro, ambas do Estado do Rio de Janeiro (Figura 18Figura 19). O haplótipo 3s6.16 foi encontrado exclusivamente no estado do Espírito Santo, corroborando com a ideia apresentada acima de que as populações de *Ae. albopictus* deste estado tenham origem diferenciada das demais regiões do país (os haplótipos do segmento IIS6 2s6.16 e 2s6.17 foram encontrados exclusivamente em populações das mesmas localidades: Vitória, Cachoeiro do Itapemirim e Nova Venécia). O haplótipo 3s6.09, foi encontrado em três populações do Norte (Itaituba, Santarém e Porto Velho), além de Posse e Londrina, das regiões Centro-oeste e Sul, respectivamente (Figura 19).

Em comparação com sequências homólogas disponíveis de populações de *Ae. albopictus* de outros países, o haplótipo 3s6.15, encontrado nas populações de Porto Velho e Cacoal (RO) e Londrina (PR), apresentou 100% de identidade com a sequência KC152046 (GenBank). Assim, pelos mesmos motivos acima observados quanto ao haplótipo 2s6.02, o 3s6.15 também deve estar presente em população de *Ae. albopictus* da Malásia.

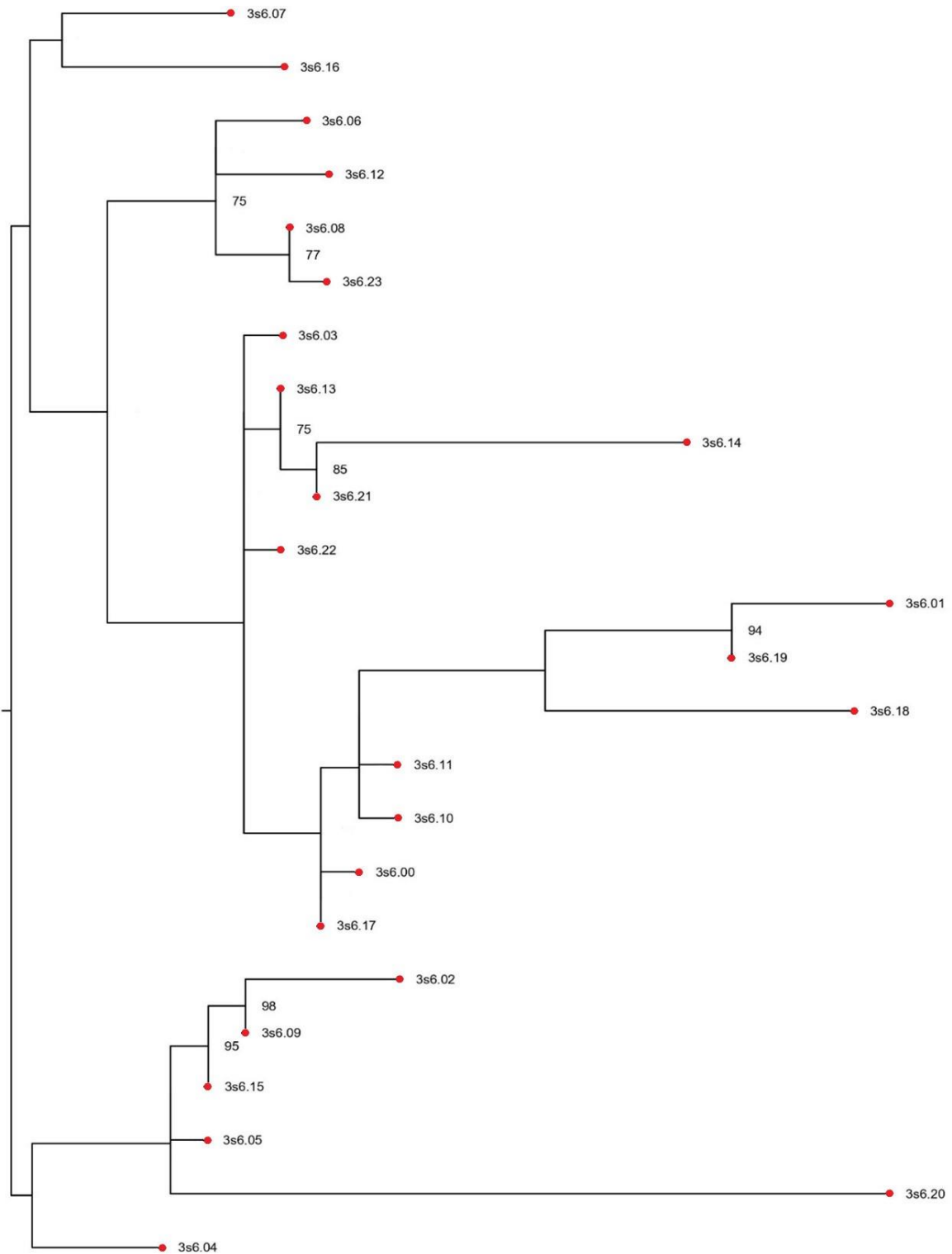


Figura 16: Árvore filogenética da região III S6 do  $Na_v$ , construída pelo método de máxima verossimilhança, com o modelo de substituição nucleotídica Kimura 2 parâmetros (K2P+I). A árvore é um consenso construído a partir de 1000 bootstrap. Os valores de bootstrap maiores que 75 %, obtidos mediante 1000 permutações estão indicados nos respectivos nós (%).

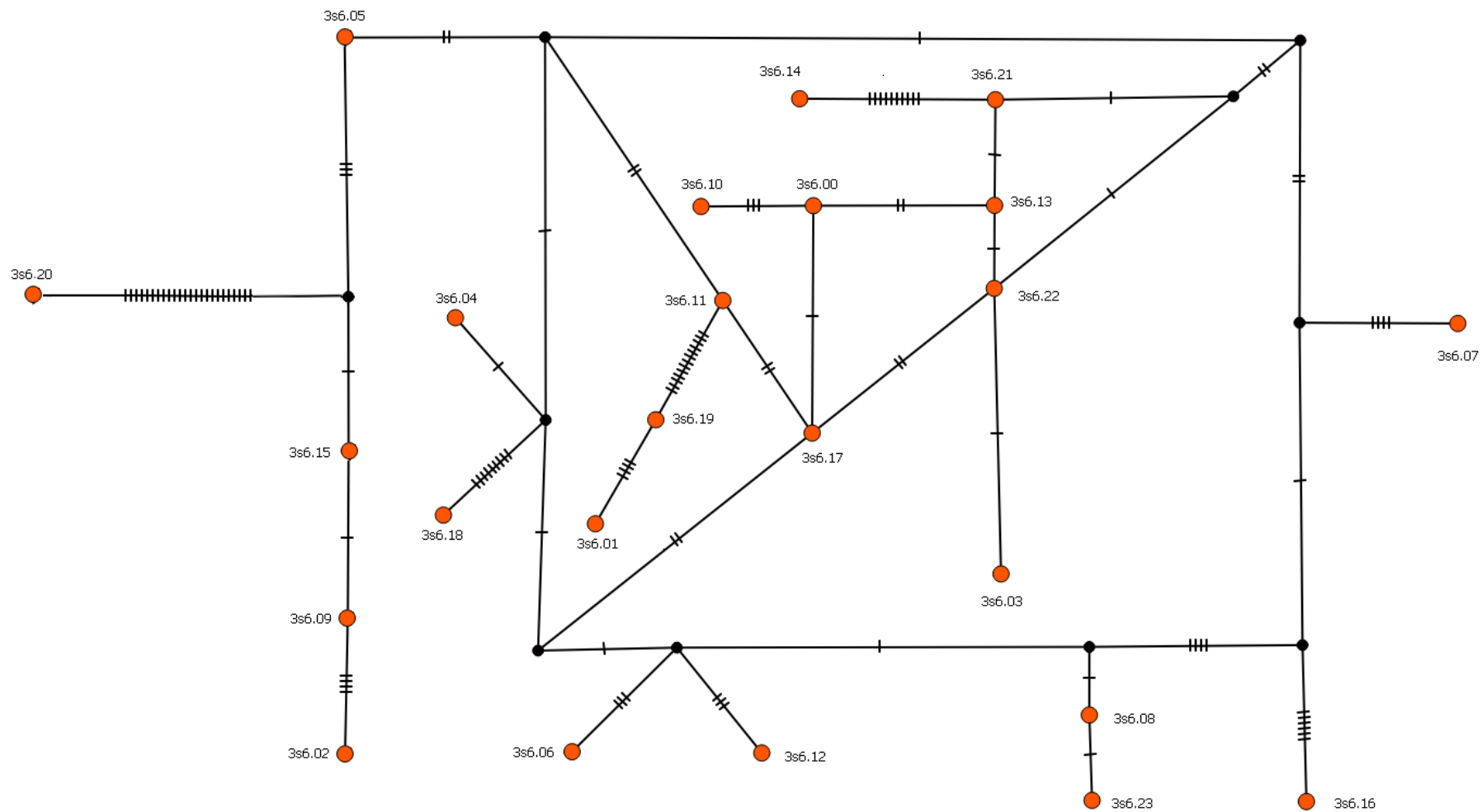


Figura 17: Rede de haplótipos da região III S6 do Nav de *Ae. albopictus* baseada na genealogia calculada pelo método TCS (109). Os haplótipos estão representados por pontos vermelhos e indicados por seu respectivo nome. As linhas tracejadas entre os pontos representam eventos mutacionais entre os haplótipos conectados.



