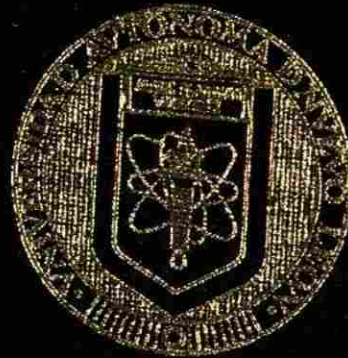


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



MAPEO CUANTITATIVO DE LOCI QUE CONTROLAN LA
RESISTENCIA A LA PERIMETRINA EN EL MOSQUITO
Aedes aegypti (DIPTERA: CULICIDAE)

Por

KARLA LIZET SAAVEDRA RODRIGUEZ

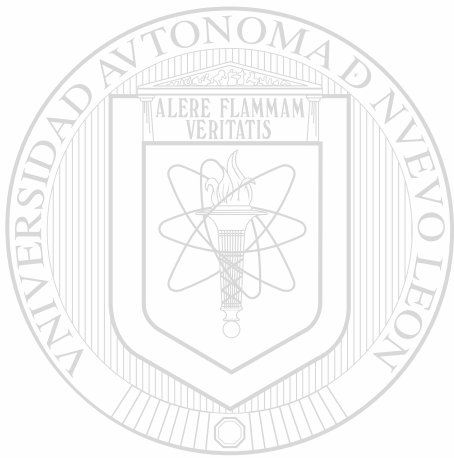
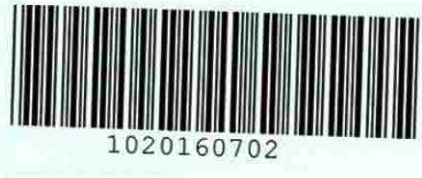
Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

JULIO, DE 2007

MAAPHO COJANTRAATWO IDBE LOCHI QOE COONTHOOLAIN I.A.
KESISIS'ITINICIA A I.A. PEEIIVETIRYA ENI ENI RECOCQUINGO
Aedes aegypti (DIEPTESSA: OULICOD.AE)

2007

TD —
Z5 320
FCB
2007
• S22



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**MAPEO CUANTITATIVO DE LOCI QUE CONTROLAN LA
RESISTENCIA A LA PERMETRINA EN EL MOSQUITO
Aedes aegypti (DIPTERA: CULICIDAE)**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Por



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

KARLA LIZET SAAVEDRA RODRIGUEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

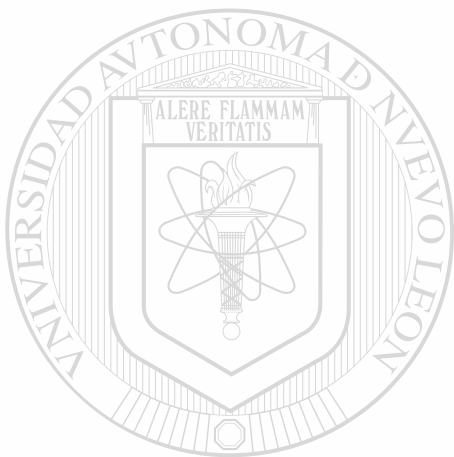
Julio, 2007

1045597

TD
Z5320
FCB
2007
.S22



FONDO
TESIS
170908



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

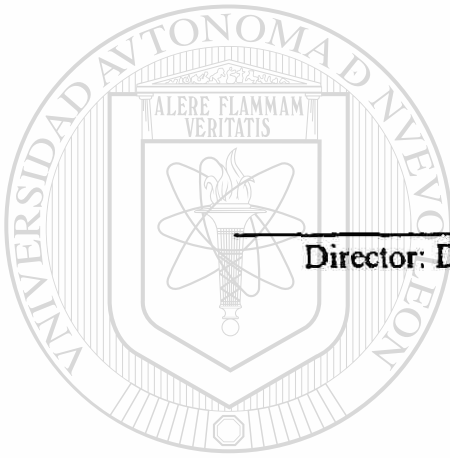
4- Septiembre - 08


Priscilla de la Cruz

MAPEO CUANTITATIVO DE LOCI QUE CONTROLAN LA
RESISTENCIA A LA PERMETRINA EN EL MOSQUITO

Aedes aegypti (DIPTERA: CULICIDAE)

Comité de Tesis



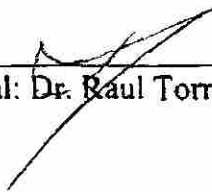

Director: Dra. Adriana Elizabeth Flores Suárez


Secretario: Dr. Gustavo Ponce García

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Vocal: Dr. Ildefonso Fernández Salas


Vocal: Dr. Raul Torres Zapata

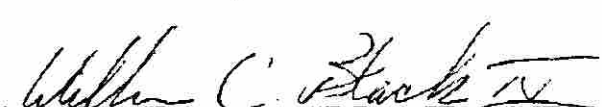
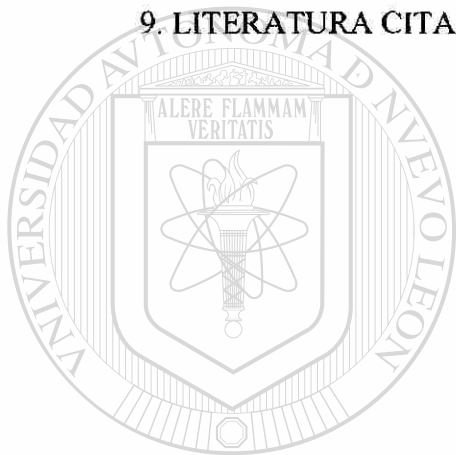

Director Externo: Dr. William C. Black IV

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
INDICE DE FIGURAS.....	vi
INDICE DE TABLAS	ix
AGRADECIMIENTOS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUCCION	1
2. HIPOTESIS.....	3
3. OBJETIVOS	4
4. ANTECEDENTES	5
4.1. <i>Aedes aegypti</i> : Ciclo Biológico, Importancia como Vector y Control	5
4.2. Insecticidas.....	8
4.2.1. Mecanismos de Acción de los Insecticidas.....	9
4.2.2. Permetrina.....	10
4.3. Resistencia a Insecticidas en Vectores.....	12
4.4. Detección de la Resistencia en una Población: Bioensayos	14
4.5. Mecanismos de Resistencia a Insecticidas.....	17
4.5.1. Resistencia Metabólica	18
4.5.1.1. Carboxil-Esterasas	18
4.5.1.2. Monoxidasas del citocromo-P450	21
4.5.1.3. Glutación-s-Transferasas.....	22
4.5.2. Resistencia por Sitio Blanco	24
4.5.2.1. Acetilcolinesterasa Insensitiva.....	24
4.5.2.2. Receptores GABA	25
4.5.2.3. Canales de Sodio.....	26
4.5.2.4. Resistencia <i>kdr</i> en el mosquito <i>Ae. aegypti</i>	28
4.6. Genética de la Resistencia	29
4.6.1. Mapas Genéticos.....	30
4.6.2. Mapeo de QTLs	32
4.6.3. Estudios de Mapeo de QTL en Mosquitos Vectores	35
5. METODOLOGIA	37
5.1. Mutaciones en el Gen <i>para</i> Asociadas con la Resistencia Tipo <i>kdr</i>	37
5.1.1. Colecciones de Mosquitos y Mantenimiento en Laboratorio	37
5.1.2. Bioensayos y Estimación de LC50	38
5.1.3 Selección de Cepa Resistente a Permetrina	40
5.1.4. Técnicas para Detección de Polimorfismos SSCP.....	40
5.1.4.1. Diseño de Iniciadores <i>kdr</i>	40
5.1.4.2. Extracción de ADN.....	41
5.1.4.3. Amplificación por PCR.	42

5.1.4.4. Clonación de Productos de PCR Amplificados con el Iniciador kdrD2T6.....	42
5.1.4.5. Análisis SSCP	43
5.1.4.6. Secuenciación y análisis de productos de PCR	46
5.1.5. Detección de Alelos Específicos en los codones <i>Iso1,011</i> y <i>Val1,016</i> .	47
5.1.5.1. Diseño de Iniciadores Alelo-Específicos	47
5.1.5.2. Reacción de PCR para Detectar Alelos Específicos	48
5.1.5.3. Frecuencia de Alelos en los Codones <i>Iso1,011</i> y <i>Val1,016</i> en Poblaciones de <i>Ae. aegypti</i>	49
5.1.5.4. Evolución de las mutaciones en el DIIS6 del gen <i>para</i>	49
5.2. Mapeo de QTL que Controlan la Resistencia a la Permetrina en <i>Ae. aegypti</i> .	50
5.2.1. Diseño de Familia de Mapeo	51
5.2.2. Fenotipo de la Familia de Mapeo.....	52
5.2.3. Extracción de ADN de la Familia de Mapeo	53
5.2.4. Amplificación de ADN Genómico (MDA)	53
5.2.5. Marcadores-SSCP Analizados en la Familia de Mapeo	54
5.2.6. Secuenciación y Análisis de Polimorfismos.....	55
5.2.7. Genotipo de la Familia de Mapeo.....	56
5.2.8. Análisis de datos	57
5.2.8.1. Chi cuadrada y Gráficas de Fenotipo-Genotipo	58
5.2.8.2. Mapa Genético de los Marcadores-SNP de la Familia de Mapeo	58
5.2.8.3. Análisis de QTL: Cartographer.....	59
6. RESULTADOS.....	62
6.1. Cepa de <i>Ae. aegypti</i> Resistente a la Permetrina.....	62
6.2. Búsqueda de Polimorfismos-SSCP en la Región DIIS6 del gen <i>para</i> de <i>Ae. aegypti</i>	63
6.2.1. Regiones de ADN Amplificadas.....	63
6.2.3. Análisis de Polimorfismos-SSCP del Exón 21 en el Gen <i>para</i>	65
6.2.4. Sistemas de PCR para Detección de Alelos en los Codones <i>Iso1,011</i> y <i>Val1,016</i> del gen <i>para</i> mediante Curva de Desnaturalización	66
6.2.4.1. Sistema <i>Iso1,011Met</i>	66
6.2.4.2. Sistema <i>Iso1,011Val</i>	67
6.2.4.3. Sistema <i>Val1,016Iso</i>	68
6.2.4.4. Sistema <i>Val1,016Gly</i>	68
6.2.4.5. Sistemas de PCR de Alelos Específicos son Resueltos en Geles de Agarosa	69
6.2.4.6. Evolución de las Mutaciones kdr.....	69
6.3. Mapeo de QTL que Controlan la Resistencia a la Permetrina en <i>Ae. aegypti</i> .	70
6.3.1. Fenotipo de la Familia de Mapeo.....	70
6.3.2. Marcadores-SSCP informativos en la Familia de Mapeo F31.1.....	71
6.3.3. Marcadores-SNP Informativos Usando los Sistemas de Detección de Alelos Específicos en la Familia de Mapeo F31.1	72
6.3.4. Posición de los Marcadores de Resistencia en el Mapa Genético	73

6.3.5. Asociación Genotipo-Fenotipo en los 32 Marcadores-SNP	74
6.3.6. Mapeo de QTL que Controlan la Resistencia a la Permetrina.....	76
6.3.6.1. Análisis MI y MIC: QTL en hembras y machos	77
6.3.6.2. Análisis MI y MIC: QTL al omitir el Genotipo Resistente <i>Iso1,016/Iso1,016</i> para el Marcador <i>Val1,016Iso</i>	78
6.3.6.3. Análisis MI y MIC: QTLs al omitir a los Mosquitos <i>Vivos</i> (resistentes al derribe).....	79
6.3.7. Asociación entre la Segregación de la Mutación <i>Met1,011</i> e <i>Iso1,016</i> en el Gen <i>para</i> en la Familia de Mapeo F31.1.....	80
7. DISCUSIONES.....	81
8. CONCLUSIONES	93
9. LITERATURA CITADA	134



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Alineación de las secuencias de ADN amplificadas con los iniciadores kdrR2T6 en tres clonas provenientes de un pool de ADN de <i>Ae. aegypti</i>	98
2. Gel de poliacrilamida mostrando los patrones-SSCP obtenidos a partir de productos amplificados con los iniciadores kdr4, del exón 20 del gen <i>para</i> de <i>Ae. aegypti</i>	99
3. Esquema de las mutaciones en la región DIIS6 del gen <i>para</i> , asociadas a la resistencia tipo kdr en varias poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> . Los aminoácidos silvestres <i>Isoleucina</i> _{1,011} y <i>Valina</i> _{1,016} aparecen subrayados y el aminoácido substituyente es especificado para cada mutación de nucleótidos.....	100
4. Gráfica de las temperaturas de desnaturalización para detección de alelos específicos en el sistema <i>Val1,016Iso</i> del gen <i>para</i> de <i>Ae. aegypti</i> . El genotipo mutante <i>Iso1,016/Iso1,016</i> produjo una curva a 77°C. El genotipo silvestre <i>Val1,016/Val1,016</i> produjo una curva a 84°C. El genotipo heterocigoto <i>Iso1,016/Val1,016</i> presentó ambas curvas.....	105
5. Fragmentación de productos de PCR alelo-específicos del sistema <i>Val1,016Iso</i> del gen <i>para</i> de <i>Ae. aegypti</i> , en geles de agarosa al 4%. La banda de 68 pares de bases (bp) presente en los carriles 1 y 2 corresponden al genotipo mutante <i>Iso1,016/Iso1,016</i> (A/A). La banda de 85 pb en los carriles 5 y 6 corresponden al genotipo silvestre <i>Val1,016/Val1,016</i> (G/G). El genotipo heterocigoto <i>Iso1,016/Val1,016</i> (A/G), de los carriles 3 y 4 presentó ambas bandas. La letra M corresponde al marcador de peso molecular de 25 pb.....	106
6. Análisis de la secuencia del intrón 20 del gen <i>para</i> de <i>Ae. aegypti</i> . Tres cladas fueron obtenidas del análisis de 87 secuencias. Las regiones sombreadas corresponden a sitios polimórficos segregantes. Los primeros 100 nucleótidos del intrón son conservados, así como también los últimos 75 nucleótidos.....	107
7. Mapa genético de <i>Ae. aegypti</i> . Las flechas indican a los genes mapeados en la familia F31.1, las flechas rojas indican a los genes de resistencia, las flechas verdes son genes previamente mapeados. Las probabilidades <i>F</i> , representan el grado de asociación entre los genotipos y la susceptibilidad para cada marcador	

evaluado. Los valores p más negativos indican una mayor asociación entre el genotipo y fenotipo. 121

8. Gráfica de la proporción de sobrevivencia, en función del número de alelos heredados por el abuelo susceptible en la familia de mapeo F31.1. Aparecen los marcadores-SNP del QTL1 en el cromosoma III: *Val1,016Iso*, *CYP4H32*, *CYP325R1* y *CCEunk0*. 122

9. Gráfica de la proporción de recuperación, en función del número de alelos heredados por el abuelo susceptible en la familia de mapeo F31.1. Aparecen los marcadores-SNP del QTL1 en el cromosoma III: *Val1,016Iso*, *CYP4H32*, *CYP325R1* y *CCEunk0*. 123

10. Gráfica de la proporción de sobrevivencia, en función del número de alelos heredados por el abuelo susceptible, en la familia de mapeo F31.1. Aparecen los marcadores-SNP del QTL2 en el cromosoma III: *CCEaelo*, *CYP9J19*, *CYP9J29* y *CYP6BY1*. 124

11. Gráfica de la proporción de recuperación, en función del número de alelos heredados por el abuelo susceptible, en la familia de mapeo F31.1. Aparecen los marcadores-SNP del QTL2 en el cromosoma III: *CCEaelo*, *CYP9J19*, *CYP9J29* y *CYP6BY1*. 125

12. Gráfica de la proporción de recuperación, en función del número de alelos heredados por el abuelo susceptible en la familia de mapeo F31.1. Aparecen los marcadores-SNP DEL QTL1 en el cromosoma II: *CYP12F5*, *CCEaelD*, *GSTe7* y *Chymo*. 126

13. Gráfica de los valores LOD asociados con la resistencia a la permetrina en los cromosomas I, II y III, en la familia de mapeo F31.1. El análisis de Mapeo de Intervalos se realizó en hembras y machos por separado. Las líneas horizontales corresponden al umbral LOD. Los QTL asociados al fenotipo corresponden a las curvas que sobrepasan al umbral LOD. Los marcadores asociados a estos QTL se encuentran en la gráfica. 127

14. Gráfica de los valores LOD asociados con la resistencia a la permetrina en los cromosomas I, II y III, en la familia de mapeo F31.1. El análisis de Mapeo de Intervalos Compuestos se realizó en hembras y machos por separado. Las líneas horizontales corresponden al umbral LOD. Los QTL asociados al fenotipo corresponden a las curvas que sobrepasan al umbral LOD. Los marcadores asociados a estos QTL se encuentran en la gráfica. 128

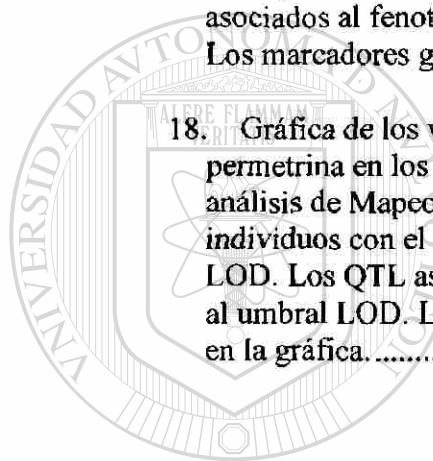
15. Gráfica de los valores LOD asociados con la resistencia a la permetrina en los cromosomas I, II y III, en la familia de mapeo F31.1. El análisis de Mapeo de Intervalos se realizó omitiendo a los individuos con genotipo homocigoto *kdir*. Las líneas horizontales corresponden al umbral LOD. Los QTL asociados al

fenotipo corresponden a las curvas que sobrepasan al umbral LOD. Los marcadores genéticos asociados a estos QTL se encuentran en la gráfica. 129

16. Gráfica de los valores LOD asociados con la resistencia a la permetrina en los cromosomas I, II y III, en la familia de mapeo F31.1. El análisis de Mapeo de Intervalos Compuestos se realizó omitiendo a los individuos con genotipo homocigoto *kdr*. Las líneas horizontales corresponden al umbral LOD. Los QTL asociados al fenotipo corresponden a las curvas que sobrepasan al umbral LOD. Los marcadores genéticos asociados a estos QTL se encuentran en la gráfica 130

17. Gráfica de los valores LOD asociados con la recuperación a la exposición a la permetrina en los cromosomas I, II y III, en la familia de mapeo F31.1. El análisis de Mapeo de Intervalos se realizó omitiendo a los individuos con el fenotipo *vivo*. Las líneas horizontales corresponden al umbral LOD. Los QTL asociados al fenotipo corresponden a las curvas que sobrepasan al umbral LOD. Los marcadores genéticos asociados a estos QTL se encuentran en la gráfica 131

18. Gráfica de los valores LOD asociados con la recuperación a la exposición a la permetrina en los cromosomas I, II y III, en la familia de mapeo F31.1. El análisis de Mapeo de Intervalos Compuestos se realizó omitiendo a los individuos con el fenotipo *vivo*. Las líneas horizontales corresponden al umbral LOD. Los QTL asociados al fenotipo corresponden a las curvas que sobrepasan al umbral LOD. Los marcadores genéticos asociados a estos QTL se encuentran en la gráfica. 132



U A N L

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

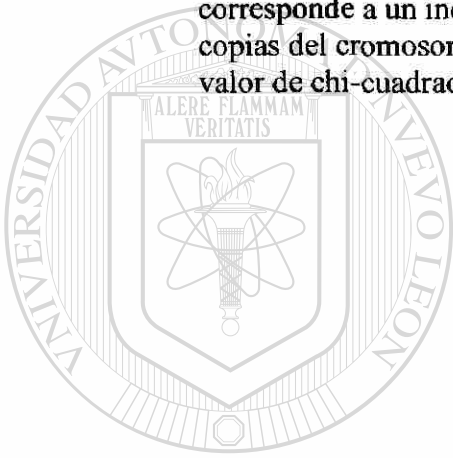
INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Cepas de <i>Ae. aegypti</i> analizadas en el estudio de frecuencia de mutaciones kdr. La ciudad, país y coordenadas de los sitios de colecta así como el número de mosquitos analizados estan adjuntos. Para las cepas de Cuba seleccionadas con insecticidas, se agregó la publicación donde fue descrito la selección y sitios de colecta.	96
2. Concentración letal media de cinco cepas de <i>Ae. aegypti</i> de México, expuestas a permetrina. Los bioensayos se realizaron con adultos expuestos a botellas impregnadas con el insecticida. La mortalidad se registró a las 24 horas.	97
3. Selección de la cepa Islas Mujeres (IMU5) resistente a permetrina. Cada generación fue expuesta a 5 µg de permetrina durante una hora. Los sobrevivientes de cada exposición fueron criados para obtener huevecillos de la próxima generación.....	97
4. Secuencias de iniciadores utilizados para la detección de alelos específicos por PCR en los codones 1,011 y 1,016 del gen <i>para</i> . También se muestran los iniciadores para la amplificación del intrón 20. Las secuencias de la cadena larga y cadena corta se proveen solo para la primera secuencia. El alelo específico en la extremo 3' se encuentra sombreado y la des-estabilización del tercer nucleótido se encuentra subrayada.....	101
5. Frecuencias de alelos y genotipos <i>Iso1,016</i> , <i>Met1,011</i> , y <i>Val1,011</i> en 32 cepas de <i>Ae. aegypti</i> . También se proveen los tamaños de muestra, los intervalos de confianza 95% (CI) en los estimados de frecuencia alélica y los estimados FIS de cada cepa.....	102
6. Lista de genes de resistencia de <i>Aedes aegypti</i> analizados por polimorfismos SSCP en la familia de mapeo F31.1. La temperatura de alineamiento óptima (Ta) y el tamaño del producto de PCR, se muestra junto con la secuencia de los iniciadores. La posición de los genes de resistencia no se conoce en el mapa físico o genético. La letra "M" denomina monomórfico y la letra "P" polimórfico.....	108
7. Lista de marcadores-SSCP genómicos de <i>Aedes aegypti</i> analizados en la familia de mapeo F31.1. La posición genética de los marcadores genómicos se presenta. La temperatura de alineamiento óptima (Ta) y el tamaño del producto	

de PCR, se muestra junto con la secuencia de los iniciadores. La letra “M” denomina monomórfico y la letra “P” polimórfico. La abreviatura “Pos” denomina la posición genética y distancia en centimorgans..... 114

8. Lista de marcadores-SNP mapeados en la familia F31.1. Los iniciadores específicos para detectar cada alelo en el marcador-SNP, se muestran junto con el cromosoma y distancia genética (cM) estimada. La cadena larga consiste en 5'-GCGGGCAGGGCGGGCGGGGGCGGGGCC-3' y la cadena corta consiste en 5'-GCGGGC-3'. 118

9. Análisis de chi-cuadrada para las frecuencias genotípicas de dos marcadores (*Iso1,011Met* y *Val1,016 Iso*) en el gen *para*. Las fórmulas de las frecuencias esperadas siguen un modelo de recombinación, utilizando una $r=0.001$. El genotipo está representado en pares de locus por cromosoma homólogo, II/MI corresponde a un individuo con genotipo *Iso 1,011/Iso 1,016* en una de las copias del cromosoma y el genotipo *Met1,011/Iso1,016* en la segunda copia. El valor de chi-cuadrada no fue significativo. 133



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT...