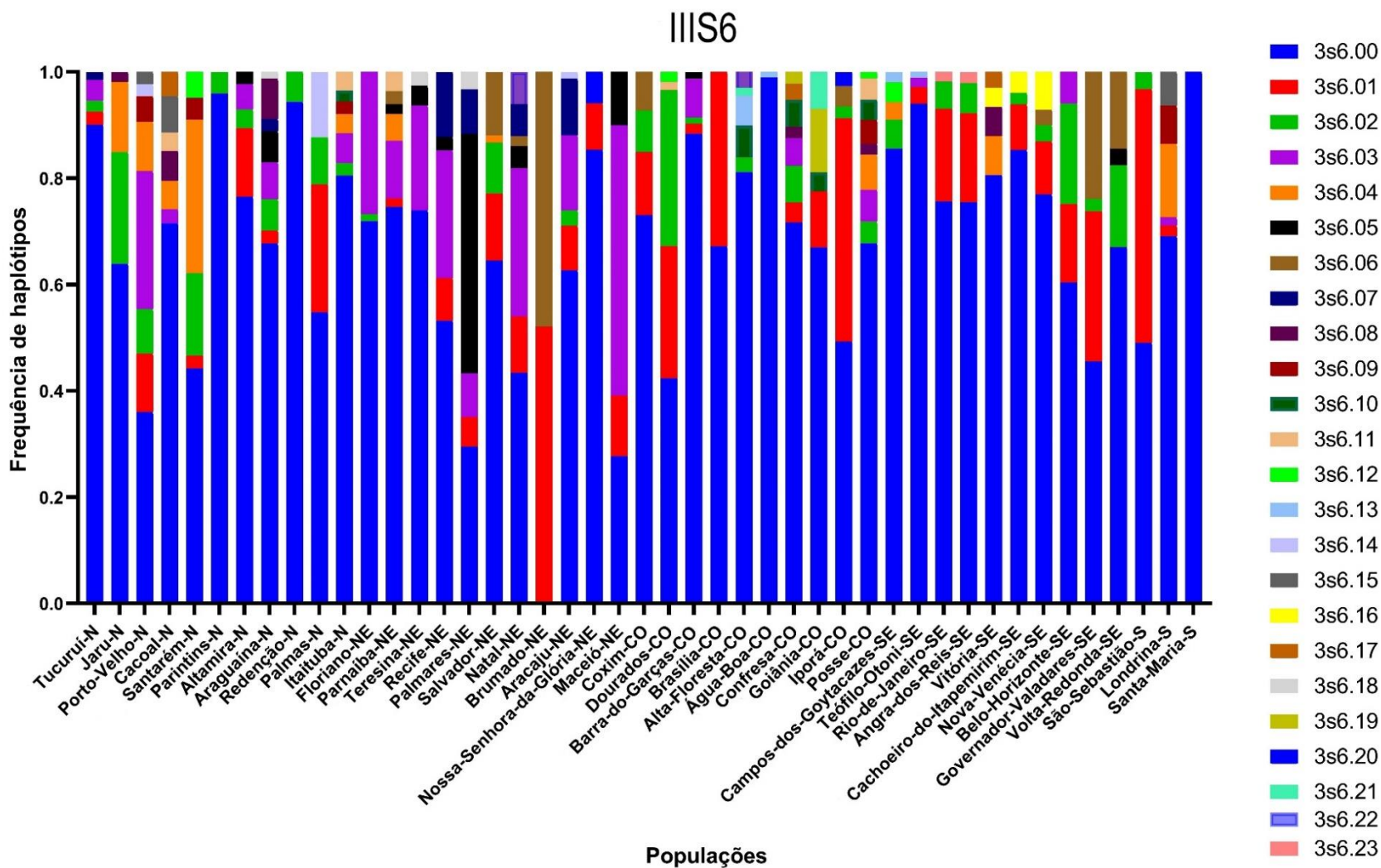


Figura 18: Frequência de haplótipos do segmento *IIIS6* do *Na<sub>v</sub>* em populações de *Ae. albopictus* agrupadas por região do Brasil. Os diferentes haplótipos estão representados em cores nas barras de cada população. As macrorregiões geográficas de cada localidade estão indicadas (N, NE, CO, SE e S).

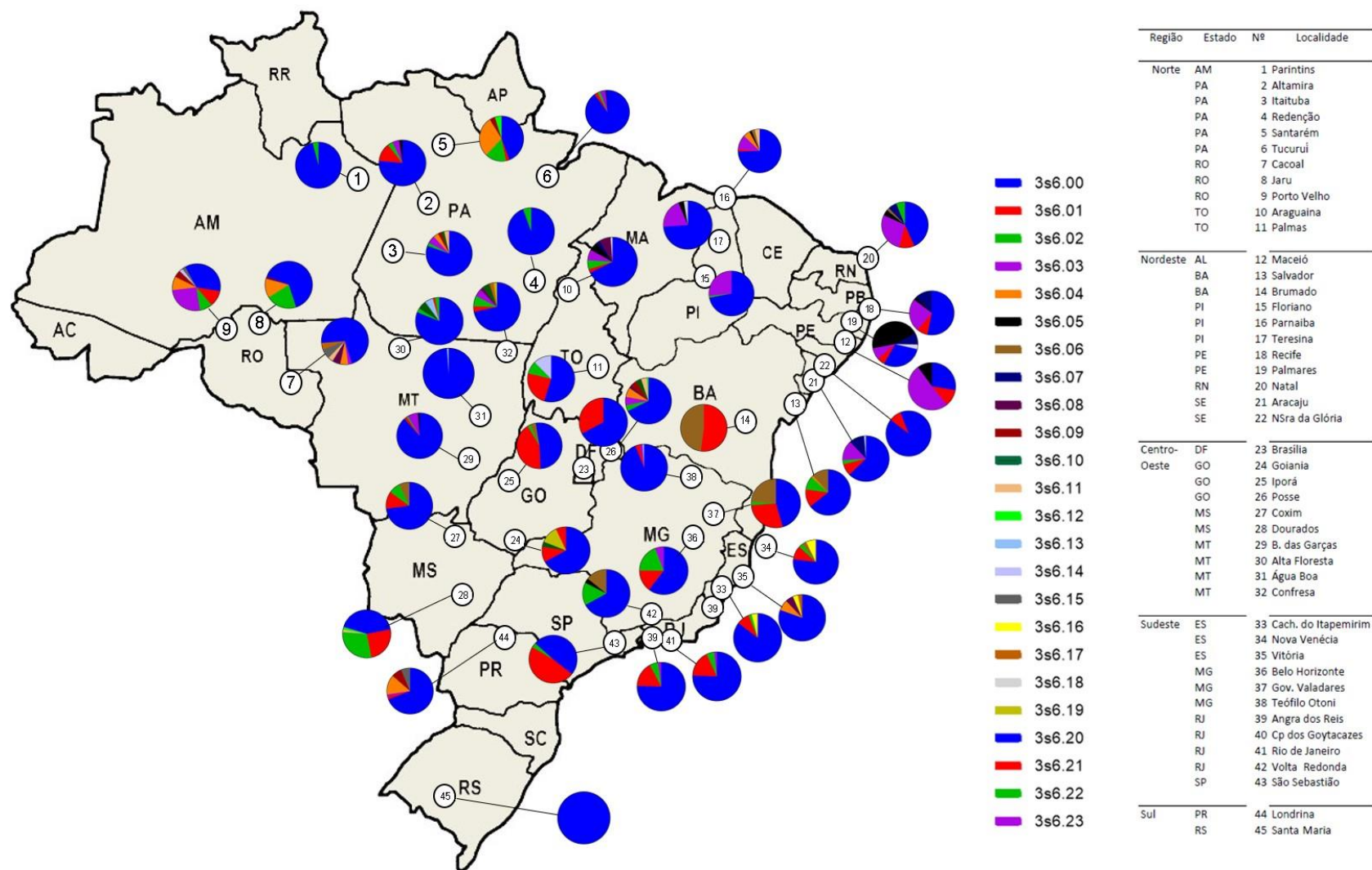


Figura 19: Distribuição de haplótipos do segmento III S6 do  $Na_v$  em populações de *Ae. albopictus* do Brasil. Cada círculo representa uma população avaliada e cada cor representa a frequência de haplótipos na população

## 6.6 Haplótipos compostos dos segmentos IIS6 e IIIS6 em fase

A sugestão da fase em que os haplótipos dos dois segmentos se encontram só é possível ser feita para aquelas populações onde pelo menos um dos segmentos foi monomórfico. Este foi o caso das populações de Maceió (IIS6 monomórfico, com o haplótipo 2s6.00) e Santa Maria (IIIS6 monomórfico, com o haplótipo 3s6.00) (Tabela 2 e Tabela 5). Desta forma, os mais prováveis haplótipos em fase para as populações brasileiras de *Ae. albopictus* são os haplótipos compostos 1) 2s6.00\_B + 3s6.00, 2) 2s6.00\_B + 3s6.01, 3) 2s6.00\_B + 3s6.05, 4) 2s6.00\_B + 3s6.07, 5) 2s6.01\_A + 3s6.00 e 6) 2s6.04\_B + 3s6.00 (Figura 20). O haplótipo composto 1 apresenta quatro substituições sinônimas: 981 (CGG/CGA), 993 (TGC/TGT), 1540 (CTC/CTT) e 1541 (AAC/AAT). Considerando a presença dos dois haplótipos mais frequentes de ambos os fragmentos estarem presentes na maioria das localidades, é possível que este seja o haplótipo composto mais circulante nas populações de *Ae. albopictus* do Brasil. As únicas localidades onde com certeza o haplótipo composto 1 não foi observado foram: Palmares, Natal, Brumado, Nossa Senhora da Glória, Palmas, Maceió e Santa Maria. O haplótipo composto 2 (2s6.00\_B + 3s6.01) apresentou as substituições sinônimas 981 (CGG/CGA), 993 (TGC/TGT) e 1528 (TTC/TTT). Este também pode estar amplamente distribuído, não sendo possível ser encontrado em 11 populações, pela ausência de algum dos haplótipos de um dos segmentos. O haplótipo composto 3 (2s6.00\_B + 3s6.05) não possui substituições nos éxons do segmento IIIS6 e é possível de ser encontrado nas cinco populações onde o haplótipo 3s6.05 foi identificado (Figura 19 e Tabela 5).

## Haplótipos compostos

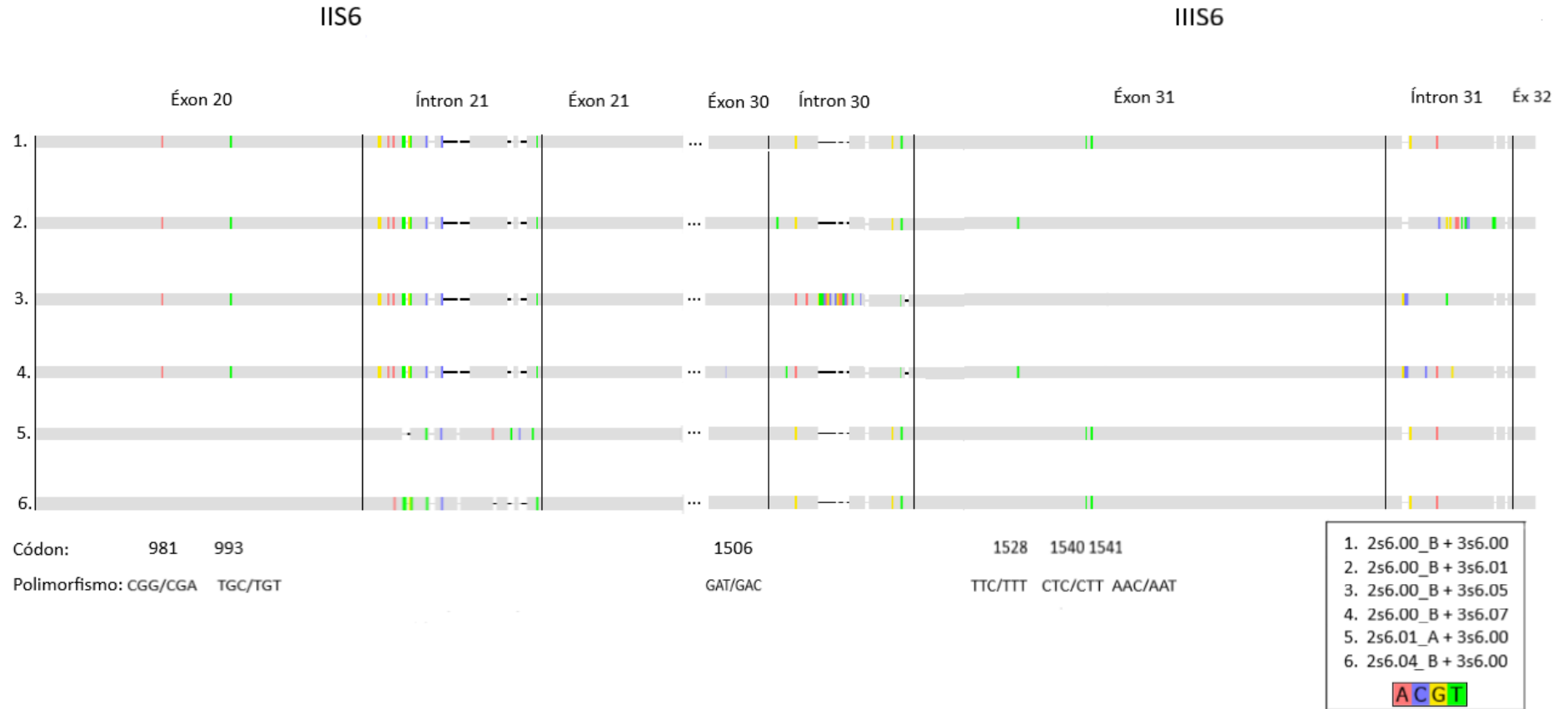


Figura 20: Esquema representando a composição dos haplótipos compostos dos fragmentos dos segmentos IIS6 e IIIS6 do  $N_{av}$  de *Ae. albopictus* do Brasil, em fase. Os haplótipos foram alinhados, e juntados a partir de populações onde pelo menos um dos segmentos foi monomórfico. Os polimorfismos em relação às sequências consenso (veja aneos I e II) estão indicados nas cores vermelho, roxo, amarelo e verde para os nucleotídeos A, C, G e T, respectivamente.