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo con la beca 128724.

A mi Familia...

Saúl, tu cariño incondicional, tu apoyo económico y emocional durante éstos tres largos años fue el combustible que permitió realizar y finalizar este proyecto. Mil gracias.

A mi polluelo, Isaac, tu sonrisa siempre ha sido la principal razón para seguir luchando.

Gracias a mi mamá, Rosy, tu cariño, consejos de paciencia y perseverancia fueron vitales para continuar.

A mis hermanos Rox y Beto, su alegría, entusiasmo y lealtad han sido un motor de ideas y ganas de sobresalir.

A a mis suegros Julieta y Saúl, gracias por el apoyo que nos han otorgado, gracias por estar ahí.

A Xochitl y Janette, gracias por su cariño y ayuda incondicional.

Al comité de Tesis...

Mis más sinceros agradecimientos a la Dra. Adriana Flores, por confiar en mí, ayudarme y revisar éste proyecto.

Gracias al comité de tesis por el apoyo brindado durante estos años, Dr. Ildefonso Fernández Salas, Dr. Gustavo Ponce, y Dr. Raúl Torres Zapata.

Gracias al Dr. William Black IV, por confiar en mí, por sus enseñanzas y paciencia en la elaboración de este proyecto.

Ludmel, mil gracias por tus consejos y amistad.

A las personas que contribuyeron en éste trabajo: Karen, tu ayuda y lealtad fueron imprescindibles; Mike, gracias por tu acertada ayuda.

Norma, tus enseñanzas fueron muy valiosas en la realización de éste proyecto.

Gracias

A mis amigos de aquí de allá...

Gracias por siempre recibimos con los brazos abiertos

Lili, Sasha, Ana, Claudia, Norma, Arge, Haydee, Carlos, Li, Alejandro, Lupita, Cristina, Clau, Irma, Normiux, Ludmel, Karen, Rox, Gustavo, Yanell, Kenya,...

RESUMEN

La fiebre por dengue hemorrágico es la enfermedad arboviral que causa más morbilidad y mortalidad en el mundo. La carencia de una vacuna efectiva contra los cuatro serotipos de virus del dengue ha convertido al control vectorial en la única medida de combate contra el dengue. Las campañas de control del vector *Aedes aegypti* se basan en el uso de insecticidas piretroides para disminuir la densidad de mosquitos adultos, sin embargo, la presión constante en campo ha seleccionado la resistencia a este grupo de insecticidas. Los principales mecanismos de resistencia se basan en alteraciones en el sitio blanco de los insecticidas y en la actividad intensificada de enzimas detoxificadoras.

El primer objetivo de éste trabajo consistió en identificar las mutaciones del gen *para* que se encuentran asociadas con la resistencia por alteración de sitio blanco de los piretroides (*kdr*) en el mosquito *Ae. aegypti*. El segundo objetivo fue detectar las regiones del genoma que están asociadas al fenotipo resistencia a la permetrina, mediante un mapeo de loci de rasgos cuantitativos (mapeo de QTL).

En este trabajo, seleccionamos una cepa de *Ae. aegypti* resistente a la permetrina proveniente de la población de Islas Mujeres, Quintana Roo, México. Una nueva mutación en el gen *para* (gen del canal de sodio dependiente de voltaje) fue significativamente asociada con la resistencia tipo *kdr* en esta cepa. Una técnica de diagnóstico molecular fue desarrollada para detectar estas mutaciones a partir de ADN genómico y realizamos una búsqueda de cuatro distintas mutaciones asociadas a este tipo de resistencia en 32 poblaciones de mosquitos de América. La frecuencia de la mutación *Val1,016Iso*, incrementó conforme la selección de cepas resistentes a piretroides (Cuba e Islas Mujeres-F8), mientras que la frecuencia de las mutaciones en el codón *Iso1,011* disminuyó o no se vio afectada.

Una familia de intercrusa F3 fue utilizada para mapear la posición genética de 21 genes pertenecientes a los tres grupos de enzimas detoxificadoras: mono-oxidasas, estererasas y glutatión-s-transferasas. La correlación entre fenotipo y genotipo de la familia de mapeo fue determinada mediante un mapeo de intervalos e intervalos compuestos.

Dos QTL controlando la susceptibilidad a la permetrina fueron identificados en el cromosoma III. El principal QTL correspondió al gen *para* y el segundo QTL consistió en un grupo de oxidasas y estererasas en el brazo inferior de cromosoma III. La segregación de alelos del marcador del gen *para* (*Val1,016Iso*) indicó que la presencia de dos alelos provenientes de la línea resistente (*Iso1,016*) estuvo significativamente asociada con el 100% de sobrevivencia a la exposición a la permetrina. La presencia de dos alelos provenientes de la línea susceptible a la permetrina estuvo asociada solamente con el 13% de la sobrevivencia.

La identificación de la base genética y el desarrollo de la prueba diagnóstica para la mutación *kdr*, proveen de una nueva herramienta para la identificación de este tipo de resistencia en poblaciones del mosquito *Ae. aegypti*. La aplicación de esta técnica podrá ser un gran soporte para la elección de insecticidas utilizados en las campañas de control vectorial.

ABSTRACT

Dengue hemorrhagic fever is the arboviral disease that causes most morbidity and mortality in the world. The lack of an effective vaccine against the 4-viral serotypes has made vectorial control the only available disease control measure. Vector control campaigns rely on pyrethroids to diminish adult mosquito-densities, however, as a result of selection pressure; resistant populations have been selected against this group of insecticides. The most important resistance mechanisms are altered insecticide target-site resistance and enhanced levels of detoxification enzymes.

In this work, we selected an *Ae. aegypti* permethrin-resistant strain from Islas Mujeres, Quintana Roo, Mexico. A novel mutation on the *para* gene (voltage gate sodium channel) was significantly associated with *kdr* resistance in this strain. A new molecular-diagnostic technique was developed to detect these mutations from genomic DNA. We made a screening of the four different mutations among 32 mosquito populations from America. The *Val1,016Iso* mutation frequency increased after resistant strain selection with permethrin (Cuba and Islas Mujeres-F8). Meanwhile, the frequency of mutations at codon *Iso1,011* was not affected or even diminished after selection.

An F3-intercross family was used to map the genetic position of 21 genes from the three major detoxification enzymes: oxidases-P450, esterases and glutathione transferases. Phenotype-genotype correlation from mapping family was determined using an interval mapping and composite interval mapping.

Two QTLs controlling permethrin susceptibility were identified in chromosome III. The major QTL belongs to the *para* gene and the second QTL consisted in a group of oxidases and esterases in the chromosome III. Allele segregation from *para* gene marker (*Val1,016Iso*) indicated that the presence of two alleles (*Iso1,016*) segregating from the resistant line was significantly associated with 100% survival following permethrin exposure. The presence of two alleles from the susceptible line was associated with 13 % survival.

The *kdr* genetic mechanism identification and the *kdr* molecular diagnostic-test development constitute an important tool for insecticide resistance monitoring in *Ae. aegypti* mosquito populations. Application of this technology could support ongoing dengue control strategies in developing countries.

INTRODUCCION

Recientemente se ha estimado que más de 2.5 billones de personas viven en regiones con prevalencia de fiebre por dengue hemorrágico. El dengue es la segunda enfermedad tropical más importante, aproximadamente ocurren entre 50 a 100 millones de casos anuales de fiebre por dengue y 500,000 casos anuales de fiebre por dengue hemorrágico. El dengue se ha convertido en la enfermedad arboviral que causa más morbilidad y muerte en humanos, además de ocasionar pérdidas económicas importantes en países de tercer mundo y en vías desarrollo (WHO, 1997).

A pesar de los adelantos tecnológicos de las últimas décadas, aún carecemos de vacunas o drogas eficaces contra la enfermedad del dengue. Desde principios del siglo XX, la forma de combate más eficaz ha consistido en el control de su vector, el mosquito *Aedes aegypti*.

Entre las medidas de control vectorial, el uso de insecticidas ha jugado un rol importante en las campañas de control del dengue. En las décadas de los 50's y 60's, el uso del insecticida DDT estuvo cerca de lograr la "erradicación" del mosquito *Ae. aegypti* en las Américas. Desafortunadamente, la combinación de diversos factores ocasionó la reinfestación de *Ae. aegypti* y posteriormente la emergencia y/o resurgencia del dengue. Uno de los principales factores que ha contribuido a la re-surgencia del dengue, ha sido la resistencia de *Ae. aegypti* a los insecticidas (Gubler, 1998a).

Inevitablemente, mientras que el uso de insecticidas sea la principal forma de control vectorial, la resistencia a insecticidas continuará siendo un factor que afecte directamente la incidencia de enfermedades emergentes y re-emergentes transmitidas por vectores (Brogdon y McCallister, 1998a).

Actualmente, existen poblaciones de campo de *Ae. aegypti* con distintos niveles de resistencia a los principales grupos de insecticidas: organoclorados, organofosforados,

carbamatos y piretroides. (Hemingway, 1989; Rodríguez *et al.*, 2001) Peor aún, la redundancia en el modo de acción de los insecticidas, ha generado la selección de poblaciones de mosquitos con resistencia cruzada y/o resistencia múltiple.

La resistencia a insecticidas puede deberse a dos tipos de mecanismos: actividad metabólica intensificada y/o alteraciones en el sitio blanco. Los mecanismos de resistencia usualmente son inferidos mediante bioensayos dosis-mortalidad y el uso de inhibidores de enzimas (WHO, 1981).

En la última década, fueron desarrolladas algunas pruebas bioquímicas que permiten la identificación de los tres principales grupos de enzimas detoxificadoras (Brogdon, 1989; WHO, 1998). Por otro lado, aunque las alteraciones en el sitio blanco han sido estudiadas en *Ae. aegypti* (Severson *et al.*, 1997), los mecanismos moleculares y genéticos que determinan estos mecanismos de resistencia son desconocidos.

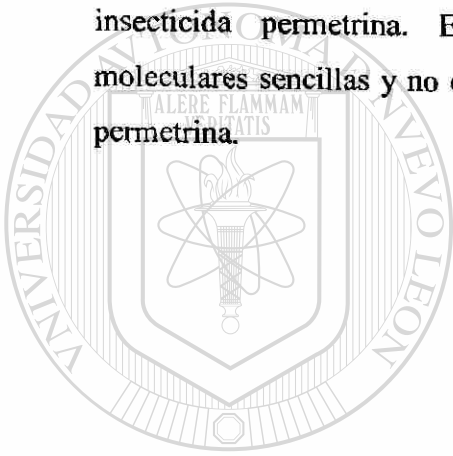
El desarrollo de nuevos insecticidas es altamente costoso y requiere de aproximadamente 15 años para su liberación al mercado. En este sentido, el manejo eficiente de los insecticidas disponibles se ha convertido en la principal forma de postergar la aparición de resistencia en poblaciones de *Ae. aegypti*.

La detección temprana de alelos de resistencia es la principal estrategia en el monitoreo y manejo de la resistencia a insecticidas. Hasta la fecha, solo existe una prueba diagnóstica de alelos que confieren resistencia a ciclodienos (French-Constant, 1995), por lo cual, el desarrollo de pruebas diagnóstico-moleculares es un requerimiento para permitir elaborar modelos predictivos de la evolución de la resistencia en poblaciones naturales de mosquitos.

A pesar de que disponemos de herramientas genético-moleculares para detección de alelos, aun carecemos de información sobre los principales genes que controlan la resistencia, sus efectos, heredabilidad y respuesta a la selección con insecticidas. En el presente trabajo, diseñamos una familia de mapeo F3, donde se determinó cuales loci controlan la resistencia a la permetrina en mosquitos adultos *Ae. aegypti*. Además, una prueba diagnóstico-molecular que detecta alelos del locus *Val1016Iso* fue desarrollado para detectar la resistencia tipo *kdr* en éste mosquito.

HIPOTESIS

La resistencia a la permetrina en el mosquito *Ae. aegypti*, es un rasgo cuantitativo que es controlado por varios genes. El mapeo de QTLs podrá identificar las principales regiones del genoma con mayor efecto en la resistencia/susceptibilidad del mosquito al insecticida permetrina. Este estudio permitirá desarrollar pruebas diagnóstico-moleculares sencillas y no costosas para detectar alelos asociados con la resistencia a la permetrina.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

OBJETIVOS

3.1. General

Identificar loci o genes que controlan la resistencia a la permetrina en cepas del mosquito *Aedes aegypti* de México.

3.2. Particulares

3.2.1. Identificar los mecanismos genéticos de la resistencia por alteraciones del sitio blanco (kdr).

3.2.1.1. Seleccionar cepas de mosquitos *Ae. aegypti* resistentes a permetrina.

3.2.1.2. Identificar mutaciones en el gen *para* (canal de sodio dependiente de voltaje) asociadas con la resistencia tipo kdr en poblaciones de mosquitos *Ae. aegypti* de América.

3.2.2.3. Desarrollar una prueba diagnóstico molecular para la identificación de las mutaciones asociadas con resistencia tipo kdr.

3.2.2. Identificar los loci asociados con la resistencia/susceptibilidad a la permetrina en el mosquito *Ae. aegypti*.

3.2.2.1. Fenotipificación y genotipificación de la familia de mapeo F3.

3.2.2.2. Localización de genes asociados a la resistencia en el mapa genético de *Ae. aegypti*.

3.2.2.3. Mapeo cuantitativo de loci que controlan la resistencia a la permetrina en la familia de mapeo.

ANTECEDENTES

4.1. *Aedes aegypti*: Ciclo Biológico, Importancia como Vector y Control

Aedes aegypti (L.) es un mosquito perteneciente al orden Díptera, familia Culicidae y subfamilia Culicinae. Se distribuye ampliamente en las regiones tropicales y subtropicales del globo, entre los 35° latitud Norte y 35° latitud Sur. *Ae. aegypti* es un insecto con metamorfosis completa, su ciclo biológico consiste en cuatro etapas: huevo, larva, pupa y adulto. Los huevecillos son depositados individualmente en sustratos húmedos que son sujetos a inundación, preferentemente recipientes artificiales domiciliarios y peridomiciliarios (Gordon, 1988). En condiciones ideales, la eclosión ocurre en un par de días, sin embargo, los huevecillos pueden mantener su viabilidad hasta por más de un año, dependiendo de la fuente de reservas y las condiciones ambientales (Eldridge, 2005).

Los estadios larvarios se desarrollan en hábitats acuáticos, donde la principal fuente de alimento consiste en microbiota filtrada por las partes bucales de la larva. La duración del desarrollo larvario depende de la temperatura del agua, disponibilidad del alimento y densidad larvaria, variando entre 5 y 14 días. Después de este periodo, una segunda metamorfosis ocurre en la fase acuática para formar la etapa de pupa. La alimentación se detiene en la fase de pupa y después de uno a dos días emerge el adulto (Eldridge, 2005).

La etapa adulta consiste en un insecto volador pequeño. Las hembras poseen una probóscis larga, adaptada para succionar sangre a través de la piel. Los machos, por otro lado, presentan una probóscis larga adaptada para succionar jugos de plantas y otras fuentes de azúcar. En forma general ambos requieren carbohidratos como principal fuente de energía, sin embargo, las hembras dependen de sangre para obtener la energía necesaria para la producción de huevecillos. Las hembras comienzan la búsqueda de sangre y la principal fuente de atracción son las trazas de dióxido de carbono y ácido

láctico emanadas por el hospedero. Las horas con mayor actividad alimenticia, ocurren entre las 6:00 am a 8:00 am y de 4:00 pm a 7:00 pm (Fernández-Salas, 1999).

Durante la alimentación, las hembras producen anticoagulantes, antihistamínicos y analgésicos que le permiten ingerir sangre a repleción. Después de la alimentación, las hembras entran en un periodo de reposo y las ovarias comienzan un proceso de oogénesis que después de 3 a 4 días culmina en la oviposición de 50 a 120 huevecillos.

Como la mayoría de los insectos hematófagos, *Ae. aegypti* es capaz de ingerir, incubar y transmitir distintos patógenos después de una alimentación de sangre infectada. En el año 1900, *Ae. aegypti* fue implicado biológicamente en la transmisión del virus de la fiebre amarilla y en 1903 en la transmisión del virus del dengue (Philip y Rozenboom, 1973).

En forma general, el virus del dengue debe cruzar la barrera del intestino medio del insecto y posteriormente dispersarse a otros órganos, entre ellos las glándulas salivales. Este proceso de incubación toma de 10 a 14 días. Una vez que el virus alcanza las glándulas salivales, el mosquito es considerado infectivo y es capaz de transmitir el virus por el resto de su vida. La permisividad de un mosquito a infectarse y/o transmitir el virus, es conocido como competencia vectorial (Hardy, 1988). Las poblaciones de *Ae. aegypti* de México, varían en la susceptibilidad a infectarse con el virus del dengue tipo-2 (Bennett *et al.*, 2002).

Actualmente, *Ae. aegypti* es considerado el principal vector del virus del dengue a nivel mundial, esto se debe a su amplia distribución geográfica, su alto grado de susceptibilidad a infectarse con el virus, así como su cercana asociación con las habitaciones humanas. Este mosquito es considerado completamente antropofílico, mas aún, el hábito de tomar mas de una alimentación de sangre durante su ciclo gonotrófico incrementa su capacidad vectorial dramáticamente (Platt *et al.*, 1997). La transmisión del dengue ocurre en forma particular durante los meses del año con más lluvia y altas temperaturas, lo que propicia condiciones necesarias para el desarrollo larval en los hábitats donde se almacena agua (Gubler y Trent, 1994).

El aumento en la actividad de epidemias por dengue, el desarrollo de hiperendemicidad y la emergencia de epidemias por dengue hemorrágico, han sido generados por diversos factores, entre ellos, cambios demográficos y sociales, reducción de recursos

para prevención y control de enfermedades transmitidas por vectores, así como cambios en las estrategias de salud pública (Gubler, 1998a).

La prevención y control del dengue, depende en controlar al mosquito vector *Ae. aegypti* dentro y alrededor de los hogares donde ocurre la mayoría de la transmisión. En los últimos 25 años, se ha puesto mucho énfasis en la aspersión espacial de insecticidas (ULV) con el objetivo de eliminar a la etapa adulta, sin embargo, al menos que sean aplicados dentro de los hogares, estos usualmente son inefectivos (WHO, 1997; Gubler, 1989). Al parecer, la medida más efectiva para controlar al mosquito transmisor del dengue es a través de la reducción de criaderos de larvas, ya sea vía eliminación de contenedores que almacenan agua o bien mediante el uso de larvicidas.

En las décadas de los 50's y 60's, varias campañas para la erradicación de vectores de enfermedades fueron implementadas a nivel mundial, entre éstas, la erradicación del mosquito *Ae. aegypti*. Desafortunadamente, todos estos programas han carecido de sustentabilidad, y una vez que el mosquito y la enfermedad fueron controlados, los limitados recursos para salud fueron transferidos a otros programas competentes. Como consecuencia, las poblaciones de *Ae. aegypti* reinfestaron e incluso invadieron nuevas regiones, al grado de que la ocurrencia de transmisión de dengue tiene ahora un nivel epidémico (Gubler, 1998b).

Actualmente, las campañas de control de *Ae. aegypti* consisten en la eliminación de criaderos de estadios larvarios y en casos de brotes de dengue, la aplicación espacial de insecticidas. Usualmente, la eliminación de pequeños utensilios que tienden a acumular agua en los patios de las casas, así como el tratamiento de larvicidas en los contenedores de agua necesarios para las actividades diarias, son realizados durante las campañas de prevención. En México, el principal insecticida utilizado para controlar a los estadios larvarios es el organofosforado temefós (Abate®).

La medida de emergencia durante brotes o epidemias de dengue, consiste en la aplicación de insecticidas en nubes de gotas de ultrabajo-volumen (ULV). Los principales insecticidas utilizados para esta finalidad son el organofosforado malatión y varios piretroides, entre ellos, deltametrina, permetrina y lambda-cialotrina.

En México, en los últimos 6 años, los principales insecticidas utilizados para control del mosquito *Ae. aegypti*, han sido el larvicida organofosforado temefós (Abate®) y el

adulticida permetrina junto con el sinergista piperonil butóxido (Aquaeslin®) (Norma Oficial Mexicana, S.S.A,1999).

La nueva tendencia en los programas de control es proveer de sustentabilidad a los programas mediante el uso de estrategias de reducción larvaria basadas en la comunidad. La razón consiste en que el control de *Ae. aegypti* solo puede lograrse por la gente que vive en las casas donde la problemática ocurre y por la gente que crea los hábitats larvarios debido a sus estilos de vida. Estos programas de participación comunitaria requieren de un programa de educación para la salud extensivo. Desafortunadamente, esta medida resulta muy lenta, por lo cual se ha propuesto una combinación de estrategias, una que permita un éxito inmediato y otra que permita proveer de sustentabilidad. La efectividad de dichos programas aun no ha sido probado en campo, siendo un área de oportunidad para las programas de control de vectores.

4.2. Insecticidas

Los primeros insecticidas consistieron en sustancias químicas inorgánicas, tales como sulfuro (1000 A.C), arsénico (900 D.C), arsenato de plomo, cloruro de mercurio, ácido bórico y algunos jabones. Estas sustancias fueron clasificadas como venenos generales, usualmente se requerían grandes cantidades y se utilizaban principalmente para control marginal de plagas.

El siguiente grupo utilizado se clasificó como insecticidas botánicos, incluyendo a la nicotina, rotenona y piretrinas. Este grupo presentaba mayor complejidad estructural, mayor potencial y más selectividad. La disponibilidad de los insecticidas botánicos fue limitada y su alto costo y su fotosensibilidad evitó que tuvieran un mayor impacto en plagas, hasta la fecha, las piretrinas han sido el botánico mas utilizado en los últimos dos siglos.

El verdadero desarrollo científico de los insecticidas comenzó en 1867 con la formulación y uso del arsénical “Verde de París”. Para la década de 1920, ya se habían dado a conocer muchas de las estructuras de los insecticidas botánicos usados desde 1800. Para 1930, la principal meta fue el descubrimiento de insecticidas orgánicos sintéticos. En esta época se optimizaron los sistemas de síntesis, identificación, búsqueda y la metodología para probar su actividad biológica.

En 1939, Müller descubrió la propiedad insecticida del primer insecticida sintético, el DDT (dicloro difenil tricloroetano). Después de éste hallazgo, hubo un rápido aumento en el número de insecticidas descubiertos, la lista incluye otros insecticidas organoclorados con modos de acción similares o distintos al DDT (ejemplo hexacloruro de benceno). En 1945, el primer organofosforado (OFs) fue descubierto, seguido en 1953, por los carbamatos y una década después por los piretroides (Casida y Quistad, 1998).

Estos cuatro grupos de insecticidas aun constituyen el 90 % del mercado en salud pública. Otros insecticidas se han adjuntado, tales como insecticidas bacterianos *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) y reguladores de crecimiento, sin embargo, el uso de dichos compuestos es limitado para muchos vectores de enfermedades debido a su alto costo y a que su modo de acción es específica para larvas.

Entre los insecticidas botánicos, la rotenona, rianodina, veratidina y azardiquina son utilizados como los ingredientes activos de cubé, riania, sabadilla y neem respectivamente, recientemente se han promovido intensivamente los programas de desarrollo y usos de los extractos de semillas del neem (Murray, 2006).

4.2.1. Mecanismos de Acción de los Insecticidas

Los cuatro principales grupos de insecticidas actúan a nivel del sistema nervioso de los insectos. Los insecticidas organoclorados actúan como basuras en los canales de sodio de las neuronas de los insectos, resultando altamente específicos y tóxicos para insectos. Aunado a esto, tienen una larga residualidad (~15 - 30 años) y su costo de producción es muy bajo, desafortunadamente, su bio-acumulación en tejidos grasos de mamíferos y sus efectos dañinos a la fauna silvestre, ocasionaron su restricción y veta en los Estados Unidos a partir de 1972. Actualmente, el lindano, endosulfán y DDT son utilizados en forma importante para salud pública en ciertas partes del mundo.

Los organofosforados y metil-carbamatos actúan mimetizando a la acetilcolina en las uniones sinápticas. Los organofosforados son convertidos en sus análogos *oxon* mediante la acción de monooxidasas antes de que actúen como inhibidores de la AchE. Estos insecticidas carecen de especificidad, resultando moderadamente tóxicos para mamíferos, sin embargo, la carencia de residualidad y bio-acumulación se convirtieron en las principales razones para incrementar su uso agrícola y en salud pública. Actualmente, 10

de los 20 insecticidas más utilizados en mercado, son organofosforados y carbamatos. Los insecticidas más utilizados para salud pública son los larvicidas temefós (OFs), propoxur (MCs) y el adulticida malatión (OFs).

Los insecticidas piretroides tienen un modo de acción similar a los organoclorados, sin embargo, los piretroides ganaron popularidad por su baja toxicidad para mamíferos, por su rápido efecto aniquilante en insectos y su residualidad intermedia (2-6 meses). Una gran variedad de moléculas de piretroides fueron introducidas en el mercado en 1970 y 1980, actualmente constituyen el 25% de la producción mundial de insecticidas. Para el mercado de salud pública son utilizados desde rociados residuales intradomiciliarios, tratamiento de pabellones, cortinas, mosquiteros así como en sprays, carboncillos, etc (Hemingway *et al.*, 2004).

Un reducido número de nuevas clases de insecticidas podrían utilizarse para control de vectores, sin embargo, el alto costo del desarrollo y registro de nuevos insecticidas, significa que los insecticidas deben ser desarrollados inicialmente por el mercado de la agricultura y después ser utilizados para el control de vectores. En el mercado de salud pública, las actividades, perfil de seguridad del insecticida y su forma de aplicación deberán ser apropiados, además, el mercado debe ser lo suficientemente grande como para garantizar los costos de registro para su uso en salud pública.

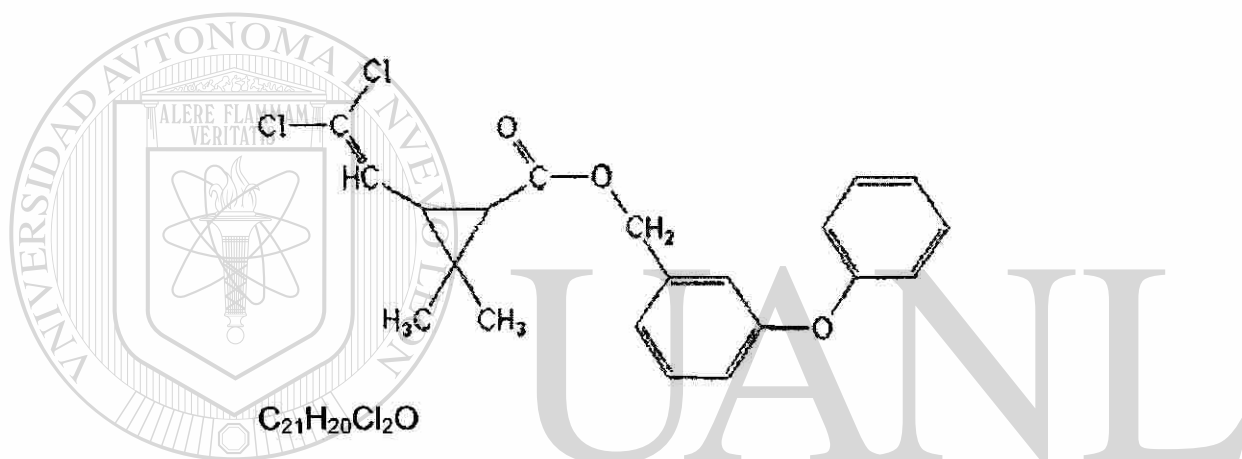
4.2.2. Permetrina

La permetrina pertenece al grupo de los piretroides. Los insecticidas piretroides son ésteres del ácido crisantémico con un alto grado de lipofilia. Los compuestos originales de esta serie fueron las piretrinas naturales, las cuales fueron aisladas de las flores del crisantemo. La química de los piretroides y su modo de acción son clasificadas como de Tipo-1 ó Tipo-2, dependiendo del alcohol substitutivo.

La permetrina pertenece al grupo del Tipo-1. En forma general este grupo incluye a los piretroides que contienen desciano-3-fenoxibencil u otros alcoholes en su estructura química. Muchos de los antiguos compuestos de Tipo-1 carecientes del fenoxibencil, resultan inestables en condiciones ambientales, impidiendo su uso en cultivos de campo (por ejemplo, piretrinas, aletrina, tetrametrina). Sin embargo, la introducción del

fenoxibencil en la permetrina mejoró la estabilidad química y permitió el uso de los piretroides en el campo (Bloomquist, 1999).

El nombre científico de la permetrina es 3-fenoxibencil (1*RS*)-*cis-trans*-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropano carboxilato. Es un insecticida no sistémico con acción de contacto, estomacal y con un poco de efecto repelente. La dosis oral aguda LD₅₀ para ratas es de 4000 y 6000 mg/kg para mezclas de isómeros *cis:trans* de 40:60 y 20:80 respectivamente (LD₅₀ aguda percutánea para ratas es >4000 mg/kg) (Shafer *et al.*, 2005). La permetrina es tóxica para peces y abejas. En mamíferos ocurre la hidrólisis de enlaces éster y el compuesto es eliminado como un conjugado glicosilado.



Estructura química de la permetrina.

Los signos típicos de intoxicación por los piretroides del Tipo-1 incluyen hiperexcitabilidad y convulsiones en insectos. En insectos, los efectos de los piretroides (especialmente los del Tipo-1) pueden desarrollarse en 1 a 2 minutos después del tratamiento y pueden resultar en el derribe, es decir, la pérdida de la postura normal y de la locomoción. La exposición de humanos a cualquiera de los dos tipos de piretroides puede causar parestesia, una sensación de quemazón o picazón de la piel, pero este efecto es más intenso con los compuestos del Tipo-2 (Bloomquist, 1999).

La intoxicación con piretroides resulta de sus potentes efectos sobre la generación de impulsos nerviosos en el sistema nervioso central y periférico. En condiciones normales, las neuronas poseen un voltaje que traspasa las membranas, de unos -60 mV, en el lado interno. El impulso nervioso o potencial de acción consiste en una despolarización

transitoria (onda positiva) cuya onda de ascenso es impulsada por un influjo de iones Na^+ , seguidos por un descenso del flujo hacia afuera de iones K^+ .

Estos flujos de iones ocurren debido a la apertura y cierre de canales iónicos de proteínas que están empotradas dentro de la membrana nerviosa (canales de sodio dependiente de voltaje). El potencial de acción se propaga a lo largo del axón hasta llegar a las terminales nerviosas, donde estimula la liberación de los transmisores químicos. Los compuestos del Tipo-1 inducen picos múltiples de las descargas en los nervios sensoriales periféricos, nervios motores y en las neuronas dentro del sistema nervioso central (SNC). Todos estos efectos ocurren por la forma en que los piretroides se unen al canal de sodio, prolongando la corriente que fluye por los canales de sodio al hacer más lento o impedir el cierre de los canales (Soderlund y Knipple, 2003).

La duración de las corrientes de sodio modificadas por los compuestos del Tipo-1 dura décimas o centésimas de milisegundos, mientras que las del Tipo-2 duran algunos minutos o aún más. Estos efectos sobre la corriente de sodio también causan un profundo incremento en la liberación de neurotransmisores de las terminales nerviosas. La sinápsis neuromuscular de los insectos es un blanco especialmente importante para los piretroides, como también para otros insecticidas. (Bloomquist, 1996).

La forma de aplicación de la permetrina y otros pirteroides utilizados en el control del dengue, es mediante aerosoles espaciales de gota de ultra bajo volumen (ULV). Para que esta aplicación sea efectiva, las gotas de permetrina deben hacer contacto con los mosquitos en vuelo o en sitios de reposo, desafortunadamente, esta medida ha demostrado ser inefectiva en muchos casos (Gubler, 1989; WHO, 2002).

Ultimamente, se ha generado gran interés en nuevas formas de aplicación residual de piretroides en cortinas, paredes y otras superficies de reposo del mosquito *Ae. aegypti* (Kroeger *et al.*, 2006; Karch *et al.*, 1995) Estas medidas, como ha sido demostrado en el control de *Anopheles*, son más focalizadas, eficientizando el uso de insecticidas económica y ambientalmente.

4.3. Resistencia a Insecticidas en Vectores

Los programas de control de vectores han dependido principalmente del uso de insecticidas y muchos de los esfuerzos de control resultaron exitosos durante varias

décadas. El primer insecticida utilizado para control de mosquitos fue el DDT. En 1955, la Organización Mundial de la Salud (WHO) llamó a la erradicación global de la malaria a través del uso de éste insecticida. El uso de rociados de casas con DDT en programas de amplia escala, redujo dramáticamente la prevalencia de malaria en Asia (Phillips, 1983). Por otro lado, los programas de aspersión aérea de temefós en los programas de control de la oncocercosis en Africa, casi eliminaron la ceguera de los ríos durante las décadas de los 70's y 80's (Curtis, 1989).

En 1946, la Organización Panamericana de la Salud (OPS), armada con DDT inició una campaña de erradicación de *Ae aegypti*. Solo un año después, ocurrieron los primeros casos de resistencia en especies de este mosquito (Brown, 1986). Para 1972, *Aedes aegypti* ya había sido erradicado del 73% del territorio y de 19 países (Gubler, 1989), sin embargo, en el mismo año, la resistencia al DDT fue reconocida como un problema serio y la campaña terminó antes que la meta de erradicación fuera alcanzada (Brown y Pal, 1971).

Los problemas de resistencia han continuado a pesar del uso de nuevos grupos de insecticidas. Alrededor de cien especies de mosquitos han generado resistencia a uno o más insecticidas (Hemingway y Ranson, 2000). El control de la malaria y dengue, han incluido algunos organoclorados (hexacloruro de benceno, DDT), organofosforados (meti-paratión, temefós, malatión y clorpirifos), carbamatos (propoxur y carbosulfán) y piretroides (resmetrina, permetrina, fenotrina) (Ayesa *et al.*, 2006).

A pesar de que el uso del BHC y dieldrín fue restringido desde hace muchos años, la resistencia a estos insecticidas sigue dispersada en poblaciones de insectos. El uso del DDT en algunos países ha sido restringido o vetado, sin embargo, la resistencia al DDT en muchas especies de mosquitos vectores es persistente (WHO, 1992). Actualmente, existe un debate sobre la continuación del uso de este insecticida, la presión pública debida a los efectos adversos del DDT hacia el ambiente, exigen su retiro del mercado en salud pública. Por otro lado, el retiro del DDT en las campañas de control de vectores en países del tercer mundo, ha sido relacionado con el aumento en la incidencia de la malaria en países de Africa. (Roberts *et al.*, 1997). Ambos puntos de vista se estan evaluando cautelosamente, antes de tomar una desición definitiva sobre el uso de este insecticida.

Diversas especies de insectos vectores han desarrollado resistencia a los organofosforados. La resistencia de amplio espectro a organofosforados, o la resistencia específica para malatión están presentes en las principales especies vectoras del género *Anopheles* (Hemingway y Ranson, 2000), *Culex* (Hemingway y Karunaratne, 1998) y también en *Aedes aegypti* (Georghiou *et al.*, 1987; Vaughan y French-Constant, 1998; Rawlins, 1998; Bisset *et al.*, 2006). Los organofosforados y carbamatos tienen el mismo modo de acción y una vez que una población de insectos es resistente a alguno de los dos insecticidas, es muy probable que ocurra un fenómeno de resistencia cruzada (Villani y Hemingway, 1987).

La resistencia a varios grupos de piretroides se ha dispersado ampliamente en culicidos y anofelinos (Chandre *et al.*, 1998, 1999). La resistencia cruzada entre piretroides y DDT en *Anopheles gambiae* ha generado una gran preocupación, ya que los piretroides son el único grupo disponible para la implementación de la estrategia más eficaz para controlar la malaria: la impregnación de pabellones.

Por último, la resistencia a piretroides ocurre en diversas poblaciones del mosquito *Ae. aegypti*, ya sea debida a la resistencia cruzada con el DDT (Hemingway *et al.*, 1989; Brengues *et al.*, 2003), ó bien, mediante mecanismos metabólicos relacionados con la resistencia a organofosforados y carbamatos (Rodríguez *et al.*, 2002; Flores *et al.*, 2003).

4.4. Detección de la Resistencia en una Población: Bioensayos

La Organización Mundial de la Salud define la resistencia como “el desarrollo de una habilidad en una cepa de algún organismo a tolerar una dosis de un tóxico que probaría ser letal para la mayoría de los individuos en una población normal de la misma especie”. La resistencia es una característica genética heredable cuya frecuencia incrementa en la población como un resultado directo a los efectos selectivos de un insecticida.

Para entender la evolución de la resistencia a insecticidas es necesario conocer los procesos que ocurren y son seleccionados en los individuos resistentes. La variación genética y fenotípica que afecta la resistencia se presenta en algunos individuos de la población como resultado de mutación o duplicación genética, modificando algún aspecto fisiológico, morfológico o de comportamiento en el fenotipo normal. Estos cambios en el fenotipo usualmente aumentan el proceso de detoxificación, reducen la

sensibilidad del sistema nervioso o bien, incrementan la capacidad de los insectos de evadir el contacto con el tóxico. Cuando el insecticida es aplicado, los individuos con dichas mutaciones tienen una ventaja considerable sobre los individuos más susceptibles en la población, teniendo mayor probabilidad de sobrevivir al tratamiento con insecticidas, y en promedio, contribuyen con más descendencia en la siguiente generación. Como resultado, la frecuencia del gen que confiere resistencia aumentará en la población al paso del tiempo (Hemingway y Ranson, 2005).

La resistencia a insecticidas puede ser investigada en muchos ámbitos, desde la caracterización molecular de los genes y los productos bioquímicos que confieren resistencia; el rol de éstos productos en las reacciones detoxificativas, e incluso el estudio de las fuerzas ecológicas y evolutivas que afectan la dinámica de estos genes en la población.

Los métodos que miden los mecanismos de resistencia varían en su sofisticación. Los bioensayos usando un rango de concentraciones de insecticidas de distintas clases pueden ayudar a establecer la resistencia y resistencia cruzada de una cepa resistente. De la misma forma, bioensayos con insecticidas que envuelven la pre-exposición a sinergistas son utilizados para determinar si algún tipo de resistencia específico es bloqueado.

En los bioensayos *dosis-respuesta* a insecticidas, muestras de insectos son expuestas a un rango de dosis de insecticidas, produciendo un rango de mortalidades en la muestra tratada. Al graficar los datos de mortalidad contra la dosis, una curva sigmoide es obtenida. Esta curva es transformada en una línea de respuesta recta, al transformar el logaritmo de la dosis y la mortalidad en escala probit (Hemingway y Ranson, 2005).

La gráfica dosis-respuesta permite al investigador establecer la dosis requerida para matar a un porcentaje dado de individuos tratados. Las cepas usualmente son caracterizadas por la dosis letal que mata al 50% (LD50) ó 95% (LD95) de los individuos. Por otro lado, cuando la dosis exacta que entra al organismo no se conoce, se puede calcular la concentración letal (ejemplo, LC50 ó LC95).

La pendiente de la línea de respuesta es una medida de la variabilidad de la población, una línea con mayor inclinación de la pendiente indica la presencia de una cepa más homogénea. Cuando una cepa de campo genéticamente heterogénea es expuesta a este tipo de bioensayos, la línea resultante debe tener poca pendiente. Una vez que la

selección con insecticidas incrementa, la pendiente se vuelve más inclinada, debido a que los insectos son cada vez más homogéneos en sus niveles de resistencia.

Los niveles de resistencia de distintas poblaciones pueden ser comparados usando esta metodología mediante el cálculo de la proporción de la resistencia (RR: resistance ratio). La RR corresponde a la dosis LD₅₀ de la cepa “investigada” dividida entre la dosis LD₅₀ de la cepa susceptible. La proporción de resistencia puede ser calculada en cualquiera de los valores LD₅₀ o LD₉₅.

Existen varias cepas susceptibles de *Anopheles* y *Culex* que han sido mantenidas en laboratorio para utilizarse como referencia en los bioensayos dosis-respuesta. Para *Ae. aegypti*, la cepa susceptible más antigua es denominada “Rockefeller” y se mantiene en varios laboratorios del mundo (por ejemplo Instituto de Medicina Tropical, Liverpool, Inglaterra; Instituto Pedro Kouri, Cuba). Una cepa susceptible más reciente se mantiene en los laboratorios de CDC (Center of Disease Control, Atlanta, E.U.A.) y es denominada “New Orleans”.

Los bioensayos *dosis-diagnóstico* fueron una respuesta a la necesidad de evaluar poblaciones en campo, donde usualmente no se tiene un alto número de especímenes. Para este objetivo, se han calculado dosis diagnósticas predeterminadas para algunas especies de insectos. Estas dosis se determinan en base a su letalidad para la mayoría de los individuos susceptibles de varias poblaciones de una especie.

La Organización Mundial de la Salud ha establecido una lista de dosis diagnósticas recomendadas para insectos vectores de enfermedades, así como kits estándar para evaluar la resistencia a varios insecticidas (WHO, 1981). El uso de las dosis diagnósticas proveen una medida aproximada de la cantidad de resistencia en una población, sin embargo, el traslape de las líneas de mortalidad de los insectos susceptibles y resistentes, ocasiona que usualmente se subestime el verdadero alcance de la resistencia.

Por otro lado, están disponibles algunos ensayos bioquímicos simples para detectar la actividad elevada de los tres sistemas de enzimas (esterasas, glutatión-s-transferasas y monooxigenasas) envueltas en el metabolismo de insecticidas (WHO, 1998; Brogdon, 1989). Otras pruebas bioquímicas y métodos moleculares basados en PCR han sido desarrollados para detectar alteraciones del sitio blanco del insecticida para algunos insectos vectores de enfermedades (Hemingway *et al.*, 2004).