## 7 DISCUSSÃO

Os arbovírus são protagonistas de surtos epidêmicos, principalmente no mundo tropical, e a falta de vacina com eficácia múltipla para as variáveis genéticas virais, em especial a dengue, impossibilita o controle das principais arboviroses que ocorrem nessa região (116,117). Nesse sentido, o controle vetorial tem sido priorizado no combate às arboviroses. Além da conscientização da população para evitar a disponibilização de criadouros ao redor de suas casas, o uso de inseticidas neurotóxicos é empregado com alta intensidade, enquanto ferramenta mais eficaz para redução rápida da densidade populacional dos mosquitos. Entretanto, o uso indiscriminado destes inseticidas nas últimas décadas tem selecionado populações de mosquitos vetores resistentes em escala global (83), incluindo o território brasileiro (52,118).

Os programas de ação de vigilância entomológica e do monitoramento da resistência a inseticidas no Brasil para o combate às arboviroses estão focados no *Ae. aegypti*, devido ao seu reconhecido papel como a única espécie com participação no ciclo urbano de dengue, chikungunya e Zika no país (119,120). Isso se reflete também na escassa literatura produzida por estudos de biologia, fisiologia e genética de *Ae. albopictus*, comparativamente ao farto material envolvendo *Ae. aegypti*. Com relação à resistência a inseticidas (RI) por exemplo, desde 1999, existe no país um programa que monitora a RI em populações naturais de *Ae. aegypti* aos inseticidas utilizados para seu controle (121). Como consequência, diversos estudos vêm revelando não somente os perfis fenotípicos da RI nessas populações, como os mecanismos moleculares selecionados para a resistência e seus efeitos em outros aspectos do fitness do inseto. A vigilância molecular de mutações *kdr*, que é um dos principais mecanismos relacionados à resistência a piretroides, vem mostrando como alelos de RI vem se espalhando por populações de *Ae. aegypti* do Brasil (122–125) inclusive com ocorrência de haplótipos de diferentes linhagens evolutivas, mas com convergência da mesma mutação *kdr*, no caso a F1534C (87).

O monitoramento da RI é feito essencialmente através de bioensaios de susceptibilidade, pela exposição de populações do inseto a determinadas doses do inseticida, sob condições controladas (73). Ensaios feitos diretamente no campo, ou com espécimes diretamente coletados, não controlam aspectos importantes da fisiologia do inseto, como idade, quantidade de ciclos gonotróficos e fontes de

alimentação, o que pode influenciar nos resultados do bioensaio. Portanto, para ensaios mais completos e comparáveis é necessário que sejam feitas colônias das populações em laboratório, de forma que os bioensaios sejam feitos com gerações subsequentes, sob condições operacionais padronizadas de alimentação, temperatura, humidade relativa, entre outros. Sob esse aspecto, os resultados do bioensaio levam cerca de dois meses após a coleta no campo para serem concluídos. Além disso, pela minuciosidade de trabalho e o espaço exigido para a manutenção das colônias, a quantidade de populações que um laboratório consegue avaliar em um ciclo de monitoramento é bastante limitada. Por outro lado, uma vez que os mecanismos selecionados para a RI sejam conhecidos, ensaios moleculares podem ser realizados para indicar a frequência de alelos associados à resistência nas populações.

A vigilância molecular, por ser baseada em DNA, pode ser realizada em qualquer fase do ciclo de vida do inseto e diretamente em espécimes coletados do campo, sem necessidade de manutenção de colônia em laboratório. O processo de extração de DNA e execução de algum ensaio de genotipagem podem ser concluídos em até um dia trabalho. Com isso, empregando-se a mesma força de trabalho e dispondo de um espaço físico muito menor e em um espaço de tempo muito mais curto, um laboratório pode analisar molecularmente diversas populações, comparado à execução de bioensaios. No entanto, é preciso manter claro que existem diversos mecanismos que contribuem com a RI, de modo que a análise de um único marcador molecular provavelmente não responde totalmente pelo perfil de resistência da população. Uma vez definido quais são os marcadores e, preferencialmente, o quanto eles contribuem para a resistência, é prático que sejam monitorados no tempo e espaço, mas sem perder a dimensão de que eles respondem apenas parcialmente para a RI (124).

Mutações *kdr* devem ter emergido em populações brasileiras de *Ae. aegypti* há pelo menos 15 anos, aumentando de frequência largamente e se dispersando para todas as regiões do país. Isso, mesmo após cessadas as aplicações de piretroides pelos programas governamentais de controle, o que indicam a importância da pressão exercida pelo uso de inseticidas domésticos, que são essencialmente da classe dos piretroides (121). O maior estudo que avaliou a distribuição de *kdr* em *Ae. aegypti* no país investigou amostras de 123 populações, no contexto do monitoramento de RI em *Ae. aegypti* no Brasil, revelando que as

mutações *kdr* estão disseminadas em altas frequências, chegando até 83,8% em uma população do Nordeste (124). Poucos estudos têm avaliado o fenótipo de RI em *Ae. albopictus* no Brasil (83).

Nesta dissertação, buscou-se investigar a ocorrência de mutações *kdr* de *Ae. albopictus*, provenientes das mesmas coletas realizadas para o monitoramento da RI de *Ae. aegypti* (124), em localidades que também continham *Ae. albopictus* em sua amostragem. No entanto, uma vez que os haplótipos *kdr* não estavam definidos para o uso de ferramentas de genotipagem em larga escala, foi necessário antes conhecer a diversidade nucleotídica de fragmentos do gene do canal de sódio regulado por voltagem ( $Na_V$ ) de populações brasileiras de *Ae. albopictus*. Desta forma, essa dissertação apresenta, de forma inédita, a diversidade de sequências dos segmentos IIS6 e IIS6 do  $Na_V$  de *Ae. albopictus* do Brasil, a partir de sequenciamento de alta resolução, para uma ampla amostragem em escala nacional. Embora não se tenha aqui detectado alterações sugestivas de mutação *kdr*, foi apresentado um painel detalhado de diversos haplótipos do  $Na_V$ , em que suas relações filogenéticas, frequências e locais de ocorrência somam informações sobre a dinâmica evolutiva desta espécie invasora no país.

Em 2011, foi publicada a primeira evidência de mutação *kdr* (F1534C) em *Ae. albopictus* (89), convergente àquela também presente em *Ae. aegypti*. Os primeiros relatos de mutações *kdr* em *Ae. albopictus* vieram de populações da Europa e Ásia, onde a espécie parece ter um maior impacto epidemiológico, muitas vezes, maior que *Ae. aegypti*. Nesse sentido, um estudo intercontinental, avaliou sequências com 1,107 pb (ao todo) do gene  $Na_V$ , distribuídos nos domínios II, III e IV do  $Na_V$  de 597 espécimes de *Ae. albopictus* provenientes de 12 populações distribuídas na Ásia, África, América e Europa, coletadas entre 2011 e 2014. Através de sequenciamento direto, os pesquisadores encontraram um total de 29 mutações sinônimas. A mutação no códon 1532 (I1532T) foi encontrada em mosquitos de Roma, Itália, com uma frequência de 19,7%, e a F1534S, detectada em populações do sul da China e da Flórida, EUA, com uma frequência variando de 9,5-22,6 % (126).

Um outro estudo realizado para determinar o status de resistência a inseticidas de diferentes regiões geográficas, avaliou 33 populações de países da Ásia, Europa e América do Sul (Brasil), coletadas entre 2015 e 2017. As populações de João Pessoa e Recife não apresentaram redução de sensibilidade à permetrina, enquanto uma redução de mortalidade de aproximadamente 3% foi observada na

amostragem do Maracanã (RJ), mas, no entanto, nenhuma das populações brasileiras foram genotipadas para *kdr*. Em contrapartida, os pesquisadores encontraram pela primeira vez a mutação *kdr* V1016G, bem relacionada à resistência a piretroides tipo I, em populações do Vietnã e Itália (127). Outro estudo, mais recente, realizado com população italiana de *Ae. albopictus*, reforçou a presença da mutação *kdr* V1016G, além de constatar sua ampla distribuição, e frequências de até 45% em populações de áreas costeiras, onde o uso de inseticidas é mais frequente. Diferente de *Ae. aegypti*, onde várias mutações foram encontradas nos domínios II, III e IV, as únicas mutações já relacionadas à resistência a piretroides em *Ae. albopictus* estão nos domínios II e III, ambos no sexto segmento (V1016G e F1534C/S, respectivamente) (88,126,128).

De fato, alguns estudos têm reportado a presença de populações de *Ae. albopictus* resistentes a piretroides, sem associação a mutações *kdr*. Por exemplo, em Camarões, 420 espécimes de populações resistentes a piretroides e DDT eram 100% homocigotos para o alelo selvagem F1534 (129). A sugestão é que poderia haver mutações em outros sítios não genotipados (como o 1016) ou participação de outro mecanismo selecionado para a resistência. Assim como observado em populações de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* de outros países africanos (130,131). Por outro lado, uma vez que mutações *kdr* parecem estar disseminadas ou emergindo de forma independente em diversas partes do mundo, é curioso quando populações simpátricas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* diferem no perfil de resistência e/ou na presença de mutações *kdr*.