4.5. Mecanismos de Resistencia a Insecticidas

La resistencia a insecticidas es el resultado de cambios genéticos que alteran atributos fisiológicos, morfológicos o de comportamiento en las especies. Los mecanismos de resistencia se dividen en cuatro categorías: penetración reducida, comportamiento, metabolismo elevado e insensibilidad del sitio blanco. Por lo general, estos mecanismos no son específicos y confieren resistencia cruzada a otros tóxicos de estructura similar y en muchos casos, a compuestos químicamente no relacionados (Soderlund y Bloomquist, 1990).

La penetración reducida es el mecanismo de resistencia menos entendido. La mayoría de los formulados de insecticidas han sido diseñados para penetrar el insecto a través de la cutícula. Algunos insectos han desarrollado cutículas más gruesas o cutículas alteradas que reducen el grado de penetración de los insecticidas (Apperson y Georghiou, 1975).

Por si sola, la penetración reducida confiere un bajo nivel de resistencia, sin embargo, en combinación con otros mecanismos de resistencia, puede potencializar la resistencia en forma no aditiva. Por otro lado, al disminuir el grado en el cual el insecticida alcanza su sitio blanco, permite que otro mecanismo pueda detoxificar más efectivamente al insecticida.

Un mecanismo de resistencia por comportamiento fue identificado en moscas que evaden cebos tratados con malatión. Por otro lado, los insecticidas como el DDT y la permetrina influyen cambios de comportamiento en los insectos, por ejemplo reducen la proporción de entrada de mosquitos hacia las casas, incrementan la proporción de escape o salida de las casas o bien, inducen un cambio en los tiempos de picadura (Lines *et al.*, 1987; Mbogo *et al.*, 1996). Aun se desconoce si estas respuestas pueden ser consideradas como un mecanismo de resistencia, ya que muchos otros factores pueden estar afectando al comportamiento de los insectos.

La resistencia metabólica es el resultado del incremento en la expresión de genes codificadores de enzimas que metabolizan a los principales xenobióticos. Tres familias de enzimas han sido involucradas en la resistencia a los cuatro grupos de insecticidas, sin embargo, su rol exacto aun no ha sido determinado. Las monoxidasas del citocromo-P450, glutatión-s-transferasas (GST) y carboxyl-esterasas son familias de enzimas que catalizan un gran rango de reacciones de detoxificación. Estas constituyen la primera

defensa enzimática contra los xenobióticos, son responsables de retirar muchos productos de deshecho del metabolismo, juegan roles esenciales en las rutas biosintéticas y están envueltas en la comunicación química (Scott, 1995).

La actividad elevada de las enzimas detoxificativas ha sido asociada con la resistencia a insecticidas en un gran rango de especies de insectos plaga. Las esterasas usualmente están envueltas en la resistencia a organofosforados, carbamatos y en menor proporción a piretroides. Las monoxidasas-P450 están involucradas en el metabolismo de piretroides y en la activación o detoxificación de insecticidas organofosforados y en menor proporción de metil-carbamatos. La DDT-dehidroclorinasa fue reconocida recientemente como una glutatión-s-transferasa en la mosca doméstica *Musca domestica*, posteriormente fue demostrado que esta enzima tiene un rol común en anofelinos y mosquitos *Aedes* (Hemingway *et al.*, 2004).

La resistencia por insensibilidad del sitio blanco se debe a mutaciones sencillas no silenciosas en genes estructurales. Para que ocurra la selección de estas mutaciones, el aminoácido resultante debe reducir la unión del insecticida, sin causar una pérdida de la función primaria del sitio blanco. Por lo tanto, el número de sustituciones probables de aminoácidos resulta muy limitada y comúnmente pueden encontrarse las mismas mutaciones asociadas a la resistencia en taxas muy divergentes. El grado en que se afecta la función debida a la mutación resistente, puede reflejarse en la viabilidad de los individuos resistentes en la ausencia de selección. Este costo en la viabilidad tiene importantes implicaciones en la persistencia de la resistencia en el campo.

Los genes de los principales sitio blancos: canales de sodio (*para*), receptores del ácido amino-butírico (GABA) y acetilcolinesterasa (AChE), han sido clonados y sus secuencias han sido comparadas entre insectos resistentes y susceptibles. Algunas mutaciones han sido asociadas con resistencia a insecticidas, aunque en muchos casos no se ha elucidado el mecanismo de resistencia a nivel molecular.

4.5.1. Resistencia Metabólica

4.5.1.1. Carboxil-Esterasas

Las carboxil-esterasas son un grupo amplio de enzimas capaces de metabolizar una gran variedad de sustratos mediante la hidrolización de los enlaces éster en presencia de

agua. Las esterasas pueden clasificarse en base a su preferencia por los substratos α o β naftol (α NA y β NA), a sus patrones electroforéticos o bien, por su secuencia nucleotídica.

Muchos insecticidas contienen enlaces éster, por lo cual, es esperado encontrar que el principal mecanismo de resistencia en cepas de insectos resistentes se deba a la actividad intensificada o sobreproducción de esterasas. En forma general, los insecticidas organofosforados y metil-carbamatos actúan como inhibidores de esterasas, ya que tienen una alta afinidad por las enzimas pero son substratos pobres.

En los insectos resistentes, existe una mayor frecuencia de la interacción esterasa-insecticida, evitando que el insecticida alcance su sitio blanco (la acetilcolinesterasa). Cuando las esterasas están presentes en la misma proporción molar que el insecticida, estas son capaces de secuestrar efectivamente a los insecticidas e hidrolizarlos lentamente (Scott, 1995).

El papel de las esterasas como mecanismo de resistencia puede ser inferido mediante tres formas: 1) detección de niveles elevados de productos de la hidrólisis de insecticidas en estudios de metabolismo en insectos resistentes; 2) sinergismo de la toxicidad del insecticida en insectos resistentes mediante el uso de inhibidores de esterasas no tóxicos, tales como TPP (0,0,0-trifenil fosfato), DEF (S,S,S-tributil fosforotritioato) o IBP (0,0-bis(1-metiletil)s-fenilmetil posforotioato); 3) detección de niveles altos de actividad de esterasas generales (Brogdon, 1989), usando substratos simples y ensayos espectrofotométricos de homogenizados o tejidos de insectos, o bien, por electroforesis y tinción de geles (Hemingway y Karunaratne, 1998).

La sobreproducción de esterasas es una respuesta evolutiva contra la presión de selección por insecticidas organofosforados y carbamatos, su presencia se ha documentado en numerosas especies de artrópodos, incluyendo mosquitos, garrapatas, áfidos y cucarachas.

El papel de las esterasas en la detoxificación de los piretroides ha sido poco estudiado, existen varios reportes de la actividad intensificada de las esterasas en poblaciones de mosquitos resistentes, entre éstas *An. gambiae*, *An. albimanus* y *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti* (Rodríguez *et al.*, 2001; Flores *et al.*, 2003), sin embargo, los genes involucrados aún son desconocidos. Algunos estudios han demostrado que las esterasas tienen baja actividad catalítica sobre algunos piretroides, sugiriendo que los elevados

niveles de esterasas presentes en cepas resistentes a piretroides, podría deberse a una pre-selección con organofosforados (Rodríguez *et al.*, 2002).

La principal causa de la excesiva síntesis de esterasas en insectos resistentes, se debe a la amplificación de genes dentro del genoma, aunque también la transcripción sobre-regulada y expresión genética alterada han sido documentadas. El mecanismo de resistencia metabólica estudiado con más detalle en vectores de enfermedades, es el sistema de esterasas elevadas en *Culex*.

En este mosquito, la sobreproducción de enzimas se debe a la amplificación de uno o más genes de esterasas, variando entre 20 a 250 copias en el genoma (Mouches *et al.*, 1990; Callaghan *et al.*, 1998). Existen varios alelos de esterasas asociados con la resistencia, sin embargo, el genotipo más común es la co-amplificación de dos genes de esterasas: $est\alpha$ y $est\beta$. Alrededor del 90% de las poblaciones resistentes de *Culex* presentan un genotipo $est\alpha^2/est\beta^2$ (Coleman *et al.*, 2002) aunque otras combinaciones han sido identificadas, por ejemplo la cepa Cyprus tiene entre 40 a 60 copias de los genes $est\alpha-5$ y $est\beta-5$, mientras que la cepa TEM-R de California solo presenta amplificación en el locus $est\beta-1$. Se ha encontrado muy poca variación en la cinética de inhibición entre los distintos alelos de esterasas, por lo cual la ventaja selectiva del genotipo $est\alpha^2/est\beta^2$ podría estar ligada a un tercer gen (aldehído oxidasa) que se co-eleva solamente con este fenotipo (Hemingway *et al.*, 2000b).

Los genes homólogos a las esterasas amplificadas en el mosquito *Culex*, han sido identificados en la misma proximidad y orientación en *An. gambiae*, pero se desconoce si están involucrados en la resistencia a piretroides, ya que las esterasas son inefectivas contra los piretroides en este mosquito (Ranson *et al.*, 2000).

Los elevados niveles de esterasas no siempre son el resultado de la amplificación genética. La sobre-expresión de la $est\alpha-1$ en la cepa Barriol de *Cx. pipiens* del Sur de Francia, se podría deber a cambios en algún elemento regulatorio no identificado y no a la amplificación del gen $est\alpha-1$. Las esterasas amplificadas pueden también ser expresadas en diferentes niveles, por ejemplo, existe cuatro veces más $est\beta$ que $est\alpha$ en *Cx. quinquefasciatus* resistente, a pesar de que los genes están presentes en una proporción 1:1. Aun así, estos mecanismos no han sido identificados a nivel genético o molecular en poblaciones naturales de mosquitos (Hemingway *et al.*, 2000a)

Por otro lado, algunas especies de *Anopheles* tienen un mecanismo que confiere resistencia específica al malatión e involucra a carboxilesterasas con alta actividad hidrolítica (Hemingway, 1982). En *An. stephensi*, tres esterasas con actividad carboxil-esterasa contra malatión han sido aisladas y caracterizadas, sin embargo, la alteración genética que genera estos cambios cualitativos no han sido identificados en poblaciones de mosquitos de campo. Datos de otros artrópodos resistentes al malatión, sugieren que una o dos mutaciones de aminoácidos en éstas enzimas podrían ser responsables de éste tipo de resistencia (Hemingway, 1983).

4.5.1.2. Monoxidasas del Citocromo-P450

Las monoxidasas del citocromo-P450 son una familia de enzimas encontrada en la mayoría de organismos, incluyendo a los insectos. Estas enzimas actúan en el metabolismo de xenobióticos y tienen un rol en el metabolismo endógeno. Las enzimas P450 se unen al oxígeno molecular y reciben electrones del NADPH para introducir una molécula de oxígeno en el sustrato. Las monoxidasas tienen un amplio rango de sustratos, pero en general, estas enzimas metabolizan sustratos lipofílicos para producir moléculas con mayor solubilidad en agua, o bien con grupos funcionales que permiten las reacciones de conjugación, promoviendo la excreción (Berge *et al.*, 1998).

Las monoxidasas P450 están envueltas en el metabolismo de todos los insecticidas, permitiendo la detoxificación a través de la hidroxilación alifática del DDT, deshidroxilación aromática del carbaryl y propoxur, y la epoxidación de ciclodienos, o bien, permitiendo la activación de los organofosforados a través de reacciones de oxidación. La gran diversidad de monoxidasas se debe a la existencia de múltiples isoformas de P450, varios patrones de expresión y un amplio espectro de sustratos (Scott, 1995).

La elevada actividad de las monoxidasas ha sido asociada con la resistencia a piretroides en *An. stephensi*, *An. subpictus*, *An. gambiae* y *Cx. quinquefasciatus* (Brogdon, *et al.*, 1999; Vulule *et al.*, 1999). El principal método para identificar este mecanismo de resistencia se basa en bioensayos con insecticidas utilizando inhibidores de las monoxidasas del citocromo-P450 (piperonil butóxido PBO). La reducción en la magnitud de la resistencia observada constituye la primera pista de la presencia de este

mecanismo de resistencia. La confirmación de este mecanismo requiere de estudios bioquímicos comparando cepas resistentes y susceptibles. Este tipo de ensayos ha sido estandarizado para múltiples especies de mosquitos vectores.

En la mayoría de los casos donde se ha correlacionado la actividad elevada de las monoxidasas-P450 con la resistencia a insecticidas, se ha identificado el rol de los genes *Cyp* pertenecientes a la familia *Cyp6*. La enzima CYP6D se sobreproduce en una cepa de *M. domestica* resistente a piretroides debido a la transcripción regulada, por otro lado, la CYP6A se ha asociado con la resistencia a organofosforados en la misma especie (Feyereisen *et al.*, 1995).

En *An. gambiae* y *Cx. quinquefasciatus* se han identificado la sobre-expresión de uno o varios genes pertenecientes a la familia *CYP6* asociados con la resistencia a piretroides (Nikou *et al.*, 2003; Gong *et al.*, 2005). Otros genes pertenecientes a las familias *CYP4*, *CYP12* y *CYP9* han sido observados en cepas resistentes a insecticidas en diferentes especies de insectos. Recientemente, diecisiete cDNAs que codifican oxidasas *CYP4* han sido identificadas en *An. albimanus* y 111 genes P450 han sido identificados en *An. gambiae*, sin embargo, aun se desconoce si estas familias de oxidasas juegan algún rol en la resistencia del mosquito (Ranson *et al.*, 2002).

4.5.1.3. Glutación-s-Transferasas

Las glutatión-s-transferasas (GSTs) son enzimas dimericas multifuncionales que juegan un rol en la detoxificación de un gran rango de xenobióticos. Las enzimas catalizan el ataque nucleofílico del glutatión reducido (GSH), en los centros electrofílicos de los compuestos lipofílicos. De los dos tipos de GSTs (microsomales y citosólicas), solo las enzimas citosólicas han sido implicadas en el metabolismo de los insecticidas.

Las GSTs pueden detoxificar insecticidas mediante reacciones de conjugación con el glutatión reducido, produciendo metabolitos hidrosolubles, o bien, al facilitar la dehidroclorinización de compuestos mediante reacciones de reducción. Mas aún, estas enzimas también contribuyen en la remoción de especies de radicales de oxígeno-libre producidas por la acción de los insecticidas (Enayati, *et al.*, 2005).

La GSTs de las clases delta y epsilon son específicas para insectos, han sido reportadas en mosquitos, mosca doméstica, drosófilidos y mosca de las ovejas. Se sugiere que las

GSTs juegan un rol en la resistencia, ya que muchos estudios han demostrado que los homogenizados de insectos resistentes a insecticidas presentan altos niveles de actividad de éstas enzimas.

El principal rol de las GSTs en la resistencia a insecticidas en mosquitos, es el metabolismo del DDT a productos no tóxicos (DDE), aunque también tienen un rol secundario en la resistencia a organofosforados. La resistencia al DDT basada en GSTs es muy común en varias especies de anofelinos, reflejando el fuerte uso de éste insecticida para el control de la malaria durante varias décadas.

En *Ae. aegypti* al menos dos grupos de GSTs se encuentran en altos niveles en insectos resistentes al DDT (Lumjuan *et al.*, 2005), mientras que en *An. gambiae* un gran número de GSTs se encuentran elevadas y algunas de ellas pertenecen a la clase delta (Ranson *et al.*, 1997).

Las GSTs en *Ae. aegypti* y *An. gambiae* de insectos resistentes se sobre-expresan en forma constitutiva. Las GSTs-2 de *Ae. aegypti* se sobre-expresan en todos los tejidos a excepción de los ovarios de los insectos resistentes. La secuencia de la clase II de GSTs de *An. gambiae* ha sido publicada y las principales clases de GST II en *Ae. aegypti* se ha clonado y secuenciado. En esta última especie, GST-2 es sobre-expresada en la cepa GG resistente a DDT, y se piensa que la mutación resistente ocasiona la interrupción de un represor, esta mutación evita la función normal del represor llevando a elevados niveles de la enzima GST-2 en mosquitos resistentes (Ranson *et al.*, 2002).

Las GSTs de la clase I son codificadas por una extensa familia de genes en *An. gambiae*, *M. domestica* y *D. melanogaster*. La organización genómica en estas tres especies es sorprendentemente diferente. En *D. melanogaster* ocho genes divergentes sin intrones se encuentran en un segmento de DNA de 14 kb. En *An. gambiae*, múltiples genes de la clase GST-1 se encuentran agrupados en un solo sitio genómico (cluster). La mayoría de los genes contienen uno o más intrones, uno de estos genes, *aggst-1a*, tiene un empalme alternativo produciendo cuatro transcritos distintos de mRNA.

La organización de la familia de genes GST-1 es muy similar en insectos resistentes y susceptibles en *An. gambiae*, sugiriendo que el mecanismo de resistencia basado en GSTs es probablemente causado por un regulador cis-trans (Ding *et al.*, 2003). Los productos

de estos genes difieren en su habilidad para metabolizar al DDT y algunos de estos genes son regulados para activar el metabolismo en mosquitos resistentes (Enayati *et al.*, 2005).

4.5.2. Resistencia por Sitio Blanco

4.5.2.1. Acetilcolinesterasa Insensitiva

Los organofosforados y carbamatos tienen su sitio blanco en la acetilcolinesterasa (AChE). La AChE hidroliza al neurotransmisor excitatorio acetilcolina en la membrana post-sináptica del nervio. La AChE de los insectos tiene una especificidad de sustrato intermedio entre la AChE de los vertebrados y la butiril-colinesterasa.

La forma molecular predominante en insectos es un dímero globular anfílico que se une a la membrana mediante una ancla glipofílica. Alteraciones en la AChE en insectos resistentes a organofosforados y carbamatos resulta en una reducción o inhibición en la sensibilidad de la enzima por estos insecticidas. En *Cx. pipiens*, la AChE-1 y AChE-2 difieren en su especificidad de sustrato, sensibilidad inhibitoria y el patrón de migración electroforético. Solo la AChE-1 parece conferir resistencia a insecticidas (Raymond *et al.*, 1986).

Hasta la fecha, se han identificado dos genes *Ace* con esta actividad. La única acetilcolinesterasa clonada en *C. pipiens* es la *Ace2*, la cual no está involucrada en la resistencia a insecticidas y además se encuentra ligada al sexo. Por otro lado, el gen *Ace1* es autosómico y confiere resistencia a insecticidas (Malcolm *et al.*, 1995).

Los vertebrados tienen dos tipos de colinesterasas: acetil-colinesterasa y butiril-colinesterasa. En *D. melanogaster* solo un gen *Ace* que codifica una colinesterasa ha sido clonada. Distintas substituciones de aminoácidos en los genes *Ace* de *Drosophila* y *M. domestica* podrían causar resistencia, siempre y cuando los residuos asociados a la resistencia se localicen cerca o dentro del sitio activo de la acetil-colinesterasa.

Hasta ahora, no ha sido registrada la resistencia basada en AChE en *An stephensi* y debido a que ninguno de los casos de resistencia registrada han estado ligados al sexo, se sugiere que estos genes no representan el sitio blanco del insecticida. El análisis detallado del perfil de inhibición de la acetilcolinesterasas de *Ae. aegypti* sugiere que existe un solo locus AChE en esta especie. En este caso, la resistencia basada en alteraciones de la acetil-colinesterasa podría estar ligada al sexo. Los genes AChE han sido clonados en los

mosquitos *Ae. aegypti* y *An. stephensi*, aunque ambos genes están ligados al sexo (Anthony *et al.*, 1995).

Cinco mutaciones puntuales asociadas con la resistencia a organofosforados y carbamatos han sido identificadas en el gen de la acetilcolinesterasa en *D. melanogaster* (Mutero *et al.*, 1994) y estudios dirigidos por mutagénesis del AChE ligado al sexo de *Ae. aegypti*, han demostrado que estas mutaciones también confieren resistencia en mosquitos (Vaughan *et al.*, 1997).

Las alteraciones en la AChE tienen un costo de viabilidad muy severo en las poblaciones de *Cx. pipiens* en el sur de Francia, probablemente causado por la reducción en la actividad de AChE de la enzima mutada comparada al tipo silvestre. Sin embargo, en *Drosophila* se ha propuesto que la presencia de múltiples mutaciones que confieren bajos niveles de resistencia podría ser una respuesta a la selección de mutaciones con mayor viabilidad en esta enzima (Ming *et al.*, 2004).

4.5.2.2. Receptores GABA

La resistencia a dieltrín fue registrada en 1950, sin embargo, la participación de los receptores GABA en este tipo de resistencia fue elucidada hasta 1990. El receptor GABA en los insectos es un canal de iones de cloro heteromultimérico, con función de inhibir la neurotransmisión en el sistema nervioso central del insecto y en uniones neuromusculares. El receptor GABA de los insectos está implicado como un sitio de acción para piretroides, ivermectinas y ciclodienos. Algunos estudios muestran que los insectos resistentes a ciclodienos son resistentes a los insecticidas picrotoxina y fenilpirazole y que el efecto de la ivermectina en neuronas cultivadas puede revertirse con el pretratamiento con picrotoxina, sugiriendo que estos insecticidas interactúan con el ionóforo de cloro asociado con el receptor GABA de insectos.

Los receptores GABA pertenecen a una superfamilia de receptores de neurotransmisores que incluyen a los receptores nicotínicos de la acetilcolina. Estos receptores están formados por oligomerización de cinco subunidades alrededor del canal central de iones de sodio. Cinco distintas subunidades han sido clonadas a partir de vertebrados. Hasta la fecha solo tres subunidades han sido clonadas en *D. melanogaster*,

pero estas no entran en la clasificación de subunidades GABA de los vertebrados (French-Constant *et al.*, 1993).

Se ha encontrado que una substitución de alanina a serina en el dominio que envuelve al canal del receptor GABA, confiere resistencia a ciclodienos tales como el dieldrin. La mutación fue identificada por primera vez en *Drosophila*, y desde entonces ha mostrado estar en un amplio rango de insectos resistentes a dieldrin, incluyendo *Ae. aegypti* (French-Constant *et al.*, 1994). La única variación en insectos resistentes es que el residuo substituido cambia a glicina en vez de serina. A pesar de que se ha detenido el uso de insecticidas ciclodienos para agricultura y salud pública, los alelos resistentes pueden ser encontrados en relativamente altas frecuencias en poblaciones de insectos en campo.

4.5.2.3. Canales de Sodio

El rápido efecto de derribe que caracteriza a los insecticidas DDT y piretroides, es ocasionado por la activación persistente de los canales de sodio. Esta activación se debe a la forma en que los insecticidas se unen al poro del canal, prolongando el mecanismo de inactivación dependiente de voltaje. La reducción en la sensibilidad del canal de sodio dependiente de voltaje a la unión de los insecticidas es la causa del fenotipo resistente conocido como “*kdr*” presente en varias especies de insectos.

Debido a que el canal de sodio es el sitio blanco del DDT y piretroides, muchos estudios en la década de los 80 y 90s se enfocaron en esta proteína. El canal de sodio dependiente de voltaje de los insectos, es una proteína transmembranal que contiene alrededor de 2108 aminoácidos plegados en cuatro dominios homólogos e hidrofóbicos (dominio I, II, III y IV), separados por uniones hidrofílicas. Cada dominio se compone de seis segmentos transmembranales (s1-s6).

Diversas especies de insectos resistentes al DDT y piretroides presentan alteraciones en el gen del canal de sodio. La asociación entre la resistencia *kdr* con modificaciones en el canal de sodio fue confirmada mediante estudios de unión de neurotoxinas (Bloomquist y Miller, 1986) y mediante estudios de mapeo genético. En estos últimos, se identificó una sola mutación en el dominio II segmento transmembranal 6 (DIIS6), asociada con la resistencia tipo *kdr* en *Musca domestica* (Williamson *et al.*, 1993).

La mutación *kdr* consistió en un cambio de nucleótidos de adenina a timina en el residuo *Leucina*1014, confiriendo un cambio de aminoácidos de leucina (*Leu*) a fenilalanina (*Phe*). Posteriormente, la misma mutación fue identificada en varias especies de mosquitos, tales como *An. gambiae*, *An. stephensi*, *An. sacharovi* y *Culex pipiens* (Martínez-Torres *et al.*, 1998; Enayati *et al.*, 2003; Martínez-Torres *et al.*, 1999; Luleyap *et al.*, 2002).

Otras mutaciones en el segmento DIIS6 han sido identificadas. Una nueva mutación en T→A en el residuo *Leu*1014 de *An. gambiae* y *Cx. pipiens* (Ranson *et al.*, 2000b; Luleyap *et al.*, 2002) confiere una sustitución a serina, sin embargo, estas cepas fueron mas resistentes al DDT que a los piretroides.

Por otro lado, algunos insectos dípteros (múscidos) con el fenotipo “*super kdr*”, además de contener la mutación *Leu*1014*Phe*, presentaron una segunda mutación (*Met*918*Thr*) que ocurre en el puente de unión de los segmentos transmembranales 4 y 5, del dominio II (Williamson *et al.*, 1996; Guerrero *et al.*, 1997). Se ha sugerido que la segunda mutación intensifica el fenotipo *kdr* en cepas de moscas resistentes, sin embargo, esta mutación no ha sido identificada en poblaciones de moscas de campo, ni en mosquitos vectores.

En forma interesante, las alteraciones del canal de sodio asociado con la resistencia, son mucho mas variables que las alteraciones identificadas en los receptores GABA, sin embargo, se siguen limitando a un pequeño número de regiones en la proteína. La mayoría de las alteraciones de la proteína del canal de sodio ocurren en una región que forma parte de la cobertura del canal de sodio (DIIS6). Se ha sugerido que los canales de sodio alterados permiten una rápida disociación del insecticida, confiriendo resistencia a los efectos tóxicos del insecticida (Soderlund y Knipple, 2003).

La mutación de leucina a fenilalanina en anofelinos puede detectarse mediante pruebas diagnóstico-moleculares basadas en PCR, discriminando entre individuos homocigotos susceptibles, homocigotos resistentes y heterocigotos (Martínez-Torres *et al.*, 1998; Lynd *et al.*, 2004). Debido a que la resistencia *kdr* es semi-recesiva o completamente recesiva, la capacidad de identificar organismos heterocigotos es de vital importancia para la detección temprana y manejo de resistencia en campo. Actualmente existe una tendencia a investigar la resistencia a piretroides mediante PCR en regiones

donde otras mutaciones *kdr* han sido encontradas, sin embargo, cambios en otras regiones podrían estar asociados a la resistencia.

4.5.2.4. Resistencia *kdr* en el Mosquito *Ae. aegypti*

La resistencia tipo *kdr* (por sus siglas en inglés: knockdown resistance) es un mecanismo de resistencia seleccionado por insecticidas piretroides y DDT. Actualmente su principal forma de detección es mediante bioensayos, donde los insectos son expuestos a DDT o piretroides en conjunto con inhibidores de enzimas, tales como PBO y DEF, para descartar resistencia por mecanismos enzimáticos.

El primer reporte de resistencia tipo *kdr* en *Ae. aegypti*, ocurrió en Tailandia (1975) después de la falla en una campaña de control utilizando bioresmetrina. Los estudios genéticos de una cepa seleccionada de esta población, demostró la presencia de un solo factor de resistencia a piretroides (Rpy) presente en el cromosoma III. Este factor fue incompletamente dominante en herencia (Soderlund y Bloomquist, 1990).

Este mecanismo de resistencia ha sido reportado en diversas poblaciones del mosquito transmisor del dengue *Ae. aegypti* hacia una variedad de insecticidas piretroides. Un estudio reciente, identificó siete mutaciones en el dominio II, segmento transmembranal S6 del canal de sodio en cepas de *Ae. aegypti* resistentes a permetrina. Ninguna de estas mutaciones ocurre en el residuo leucina 1014 presente en otros dípteros, sin embargo, algunos polimorfismos han sido encontrados en cercana proximidad a esta región.

Una de las mutaciones ocurre en la primera posición del codón isoleucina en el residuo 1,011 (*Iso1,011*), donde un cambio de adenina a guanina (A→G) ocasiona una substitución del aminoácido de isoleucina por metionina (*Met*), esta mutación fue encontrada en cepas resistentes a piretroides de Sud-América (Bregues *et al.*, 2003).

Una segunda mutación asociada a la resistencia *kdr* en el mosquito *Ae. aegypti* fue identificada en cepas resistentes a piretroides y DDT provenientes de Tailandia. Esta mutación ocurre en el codón 1,016 (*Val1,016*), donde una substitución de nucleótidos de timina a guanina (T→G) en la segunda posición del codón, ocasiona la substitución del aminoácido valina (silvestre) a glicina (resistentes). (Bregues *et al.*, 2003; Prapanthadara *et al.*, 2002).

4.6. Genética de la Resistencia

La resistencia a insecticidas es un fenómeno evolutivo que solo puede entenderse con la información genética. Los estudios genéticos son la principal herramienta en el desarrollo de mejores métodos de detección, en la investigación de los mecanismos de resistencia, así como en la elección de mejores estrategias para el manejo de la resistencia (Roush y Daly, 1990).

El estudio de la adaptación sigue siendo uno de los principales enfoques de la entomología. La genética de la adaptación se fundamenta en la sustitución de genes dentro de las poblaciones en el tiempo: los alelos favorecidos por selección natural reemplazan a otros alelos y al mismo tiempo cambian los rasgos dentro de una población.

En forma histórica, la genética de la adaptación ha sido estudiada en tres formas 1) por análisis cuantitativo de variación fenotípica, 2) por genética de poblaciones basada en marcadores, y 3) por análisis de polimorfismos de genes simples.

Las diferencias entre estos estudios ha desaparecido rápidamente con el advenimiento de los “proyectos genómicos” que mapean y secuencian los genomas completos (*Drosophila melanogaster*, *An. gambiae* y *Ae. aegypti*). Otro aspecto importante ha sido el desarrollo de procedimientos estadísticos (bioinformática) para la examinación de las bases de datos y por último, la creación de mapas genéticos capaces de identificar loci que afectan la variación fenotípica (quantitative trait loci: QTL)(Black *et al.*, 2001).

Para conocer las bases genéticas de los distintos mecanismos de resistencia a insecticidas, es necesario conocer la variación (polimorfismos) que ocurre en los genes que podrían estar implicados en la resistencia. Posteriormente, debe conocerse si esta variación genética produce proteínas con un mayor grado de detoxificación de insecticidas.

El desarrollo de pruebas diagnósticas que detecten estos alelos, permitirá iniciar estudios sobre la frecuencia, estabilidad y evolución de alelos resistentes en poblaciones de campo, abriendo el paso al desarrollo de estrategias de uso de insecticidas que disminuyan la selección de poblaciones resistentes.

La reciente liberación de proyectos genómicos de mosquitos ha facilitado enormemente el estudio de la genética de la resistencia y en la próxima década podrán

identificarse alelos (forma alternativa de un gen) que se asocian con la resistencia a los principales grupos de insecticidas utilizados actualmente.

4.6.1. Mapas Genéticos

Un mapa genético es una representación gráfica que indica la frecuencia con la que los marcadores a lo largo de un cromosoma recombinan durante la meiosis. Por otro lado, un locus en un mapa físico se define como la posición en el arreglo lineal de nucleótidos a lo largo de un cromosoma, teniendo una posición mas precisa en el mapa físico.

Los mapas genéticos de una gran variedad de especies vectoras ya están disponibles, en gran parte gracias a la reciente revolución de la genética molecular que incrementó dramáticamente los números y tipos de marcadores genéticos que pueden ser analizados en los genomas de los vectores. Esto trajo la evolución de los mapas genéticos intensivos o saturados.

Los mapas genéticos utilizan marcadores genéticos basados en varias tecnologías. El primer mapa genético construido para *Ae. aegypti* se basó en polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLPs) (Severson *et al.*, 1993), la limitación de este tipo de mapas se debía a la cantidad de ADN disponible que solo permitía el análisis de un máximo de 25 a 30 marcadores por cada individuo. Esta limitación desapareció en 1985, cuando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permitió amplificar rápidamente la secuencia de un gen a partir de una mínima cantidad de ADN. Esta técnica revolucionó la forma en que todas las determinaciones genético-moleculares habían sido realizadas.

El PCR amplifica directamente la secuencia de ADN en unas pocas horas usando cebadores de oligonucleótidos que se alinean a regiones conservadas y flanquean a una secuencia de un gen de interés. El producto de ADN amplificado por PCR puede ser analizado a nivel de variación nucleotídica usando métodos como: polimorfismos de ADN amplificado al azar (RAPDs), polimorfismos de fragmentos de longitud amplificados (AFLPs), microsátélites, polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP) y polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs), entre otros. La técnica de PCR permite al investigador realizar cientos de determinaciones en un simple organismo.

Los mapas genéticos se basan en el registro de los eventos de recombinación en una familia de cruce. Para esto, es necesario tener una serie de marcadores genéticos que permitan discernir entre gametos (ó individuos) con genotipos parental o recombinante. La segregación de los alelos en una familia es comparada entre marcadores, esperando que ocurran más eventos de recombinación entre dos marcadores que se encuentran más lejanos.

Las unidades de un mapa genético son denominadas centimorgans (cM). Un cM es una unidad de frecuencia de recombinación entre alelos en un par de loci, en un simple evento de meiosis, un cM equivale a un solo evento de recombinación en cada 100 meiosis. Los mapas genéticos han sido frecuentemente generados usando diseños de intercruce F1 o retrocruces recurrentes. Se ha estimado que el límite máximo de distancia de recombinación entre dos loci es de 50 cM, esto se basa en que no pueden existir más gametos con genotipos recombinantes que gametos con el genotipo parental. Sin embargo, es frecuente que los mapas genéticos tengan más de 50 cM, esto se debe principalmente al tamaño físico de un cromosoma individual.

Recientemente se han desarrollado algoritmos estadísticos para analizar simultáneamente las frecuencias de recombinación entre muchos loci. Estos algoritmos realizan comparaciones entre muchos puntos de unión, usando todas las posibles frecuencias entre dos puntos para identificar el orden más probable de cada grupo genético.

Los algoritmos requieren de la información precisa sobre la segregación de alelos ya sea en un intercruce F1, en una línea endogámica-recombinante (RIL), o bien en una retrocruce con un padre recurrente. Un requisito es determinar el genotipo correcto para cada uno de los padres-P1 (generación parental) y padres-F1 (generación filial 1). Afortunadamente, cuando se utilizan marcadores basados en ADN, solo 4 distintos alelos pueden estar segregando en cada locus en una cruce dada.

Los loci donde los padres P1 no comparten ningún alelo en común, son considerados completamente informativos, debido a que puede trazarse el linaje correcto en la progenie. Por otro lado, en algunos loci, los padres P1 pueden compartir un alelo común, dichos loci se consideran parcialmente informativos. Por último, cuando ambos padres comparten dos alelos en un locus (heterocigotos), se considera que este marcador no es

informativo. Las frecuencias de recombinación pueden ser calculadas usando loci de marcadores informativos y también de marcadores parcialmente informativos, aunque estos últimos tienen errores estándar más grandes (Black y Severson, 2005).

Una vez que los genotipos son determinados para cada marcador, estos se colocan en una matriz de datos de cada locus en cada uno de los individuos de la progenie F2 o progenie de la retrocruza. Existen dos paquetes de software comúnmente utilizados en el cálculo de distancias de recombinación tales como MAPMAKER (Lander *et al.*, 1987) y JoinMap (Stam y Ooijen, 1995).

Estos programas determinan para cada par de loci: 1) cuáles son los genotipos informativos, 2) estiman las distancias entre pares (pairwise distances) a partir de un genotipo informativo y, 3) estiman los valores de LOD (log odds ratio) para cada una de las estimaciones. El valor LOD es la probabilidad de que la estimación de unión genética pueda ser causada solo por azar. La ecuación es $LOD = -1 \times \log_{10}$ (probabilidad de que un evento ocurra solo por azar). Los marcadores cercanamente ligados generalmente tienen altos valores LOD y una vez que la proporción de recombinación se acerca al 50%, los valores LOD declinan.

Una vez que se consigue un mapa genético, es posible identificar los loci que condicionan al rasgo de interés. El mapeo intensivo de unión y los análisis QTL son tan cercanos que los investigadores usualmente determinan ambos simultáneamente, ya que la misma matriz de datos puede ser utilizada para alcanzar ambas metas.

4.6.2. Mapeo de QTLs

QTL (por sus siglas en inglés: **quantitative trait loci**) se define como un loci (plural de *locus*) en el genoma que controla un rasgo fenotípico. Un locus, se entiende como una posición en un cromosoma y un rasgo puede entenderse como una característica fenotípica que es heredada. La localización de un QTL consiste en estudiar la segregación del fenotipo y genotipo a partir de una familia de mapeo.

Existen dos tipos de rasgos fenotípicos, los mendelianos y los cuantitativos. Los rasgos mendelianos usualmente consisten en alelos altamente perjudiciales que ocasionan errores en el metabolismo y desórdenes causados por genes únicos, estos son raros en la población en general. Por otro lado, los rasgos cuantitativos son el resultado de múltiples

factores genéticos y del ambiente, que afectan a gran parte de la población. La localización de un loci que controla un rasgo fenotípico requiere de un mapa genético y/o un mapa físico.

La variación de los rasgos cuantitativos es el material puro sobre el cual actúan las fuerzas evolutivas para producir diversidad fenotípica y adaptación. La variación fenotípica de los rasgos cuantitativos resulta de la segregación simultánea de alelos en múltiples loci de rasgos cuantitativos. El entendimiento de la arquitectura genética de los rasgos cuantitativos comienza con el mapeo de loci de rasgos cuantitativos (QTL), obteniendo regiones genómicas amplias, y finaliza con la definición molecular de alelos de loci de rasgos cuantitativos (QTN) (Mackay T.F.C., 2001.)

Para lograr el completo entendimiento de la arquitectura genética de un rasgo cuantitativo se requiere de respuestas a las siguientes preguntas: ¿En qué loci ocurren las variaciones de mutación que afectan al rasgo cuantitativo?, ¿Cuáles son los grados de mutación espontánea en estos loci?, ¿Cuáles loci afectan la variación en poblaciones naturales de una misma especie y entre especies?, ¿Cuáles son los efectos alélicos en los heterocigotos y homocigotos en estos loci?, ¿Los efectos de los loci individuales en el fenotipo final son independientes (aditivos), o el efecto de loci múltiples es no lineal (epistásis)?, ¿Cuál es el efecto de los alelos del QTL en otros rasgos cuantitativos, incluyendo la viabilidad reproductiva?, ¿Que define a un alelo QTL a nivel molecular?, ¿Cuál es la frecuencia de alelos QTL dentro y entre poblaciones?, entre otras.

El principio del mapeo de QTL requiere de: 1) dos cepas endogámicas en las cuales se hayan fijado alelos en loci que afectan la variación del rasgo de interés y 2) un mapa genético basado en marcadores moleculares polimórficos. Posteriormente, se desarrolla una población de mapeo en la cual se determina el fenotipo y el genotipo de muchos locus de cada individuo. Las poblaciones de mapeo pueden obtenerse por retrocruza, F2, líneas recombinantes endogámicas u otras generaciones segregantes derivadas de las cepas parentales (Mackay T.F.C., 2001).

En su forma más simple, el mapeo de QTL implica recorrer el genoma, un marcador a la vez, clasificando a los individuos en clases de genotipos por cada marcador y realizando pruebas estadísticas para determinar la presencia de diferencia significativa del

fenotipo entre las clases de genotipo de un marcador. Si esta diferencia es encontrada, entonces se considera que el QTL esta ligado al marcador.

Un análisis de contingencia de chi cuadrada o un procedimiento de ANOVA pueden repetirse exhaustivamente entre cada uno de los loci del estudio, sin embargo, este intento trata a cada locus como un factor independiente. En la realidad, se sabe que los alelos en un loci no segregan independientemente. Cada marcador del loci estará estadísticamente asociado con el fenotipo, siempre y cuando estos se encuentren en cercana proximidad con el QTL. Más aún, la posición más probable del QTL no puede ser inferida utilizando esta aproximación. Esto ha intensificado el desarrollo de métodos mas severos y exactos para probar la presencia de un QTL y mas importante, de estimar la posición genética del QTL. Este procedimiento tal cuál, subestima el efecto del QTL por una cantidad proporcional a la distancia entre el QTL y el marcador, pero este problema se ha superado mediante el mapeo de QTL relativo a los dos marcadores que lo flanquean (mapeo por intervalos) (Black y Severson, 1995).

El mapeo por intervalos es un método que utiliza pares de marcadores adyacentes para probar asociaciones estadísticas de un intervalo con el fenotipo. El mapeo de QTL utiliza valores LOD, para probar la probabilidad de que una asociación en particular proviene de un acontecimiento al azar. En este caso, $LOD = \log_{10}(\text{probabilidad de hipótesis alterna} / \text{probabilidad de hipótesis nula})$. La hipótesis nula (H_0) es que no existe asociación entre fenotipo y genotipo; la hipótesis alterna es que existe una asociación entre el fenotipo de un individuo con el genotipo. Si la probabilidad de H_a excede la probabilidad de H_0 entonces, el valor del LOD sera mayor a 0. Por ejemplo, si la probabilidad de H_a equivale a 1000 veces la probabilidad de H_0 , entonces el valor LOD es 3.0. En un mapeo por intervalos, el valor LOD para cada intervalo se grafica en el eje-y, mientras que el mapa genético se coloca en el eje-x. El mapeo de intervalos agrega los valores LOD a lo largo de cromosoma y después estima la posición más probable del QTL.

Una pregunta común concierne a la magnitud en la cual los valores LOD deben ser considerados válidos. Comúnmente, se utilizan pruebas de permutación para asegurar la consistencia con la cual el set de datos soporta a los valores LOD para cada intervalo. Un método propuesto consiste en que después de calcular los valores LOD del set original de datos, los fenotipos de los individuos son permutados al azar en los genotipos

individuales. Después, los valores LOD son estimados y almacenados para el set de datos permutados. Este procedimiento de permutación se repite 1000 veces (Churchill, 1994). El software reporta para cada intervalo los valores LOD más grandes (en las posiciones 900, 950 y 999). También reporta los umbrales más grandes del experimento. La comparación en la cual el 95% de los umbrales de intervalo y experimento coinciden es utilizada. El umbral comparativo tiende a sobrestimar el número de QTLs. En forma contraria, el umbral del experimento tiende a ser conservativo y por supuesto subestima el número de QTLs.

Dependiendo de la magnitud del efecto y en las relaciones de ligamiento, los LOD de diferentes mapas de intervalo pueden variar de uno a otro y esto puede afectar las estimaciones LOD en intervalos individuales. El mapeo por intervalos compuestos (Zeng, 1994) ajusta los valores LOD a intervalos individuales usando un número variable de marcadores para controlar los efectos de otros intervalos en el mapa, además utiliza una ventana variable para ajustar los efectos de intervalos en proximidad con el intervalo que esta siendo analizado. Las pruebas de permutación pueden ser aplicadas al mapeo compuesto de intervalos. Como siempre el factor crítico en que determina la precisión de un QTL reside en el tamaño de la muestra.

4.6.3. Estudios de Mapeo de QTL en Mosquitos Vectores

La técnicas de mapeo de QTL han sido utilizadas para examinar varios fenotipos complejos de los mosquitos *An. gambiae*, *Ae. aegypti* y *An. funestus*. Aunque esta técnica puede ser aplicada para estudiar cualquier fenotipo, la mayoría de los estudios se han dirigido a aspectos de la competencia para transmitir patógenos y para determinar loci que controlan la resistencia a insecticidas.