No Brasil, pelo menos dois alelos *kdr* estão amplamente disseminados em populações de *Ae. aegypti* (124), mas aqui nenhuma mutação *kdr* foi observada em *Ae. albopictus*, ou nem mesmo sequer alguma substituição não-sinônima, apesar da ampla amostragem e do método de sequenciamento com alta cobertura média (119,5x). No Paquistão, *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* coletados na mesma região estavam resistentes a piretroides. No entanto, a primeira espécie apresentou as mutações *kdr* T1520I e F1534C, em alta frequência, e nenhuma foi identificada em *Ae. albopictus* (132). Também em populações da Malásia, constatou-se a ausência de mutações *kdr* em *Ae. albopictus*, enquanto foram detectadas as mutações F1534C e V1016G em *Ae. aegypti* (133). Nesses casos em que mutações *kdr* não foram identificadas, a resistência metabólica foi então apontada como principal mecanismo envolvido na conferência de resistência em *Ae. albopictus*, mais



especificamente, a superexpressão de enzimas da família do citocromo P450, como o *CYP6P12* (134).

O fato de não ter sido observada nenhuma substituição não-sinônima entre os diversos haplótipos do gene *Nav* aqui encontrados, apesar de ampla amostragem, não significa que as populações de *Ae. albopictus* do Brasil não estejam resistentes a piretroides, mesmo enfrentando as mesmas pressões a que *Ae. aegypti* está sujeito, pelo alto uso de piretroides nas residências. Para melhor responder a essa questão, será necessário investir na realização de bioensaios e explorar outros mecanismos moleculares ligados à resistência, já descritos em populações de *Ae. albopictus* outros países (91), como é o caso da superexpressão de enzimas da família do citocromo P450, como o *CYP6P12* em populações da Malásia (134).

É importante destacar que um estudo prévio de nosso grupo apontou a presença da mutação *kdr* F1534C em populações brasileiras de *Ae. albopictus* (135). Aqui nesse estudo foram inicialmente encontrados dois haplótipos idênticos aos descritos naquela publicação (GenBank: KX371864 e KX371865), em que um deles de fato tinha a mutação *kdr* F1534C, ficando agrupados bem distantes dos demais haplótipos. Além disso, suas sequências eram mais semelhantes com as de *Ae. aegypti*, sugerindo, portanto, contaminação com esta espécie. Com isso, aqui foram feitas amplificação e sequenciamento do gene *COI* de amostras das populações em que tais haplótipos apareceram, o que de fato confirmou serem *Ae. aegypti* (dados não mostrados). Desta forma, os dois haplótipos de *Ae. aegypti* foram retirados e seguiu-se com as análises com os demais 24. Isto indica que o algoritmo do *SeekDeep* aqui utilizado filtrou com sucesso as sequências contaminantes de *Ae. aegypti* para o segmento IIS6, mas não para o do IIIS6. Indica também que o trabalho previamente publicado por nosso grupo está equivocado e precisa ser retirado.

O Brasil é um país de dimensões continentais, onde atualmente só não há registros da ocorrência de *Ae. albopictus* em um único estado, o Acre. Nesse sentido, o banco de DNA aqui organizado abrange populações bem distribuídas no território brasileiro e representa um material valioso para vigilância molecular desta espécie invasora no país. Com a futura atualização de amostras das mesmas populações, será possível ainda analisar detalhes da estruturação genética e de fluxo gênico entre elas. O sequenciamento de alta vazão aqui realizado, evidenciou alta diversidade nucleotídica nos segmentos IIS6 e IIIS6 do *Nav* de *Ae. albopictus* do

Brasil (20 e 24 haplótipos para as regiões IIS6 e IIS6, respectivamente, Tabela 2 e Tabela 4). A partir das análises da frequência e da distribuição desses haplótipos, foi possível suscitar uma série de observações e algumas hipóteses. Uma delas é de que caso haja pressão para resistência a piretroides, alterações no *Nav* não devem estar envolvidas no processo de aquisição de resistência, como discutido acima. Isso, não somente pela ausência das clássicas mutações *kdr*, mas pela alta variedade de haplótipos encontrada. Esta variabilidade seria provavelmente bem menor caso houvesse alguma outra mutação *kdr* em segmentos do gene aqui não avaliados, uma vez que a seleção purificadora tenderia a eliminar os haplótipos não *kdr* (87). Por exemplo, também a partir de sequenciamento de alta vazão em diversas populações, apenas quatro haplótipos do segmento IIS6 foram observados em populações *Ae. aegypti* do Brasil (87). Uma população de *Ae. albopictus* do Paquistão também apresentou maior diversidade de haplótipos para estes mesmos segmentos do *Nav* do que em *Ae. aegypti* coletados na mesma região (132). Mas neste caso, isso era esperado, já que o *Ae. albopictus* é nativa da região e o *Ae. aegypti* é a espécie invasora.

O genoma completo do *Ae. albopictus* é maior que o do *Ae. aegypti*, sendo considerado, até o momento, o maior genoma dentre os mosquitos vetores. Além de ter uma carga genética densa, *Ae. albopictus* mostra uma grande quantidade de sequências repetitivas (duplicação estimada em 14,0%) e retrotransposons (55,03% do tamanho do genoma), o que dificulta a anotação precisa de seu genoma completo. É importante ressaltar que as famílias gênicas expandidas no genoma de *Ae. albopictus* são relacionadas a determinação do sexo, resistência a inseticidas, diapausa e à imunidade viral (13,136,137). As duplicações gênicas representam um importante mecanismo evolutivo de manutenção genética, contribuindo para plasticidade fenotípica e adaptação ambiental de espécies. Nesse sentido, apesar de ainda não terem sido observadas duplicações no *Nav* de *Ae. albopictus*, não é descartada a hipótese de que estejam relacionadas à alta diversidade de haplótipos aqui encontrada.

Populações de *Ae. albopictus* do Brasil tem demonstrado certa estruturação genética. Uma análise de isoenzimas em populações estados de ES, RJ, SC, PR, BA e MA, apontou uma elevada diversidade entre essas populações brasileiras, demonstrando ainda uma pequena relação entre a estrutura genética e a distância geográfica entre elas (101). Já análises com o gene mitocondrial *ND5* evidenciaram

uma baixa variabilidade genética entre populações de Vitória (ES), Jacarepaguá (RJ), Anita Guaribaldi (SC) e Praia da Fora (SC), sugerindo ainda um ancestral em comum entre populações brasileiras e estadunidenses (138).

Estudos mais recentes, utilizaram microssatélites enquanto marcadores neutros, que apresentam um maior potencial de resolução. Por exemplo, populações de *Ae. albopictus* do estado de SP foram separadas em dois grupos, com o fluxo gênico limitado, provavelmente devido à capacidade limitada de dispersão ativa da espécie (33,139,140). Entre populações sem evidência de isolamento geográfico foi observado maior fluxo gênico (140). Em uma maior escala, onde foram avaliadas populações de vários países do mundo, incluindo o Brasil, identificou-se que populações brasileiras dos estados AM e BA pertenciam a um único grupo monofilético, de origem asiática, onde os perfis genéticos das populações asiáticas estavam marcados por eventos de recolonização e, conseqüentemente, mistura entre populações invasoras e nativas (141).

O *Ae. albopictus* é nativo do sudeste da Ásia e se espalhou rapidamente pelo mundo nas últimas quatro décadas. As primeiras disseminações ocorreram para ilhas do Oceano Pacífico e para ilhas do Oceano Índico durante o século XIX (32). O maior fenômeno de expansão começou na década de 1980 e ainda continua acontecendo. Invadiu a Albânia em 1979, na Europa (142), Texas (EUA) em 1985, América do Norte (15,143) e América do Sul (Brasil, em 1986) (20). Tornou-se rapidamente bem estabelecido em todos os países mediterrâneos europeus (144). No Norte da África, foi relatado na Argélia (145,146) e em Marrocos em 2015 (145). Mais recentemente, em 2018, a espécie foi registrada na Tunísia (147). O tigre asiático é uma das espécies invasoras que conseguiu melhor se adaptar a diferentes ambientes, apresentando resistência às variadas pressões seletivas causadas pelo processo de urbanização (148,149). Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994), sugeriram que populações japonesas de *Ae. albopictus* tenham sido introduzidas no Brasil por meio das condições criadas pelo transporte de ferro realizado através de portos do Espírito Santo (150). A partir daquele momento, a espécie teria tido sua disseminação facilitada por ferrovias que transportavam o material que chegava aos portos do país. No entanto, alguns estudos divergem em relação à origem das populações de *Ae. albopictus* do Brasil, sugerindo indícios de múltiplas introduções (101,141,151–153), assim como é observado em outros países do mundo, e mesmo

em sua região nativa, onde as populações atuais parecem ser resultantes de processos de recolonização (140,141).

A presença de múltiplos haplótipos para o *Nav* identificadas nas populações do Brasil, corroboram a hipótese de múltiplas introduções. Paralelamente, análises filogenética e espacial de distribuição dos haplótipos também sugere possível emergência de novas sequências junto à expansão recente da espécie pelo país. Por exemplo, o haplótipo 3s6.15, observado em populações de Roraima e Paraná, é semelhante ao de população de *Ae. albopictus* da Malásia (GenBank, KC152046). De acordo com a rede de haplótipos das sequências brasileiras para o segmento IIS6 (

Figura 17), o haplótipo 3s6.09, também de ocorrência em populações do Norte e do Sul, teria emergido do 3s6.15, e em seguida dado origem ao 3s6.02, que está amplamente distribuído, em populações de 29 localidades. Desta forma, é possível sugerir que os haplótipos 3s6.15 e 3s6.09 sejam ancestrais, trazidos por populações invasoras de origem asiática, e que o 3s6.02 tenha emergido no Brasil e se difundido pelo país.

A exclusividade regional observada em alguns haplótipos, como o 2s6.16, 2s6.17 e 3s6.16, encontrados nas cidades de Vitória, Cachoeiro do Itapemirim e Nova Venécia, todas no estado do Espírito Santo, que comporta um dos maiores portos do Brasil, por onde acredita-se que tenha sido dada a entrada de *Ae. albopictus*, através de dispersão passiva por meio de navios de transporte de ferro da mineradora Vale (5). O haplótipo 3s6.23, encontrado exclusivamente nas cidades de Angra dos Reis e Rio de Janeiro, pode ser outra evidência de que diferentes linhagens de *Ae. albopictus* estão sendo introduzidas no Brasil. Essas análises especulativas corroboram a hipótese de Consoli e Oliveira (1994) sobre a entrada de *Ae. albopictus* no país através de portos no Espírito Santo, também se alinhando em relação à origem asiática das populações. Contudo, estudar a dinâmica evolutiva populacional irá ajudar a entender melhor como as populações de *Ae. albopictus* estão se estruturando geneticamente em meio à ampla diversidade ecológica encontrada no território brasileiro (13,140,154–156).