En *An. gambiae*, los primeros estudios de mapeo de QTL se enfocaron en el fenotipo de resistencia por encapsulación melanótica. Tres QTL con efectos aditivos han sido identificados y controlan el 70% de la variación fenotípica en la encapsulación de ooquistos de *Plasmodium cynomolgi* (Zheng *et al.*, 1997).

En *An. gambiae* se han identificado dos QTL (rtd1 y rtd2) que controlan mas del 50 % de la variación en la susceptibilidad al DDT (Ranson *et al.*, 2000a). En el mismo mosquito fueron identificados tres QTLs controlando la resistencia a la permetrina, el de

mayor importancia se co-localiza con el gen del canal de sodio en el cromosoma II (Ranson *et al.*, 2004). En el mosquito *An. funestus* un estudio de QTL identificó a un solo QTL, *rp1* determinando el 60% de la variación en la susceptibilidad a la permetrina. Este loci está genéticamente ligado a un cluster de genes CYP6 de citocromo-P450 (Wondji *et al.*, 2007).

En el mosquito *Ae. aegypti*, han sido mapeados loci que afectan la infección del virus del dengue-2 en el intestino del mosquito, en uno de los estudios, el mapeo de la familia de intercrusa F1 detectó un loci en el cromosoma II y un segundo loci en el cromosoma III, ambos loci ocasionan el 30% de la variación fenotípica (Bosio *et al.*, 2000). En el mismo mosquito se mapearon las regiones que controlan la infección del virus del dengue en el intestino, utilizando una familia de una línea de intercrusa avanzada F5, (AIL) previamente establecida; fueron detectados un nuevo loci ligado al sexo y un segundo QTL en el cromosoma II con genotipos sujetos a selección por balance. Los alelos en estos QTL contribuyeron aditivamente para determinar la susceptibilidad a la infección con el virus (Gomez-Machorro *et al.*, 2004).

Bennett *et al.*, (2005) mapearon los QTLs que afectan la habilidad de diseminar la infección del virus del dengue-2 a otros tejidos del mosquito. El mapeo se realizó en una familia de intercrusa F2 y posteriormente en la generación avanzada F5. Se encontraron tres QTL distribuidos en los tres cromosomas, con efectos aditivos o dominantes en determinar la diseminación del virus y contribuyeron al 45% de la variación fenotípica. Las posiciones de los QTL que controlan la infección y diseminación del virus del dengue-2 corresponden a los mismos loci de los estudios antes descritos.

METODOLOGIA

5.1. Mutaciones en el gen *para* asociadas con la resistencia tipo *kdr*

El primer objetivo (sección 5.1.1) consistió en identificar polimorfismos en la región DIIS6 del canal de sodio dependiente de voltaje (gen *para*). Este objetivo tuvo un diseño experimental observacional, no fueron usados tratamientos ni controles. Utilizamos un solo grupo de ~250 individuos (cuatro poblaciones de campo de *Ae. aegypti* de México y una cepa seleccionada para resistencia a la permetrina) y una sola observación categórica (clase de haplotipos SSCP).

La región DIIS6 del canal de sodio fue amplificada mediante PCR y después fue analizada por polimorfismos mediante la técnica SSCP. El ADN de los mosquitos con diferentes haplotipos SSCP fue secuenciado y analizado con la finalidad de identificar los polimorfismos presentes en ésta región. Dos nuevas mutaciones fueron identificadas, una en el codón 1,011 y la segunda en el codón 1,016.

El segundo objetivo (sección 5.1.2.) consistió en determinar la frecuencia alélica de las cuatro mutaciones “*kdr*” (*Met1,011*, *Val1,011*, *Gly1,016* e *Iso1,016*) del gen *para* en 32 distintas colecciones del mosquito *Ae. aegypti* de América. Para éste diseño experimental no fueron utilizados tratamientos ni controles. Utilizamos 32 grupos (32 colecciones de mosquitos), en las cuales se realizaron cuatro mediciones categóricas (genotipo de las cuatro mutaciones-*kdr*). El ADN de 30-50 mosquitos de cada colección de mosquitos fue extraído y la frecuencia alélica de las cuatro mutaciones fue identificada para cada población mediante PCR específico para alelos. La frecuencia alélica fue analizada junto con le evolución y filogenia de dichas mutaciones.

5.1.1. Colecciones de mosquitos y mantenimiento en laboratorio

Los mosquitos fueron colectados en seis poblaciones de México: Loreto, Baja California Sur (26.000309° Latitud Nte y -111.339285° Longitud Oeste); Cd. Constitución, Baja California Sur (25.022414° Latitud Nte y -111.662518° Longitud Oeste); Tecate, Baja California Sur (32.569099° Latitud Nte y -116.631401° Longitud Oeste); Islas Mujeres, Quintana Roo; Coatzacoalcos (18.128856° Latitud Nte, -94.451492°), Veracruz; y Mazatlán (23.251603° Latitud Nte, -106.428641° Longitud Oeste), Sinaloa. La cepa susceptible de referencia New Orleans fue donada por el Dr. William Brogdon (CDC, Atlanta) y ha sido mantenida en laboratorio por múltiples generaciones sin ser sometida a ningún pesticida.

Las larvas fueron colectadas en campo y transportadas al laboratorio de Entomología Médica en la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL en los años 2003 y 2004. Las larvas fueron alimentadas con comida para pez (Aquacrece®) y una vez que llegaron al estado de pupa, fueron colocados dentro de jaulas donde los adultos fueron suplementados con una solución de sacarosa al 10%. Las hembras fueron alimentadas con sangre de ratón para permitir la producción de huevecillos. El sustrato de oviposición consistió en tiras de papel filtro colocado en contenedores de plástico.

Dependiendo de la cantidad de huevecillos F1 obtenidos, se repitió la misma metodología para obtener una segunda o tercera generación de huevecillos. Las papeletas con huevecillos de las generaciones F2 y F3 fueron transportadas al Laboratorio de Microbiología, en la Universidad del Estado de Colorado, E.U.A. Alrededor de 80 mosquitos de cada colección de mosquitos fueron congelados a -80 °C para la posterior extracción de ADN.

5.1.2. Bioensayos y estimación de LC50

Los bioensayos se basaron en una combinación de las metodologías descritas por CDC (Brogdon y McCallister, 1998b) y WHO (WHO, 1981). Los mosquitos fueron expuestos a distintas concentraciones de permetrina, durante un tiempo de 1 hora. La mortalidad a las 24 horas fue utilizada para determinar la concentración LC50 para este insecticida. El diseño experimental consistió en cinco concentraciones de permetrina (tratamientos) y un control negativo.

Las botellas wheaton de 250 ml fueron impregnadas con distintas concentraciones de permetrina, usando acetona como solvente. Una solución stock de permetrina (stock #1) fue preparada añadiendo 1 ml de acetona a 100 mg de permetrina (grado técnico) obteniendo una concentración final de 100 microgramos (μg) de permetrina por microlitro (μl) de solución.

Una segunda solución stock (#2) fue preparada disolviendo 1 μl del stock #1 en 1 ml de acetona, obteniendo una concentración final de 100 nanogramos (ng) por microlitro. Distintas cantidades de este stock, 5, 10, 25, 50 y 100 μl , respectivamente, fueron diluidas en 1 ml de acetona para obtener concentraciones finales de permetrina de 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 y 10 μg por botella respectivamente. Las botellas wheaton de 250 ml, fueron impregnadas con estas soluciones, asegurando que la acetona se haya evaporado completamente. Las botellas se utilizaron después dos horas de la impregnación para asegurar la evaporación completa de la acetona.

Alrededor de 40 mosquitos adultos entre 3 a 4 días de edad fueron aspirados y colocados dentro de las botellas durante un periodo de 1 hora. Transcurrida la hora de exposición, los mosquitos fueron transferidos a cajas de cartón por un tiempo de 24 horas. Las cajas de cartón fueron colocadas en una incubadora con 80% de humedad relativa, una temperatura constante de 28°C y un fotoperiodo de 14 horas luz.

El derribe fue definido como el número de mosquitos derribados transcurrida la hora de exposición, mientras que la mortalidad fue registrada a las 24 horas post-exposición. Los experimentos se replicaron por triplicado. El criterio para determinar el estado de derribe se basó en: 1) el mosquito se encuentra con el dorso en el fondo de la botella (o con las patas hacia arriba), 2) es incapaz de volar, 3) tiene movimientos aberrantes y es incapaz de mantenerse en posición erguida. Un mosquito muerto fue aquel que no presentó movimiento después de un tiempo de 24 horas.

El número de mosquitos vivos, derribados, recuperados y muertos fue registrado en una página de Excell. El número de mosquitos muertos a las 24 horas, fue graficado colocando la concentración de permetrina en el eje de las X y la mortalidad en el eje de las Y . La concentración letal 50 (LC50) fue determinada para cada colonia de mosquitos. Las colecciones cuyas LC50 sobrepasaron a la cepa susceptible New Orleans fueron posteriormente seleccionadas con permetrina por varias generaciones.

5.1.3 Selección de cepa resistente a permetrina

Las cepas resistentes tienen como función ser referencia y hacer comparaciones con otras cepas o poblaciones de campo. Las colecciones de Mazatlán (generación F4) y Cd. Constitución (F4) fueron seleccionadas con 0.5 µg de permetrina (~LC50). La colección de Islas Mujeres (F2), fue seleccionada con 5 µg de permetrina (~LC70). Cada cepa de mosquitos fue seleccionada por tres generaciones.

La selección consistió en exponer ~100 mosquitos adultos a botellas impregnadas con la respectiva cantidad de permetrina durante una hora. El derribe fue registrado y la totalidad de los mosquitos fue colocada en cajas de cartón en una incubadora a las condiciones descritas anteriormente. Los mosquitos sobrevivientes y recuperados a las 24 horas post-exposición, fueron colocados en una jaula para permitir la cópula en masa. Las hembras fueron alimentadas con sangre de ratón para la obtención de huevecillos de la siguiente generación.

La progenie de la primera generación seleccionada, fue eclosionada y criada hasta obtener adultos. Los adultos fueron sometidos a las mismas concentraciones de permetrina y los sobrevivientes fueron colectados y colocados en jaulas para obtener huevecillos de la siguiente generación. Esta metodología se repitió una vez más.

5.1.4. Técnicas para detección de polimorfismos SSCP

5.1.4.1. Diseño de iniciadores *kdr*

Este paso consistió en desarrollar iniciadores capaces de amplificar al dominio II segmento transmembranal 6, del gen del canal de sodio dependiente de voltaje (*VGSC* en *M. domestica* o gen “*para*” en *D. melanogaster*) del mosquito *Aedes aegypti* (número de acceso AY663385). Los cebadores fueron diseñados con el programa Primer Premier 5 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA) a partir de una librería de ADN de *Aedes aegypti* procedente de la Universidad del Estado de Colorado en E.U.A..

La secuencia de ADN complementario, de la región DIIS6 de *Ae. aegypti* fue colocada en el programa Primer Premier 5. El programa se estandarizó para obtener productos de PCR de 250 a 300 pares de bases (pb) y los pares de iniciadores obtenidos fueron analizados para harpirinas, dímeros y regiones de alineación falsas. El par de iniciadores

denominado kdrD2T6 (5'-ATGTGGGATTGTATGCTTG-3' y 5'-TCTTGTTTCGTTTCGTTGTC-3') fue enviado a sintetizar en la compañía OPERON (Operon Inc., Huntsville, AL).

Los iniciadores kdrD2T6 fueron optimizados usando un pool de ADN de *Ae. aegypti* de Puerto Rico. La optimización de los iniciadores consistió en someter la reacción de PCR (ver en sección 5.1.2.3.) a distintas temperaturas de alineación, desde 45°C a 65°C. Los productos de PCR fueron fraccionados en geles de agarosa al 1.2% y la presencia de bandas amplificadas se revisó en un transiluminador de UV, la presencia de una sola banda de peso molecular esperado y suficiente intensidad, fue elegida como la temperatura ideal para amplificación.

5.1.4.2. Extracción de ADN

El ADN genómico fue extraído de cada mosquito individualmente en base a la técnica de sales (Black y Munstermann, 1996). Los mosquitos fueron macerados individualmente en 50 µl de buffer de homogenización (0.1M NaCl, 0.2M sacarosa, 0.1 Tris-HCL pH 9.1, 0.05M EDTA y 0.5% dodecilsulfato de sodio) utilizando pisitilos Kontes y tubos eppendorf de 1.7 ml. Este homogenado fue incubado a 65°C por 30 minutos. Después de éste periodo, fueron agregados 7 µl de acetato de potasio (8M). Los tubos fueron colocados en hielo por al menos 30 minutos para precipitar el SDS (dodecilsulfato de sodio). Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 14,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos. El sobrenadante fue transferido a nuevos tubos estériles de 1.7 ml. Los ácidos nucleicos fueron precipitados al agregar 100 µl de etanol al 100% a cada tubo e incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos. Este ADN fue centrifugado a 14,000 rpm durante 15 minutos, el etanol fue removido cuidadosamente. Después, 100 µl de etanol al 70% fueron agregados al pellet formado, centrifugado 5 minutos a 14,000 rpm para remover el exceso de sales; el sobrenadante fue desechado cuidadosamente para no perder el pellet formado. Por último, se utilizó un segundo lavado con 100 µl de etanol al 100 %, logrando deshidratar al pellet. El pellet de ADN se secó usando un Speed-Vac y después fue resuspendido en 150 a 200 µl de buffer TE (0.05M Tris-HCl, 0.05 EDTA, pH 8.0). Una alícuota de 100 µl de ADN fue colocada en viales con tapa de rosca y fue almacenada a -80°C. El ADN restante fue colocado en el refrigerador a 4°C para uso diario en las reacciones de cadena de la polimerasa (PCR).

5.1.4.3. Amplificación por PCR.

Esta fue efectuada según Black y DuTeau (1997). Las reacciones de PCR se realizaron en microplacas de policarbonato de 96 pocillos (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Para asegurar la homogeneidad de las condiciones de PCR, se preparó un solo mix de reacción de PCR suficiente para amplificar 100 reacciones de 50 μ l (volumen final). Esta reacción consistió en 4350 μ l de agua bidestilada (ddH₂O), 500 μ l de buffer para Taq 10X [500mM KCl, 100mM TrisHCl (pH 9.0), 15 mM MgCl₂, 0.1% gelatina (w/v) y 1.0 % Triton-X-100], 50 μ l de dNTP (20 mM Biorad), 5000 picomoles de cada iniciador y 40 μ l de Taq-polimerasa termoestable (producida por el Laboratorio del Dr. William Black IV). Alrededor de 49 μ l de la mezcla de la reacción fue distribuida en cada pocillo de la microplaca. La placa fue colocada en hielo y 1 μ l de ADN de cada mosquito fue colocado en su respectivo pocillo. Dos gotas de aceite mineral fueron agregadas en cada pocillo y la placa fue sellada con papel plástico adhesivo para evitar la evaporación y contaminación de la reacción. En cada placa se utilizó un control negativo, el cual consistió de la misma mezcla de reacción sin agregar ADN.

Cada placa fue colocada en un termociclador de 96 pocillos (BioRad). La reacción fue sometida a un periodo de 5 minutos de desnaturalización inicial a 95°C y después a 30 ciclos de: 1) un minuto a 95°C para desnaturalización; 2) un minuto a la temperatura de alineación del respectivo par de iniciadores; 3) dos minutos a 72°C para extensión. Después de estos ciclos, hubo un periodo de extensión final a 72°C por diez minutos. La placa fue después enfriada a 4°C y almacenada en refrigerador a 4°C.

Varios productos de PCR, el marcador de una kilobase (TrackIt, Invitrogen, Carlsbad, CA) y el control negativo se revisaron en geles de agarosa al 1.2% (w/v) disuelto en buffer TBE. Para cargar las muestras en el gel, se mezclaron 4 μ l del producto de PCR con 4 μ l buffer de carga (LB conteniendo el marcador Sybergreen) y después se colocaron en los pocillos del gel. La electroforésis se realizó por 20 minutos a 112 voltios. Los productos de PCR se visualizaron sobre un transiluminador de luz ultravioleta.

5.1.4.4. Clonación de productos de PCR amplificados con el iniciador kdrD2T6

Para asegurar que las bandas amplificadas con el par de iniciadores kdrD2T6 corresponden al dominio-II segmento-6, del gen *para*, los productos de PCR amplificado, fueron extraídos y purificados del gel de agarosa utilizando el kit de Quiagen para extracción de geles de agarosa (QIAquick gel extraction kit). Los productos de PCR purificados fueron ligados en el vector topo 2.1 (TOPO TA cloning kits). Posteriormente el vector fue cultivado en cepas de *E. coli* competente. Las colonias transformadas con el inserto fueron seleccionadas con ampicilina. Se tomó una muestra de 10 colonias blancas de cada una de las colonias transformadas (clonas).

Se realizó una reacción de PCR utilizando los iniciadores kdrR2T6, a partir de las clonas. Los productos fueron fraccionados en un gel de agarosa al 1.2%. Cuando se obtuvieron fragmentos de peso esperado, las clonas fueron purificadas (QIAprep Spin Miniprep kit) y fueron enviadas a secuenciar (Davis, California) utilizando los iniciadores M13 y T7. Las secuencias fueron editadas y analizadas con el programa SeqMan y Clustalw, respectivamente.

5.1.4.5. Análisis SSCP

Las diferencias genotípicas entre los mosquitos de cada colección fueron identificadas mediante el análisis de polimorfismos conformacionales de cadenas sencillas (SSCP) (Black y DuTeau, 1997). Los fragmentos analizados corresponden al DIIS6 del gen *para*, y estas regiones fueron amplificadas con los iniciadores kdr2 y kdr4.

En resumen, los productos de PCR (100-350 pb) fueron desnaturalizados con calor e inmediatamente fueron colocados en hielo, permitiendo la formación de estructuras de conformación secundaria. Estos productos con conformación secundaria, fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida. La base de la técnica consiste en que los polimorfismos presentes en el ADN de los fragmentos de PCR, ocasionan la formación de distintas estructuras secundarias de las cadenas simples. Las cadenas con distinta conformación secundaria corren a distinta velocidad en el gel. Los geles son teñidos con nitrato de plata y las bandas son reveladas con carbonato de sodio. La presencia de diferentes patrones de bandas (haplotipos) sugiere la presencia de polimorfismos en la cadena de ADN. Por último, los productos de PCR de los individuos

con distintos haplotipos son enviados a secuenciar para corroborar la presencia de polimorfismos a nivel de nucleótido.

Para formar el gel de poliacrilamida se utilizaron vidrios de 40x50 cm de superficie (sistema Sequigen Bio-Rad, Biorad Laboratories, Hercules, CA). El primer proceso consistió en preparar una de las superficies del vidrio y la superficie plana de la unidad de electroforesis. La superficie del vidrio se limpió con ddH₂O usando una servilleta (kimpwipe). Después de un plazo de dos minutos, la superficie se lavó con alcohol al 95% utilizando un servilleta y se dejó evaporar por dos minutos. Posteriormente, se distribuyeron 5 µl de silano de adherencia (g-metacrioloxo-propil- timethoxusilano, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) previamente disueltos en 1 mL de etanol (95 % conteniendo 0.5 % ácido acético glacial). Después de evaporar por 5 minutos, se realizaron tres lavados con alcohol al 95 %, este paso permitió distribuir homogéneamente al xilano, además de remover su exceso en los vidrios. Después de cada lavado, se dejó un tiempo de evaporación de dos minutos.

Por otro lado, la superficie plana de la unidad de electroforesis IPC (40x50 cm) fue lavada con ddH₂O, se dejó secar por dos minutos y después se aplicó un lavado con etanol al 95%, usando servilletas. Después de dos minutos, esta superficie fue tratada con 2 mL del repelente de agua RainEx usando una servilleta pequeña. Esta superficie se dejó reposar por cinco minutos para permitir la evaporación completa.

Para ensamblar la unidad de electroforesis (IPC) y el vidrio, las superficies tratadas con silano y RainEX fueron colocadas una frente a la otra, utilizando una tira separadora de 0,4 mm de grosor. Las placas fueron prensadas por los lados y selladas en la parte inferior. Posteriormente, la unidad IPC se colocó en forma horizontal. Alrededor de 100 mL de poliacrilamida (5.0 %) previamente mezclada con 100 µl de TEMED y 100µl de APS (250 mg de peroxidisulfato de amonio en 1 mL de ddH₂O) fueron colocados dentro de una jeringa de 300 mL. Esta mezcla fue inyectada cuidadosamente para llenar el espacio (0.4 mm de grosor) entre el vidrio y la superficie plana de la IPC, evitando la formación de burbujas de aire. Una tira de plástico de 2 cm de alto se colocó en la parte superior del gel con la finalidad de formar un espacio para cargar las muestras. Una hora después, la unidad IPC se colocó en forma vertical en el contenedor de la IPC y se agregaron cerca de 2000 ml de buffer TBE 1X a la unidad IPC.

Entre 2 a 4 μ l del producto de PCR fueron mezclados con 4 μ l de buffer desnaturalizante de carga (DLM: 10 mM NaOH, 95% formamida, 0.05 azul de bromofenol y 0.05% cyanol de xileno). Esta mezcla fue calentada a 95°C por cinco minutos e inmediatamente colocada en hielo durante otros cinco minutos. Este paso es necesario para promover la formación de complejos dentro de las mismas cadenas sencillas y para reducir la restauración de la doble cadena de ADN. Estos productos, además de un marcador de tamaño estándar (1kb ladder, Gibco BRL, Gaithersburg MD) fueron sometidos a electroforesis (sistema Sequigen Bio-Rad, Biorad Laboratories, Hercules, CA) a una corriente constante de 13 miliampéres, durante 15 a 18 horas a temperatura ambiente.

Los fragmentos de ADN sometidos a electroforesis fueron detectados usando tinción con plata. Para esto, el vidrio con el gel adherido fue separado cuidadosamente del IPC y se colocó en una charola de plástico (50x70cm). Para fijar el ADN, se agregaron 2 litros (L) de ácido acético glacial (10 % v/v disuelto en dH₂O) y la charola se agitó a 70 rpm durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, el ácido acético fue colocado en un recipiente de plástico para utilizarse después. El vidrio fue lavado tres veces con ddH₂O por dos minutos en cada lavado.

Posteriormente, se agregaron dos litros de la solución de tinción [0.075% (w/v) nitrato de plata y formaldehído a una concentración final de 15 % (v/v)] por 30 minutos. La solución de plata fue retirada y el vidrio se lavó durante 15 segundos con agua destilada. El último paso fue agregar la solución reveladora [3% carbonato de sodio enfriado a 10°C, previamente tratada con formaldehído (0.15% v/v) y tiosulfato de sodio (0.0002% w/v)]. Una vez que las bandas se resolvieron claramente (~5 a 7 minutos), la solución fijadora (ácido acético glacial) fue agregada directamente sobre el vidrio y agitada durante 5 a 10 minutos. Los geles fueron enjuagados por 20 minutos en dH₂O para remover los residuos de sales que pueden manchar al gel después de secarse. Los geles se removieron de la charola y se colocaron en forma vertical para secarse durante la noche.

La revisión visual de los geles se realizó colocando el vidrio en placas de luz, para permitir un buen contraste. El primer paso consistió en colocar el nombre de la población y el número del mosquito en cada carril. Posteriormente, en orden de aparición se diferenciaron a los distintos haplotipos en base al patrón de bandas. A cada tipo de patrón

de bandas se le designó una letra del alfabeto. El resto de los individuos fue clasificado en base al tipo de patrón que presentó. El tipo de patrón de SSCP (letra) para cada individuo y población fue registrado en una base de datos.

5.1.4.6. Secuenciación y análisis de productos de PCR

Dos productos de PCR por cada tipo de patrón SSCP, fueron enviados a secuenciar para analizar las diferencias entre haplotipos a nivel nucleótido. Previo al envío, los 45 μ l de producto de PCR fueron purificados utilizando un kit para purificación de productos de PCR (Qiaquick PCR purification kit, Qiagen) utilizando el procedimiento de microcentrifugación. Los productos se mezclaron con 200 μ l de buffer de unión y se colocaron en columnas de purificación con un filtro de sílica. Esta mezcla fue centrifugada por un minuto a 14,000 rpm, el decantado se desechó y el filtro se lavó con 750 μ l de buffer de elución, centrifugando por un minuto. El decantado fue desechado y se procedió a otro ciclo de centrifugación. Para eluir el ADN, se agregaron 30 μ l de ddH₂O sobre la membrana, dejando reposar durante un minuto y posteriormente fue centrifugado por un minuto.

Alrededor de 28 μ l de producto de PCR purificado a la concentración de 10 ng/ μ l/100pb fueron obtenidos de cada muestra. Este ADN se separó en dos alícuotas de 14 μ l para permitir la secuenciación de la cadena positiva y negativa respectivamente. Las muestras fueron etiquetadas, liofilizadas y enviadas al centro de Secuenciación de Davis (Davis California).

Las cromatografías de las secuencias fueron analizadas y alineadas con los softwares SeqMan® y Clustalw respectivamente (Thompson *et al.*, 1994). Un sitio polimórfico fue aquel donde aparecían dos distintos nucleótidos (adenina, timina, guanina o citosina) en el mismo sitio de la secuencia. La presencia de una sola curva sugirió que ese individuo fue homocigoto para ese nucleótido. La presencia de dos curvas en el mismo sitio sugirió la heterocigocidad de ese individuo. La presencia de polimorfismos fue revisada tanto en la cadena positiva y negativa del mismo individuo, si hubo discrepancia en el nucleótido presente en ese loci, se descartó ese sitio polimórfico.

5.1.5. Detección de alelos específicos en los codones *Iso1,011* y *Val1,016*

Cuatro sistemas fueron desarrollados para detectar alelos específicos en cada SNP (single nucleotide polymorphism) del DIIS6 del gen *para*, asociados con la resistencia *kdr*. Los sistemas de detección de alelos específicos, se basaron en dos mutaciones encontradas en los codones *Iso1,011* y dos mutaciones en el codón *Val1,016*.

La base de la técnica consiste en amplificar productos de PCR de distinto tamaño para cada alelo específico en una sola reacción. Este producto de PCR contiene un marcador fluorescente (sybergreen) que se une a la cadena doble de ADN. Posteriormente, los productos de PCR se someten a un aumento gradual de temperatura, ocasionando la desnaturalización de dichas cadenas. La disociación del marcador fluorescente de la doble cadena de ADN es detectada por una máquina de PCR-tiempo-real, registrando las temperaturas donde ocurrió una mayor disociación. Un producto de PCR de mayor tamaño presenta una temperatura de disociación más alta, mientras que un producto de menor tamaño se desnaturaliza con menor temperatura. Estas curvas de desnaturalización son graficadas, permitiendo registrar la presencia de una sola curva a una temperatura alta (homocigoto Y), una curva de baja temperatura (homocigoto X) o bien, la presencia de ambas curvas en el mismo individuo (heterocigoto XY).

5.1.5.1. Diseño de iniciadores alelo-específicos

Los iniciadores positivo y negativo fueron diseñados con el programa Primer-Premier 5 para obtener productos de PCR entre 50 y 90 pares de bases. Los iniciadores midieron entre 18 y 25 pares de bases. El iniciador positivo (alelo-específico) fue diseñado en forma de que el último nucleótido de la región -3' correspondiera al alelo polimórfico. Para detectar a cada alelo específico, se realizaron dos modificaciones en el iniciador positivo: 1) para detectar el alelo X, se adicionó la cadena de "GCGGGC" al extremo 5' del iniciador positivo específico X; por otro lado, para detectar el alelo específico Y, se adicionó la cadena, "GCGGGCAGGGCGGCGGGGGCGGGGCC" en el extremo 5' del iniciador positivo Y (Germen y Higuchi 1999; Wang *et al.*, 2005); 2) la segunda modificación consistió en des-estabilizar cada uno de los iniciadores positivos al modificar al tercer nucleótido de la región 3' hacia el grupo purina o pirimidina contrario (Okimoto y Dodgson, 1996).

Los iniciadores fueron sintetizados por las compañías de OPERON, cada iniciador fue resuspendido en una cantidad de TE para obtener una concentración final de 500 picomoles (pmol) por microlitro. La cantidad de TE para diluir al iniciador se calculó dividiendo el número de picomoles de cada iniciador entre 500 (concentración final).

5.1.5.2. Reacción de PCR para detectar alelos específicos

Una reacción de PCR consistió en 11.85 μ l de ddH₂O, 12.5 μ l del master Mix IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories: 100mM KCl, 40 mM Tris-HCl pH8.4, 0.4 mM de cada dNTP, 50 unidades/ml de iTaq DNA polimerasa, 6 mM MgCl₂, SYBR Green1, 20nM de fluoresceína) y ~0.05 μ l de cada iniciador específico e iniciador reverso, completando una reacción con volumen final de 25 μ l.

La mayoría de las reacciones se realizaron en microplacas de 96 pocillos (Hard Shell™, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) de color blanco, ya que permiten una mejor detección de la fluorescencia. Para realizar 96 reacciones de un volumen final de 18 μ l/rx, se utilizó una mezcla de 875 μ l de IQ-sybergreen mix, 830 μ l de ddH₂O y 3.5 μ l de cada iniciador. Posteriormente, se distribuyeron 18 μ l de esta mezcla en cada pocillo de la microplaca y entre 0.5 a 1.0 μ l de ADN de cada mosquito se colocó en su respectivo pocillo. Los pocillos fueron cubiertos con tiras plásticas planas (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

La placa se colocó en un termociclador y se sometió a 12 minutos a 95°C para desnaturalización y a 39 ciclos de 1) 95°C por 20 segundos para desnaturalización, 2) 60°C por un minuto 3) 72°C por 30 segundos para extensión. Un periodo de extensión final de cinco minutos a 72°C y un periodo de incubación de 4°C por no más de 24 horas fueron incluidos. Posteriormente, la placa se transportó a una máquina de PCR tiempo-real (Opticon 2 DNA Engine, MJ Research, Waltham MA), donde se realizó la detección de alelos específicos mediante un análisis de curva de desnaturalización (melting curve). Las condiciones de la reacción, tales como tipo de placa (blanca), tipo de marcador fluorescente (sybgreen) y la identificación de los pocillos control, pocillos vacíos y pocillos con muestra fueron señalados. El programa consistió en una lectura de placa a una proporción de 0.2°C por segundo, con una rampa de temperatura desde 65°C a 95°C.

5.1.5.3. Frecuencia de alelos en los codones *Ile1,011* y *Val1,016* en poblaciones de *Ae. aegypti*.

La frecuencia de alelos en los cuatro sistemas desarrollados (*Iso1,011Met*, *Iso1,011Val*, *Val1,016Iso* y *Val1,016Gly*) fue estimada en 27 colecciones de campo *Ae. aegypti* y 5 cepas seleccionadas con insecticidas. La tabla 1 muestra el origen de las colecciones y o su referencia. Alrededor de 50 mosquitos de la generación F2 de las nueve colecciones de Venezuela (analizadas por la Dra. Ludmel Urdaneta) y 9 colecciones de México fueron evaluadas. Las colecciones de Panamá, Costa Rica, Nicaragua y cuatro cepas de Santiago de Cuba (seleccionadas con temefos-F6, propoxur-F14 y deltametrina F12, F13) fueron gentilmente donadas por la Dra. Magdalena Rodríguez (Rodríguez *et al.*, 2005).

En tabla 1, se muestran las poblaciones donde fueron colectados los mosquitos analizados. La presencia y/o evolución de estas mutaciones fue evaluada en las cepas seleccionadas con deltametrina por 13 generaciones (Santiago de Cuba) y la cepa IMUF-5 (Islas Mujeres) seleccionada por 5 generaciones con permetrina realizada en este estudio.

5.1.5.4. Evolución de las mutaciones en el DIIS6 del gen *para*

La región 3' del exón 20, el intrón 20 y la región 5' del exón 21 fueron amplificadas y secuenciadas para analizar la evolución de las cuatro mutaciones en el gen *para*. Los iniciadores *kdr2* (5'-ATGTGGGATTGTATGCTTG-3' y 5'-GATGAACCGAAATTGGAC-3') fueron utilizados para amplificar esta región. Las secuencias de 87 mosquitos fueron elegidas por sus genotipos en los residuos 1011 y 1016. Las secuencias fueron alineadas utilizando Clustalw (Thompson *et al.*, 1994).

El número de sitios segregantes, inserciones/deleciones, haplotipos, diversidad de nucleótidos (π , (Nei & Miller 1990)), número promedio de diferencias de nucleótidos (k , (Tajima, 1993)), el número mínimo de eventos de recombinación (R_m , (Hudson y Kaplan 1985)) y los coeficientes de desequilibrio de unión (Hill y Robertson 1968) fueron estimados usando DNASP 4.10.9 (Rozas *et al.*, 2003). La reconstrucción filogenética fue efectuada usando un análisis de máxima parsimonia en PAUP 4.0 (Swofford, 1993) en

las cuales las inserciones/delecciones fueron tratadas como un quinto caracter y un análisis bootstrap con 1000 replicas fue realizado para probar el soporte de la filogenia derivada.

5.2. Mapeo de QTL que controlan la resistencia a la permetrina en *Ae. aegypti*

Este objetivo consistió en identificar los loci (sitios en el genoma) que afectan significativamente a la resistencia (fenotipo) a la permetrina en el mosquito *Ae. aegypti*. En el diseño experimental no se utilizó tratamientos ni controles, se manejó un solo grupo (familia de mapeo-F3) y posteriormente se realizaron 33 mediciones independientes en cada individuo del grupo (441 individuos). Las mediciones realizadas fueron discretas (categóricas). Una de las mediciones consistió en medir la respuesta a la exposición a la permetrina (fenotipo: vivo, recuperado ó muerto) y las restantes 32 mediciones consistieron en determinar el genotipo para los 32 marcadores genéticos (genotipo: A, B ó H).

El modelo de intercrusa F1 fue utilizado para obtener una familia de mapeo-F3. Las cruza parentales consistieron en cepas resistentes y susceptibles al insecticida permetrina. Una vez que obtuvimos la familia de mapeo-F3 (441 individuos), cada uno de los individuos fué fenotipificado mediante la exposición a una LC₅₀ de permetrina, separando el fenotipo en tres grupos: *vivos*, *recuperados* y *muerdos*. Estos tres grupos de mosquitos de la familia de mapeo fueron congelados, se extrajo ADN y realizamos la genotipificación de cada individuo mediante el uso de 32 marcadores genéticos de nucleótidos simples (SNPs). Tres clases de genotipos fueron obtenidos: homocigoto proveniente de la cepa resistente (A), homocigoto que proviene de la cepa susceptible (B) y heterocigotos (H).

Se estableció un base de datos utilizando las mediciones realizadas (clase de fenotipo y genotipo) de cada individuo de la familia de mapeo. Tres análisis fueron realizados: 1) análisis de contingencia chi-cuadrada para determinar la existencia de asociación entre algún tipo de genotipo con el fenotipo, para cada marcador individualmente; 2) análisis de unión genética en el programa JoinMap para determinar la frecuencia de recombinación entre pares de marcadores genéticos y establecer su orden en el mapa genético y 3) análisis en el programa Cartographer, donde se utiliza una serie de módulos

para caracterizar a un QTL, obteniendo los sitios en el genoma donde ocurre una relación significativa entre la resistencia (fenotipo) y los marcadores genéticos.

5.2.1. Diseño de familia de mapeo

Un total de 20 parejas de mosquitos fueron colonizadas en cajas de cartón, la generación parental-P1 consistió en cruzar una hembra vírgen perteneciente a la cepa seleccionada con permetrina IMU5-F4 con un macho proveniente de la cepa de New Orleans.

Por otro lado, para determinar si la resistencia esta ligada al sexo, se realizaron otras 20 cruza recíprocas, utilizando una hembra virgen proveniente de New Orleans y un macho de la cepa resistente IMU5-F4. Las hembras P1 fueron alimentadas tres veces con sangre de ratón para permitir la producción de suficientes huevecillos. Después de la primera alimentación, los machos fueron aspirados de la caja, colocados en un tubo eppendorf de 1.5 ml etiquetado con la generación y el número de la familia (por ejemplo P1-3) y se congelaron a -80°C . Una vez que las tres papeletas de huevecillos fueron colectadas, etiquetadas y almacenadas, las hembras P1 fueron aspiradas y colocadas en un tubo con su respectiva pareja y posteriormente se almacenaron a -80°C .

Los huevecillos obtenidos de cada pareja P1, fueron eclosionados en vasos de plástico. Las pupas F1 fueron sexadas conforme a su tamaño con la finalidad de asegurar que las hembras fueran vírgenes y copularán solamente con su respectiva pareja. Las pupas de mayor tamaño fueron catalogadas como hembras y las pupas de menor tamaño como machos. Una pupa hembra y una pupa macho fueron colocadas en una copa dentro de una caja de cartón, a estas parejas se les denominó intercruza F1. En total se realizaron cinco intercruzas F1 por cada familia P1 construida.

Una vez que emergieron los adultos de las intercruzas F1, se dejó un plazo de tres días para permitir la cópula. Posteriormente, tres alimentaciones con sangre de ratón fueron realizadas para obtener $\sim 70-130$ huevecillos de la generación F2. Los machos fueron almacenados a -80°C después de la primera alimentación de sangre. Después de colectar tres papeletas de huevecillos, las hembras fueron almacenadas junto con su pareja F1.

En este punto se eligieron las cinco familias con mayor número de huevecillos. Los huevecillos F2 fueron eclosionados y colocados en una jaula para permitir la cópula en

masa. Este paso permitió la recombinación de alelos y la obtención de una familia suficientemente grande para realizar el mapeo de QTLs. Los huevecillos de la generación F3 de cada familia fueron almacenados en bolsas de plástico a temperatura ambiente.

Las generaciones posteriores a la generación F2 de cada familia fueron consideradas como líneas de intercrusa avanzada (AIL). Un AIL permite detectar la segregación “avanzada” de alelos en una familia de mapeo específica, esto se basa en que ocurren más eventos de recombinación en generaciones posteriores a la generación de intercrusa F2.

La línea avanzada consistió en realizar una crusa en masa entre ~100 hembras y 100 machos obtenidos de una familia F2. Las hembras de cada familia AIL fueron alimentadas con sangre de ratón para obtener cerca de 1000 huevecillos F3. Cada seis meses, se repite la misma metodología con la progenie F4, F5, F6 y así sucesivamente. La línea de intercrusa avanzada de la generación F3 fue utilizada para elegir a la familia de mapeo de QTL en este estudio.

5.2.2. Fenotipo de la familia de mapeo

Esta se realizó mediante bioensayos de adultos de 3-6 días de edad expuestos a la concentración letal-50 de permetrina en botellas wheaton. Alrededor de 700 mosquitos fueron expuestos al insecticida durante una hora, posteriormente, fueron retirados de la botella y colocados en un cilindro de cartón. Los mosquitos que fueron capaces de mantener una posición erguida o de volar a una hora de exposición, fueron aspirados y colocados en un nuevo cilindro etiquetado, estos mosquitos fueron registrados como vivos.

El resto de los mosquitos derribados, fueron colocados en una incubadora a 28°C y una humedad relativa de 80%. Después de 4 horas, los cilindros se extrajeron del incubador y se registró el número de mosquitos *recuperados* y el número de mosquitos *muertos*. Utilizamos un tiempo de 4 horas, para evitar la degradación del ADN de los mosquitos muertos. La mortalidad registrada a las 4 horas, 8 horas y 24 horas fue muy similar en una serie de experimentos con los mosquitos de la familia de mapeo.

Los mosquitos de cada grupo fenotípico (*vivos*, *recuperados* y *muertos*) fueron almacenados en tubos de 15 ml a -80°C para su posterior extracción de ADN y genotipificación.

La familia de mapeo incluyó a la generación parental P1 (abuela y abuelo), generación filial de intercrusa F1 (madre y padre) y 439 individuos de la generación filial F3 previamente fenotipificados mediante la exposición a permetrina. Los mosquitos hembra-*vivos* fueron colocados en los tubos etiquetados con los números 1 al 75, los mosquitos hembra-*recuperados* se colocaron en tubos individuales etiquetados con los números 126 al 201. A los machos-*vivos* se les asignaron los tubos 251 a 318, mientras que los mosquitos machos-*recuperados* se enumeraron del 376 a 445. Por último, los mosquitos hembra-*muertos* se colocaron en los tubos 501 a 575 y los mosquitos macho-*muertos* tuvieron los números 751 a 825.

5.2.3. Extracción de ADN de la familia de mapeo

El ADN de cada individuo de la familia, se obtuvo mediante la técnica de extracción de sales (Black y Munsterman, 1996) descrito en la sección 5.1.4.2. El ADN de las hembras se resuspendió en 200 μ l de TE y el ADN de los machos se resuspendió en 150 μ l de TE. Una alícuota de 80 μ l de ADN se almacenó en tubos criogénicos a -80°C . El resto del ADN se mantuvo en el refrigerador para su uso diario en las reacciones de PCR.

5.2.4. Amplificación de ADN genómico (MDA)

Para prevenir que los ~ 150 - 200 μ l ADN de algunos individuos de la familia de mapeo se terminara, decidimos realizar la amplificación de ADN genómico (multiple displacement amplification: MDA), basándonos en la técnica descrita por Gorrochotegui-Escalante (2003). En esta técnica se utilizó 1 μ l de ADN y el kit TempliPhi™ 500 Amplification Kit (Amersham Biosciences, Amersham Biosciences UK Limited, England), permitiendo amplificar entre 100 a 400 veces el ADN genómico total.

Alrededor de 1 μ l de la muestra de ADN resuspendida en TE (10 mM Tris EDTA pH 8.0) fue agregada a 5 μ l de buffer de muestra. El buffer de muestra consistió en 10 mM TE pH 8.0 y 100 μ M de hexámeros de tiofosfato resistentes a exonucleasas (5'-NpNpNpNpsNpsN-3'). Esta mezcla fue combinada con 5 μ l de mezcla de reacción. La mezcla de reacción consistió en 74 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM de dNTPs, 100 μ M de hexámeros resistentes a exonucleasas y 0.2 unidades de pirofosfatasa de levadura (Roche Molecular Biochemicals).

Por último, la ADN-polimerasa ϕ 29 (8 unidades) (Amersham PharmaciaBiosciences) fue agregada a la mezcla. Las reacciones fueron incuabadas por 18 horas a 30°C y finalizadas al calentar la reacción a 65° por 10 minutos. Después de la reacción, el ADN amplificado fue resuspendido en 100 μ l, al agregar 90 μ l de ddH₂O a la reacción MDA. Los MDAs fueron almacenados a -20°C. Los MDAs tuvieron los mismos resultados en la amplificación por PCR, con la diferencia de que cada reacción de PCR requiere entre 1.5 a 2.5 μ l de MDA.

5.2.5. Marcadores-SSCP analizados en la familia de mapeo

A pesar de que contamos con un mapa genético de cerca de 60 marcadores-SSCP alrededor de todo el genoma, decidimos desarrollar marcadores basados en los genes de resistencia. Un total de 107 iniciadores que amplifican distintos genes o áreas de los genes asociados con la resistencia a insecticidas, fueron diseñados y optimizados utilizando el programa PrimerPremier-5.

Los iniciadores que amplifican 68 genes de oxidasas del citocromo-P450, 26 genes de esterasas y 24 genes de glutatión transferasas fueron optimizados para la obtención de la temperatura de alineamiento. Para esta finalidad se utilizó un pool de ADN de *Ae. aegypti* de Puerto Rico, en una reacción de PCR sometida a un programa de gradientes de temperatura entre 46 a 65°C. Los productos de PCR esperados, midieron entre 180 a 380 pares de bases. La elección de la temperatura de alineamiento se basó en la presencia de una sola banda con suficiente intensidad en el rango del peso esperado.