O conhecimento da diversidade de haplótipos é interessante para estruturar o conhecimento da dinâmica evolutiva do vetor e, em efeitos práticos, para fins de vigilância molecular. Ensaio de genotipagem do tipo alelo-específica são muito práticos e amplamente utilizados para se determinar a frequência genotípica de

determinadas mutações *kdr* já bem estabelecidas (81,82,157). É preciso, porém, observar se na população existem outros polimorfismos no códon *kdr* (ou qualquer marcador que seja) investigado, prejudicando a precisão do ensaio, por conta de *mismatches* no anelamento de *primers* e sondas. Por exemplo em *Ae. albopictus* da Itália foi observada a mutação *kdr* V1016G (1016 GTA/GAA) (128), cuja genotipagem pode ser prejudicada pela ocorrência do haplótipo não *kdr*, com substituição sinônima 1016 GTG (128), similar ao haplótipo 2s6\_05, aqui observado em populações dos estados de PI, PA, RO, RJ, AM, TO e MT. Desta forma, um ensaio alelo-específico para detecção da mutação V1016G em populações brasileiras de *Ae. albopictus* apresentaria resultados imprecisos para diversas localidades.

Estratégias de controle vetorial, principalmente novos métodos empregando ferramentas genéticas, precisam do conhecimento genômico populacional (158). Por exemplo, sequenciamento de amplas regiões do genoma ou a genotipagem de milhares de *SNPs* (159), podem ajudar a estabelecer o papel da dispersão ativa e passiva do mosquito, influenciado pelas ações humanas. Mesmo que as populações brasileiras de *Ae. albopictus* não sejam resistentes a inseticidas, a diversidade aqui encontrada é matéria prima para a seleção de variantes favoráveis à resistência. Além disso, é provável que estejam ocorrendo múltiplas entradas de populações do vetor no país, que podem trazer alelos de resistência já observados em outros países. Desta forma, as populações de *Ae. albopictus* do Brasil precisam ser constantemente monitoradas, devido à possibilidade de emergência (ou nova introdução) de linhagens com diferentes novos perfis genéticos, que possam favorecer a emergência de populações resistentes ou mesmo com maior competência vetorial (92).

## **8 PERSPECTIVAS**

A partir do DNA das mesmas amostras aqui avaliadas e de novas coletas, conhecer a dinâmica evolutiva de origem, fluxo gênico e estruturação genética do *Ae. albopictus* no Brasil, utilizando-se diversos marcadores neutros e/ou sequenciamento de amplas regiões do genoma.

## 9 CONCLUSÕES

- O método de sequenciamento de alta vazão para determinação da diversidade nucleotídica de mais de um fragmento genômico, simultaneamente e em diversas populações se mostrou eficiente.
- Uma alta diversidade nucleotídica no  $Na_V$  de populações brasileiras de *Ae. albopictus* foi encontrada, existindo ao menos, 20 e 24 haplótipos nos segmentos IIS6 e IIIS6, respectivamente.
- Não foi observada nenhuma substituição não-sinônima em ambos os segmentos, e, portanto, sem evidências de mutações *kdr* entre as populações analisadas.
- Os haplótipos do segmento IIS6 do  $Na_V$  estão divididos em dois clados, distribuídos com frequência aproximadamente similares entre os dois clados nas populações de todas as regiões do país, exceto no Nordeste, onde as frequências dos haplótipos do clado A foram 5,6x mais frequentes que as do clado B.
- Alguns haplótipos foram exclusivamente observados em populações de um único estado ou região, como foi o caso dos haplótipos 2s6.16, 2s6.17, 3s6.16 (Espírito Santo), 3s6.23 (Rio de Janeiro), 2s6.11 (região Norte), 3s6.19 e 3s6.21 (região Centro-oeste).
- A distribuição e as frequências dos haplótipos observados sugerem uma regionalização de alguns haplótipos, indicando possível estruturação genética.





```

          V L N L F L A L L L S N F G S S S L S A P T A D [1039]
Consensus aatgctttctctc-ccc-tcccaaacagGTACTTAACTTTTCTTAGCCTTGCCTTTTGTCCAATTCGGTTCATCGTCGCTGTCGGCACCACGGCCGACAA 331
2s6.00 .....-...-...-...t.....
2s6.01 ...a.....t...c.....t.....
2s6.02 .....-...t.t.....
2s6.03 ...t.....-...-...-...
2s6.04 .....-...-...-...t.....
2s6.05 .....-...c.....t.....G.....
2s6.06 ...a.....t...c.....t.....
2s6.07 .....-...c.....t.....
2s6.08 .....-...t.....
2s6.09 .....-...t.....
2s6.10 .....-...c.....ta.....
2s6.11 ...t.....-...-...t.....T.....
2s6.12 .....-...t.....t.....A.....
2s6.13 ...t.....-...-...-...
2s6.14 .....-...tc.....t.....
2s6.15 .....t...c.t...t.....
2s6.16 .....-...-...-...t.....
2s6.17 .....-...-...-...t.....A.....
2s6.18 .....t...t...t.tg.....
2s6.19 ...t.....-...-...-...

```

Diversidade nucleotídica no segmento IIS6 do Nav em populações de *Aedes albopictus* do Brasil. Alinhamento geneious entre os haplótipos encontrados neste estudo (2s6.00-3s6.19) e sequência consenso gerada pelo software geneious. Os nucleotídeos em letras maiúsculas correspondem à região de codificação (Éxons 20 e 21) e aqueles em letras minúsculas referem-se ao íntron, com a numeração no alinhamento no topo de cada bloco, e sublinhado as sequências referentes às posições dos primers. Os sítios invariáveis estão indicados com pontos, os sítios polimórficos com o nucleotídeo alternativo e os gaps com (-). Os códons em vermelho representam os códons 1520, 1532 e 1534, respectivamente, onde ocorrem mutações *kdr* em *Ae. albopictus*.





Anexo II - *Aedes albopictus* - gene *Nav* - segmento IIIS6, éxons 30-31 - legenda

Diversidade nucleotídica no segmento IIIS6 do *Nav* em populações de *Aedes albopictus* do Brasil. Alinhamento geneious entre os haplótipos encontrados neste estudo (3s6.00-3s6.23) e sequência consenso gerada pelo software geneious. Os nucleotídeos em letras maiúsculas correspondem à região de codificação (Éxons 30 e 31) e aqueles em letras minúsculas referem-se ao íntron, com a numeração no alinhamento no topo de cada bloco, e sublinhado as sequências referentes às posições dos primers. Os sítios invariáveis estão indicados com pontos, os sítios polimórficos com o nucleotídeo alternativo e os gaps com (-). Os códons em vermelho representam os códons 1520, 1532 e 1534, respectivamente, onde ocorrem mutações *kdr* em *Ae. albopictus*.

## 11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Colless DH. A note on the status of *Aedes malayensis* and distribution of *Aedes albopictus*. Mosq Syst. 1973;5(Woodhill 1949):225–6.
2. Jason Pitts R. A blood-free protein meal supporting oogenesis in the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse). J Insect Physiol [Internet]. 2014;64(1):1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.02.012>
3. Delatte H, Desvars A, Bouétard A, Bord S, Gimonneau, Geoffrey Vourc'h G, Fontenille D. Blood-feeding behavior of *Aedes albopictus*, a vector of chikungunya on la reunion. Vector-Borne Zoonotic Dis [Internet]. 2010;10(3):249–58. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed9&NEWS=N&AN=2010262819>
4. Farnesi LC, Menna-Barreto RFS, Martins AJ, Valle D, Rezende GL. Physical features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*: Connection with distinct levels of resistance to desiccation. J Insect Physiol. 2015 Dec;83:43–52.
5. Consoli RAGB, Oliveira RL de. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. 1994.
6. Paupy C, Delatte H, Bagny L, Corbel V, Fontenille D. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. Microbes Infect. 2009;11(14–15):1177–85.
7. Gratz NG. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. Vol. 18, Medical and Veterinary Entomology. 2004. p. 215–27.
8. Weaver SC, Reisen WK. Present and future arboviral threats. Vol. 85, Antiviral Research. 2010. p. 328–45.
9. Lwande OW, Obanda V, Lindström A, Ahlm C, Evander M, Näslund J, et al. Globe-Trotting *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Risk Factors for Arbovirus Pandemics. Vol. 20, Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 2020. p. 71–81.

10. Briegel H, Timmermann SE. *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): Physiological aspects of development and reproduction. *J Med Entomol*. 2001;38(4):566–71.
11. Benelli G, Wilke ABB, Beier JC. *Aedes albopictus* (Asian Tiger Mosquito). *Trends Parasitol*. 2020;36(11):942–3.
12. Paupy C, Delatte H, Bagny L, Corbel V, Fontenille D. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. *Microbes Infect* [Internet]. 2009;11(14–15):1177–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2009.05.005>
13. Chen XG, Jiang X, Gu J, Xu M, Wu Y, Deng Y, et al. Genome sequence of the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*, reveals insights into its biology, genetics, and evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(44):E5907–15.
14. ISSG. Global Invasive Species Database (GISD). Species profile *Aedes albopictus*. 2021.
15. Sprenger D, Wuithiranyagool T. The discovery and distribution of *Aedes albopictus* in Harris County, Texas. *J Am Mosq Control Assoc*. 1986 Jun;2(2):217–9.
16. Hughes JH, Porter JE. Dispersal of mosquitoes through transportation with particular reference to immature stages. *Mosq News*. 1956;16(2):116–11.
17. Eritja R, da Cunha Ramos H, Aranda C. Aircraft-mediated mosquito transport: new direct evidence. *J Am Mosq Control Assoc*. 2000 Dec;16(4):339.
18. Isaäcson M. Airport malaria: a review. *Bull World Health Organ*. 1989;67(6):737–43.
19. Eritja R, Palmer JRB, Roiz D, Sanpera-Calbet I, Bartumeus F. Direct Evidence of Adult *Aedes albopictus* Dispersal by Car. *Sci Rep*. 2017 Oct;7(1):14399.
20. Forattini OP. Identification of *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) in Brazil. *Rev Saude Publica* [Internet]. 1986 Jun [cited 2021 Feb 22];20(3):244–5. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-89101986000300009&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101986000300009&lng=pt&tlng=pt)
21. de Brito M, Marques GR, Marques CC, Tubaki RM. First finding of *Aedes*

- (*Stegomyia albopictus* (Skuse) in the State of São Paulo (Brazil). *Rev Saude Publica* [Internet]. 1986 Dec [cited 2021 May 27];20(6):489. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-89101986000600011&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101986000600011&lng=pt&tlng=pt)
22. Sant'Ana AL. First recorded occurrence of *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) in the southeastern region of Brazil. *Rev Saude Publica* [Internet]. 1996 Aug [cited 2021 Feb 22];30(4):392–3. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-89101996000400013&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101996000400013&lng=pt&tlng=pt)
  23. dos Santos SO, do Nascimento JC. First register of *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) presence in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Saude Publica* [Internet]. 1998 Oct [cited 2021 Feb 22];32(5):486. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-89101998000500013&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101998000500013&lng=pt&tlng=pt)
  24. Santana AC da S, Dantas de Araujo CZ, Novaes JRP de, Santos M da GM dos, Santana WS. Primeira Ocorrência de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Estado de Sergipe. *EntomoBrasilis*. 2014;7(3):227–9.
  25. Carvalho RG, Lourenço-De-Oliveira R, Braga IA. Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2014 Sep [cited 2021 May 28];109(6):787–96. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762014000600787&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762014000600787&lng=en&tlng=en)
  26. Saraiva JF, Maitra A, Galardo AKR, Scarpassa VM. First record of *Aedes (Stegomyia) albopictus* in the state of amapá, northern Brazil. *Acta Amaz* [Internet]. 2019 Mar [cited 2021 Feb 22];49(1):71–4. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0044-59672019000100071&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0044-59672019000100071&lng=en&tlng=en)
  27. Roiz D, Wilson AL, Scott TW, Fonseca DM, Jourdain F, Müller P, et al. First record

- of *Aedes (Stegomyia) albopictus* in the state of amapá, northern Brazil. Morrison AC, editor. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2021 Feb 16];12(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2009.05.005>
28. Ferreira-de-Lima VH, Câmara DCP, Honório NA, Lima-Camara TN. The Asian tiger mosquito in Brazil: Observations on biology and ecological interactions since its first detection in 1986. Acta Trop [Internet]. 2020;205(January):105386. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105386>
29. Pancetti FGM, Honório NA, Urbinatti PR, Lima-Camara TN, Pancetti FGM, Honório NA, et al. Twenty-eight years of *Aedes albopictus* in Brazil: a rationale to maintain active entomological and epidemiological surveillance. Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. 2015 Feb [cited 2021 Feb 22];48(1):87–9. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86822015000100087&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822015000100087&lng=en&tlng=en)
30. Ferreira-de-Lima VH, Andrade P, Thomazelli L, Marrelli M, Urbinatti P, Almeida R, et al. Silent circulation of dengue virus in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) resulting from natural vertical transmission. Sci Rep. 2020 Mar 2;10:3855.
31. Reiter P, Sprenger D. The used tire trade: a mechanism for the worldwide dispersal of container breeding mosquitoes. J Am Mosq Control Assoc. 1987 Sep;3(3):494–501.
32. Knudsen AB. Global distribution and continuing spread of *Aedes albopictus*. Parassitologia. 1995 Dec;37(2–3):91–7.
33. Ayllón T, Câmara DCP, Morone FC, da Silva Gonçalves L, de Barros FSM, Brasil P, et al. Dispersion and oviposition of *Aedes albopictus* in a Brazilian slum: Initial evidence of Asian tiger mosquito domiciliation in urban environments. Morrison AC, editor. PLoS One [Internet]. 2018 Apr 23 [cited 2021 Feb 19];13(4):e0195014. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0195014>
34. Forattini OP. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Cad Saude Publica [Internet]. 1995 Mar [cited 2021 May 26];11(1):157–8. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-)



35. Vavassori L, Saddler A, Müller P. Active dispersal of *Aedes albopictus*: A mark-release-recapture study using self-marking units. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2019;12(1):1–14. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3837-5>
36. Marini F, Caputo B, Pombi M, Travaglio M, Montarsi F, Drago A, et al. Estimating Spatio-Temporal Dynamics of *Aedes albopictus* Dispersal to Guide Control Interventions in Case of Exotic Arboviruses in Temperate Regions. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(1):10281. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46466-4>
37. Honório NA, Costa Silva W, Leite PJ, Gonçalves JM, Lounibos LP, Lourenço-de-Oliveira R. Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an Urban Endemic Dengue Area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2003 Mar [cited 2021 May 31];98(2):191–8. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762003000200005&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762003000200005&lng=en&tlng=en)
38. Sivan A, Shriram AN, Sunish IP, Vidhya PT. Host-feeding pattern of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in heterogeneous landscapes of South Andaman, Andaman and Nicobar Islands, India. *Parasitol Res*. 2015;114(9):3539–46.
39. Kraemer MUG, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQN, Shearer FM, Barker CM, et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Elife*. 2015;4(JUNE2015):1–18.
40. Richards SL, Ponnusamy L, Unnasch TR, Hassan HK, Apperson CS. Host-feeding patterns of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in relation to availability of human and domestic animals in suburban landscapes of central North Carolina. *J Med Entomol*. 2006;43(3):543–51.
41. Faraji A, Egizi A, Fonseca DM, Unlu I, Crepeau T, Healy SP, et al. Comparative Host Feeding Patterns of the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus*, in Urban and Suburban Northeastern USA and Implications for Disease Transmission. *PLoS Negl*

Trop Dis. 2014;8(8).

42. Bonizzoni M, Gasperi G, Chen X, James AA. The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: Current knowledge and future perspectives. Trends Parasitol [Internet]. 2013;29(9):460–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2013.07.003>
43. Pereira-Dos-Santos T, Roiz D, Lourenço-De-Oliveira R, Paupy C. A systematic review: Is *Aedes albopictus* an efficient bridge vector for zoonotic arboviruses? Pathogens. 2020;9(4):1–24.
44. Armbruster PA. Photoperiodic Diapause and the Establishment of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in North America. Vol. 53, Journal of Medical Entomology. 2016. p. 1013–23.
45. Hawley WA, Reiter P, Copeland RS, Pumpuni CB, Craig GB. *Aedes albopictus* in North America: Probable introduction in used tires from Northern Asia. Science (80-). 1987;236(4805):1114–6.
46. Kesavaraju B, Brey CW, Farajollahi A, Evans HL, Gaugler R. Effect of Malathion on Larval Competition Between *Aedes albopictus* and *Aedes atropalpus* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol [Internet]. 2011 Mar 1;48(2):479–84. Available from: <https://doi.org/10.1603/ME10101>
47. Waldock J, Chandra NL, Lelieveld J, Proestos Y, Michael E, Christophides G, et al. The role of environmental variables on *Aedes albopictus* biology and chikungunya epidemiology. Pathog Glob Health. 2013 Jul;107(5):224–41.
48. Kesavaraju B, Leisnham PT, Keane S, Delisi N, Pozatti R. Interspecific Competition between *Aedes albopictus* and *A. sierrensis*: potential for Competitive Displacement in the Western United States. PLoS One. 2014;9(2):e89698.
49. Armistead JS, Arias JR, Nishimura N, Lounibos LP. Interspecific larval competition between *Aedes albopictus* and *Aedes japonicus* (Diptera: Culicidae) in northern Virginia. J Med Entomol. 2008 Jul;45(4):629–37.
50. Ho BC, Ewert A, Chew LM. Interspecific competition among *Aedes aegypti*, *Ae.*

albopictus, and *Ae. triseriatus* (Diptera: Culicidae): larval development in mixed cultures. *J Med Entomol* [Internet]. 1989 Nov 1 [cited 2021 May 27];26(6):615–23. Available from: <https://academic.oup.com/jme/article-lookup/doi/10.1093/jmedent/26.6.615>

51. Bevins SN. Invasive mosquitoes, larval competition, and indirect effects on the vector competence of native mosquito species (Diptera: Culicidae). *Biol Invasions* [Internet]. 2008;10(7):1109–17. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10530-007-9188-8>
52. Tancredi A, Papandrea D, Marconcini M, Carballar-Lejarazu R, Casas-Martinez M, Lo E, et al. Different populations of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) from Central Africa are susceptible to zika virus infection. *Parasites and Vectors* [Internet]. Tenth Edit. 2020 Nov 1 [cited 2021 Feb 16];12(1):1–12. Available from: <http://library1.nida.ac.th/termpaper6/sd/2554/19755.pdf>
53. Braks MAH, Honório NA, Lounibos LP, Lourenço-de-Oliveira R, Juliano SA. Interspecific competition between two invasive species of container mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), in Brazil. *Ann Entomol Soc Am*. 2004;97(1):130–9.
54. Camara DCP, Codeço CT, Juliano SA, Lounibos LP, Riback TIS, Pereira GR, et al. Seasonal differences in density but similar competitive impact of *Aedes albopictus* (Skuse) on *Aedes aegypti* (L.) in rio de janeiro, Brazil. *PLoS One*. 2016 Jun 1;11(6).
55. Bargielowski IE, Lounibos LP. Satyrization and satyrization-resistance in competitive displacements of invasive mosquito species. *Insect Sci*. 2016 Apr;23(2):162–74.
56. Honório NA, Wiggins K, Câmara DCP, Eastmond B, Alto BW. Chikungunya virus vector competency of Brazilian and Florida mosquito vectors. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(6):1–16.
57. Feitoza TD, Ferreira-de-Lima VH, Câmara DC, Honório NA, Lounibos LP, Lima-Camara TN. Interspecific Mating Effects on Locomotor Activity Rhythms and Refractoriness of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Females. Vol. 11, *Insects* . 2020.

58. Honorio N, Carrasquilla M, Bargielowski I, Nishimura N, Swan T, Lounibos L. Male origin determines satyrization potential of *Aedes aegypti* by invasive *Aedes albopictus*. *Biol Invasions*. 2018 Mar 1;20.
59. Braks MAH, Honório NA, Lourenço-De-Oliveira R, Juliano SA, Lounibos LP. Convergent Habitat Segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Southeastern Brazil and Florida. *J Med Entomol*. 2003;40(6):785–94.
60. Lequime S, Lambrechts L. Vertical transmission of arboviruses in mosquitoes: a historical perspective. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis*. 2014 Dec;28:681–90.
61. Grunnill M, Boots M. How Important is Vertical Transmission of Dengue Viruses by Mosquitoes (Diptera: Culicidae)? *J Med Entomol*. 2016 Jan;53(1):1–19.
62. Ferreira-De-Lima VH, Lima-Camara TN. Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: A systematic review. Vol. 11, *Parasites and Vectors*. BioMed Central; 2018.
63. Angel B, Joshi V. Distribution and seasonality of vertically transmitted dengue viruses in *Aedes* mosquitoes in arid and semi-arid areas of Rajasthan, India. *J Vector Borne Dis*. 2008 Mar;45(1):56–9.
64. Thongrunkiat S, Maneekan P, Wasinpiyamongkol L, Prummongkol S. Prospective field study of transovarial dengue-virus transmission by two different forms of *Aedes aegypti* in an urban area of Bangkok, Thailand. *J Vector Ecol*. 2011 Jun;36(1):147–52.
65. Serufo JC, Oca HM de, Tavares VA, Souza AM, Rosa R V., Jamal MC, et al. Isolation of dengue virus type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos city, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 1993 Sep [cited 2021 Jun 1];88(3):503–4. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02761993000300025&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761993000300025&lng=en&tlng=en)
66. Martins VEP, Alencar CH, Kamimura MT, de Carvalho Araújo FM, de Simone SG,

- Dutra RF, et al. Occurrence of natural vertical transmission of dengue-2 and dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. Vasilakis N, editor. PLoS One [Internet]. 2012 Jul 25 [cited 2021 May 31];7(7):e41386. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0041386>
67. Jain J, Kushwah RBS, Singh SS, Sharma A, Adak T, Singh OP, et al. Evidence for natural vertical transmission of chikungunya viruses in field populations of *Aedes aegypti* in Delhi and Haryana states in India—a preliminary report. *Acta Trop*. 2016 Oct;162:46–55.
  68. Niyas KP, Abraham R, Unnikrishnan RN, Mathew T, Nair S, Manakkadan A, et al. Molecular characterization of Chikungunya virus isolates from clinical samples and adult *Aedes albopictus* mosquitoes emerged from larvae from Kerala, South India. *Virology*. 2010 Aug;7:189.
  69. de Almeida PR, Ehlers LP, Demoliner M, Eisen AKA, Girardi V, de Lorenzo C, et al. Detection of a novel African-lineage-like Zika virus naturally infecting free-living neotropical primates in Southern Brazil. *bioRxiv*. 2019;
  70. Alencar J, de Mello CF, Marcondes CB, Guimarães AÉ, Toma HK, Bastos AQ, et al. Natural infection and vertical transmission of two flaviviruses (Yellow fever and Zika) in mosquitoes in primary forests in the Brazilian state of Rio de Janeiro (Diptera: Culicidae). *bioRxiv*. 2019;1–25.
  71. Smartt CT, Stenn TMS, Chen T-Y, Teixeira MG, Queiroz EP, Souza Dos Santos L, et al. Evidence of Zika Virus RNA Fragments in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Field-Collected Eggs From Camaçari, Bahia, Brazil. *J Med Entomol*. 2017 Jul;54(4):1085–7.
  72. Pereira TN, Carvalho FD, De Mendonça SF, Rocha MN, Moreira LA. Vector competence of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes for Mayaro virus. Kittayapong P, editor. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2020 Apr 14 [cited 2021 Jun 1];14(4):e0007518. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0007518>
  73. Ministério da Saúde, Corbel V, Achee NL, Chandre F, Coulibaly MB, Dusfour I, et al.

乳鼠心肌提取 HHS Public Access. Morrison AC, editor. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. Tenth Edit. 2020 Nov 1 [cited 2021 Feb 16];12(1):1–12. Available from: <http://library1.nida.ac.th/termpaper6/sd/2554/19755.pdf>

74. Organização Pan-Americana da Saúde. Avaliação das estratégias inovadoras para o controle de *Aedes aegypti*: desafios para a introdução e avaliação do impacto dessas [Internet]. 2019. 72 p. Available from: [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51374/9789275720967\\_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51374/9789275720967_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
75. Ganassi S, Masi M, Grazioso P, Evidente A, De Cristofaro A. Activity of Some Plant and Fungal Metabolites towards *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae). *Toxins* (Basel). 2021 Apr;13(4).
76. Xi Z, Khoo CCH, Dobson SL. Interspecific transfer of Wolbachia into the mosquito disease vector *Aedes albopictus*. *Proceedings Biol Sci* [Internet]. 2006 Jun 7;273(1592):1317–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16777718>
77. Organization WH. Evaluation of genetically modified mosquitoes for the control of vector-borne diseases. 2020;(October).
78. Fotakis EA, Giantsis IA, Castells Sierra J, Tanti F, Balaska S, Mavridis K, et al. Population dynamics, pathogen detection and insecticide resistance of mosquito and sand fly in refugee camps, Greece. *Infect Dis Poverty*. 2020;9(1):1–13.
79. Mains JW, Brelsfoard CL, Dobson SL. Male Mosquitoes as Vehicles for Insecticide. Barrera R, editor. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2015 Jan 15 [cited 2021 May 27];9(1):e0003406. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003406>
80. Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol e Serviços Saúde*. 2007;16(4):279–93.
81. Silver KS, Du Y, Nomura Y, Oliveira EE, Salgado VL, Zhorov BS, et al. Voltage-gated sodium channels as insecticide targets. In: *Advances in Insect Physiology*. Academic Press Inc.; 2014. p. 389–433.

82. Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol.* 2004;34(7):653–65.
83. Moyes CL, Vontas J, Martins AJ, Ng LC, Koou SY, Dufour I, et al. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. Vol. 11, *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Public Library of Science; 2017.
84. Corbel V. Distribution, Mechanisms, Impact and Management of Insecticide Resistance in Malaria Vectors: A Pragmatic Review. In: Manguin RNE-S, editor. Rijeka: IntechOpen; 2013. p. Ch. 19. Available from: <https://doi.org/10.5772/56117>
85. Ranson H, Claudianos C, Ortelli F, Abgrall C, Hemingway J, Sharakhova M V, et al. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science.* 2002 Oct;298(5591):179–81.
86. Macoris M de L, Martins AJ, Andrighetti MTM, Lima JBP, Valle D. Pyrethroid resistance persists after ten years without usage against *Aedes aegypti* in governmental campaigns: Lessons from São Paulo State, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(3):1–18.
87. Cosme LV, Gloria-Soriaid A, Caccone A, Powell JR, Martins AJ. Evolution of *kdr* haplotypes in worldwide populations of *Aedes aegypti*: Independent origins of the F1534C *kdr* mutation. Pietrantonio P, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2020 Apr 16 [cited 2021 Apr 27];14(4):1–18. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0008219>
88. Auteri M, La Russa F, Blanda V, Torina A. Insecticide Resistance Associated with *kdr* Mutations in *Aedes albopictus*: An Update on Worldwide Evidences. Martins AJ, editor. *Biomed Res Int* [Internet]. 2018;2018:3098575. Available from: <https://doi.org/10.1155/2018/3098575>
89. Kasai S, Ng LC, Lam-Phua SG, Tang CS, Itokawa K, Komagata O, et al. First detection of a putative knockdown resistance gene in major mosquito vector, *Aedes albopictus*. *Jpn J Infect Dis.* 2011;64(3):217–21.

90. Chen H, Li K, Wang X, Yang X, Lin Y, Cai F, et al. First identification of kdr allele F1534S in VGSC gene and its association with resistance to pyrethroid insecticides in *Aedes albopictus* populations from Haikou City, Hainan Island, China. *Infect Dis Poverty* [Internet]. 2016;5(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40249-016-0125-x>
91. Tancredi A, Papandrea D, Marconcini M, Carballar-Lejarazu R, Casas-Martinez M, Lo E, et al. Tracing temporal and geographic distribution of resistance to pyrethroids in the arboviral vector *Aedes albopictus*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020 Jun;14(6):e0008350.
92. Lambrechts L, Scott TW, Gubler DJ. Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission [Internet]. Halstead SB, editor. Vol. 4, *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Public Library of Science; 2010 [cited 2021 May 18]. p. e646. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0000646>
93. Grard G, Caron M, Mombo IM, Nkoghe D, Mboui Ondo S, Jiolle D, et al. Zika Virus in Gabon (Central Africa) - 2007: A New Threat from *Aedes albopictus*? Charrel R, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2014 Feb 6 [cited 2021 Feb 16];8(2):e2681. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002681>
94. Dubrulle M, Mousson L, Moutailier S, Vazeille M, Failloux AB. Chikungunya virus and *Aedes* mosquitoes: Saliva is infectious as soon as two days after oral infection. *PLoS One*. 2009;4(6).
95. Sengupta S, Mukherjee S, Haldar SK, Bhattacharya N, Tripathi A. Re-emergence of Chikungunya virus infection in Eastern India. *Brazilian J Microbiol*. 2020;51(1):177–82.
96. Vazeille M, Mousson L, Martin E, Failloux AB. Orally co-infected *Aedes albopictus* from La Reunion Island, Indian Ocean, can deliver both dengue and chikungunya infectious viral particles in their saliva. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(6).
97. Rezende HR, Romano CM, Claro IM, Caleiro GS, Sabino EC, Felix AC, et al. First report of *Aedes albopictus* infected by Dengue and Zika virus in a rural outbreak in



Brazil. Moreira LA, editor. PLoS One [Internet]. 2020 Mar 12 [cited 2021 May 30];15(3):e0229847. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0229847>

98. Vega-Rúa A, Marconcini M, Madec Y, Manni M, Carraretto D, Gomulski LM, et al. Vector competence of *Aedes albopictus* populations for chikungunya virus is shaped by their demographic history. *Commun Biol.* 2020;3(1):25–8.
99. Chouin-Carneiro T, David MR, de Bruycker Nogueira F, Dos Santos FB, Lourenço-De-oliveira R. Zika virus transmission by brazilian *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* is virus dose and temperature-dependent. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020;14(9):1–14.
100. Fernandes RS, O’connor O, Bersot MIL, Girault D, Dokunengo MR, Pocquet N, et al. Vector competence of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* from Brazil and New Caledonia for three zika virus lineages. *Pathogens.* 2020;9(7):1–17.
101. Lourenço de Oliveira R, Vazeille M, de Filippis AMB, Failloux AB. Large genetic differentiation and low variation in vector competence for dengue and yellow fever viruses of *Aedes albopictus* from Brazil, the United States, and the Cayman Islands. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;69(1):105–14.
102. Vega-Rua A, Zouache K, Girod R, Failloux A-B, Lourenco-de-Oliveira R. High Level of Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Ten American Countries as a Crucial Factor in the Spread of Chikungunya Virus. *J Virol.* 2014;88(11):6294–306.
103. Couto-Lima Di, Madec Y, Bersot MI, Campos SS, Motta MDA, Dos Santos FB, et al. Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent *Aedes* populations. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–12.
104. Campos KB, Martins AJ, Rodovalho C de M, Bellinato DF, Dias L dos S, Macoris M de L da G, et al. Assessment of the susceptibility status of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations to pyriproxyfen and malathion in a nation-wide monitoring of insecticide resistance performed in Brazil from 2017 to 2018. *Parasit Vectors*

[Internet]. 2020;13(1):531. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04406-6>

105. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 2012 Jun 15;28(12):1647–9.
106. Hathaway NJ, Parobek CM, Juliano JJ, Bailey JA. SeekDeep: Single-base resolution de novo clustering for amplicon deep sequencing. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(4):1–13.
107. FastQC [Internet]. 2015. Available from: <https://qubeshub.org/resources/fastqc>
108. Leigh JW, Bryant D. POPART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol*. 2015 Sep;6(9):1110–6.
109. Snell Q, Posada D, Crandall KA. TCS: Estimating Gene Genealogies [Internet]. 2002. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/220950274>
110. Minh BQ, Trifinopoulos J, Schrempf D, Schmidt HA. IQ-TREE version 2.0: Tutorials and Manual Phylogenomic software by maximum likelihood. *Manual/tutorial* [Internet]. 2019; Available from: <http://www.iqtree.org>
111. Nguyen LT, Schmidt HA, Von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2021 May 1];32(1):268–74. Available from: <https://academic.oup.com/mbe/article-lookup/doi/10.1093/molbev/msu300>
112. Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, Von Haeseler A, Jermini LS. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat Methods*. 2017;14(6):587–9.
113. Hoang DT, Chernomor O, von Haeseler A, Minh BQ, Vinh LS. UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *bioRxiv*. 2017;35(2):518–22.
114. Mahadani AK, Awasthi S, Sanyal G, Bhattacharjee P, Pippal S. Indel-K2P: a

modified Kimura 2 Parameters (K2P) model to incorporate insertion and deletion (Indel) information in phylogenetic analysis. *Cyber-Physical Syst* [Internet]. 2021 Feb 16;1–13. Available from: <https://doi.org/10.1080/23335777.2021.1879274>

115. Martins AJ, Lins RMMDA, Linss JGB, Peixoto AA, Valle D. Voltage-gated sodium channel polymorphism and metabolic resistance in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* from Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;81(1):108–15.
116. Wilder-Smith A. Dengue vaccine development: status and future. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz*. 2020;63(1):40–4.
117. Da Silveira LTC, Tura B, Santos M. Systematic review of dengue vaccine efficacy. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):1–8.
118. Demok S, Endersby-Harshman N, Vinit R, Timinao L, Robinson LJ, Susapu M, et al. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes in Papua New Guinea. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2019;12(1):1–8. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3585-6>
119. Medeiros AS, Costa DMP, Branco MSD, Sousa DMC, Monteiro JD, Galvão SPM, et al. Dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in urban areas in the state of Rio Grande do Norte, Brazil: Importance of virological and entomological surveillance. *PLoS One* [Internet]. 2018 Mar 13;13(3):e0194108–e0194108. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29534105>
120. Degallier N, Teixeira JMS crates, Soares Sd S da S, Pereira RD, Pinto SCF, Chaib Ad A de JM, et al. *Aedes albopictus* may not be vector of dengue virus in human epidemics in Brazil. *Rev Saude Publica*. 2003 Jun;37(3):386–7.
121. Valle D, Bellinato D, Viana-Medeiros P, Bento J, Lima J, De A, et al. Resistance to temephos and deltamethrin in *Aedes aegypti* from Brazil between 1985 and 2017. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2019 Apr 27;114.
122. Martins AJ, Ribeiro CD e M, Bellinato DF, Peixoto AA, Valle D, Lima JBP. Effect of Insecticide Resistance on Development, Longevity and Reproduction of Field or Laboratory Selected *Aedes aegypti* Populations. Ganta R, editor. *PLoS One*

[Internet]. 2012 Mar 14 [cited 2021 Jun 6];7(3):e31889. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0031889>

123. Linss JGB, Brito LP, Garcia GA, Araki AS, Bruno RV, Lima JBP, et al. Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. *Parasit Vectors* [Internet]. 2014;7(1):25. Available from: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-25>
124. Costa MM, Campos KB, Brito LP, Roux E, Melo Rodovalho C, Bellinato DF, et al. Kdr genotyping in *Aedes aegypti* from Brazil on a nation-wide scale from 2017 to 2018. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):13267. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70029-7>
125. Brito LP, Carrara L, Freitas RM de, Lima JBP, Martins AJ. Levels of Resistance to Pyrethroid among Distinct *kdr* Alleles in *Aedes aegypti* Laboratory Lines and Frequency of *kdr* Alleles in 27 Natural Populations from Rio de Janeiro, Brazil. Xu G, editor. *Biomed Res Int* [Internet]. 2018;2018:2410819. Available from: <https://doi.org/10.1155/2018/2410819>
126. Xu J, Bonizzoni M, Zhong D, Zhou G, Cai S, Li Y, et al. Multi-country Survey Revealed Prevalent and Novel F1534S Mutation in Voltage-Gated Sodium Channel (VGSC) Gene in *Aedes albopictus*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 May;10(5):e0004696.
127. Kasai S, Caputo B, Tsunoda T, Cuong TC, Maekawa Y, Lam-Phua SG, et al. First detection of a Vssc allele V1016G conferring a high level of insecticide resistance in *Aedes albopictus* collected from Europe (Italy) and Asia (Vietnam), 2016: a new emerging threat to controlling arboviral diseases. *Euro Surveill Bull Eur sur les Mal Transm = Eur Commun Dis Bull*. 2019 Jan;24(5).
128. Pichler V, Mancini E, Micocci M, Calzetta M, Arnoldi D, Rizzoli A, et al. A Novel Allele Specific Polymerase Chain Reaction (AS-PCR) Assay to Detect the V1016G Knockdown Resistance Mutation Confirms Its Widespread Presence in *Aedes albopictus* Populations from Italy. *Insects* [Internet]. 2021;12(1). Available from: <https://www.mdpi.com/2075-4450/12/1/79>
129. Yougang AP, Kamgang B, Tedjou AN, Wilson-Bahun TA, Njiokou F, Wondji CS.

Nationwide profiling of insecticide resistance in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Cameroon. PLoS One. 2020;15(6):e0234572.

130. Ngoagouni C, Kamgang B, Brengues C, Yahouedo G, Paupy C, Nakouné E, et al. Susceptibility profile and metabolic mechanisms involved in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* resistant to DDT and deltamethrin in the Central African Republic. Parasit Vectors [Internet]. 2016;9(1):599. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1887-5>
131. Kamgang B, Marcombe S, Chandre F, Nchoutpouen E, Nwane P, Etang J, et al. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Central Africa. Parasit Vectors [Internet]. 2011;4(1):79. Available from: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-79>
132. Rahman RU, Souza B, Uddin I, Carrara L, Brito LP, Costa MM, et al. Insecticide resistance and underlying targets-site and metabolic mechanisms in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Lahore, Pakistan. Sci Rep. 2021 Feb;11(1):4555.
133. Ishak IH, Jaal Z, Ranson H, Wondji CS. Contrasting patterns of insecticide resistance and knockdown resistance (kdr) in the dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Malaysia. Parasit Vectors [Internet]. 2015;8(1):181. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0797-2>
134. Ishak IH, Riveron JM, Ibrahim SS, Stott R, Longbottom J, Irving H, et al. The Cytochrome P450 gene CYP6P12 confers pyrethroid resistance in kdr-free Malaysian populations of the dengue vector *Aedes albopictus*. Sci Rep [Internet]. 2016;6(1):24707. Available from: <https://doi.org/10.1038/srep24707>
135. Aguirre-Obando OA, Martins AJ, Navarro-Silva MA. First report of the Phe1534Cys kdr mutation in natural populations of *Aedes albopictus* from Brazil. Parasites and Vectors. 2017;10(1):1–10.
136. Gao J, Zhang H-D, Guo X-X, Xing D, Dong Y-D, Lan C-J, et al. Dispersal patterns and population genetic structure of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in three different climatic regions of China. Parasit Vectors [Internet]. 2021;14(1):12. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04521-4>

137. Palatini U, Masri RA, Cosme L V., Koren S, Thibaud-Nissen F, Biedler JK, et al. Improved reference genome of the arboviral vector *Aedes albopictus*. bioRxiv. 2020;1–29.
138. Birungi J, Munstermann LE. Genetic structure of *Aedes albopictus* (diptera: Culicidae) populations based on mitochondrial ND5 sequences: Evidence for an independent invasion into Brazil and United States. *Ann Entomol Soc Am*. 2002;95(1):130–2.
139. Manni M, Guglielmino CR, Scolari F, Vega-Rúa A, Failloux AB, Somboon P, et al. Genetic evidence for a worldwide chaotic dispersion pattern of the arbovirus vector, *Aedes albopictus*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(1).
140. Multini LC, da Silva de Souza AL, Marrelli MT, Wilke ABB. Population structuring of the invasive mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) on a microgeographic scale. *PLoS One*. 2019;14(8):1–15.
141. Kotsakiozi P, Richardson JB, Pichler V, Favia G, Martins AJ, Urbanelli S, et al. Population genomics of the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*: insights into the recent worldwide invasion. *Ecol Evol*. 2017;7(23):10143–57.
142. Adhami J, Reiter P. Introduction and establishment of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* skuse (Diptera: Culicidae) in Albania. *J Am Mosq Control Assoc*. 1998 Sep;14(3):340–3.
143. Moore CG, Mitchell CJ. *Aedes albopictus* in the United States: ten-year presence and public health implications. *Emerg Infect Dis*. 1997;3(3):329–34.
144. Akiner MM, Demirci B, Babuadze G, Robert V, Schaffner F. Spread of the Invasive Mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the Black Sea Region Increases Risk of Chikungunya, Dengue, and Zika Outbreaks in Europe. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Apr;10(4):e0004664.
145. Bennouna A, Balenghien T, El Rhaffouli H, Schaffner F, Garros C, Gardès L, et al. First record of *Stegomyia albopicta* (= *Aedes albopictus*) in Morocco: a major threat to public health in North Africa? *Med Vet Entomol*. 2017 Mar;31(1):102–6.

146. Benallal KE, Allal-Ikhlef A, Benhamouda K, Schaffner F, Harrat Z. First report of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Diptera: Culicidae) in Oran, West of Algeria. *Acta Trop*. 2016 Dec;164:411–3.
147. Bohers C, Mousson L, Madec Y, Vazeille M, Rhim A, M'ghirbi Y, et al. The recently introduced *Aedes albopictus* in tunisia has the potential to transmit chikungunya, dengue and zika viruses. Lenhart A, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2020 Oct 2 [cited 2021 Jun 7];14(10):1–19. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0008475>
148. Paupy C, Ollomo B, Kamgang B, Moutailler S, Rousset D, Demanou M, et al. Comparative role of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in the emergence of dengue and chikungunya in central Africa. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2010;10(3):259–66.
149. Kraemer MUG, Reiner RC, Brady OJ, Messina JP, Gilbert M, Pigott DM, et al. Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nat Microbiol* [Internet]. 2019;4(5):854–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-019-0376-y>
150. Kambhampati S, Black WC, Rai KS. Geographic origin of the US and Brazilian *Aedes albopictus* inferred from allozyme analysis. *Heredity* (Edinb) [Internet]. 1991;67(1):85–94. Available from: <https://doi.org/10.1038/hdy.1991.67>
151. Ayres C, Romão T, Melo-Santos M, Furtado A. Genetic diversity in Brazilian populations of *Aedes albopictus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2002 Sep [cited 2021 Jun 8];97(6):871–5. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762002000600022&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762002000600022&lng=en&tlng=en)
152. Birungi J, Munstermann LE. Genetic structure of *Aedes albopictus* (diptera: Culicidae) populations based on mitochondrial ND5 sequences: Evidence for an independent invasion into Brazil and United States. *Ann Entomol Soc Am*. 2002 Jan 1;95:130–2.
153. Lourenço-de-Oliveira R, Vazeille M, de Filippis AMB, Failloux AB. *Aedes aegypti* in

Brazil: Genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2004;98(1):43–54.

154. Manel S, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P. Landscape genetics: Combining landscape ecology and population genetics. *Trends Ecol Evol.* 2003;18(4):189–97.
155. Medley KA, Westby KM, Jenkins DG. Rapid local adaptation to northern winters in the invasive Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*: A moving target. *J Appl Ecol* [Internet]. 2019 Nov 1;56(11):2518–27. Available from: <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13480>
156. Bennett KL, McMillan WO, Loaiza JR. The genomic signal of local environmental adaptation in *Aedes aegypti* mosquitoes . *Evol Appl.* 2021;0–3.
157. Yan R, Zhou Q, Xu Z, Zhu G, Dong K, Zhorov BS, et al. Three sodium channel mutations from *Aedes albopictus* confer resistance to Type I, but not Type II pyrethroids. *Insect Biochem Mol Biol.* 2020 Aug;123:103411.
158. Schmidt TL, Endersby-harshman NM, Hoffmann AA. Trends in Improving mosquito control strategies with population genomics. *Trends Parasitol* [Internet]. 2021;1–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.05.002>
159. Evans BR, Gloria-Soria A, Hou L, McBride C, Bonizzoni M, Zhao H, et al. A multipurpose, high-throughput single-nucleotide polymorphism chip for the dengue and yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *G3 Genes, Genomes, Genet.* 2015;5(5):711–8.