Los patrones de segregación de los haplotipos en la familia de mapeo, fueron analizados mediante la técnica de SSCP. Los productos de PCR de la generación parental P1 (abuela y abuelo), generación F1 de intercrusa (madre y padre) y cerca de 10 individuos de la generación F3, fueron amplificados según la sección 5.1.4.5. Los polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP) fueron performados y analizados mediante el procedimiento descrito en la sección 5.1.2.5.

La segregación de polimorfismos de 107 fragmentos amplificados a partir de los genes de resistencia fue analizada. Por otro lado, también utilizamos marcadores genómicos-SSCP previamente publicados para el mosquito *Ae. aegypti* (Fulton *et al.*, 2001; Gomez-Machorro *et al.*, 2004). Un total de 43 marcadores-SSCP distribuidos en todo el genoma

fueron analizados para la familia de mapeo-F3. El mapeo de genes cuya posición en el mapa genético ya son conocidas, permite confirmar la posición de los nuevos marcadores de genes asociados a la resistencia.

Para categorizar a un marcador-SSCP como completamente informativo, parcialmente informativo o no informativo, se realizó una comparación visual de los patrones de haplotipos obtenidos en la generación parental P1 (abuelo y abuela). Cuando los patrones de los abuelos fueron idénticos, el marcador fue denominado “no informativo”. Cuando existieron diferencias en el patrón de bandas del abuelo y abuela, pero uno de estos patrones se presentaba en uno de los padres F1, entonces el marcador fue clasificado como “parcialmente informativo”. Por último, un marcador completamente informativo fue aquel donde los patrones de bandas entre la abuela y abuelo fueron completamente diferentes, además, la combinación de estas bandas pudo observarse en ambos padres F1.

5.2.6. Secuenciación y análisis de polimorfismos

El siguiente paso fue obtener la secuencia de los marcadores completa o parcialmente informativos. Los productos de PCR de la abuela, abuelo, madre y padre, fueron purificados y enviados a secuenciar, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 5.1.4.6.

Las cromatografías de las secuencias fueron alineadas y analizadas con el software SeqMan. El primer paso consistió en hacer una lista del número del nucleótido polimórfico (SNP) en la secuencia. Un sitio polimórfico (SNP) fue aquel donde aparecían dos distintos nucleótidos (adenina, timina, guanina o citosina) en el mismo sitio de la secuencia. La presencia de una sola curva sugirió que ese individuo fue homocigoto para ese nucleótido. La presencia de dos curvas en el mismo sitio sugirió la heterocigocidad del individuo. La presencia de polimorfismos fue revisada tanto en la cadena positiva y negativa del mismo individuo, si hubo discrepancia en el nucleótido presente en ese loci, se descartó ese sitio polimórfico.

Una vez que terminamos con la revisión de polimorfismos de la secuencia completa, procedimos a registrar el genotipo de cada SNP en cada uno de los individuos de la familia parental (abuelos P1) y filial F1. Si la abuela fue homocigoto A/A y el abuelo

homocigoto G/G, entonces se esperaba obtener una progenie-F1 heterocigota (A/G x A/G). En dicho caso, este SNP fue considerado completamente informativo.

Cuando uno de los abuelos fue homocigoto A/A y el otro fue heterocigoto A/G, esperabamos tener una progenie con los genotipos A/A o A/G. Si ambos padres F1 tuvieron el genotipo A/A, entonces el SNP fue considerado no informativo. Pero, si los padres F1 presentaban los genotipos A/A x A/G o A/G x A/G, entonces el SNP fue considerado parcialmente informativo.

Si ambos abuelos compartían un genotipo heterocigoto (A/G x A/G), este SNP se registró como no informativo. La razón reside en que no es posible trazar la línea de la cual viene cada uno de los alelos para ese gen. Lo ideal es presentar marcadores completamente informativos, sin embargo, también es posible obtener información de los marcadores parcialmente informativos.

El consenso de las 8 cromatografías (2/individuo) de ADN fue guardado en un archivo FASTA (dicho archivo conserva las cromatografías de todos los individuos). El consenso de las ocho secuencias, incluyendo todos los sitios polimórficos completa y parcialmente informativos, fue guardado en un archivo SEQ.

5.2.7. Genotipo de la familia de mapeo

Un SNP informativo por cada gen, fue seleccionado para desarrollar iniciadores específicos para alelos. Se le dió preferencia a los SNPs completamente informativos, después a los parcialmente informativos. El diseño de los iniciadores se realizó con el programa Primer-Premier5. La metodología para modificación de iniciadores fue descrita anteriormente en la sección 5.1.3.

La detección del alelo correcto en cada SNP, fue corroborado en la generación parental P1 y la generación filial F1. Los resultados de la detección de alelos fueron comparados con la información obtenida de las cromatografías de las secuencias de cada uno de los individuos. En caso de discrepancias, se repitió el experimento y si el problema fue consistente, entonces el sistema fue descartado.

El genotipo de cada individuo de la familia de mapeo (441 individuos) fue determinado mediante la detección de alelos específicos de cada uno de los 32 sistemas desarrollados. La reacción de PCR incluyó al IQ-super mix (Bio-Rad), ddH₂O y los tres

iniciadores del sistema. Las condiciones de la reacción del PCR-específico, el programa de amplificación y el programa para obtener la curva de desnaturalización en la máquina de PCR tiempo-Real fueron descritos anteriormente en la sección 5.1.5.1.

Un total de cinco microplacas fueron requeridas para determinar el genotipo de los 441 individuos de la familia de mapeo. Para asegurar la repetibilidad de cada sistema, el último individuo de una microplaca uno, fue también colocado en el primer pocillo de la microplaca dos, y así sucesivamente.

La gráficas de las curvas obtenidas para cada individuo fueron guardadas en un archivo TAD2 del programa Opticon 2 de la máquina de PCR tiempo-Real. El par de nucleótidos (genotipo) presente en cada individuo fue registrado manualmente en una libreta.

5.2.8. Análisis de datos

En una lista de individuos, comenzando con la abuela-P1, abuelo-P1, madre-F1, padre-F1, e individuos 1,2,3,...,825 de la familia de mapeo-F3, se anotó la temperatura pico de desnaturalización para cada alelo específico en cada marcador-loci. En esta base de datos se escribió el par de alelos presentes en cada individuo, es decir, el alelo adenina, timina, guanina o citosina. Por ejemplo, el individuo 1 tuvo un genotipo A/A, el individuo 2 tuvo un genotipo A/G y así sucesivamente.

Una segunda base de datos fue construida en una hoja de Excell, en ésta se escribió el genotipo con un sistema de A, B y H. El alelo proveniente de la abuela-P1 fue denominado como alelo "a", por lo tanto, el genotipo de un organismo homocigoto para este alelo fue denominado "A". El alelo proveniente del abuelo-P1 se denominó alelo "b", el genotipo de un organismo homocigoto para este alelo fue catalogado como "B". Por último, la presencia de ambos alelos, "a" y "b" en un solo individuo, fue considerada como un genotipo heterocigoto "H". Los datos perdidos fueron denominados como ".". Los nombres de los marcadores se colocaron en las celdas horizontales y los 439 individuos en primera columna vertical. Esta base de datos fue necesaria para realizar tres análisis: 1) análisis de contingencia de chi cuadrada efectuados en el programa estadístico SAS; 2) análisis de unión genética en el programa JoinMap 2.0 (Stam and Van

Ooijen, 1995), y.3) caracterización de los principales QTL afectando la resistencia a insecticidas.

5.2.8.1. Chi cuadrada y gráficas de fenotipo-genotipo

Debido a que el fenotipo y genotipo son dos variables categóricas (discretas), el análisis de contingencia de chi cuadrada fue utilizado para conocer si las variables se distribuyen independientemente. Este análisis se corrió en el programa estadístico SAS 8.1 (SAS Institute, 1999). Este análisis permite identificar cuales marcadores genéticos pueden estar asociados con el rasgo cuantitativo (susceptibilidad/resistencia).

La base de datos provenientes de la hoja de excell con los genotipos A, B y H, fue copiada directamente en la hoja de edición de SAS, los comandos específicos para determinar los individuos, marcadores y las comparaciones entre susceptibilidad y cada uno de los marcadores fue escrita en base al manual de instrucciones. En este análisis, la hipótesis nula fue que no existe asociación entre el fenotipo y el genotipo de cierto marcador, es decir los genotipos se distribuyen al azar en cada uno de los fenotipos. La hipótesis alterna fue que si existe asociación entre el fenotipo y genotipo en el marcador analizado.

La prueba de Fisher fue utilizada para determinar la probabilidad de que la hipótesis nula sea aceptada solamente por azar. Por lo tanto, los valores de probabilidad F mas pequeños indican que la probabilidad de aceptar la hipótesis nula es menor y que la hipótesis alterna sea mas certera. Cuando se obtuvo un marcador en donde la hipótesis nula fue rechazada, las frecuencias de cada genotipo fueron graficadas utilizando el programa Sigma Plot. El eje de la X consistió en el número de alelos provenientes del abuelo susceptible, utilizando los valores 0, 1 y 2. El eje de la Y consistió en la proporción de sobrevivencia.

5.2.8.2. Mapa genético de los marcadores-SNP de la familia de mapeo

El siguiente análisis consistió en localizar la posición de cada uno de los 20 nuevos marcadores genéticos de resistencia en su respectivo grupo de unión (cromosoma). El programa utilizado fue el JoinMap 2.0 (Stam y Ooijen, 1995). Los diez marcadores

genómicos de SNPs diseñados en este estudio, fueron basados en marcadores-SSCP de genes previamente mapeados (Black y Severson, 2005). Estos marcadores SNP genómicos fueron utilizados como referencia para obtener una posición más exacta de los 20 nuevos marcadores genéticos asociados a la resistencia a insecticidas.

En JoinMap (JM), varias de las tareas de un proyecto de mapeo son realizadas por módulos separados. El primer paso del proyecto de mapeo fue la creación de un archivo de datos para ser procesado por JM. Todos los archivos manejados o producidos por JM son archivos de texto *ascii*. La base de datos contiene los nombres de los marcadores y los códigos de los genotipos (A, B, H) para cada individuo de la población; el tipo de familia de mapeo anotado fue RIL (línea recombinante endogámica).

La siguiente fase fue asignar los marcadores a un grupo de ligamiento o unión. El módulo JMPGRP se encargó de agrupar los marcadores, basándose en los valores LOD y los estimados de recombinación para cada par de marcadores. Fue utilizado un umbral LOD inicial y final de 0.0 y 8.0 respectivamente, con incrementos de 0.1. En este trabajo tomamos el valor LOD de 3.1, ya que en éste se formaron tres grupos de unión correspondientes a los tres cromosomas de *Ae. aegypti*.

Posteriormente, el archivo de los datos originales fue separado en tres distintos archivos, correspondiendo a cada uno de los cromosomas, esta tarea se realizó con el módulo JMSPL. El siguiente paso fue calcular las frecuencias de recombinación entre pares de cromosomas y su LOD correspondiente, para todos los marcadores que pertenecen a cierto grupo de unión. Esto se realizó para cada grupo por separado con el módulo JMREC. Los resultados de estos cálculos fueron escritos en un archivo denominado *pairwise* (PWD). Finalmente, estos datos se introdujeron en un archivo para la construcción del mapa y el mapa genético fue generado usando el módulo JMMAP. El mapa genético fue graficado utilizando el programa DrawMap (Van Ooijen, 1994).

5.2.8.3. Análisis de QTL: Cartographer

Por último, el análisis de QTLs que controlan la sobrevivencia y recuperación de los mosquitos de la familia de mapeo, se realizó mediante mapeo de intervalos (MI) y mapeo de intervalos compuestos (CIM) (Zeng, 1994), usando el programa QTL Cartographer 2.0 (Basten *et al.*, 2002). Una base de datos crudos en formato MCD fue realizada, los

marcadores del cromosoma I, II y III fueron colocados en orden según la distancia en centimorgans en donde se localiza cada marcador. A los mosquitos con genotipo homocigotos para el alelo proveniente de la abuela-P1, se les asignó el número "1"; a los individuos con genotipo homocigoto provenientes del abuelo-P1 se asignó el número "3". Los mosquitos heterocigotos fueron denominados con el número "2" y a los datos perdidos el número "4".

QTL Cartographer utiliza un orden secuencial de módulos para caracterizar y calificar a un QTL. El primer módulo es denominado Qstats, calcula algunas estadísticas básicas, resume los datos perdidos y también prueba el ajuste a la segregación mendeliana en todos los marcadores.

El segundo módulo es LRmapqtl, el cual ajusta los datos a un modelo de regresión lineal simple, un marcador a la vez. Permite dar un vistazo al lugar donde puede encontrarse un QTL en el genoma, usando el modelo lineal $y_i = b_0 + b_1 x_i + e$, donde y_i es el fenotipo del individuo i , y x_i es el indicador variable para el marcador genotípico. Por otro lado, b_1 y b_0 son los parámetros de regresión que pueden ser estimados y e es el error con distribución normal.

Para determinar en qué grado un marcador está unido al QTL, se necesita probar si b_1 es significativamente diferente de cero. Una prueba estadística de F, compara la hipótesis nula $H_0: b_1 = 0$ con una hipótesis alterna $H_1: b_1 \neq 0$. La probabilidad de F es una medida de cuánto soporte existe para la H_0 . Un menor valor de probabilidad F indica menor soporte para la H_0 y entonces, mayor soporte para la H_1 . En el análisis simple, se utiliza un solo marcador a la vez, por lo cual, los efectos son sub-estimados y la posición del QTL no puede ser determinada.

El tercer módulo, SRmapqtl utiliza una opción de regresión stepwise. Utiliza un modelo de regresión lineal para probar el efecto del marcador en turno en el rasgo cuantitativo. Se asigna un valor de uno al marcador con la estadística-F más alta y es incluido en todos los análisis subsecuentes. En otras palabras, este módulo califica el grado en el cual los marcadores individuales explican la variación fenotípica.

El cuarto módulo es denominado Zmapqtl, realiza los análisis de mapeo de intervalos (IM) y mapeo de intervalos compuestos (CIM) y realiza una prueba de permutaciones. El mapeo de intervalos (IM) puede ser considerado una extensión del análisis de marcadores

simples. El mapeo de intervalos provee una forma sistemática para escanear el genoma entero y buscar la evidencia de un QTL.

El mapeo de intervalos flanquea dos marcadores, construye un intervalo entre estos y después busca un QTL. La función de Kosambi fue utilizada para traducir la frecuencia de recombinación a distancia o viceversa. Un valor LOD fue calculado en cada incremento en el intervalo. Finalmente el valor LOD fue calculado para el genoma completo. Cuando un pico ha excedido el valor del umbral, se declara que se ha encontrado un QTL en ese lugar. El mapeo de intervalos es un estándar general para usarse en todos los sets de datos.

Por último, el mapeo compuesto de intervalos (CIM) se encarga de agregar loci de fondo al mapeo de intervalos simple. El mapeo compuesto de intervalos ajusta parámetros para un QTL-blanco en un intervalo, mientras simultáneamente se ajusta a un coeficiente de regresión parcial para “marcadores de fondo” que tienen efecto en la varianza causada por un QTL no-blanco.

En teoría el mapeo compuesto de intervalos tiene más poder y precisión, ya que los efectos de otros QTL no están presentes como varianza residual. Mas aun, remueve el sesgo que normalmente puede ser causada por un QTL que está unido a la posición que se está analizando. Los marcadores de fondo usualmente están entre 20 a 40 cM aparte.

QTL cartographer ofrece seis modelos para especificar cuáles marcadores deben utilizarse como cofactores. En el modelo 6, el número de marcadores utilizados para controlar el fondo genético np fue de 5. El tamaño de ventana ws fue de 10 cM, este definió cuáles marcadores flanquearon al sitio prueba (qtl). Los umbrales de comparación (95 %) de cada intervalo se estimaron mediante 1000 permutaciones.

RESULTADOS

6.1. Cepa de *Ae. aegypti* resistente a la permetrina

Los adultos de las generaciones de mosquitos F2, F3 ó F4 provenientes de Cd. Constitución, Coahuila de Zaragoza, Mazatlán, Islas Mujeres y la cepa susceptible de referencia New Orleans, fueron sometidos a varias concentraciones de permetrina para determinar la LC50. La proporción de resistencia (RR) fue calculada dividiendo las LC50 obtenidas, entre la LC50 de la cepa de New Orleans.

En la tabla 2, se muestran las LC50 para las colecciones evaluadas. La LC50 de la población de Islas Mujeres fué 25 veces mayor a la cepa susceptible New Orleans. Las LC50 de las colecciones de Mazatlán y Cd. Constitución fueron ~2.5 veces mayores a la de New Orleans.

Los mosquitos de las cepas New Orleans, Cd. Constitución y Mazatlán, tuvieron una concentración letal 90 (LC90) de 0.5 y 0.7 µg de permetrina, respectivamente. La totalidad de los mosquitos expuestos al insecticida cayeron derribados a la hora de exposición. Por otro lado, la colección de Islas Mujeres tuvo una LC90 de 7.2 µg de permetrina/botella. Alrededor del ~13% de los mosquitos sobrevivientes, no fué derribado, lo cual sugirió la presencia del mecanismo de resistencia al derribe (*kdr*).

Las colecciones de Cd. Constitución, Mazatlán e Islas Mujeres fueron seleccionadas con su respectiva LC50 de permetrina durante tres generaciones. La mortalidad de las cepas de Cd. Constitución y Mazatlán no se vió afectada por la selección, sin embargo, la mortalidad de Islas Mujeres disminuyó drásticamente después de tres generaciones de selección.

La cepa resistente a permetrina fue designada IMU5 (Islas Mujeres seleccionada con 5.0 µg de permetrina), seguido por la generación filial. Los mosquitos adultos de la generación F2 de Islas Mujeres fueron expuestos a la concentración de permetrina de 5.0

$\mu\text{g}/\text{botella}$ por un tiempo de 1 hora. El derribe registrado a la hora (knockdown) y la mortalidad a las 24 horas fue de 88.7 y 78.5 % respectivamente.

Los mosquitos IMU5-F2 sobrevivientes a la exposición al insecticida (~21.0%) fueron colectados y colocados en una jaula para permitir la cópula. Las hembras fueron alimentadas con sangre para la producción de huevecillos F3. Estos fueron criados hasta adultos y sometidos a las mismas concentraciones de permetrina, obteniendo un derribe y mortalidad de 24 y 1.6 %, respectivamente. La disminución del porcentaje de mortalidad indicó que algún mecanismo de resistencia fue seleccionado y heredado a la siguiente generación. En la tabla 3, puede observarse el número de mosquitos seleccionados mediante esta metodología.

Las cepas resistentes tienen como función ser referencia para comparaciones con otras cepas o poblaciones de campo. La cepa IMU5-F4 fue mantenida en el laboratorio para iniciar la identificación de los mecanismos genéticos que controlan la resistencia a permetrina. La generación IMUF5-F4 fue utilizada para generar una familia de mapeo e identificar los QTLs asociados a la resistencia a la permetrina. Por otro lado, la generación IMUF5-F8 fue utilizada para la búsqueda de polimorfismos en el canal de sodio.

6.2. Búsqueda de polimorfismos-SSCP en la región DIIS6 del gen *para* de *Ae. aegypti*

6.2.1. Regiones de ADN amplificadas

Los iniciadores *kdrD2T6* diseñados para amplificar al dominio II segmento transmembranal 6 del gen *para* (canal de sodio dependiente de voltaje), amplificaron dos bandas de PCR. Una de las bandas de ~470 pares de bases (pb) fue amplificada a la temperatura de 56°C y la segunda banda presentó alrededor de 600 pb a la temperatura de 46°C. Los dos productos de PCR amplificados fueron extraídos y purificados del gel de agarosa (QIAquick gel extraction kit), clonados en el vector topo 2.1 (TOPO TA cloning kits) y posteriormente cultivadas en cepas de *E. coli* competente. Después de la selección con ampicilina, se seleccionaron 10 colonias.

El PCR de las clonas se realizó utilizando los primers *kdrR2T6*. Fragmentos de 400 a 420 pb fueron obtenidos en tres de las clonas: 7.2, 7.4 y 7.6. Las clonas 2.2, 2.4 y 2.8 amplificaron regiones de ~600 pb. Los fragmentos fueron purificados (QIAprep Spin

Miniprep kit) y secuenciados (Davis, California) con los primers M13 y T7. Las secuencias fueron editadas y analizadas con el programa SeqMan y Clustalw respectivamente.

Las secuencias de las clonas fueron sometidas a un Blast de nucleótidos (ncbi.nlm.nih.gov), los resultados indicaron que las secuencias 7.2, 7.4 y 7.6 pertenecen al gen del canal de sodio dependiente de voltaje de *Ae. aegypti* (VGSC o gen *para*) exactamente el dominio II, segmento transmembranal 6, con una identidad mayor al 98 % (número de acceso AY663385). Por otro lado, las secuencias obtenidas de las clonas 2.2, 2.4 y 2.8 correspondieron al receptor homólogo de la hormona receptora de esteroides del mosquito *Ae. aegypti* (número de acceso AF106703).

El segmento amplificado por los iniciadores kdrD2T6 a la temperatura de 56°C, incluye al exón 20 (81 bp), intrón 20 (229 a 247 pb) y parte del exón 21 (88 pb) del gen *para*. Al analizar el alineamiento de las secuencias de las tres clonas, ningún polimorfismo fue identificado en el exón 20. El intrón 20 fue cuatro veces más grande que el intrón reportado para anofelinos (62 pb), conteniendo inserciones y deleciones abundantes. Por último, la secuencia del exón 21 fue conservada, a excepción de dos polimorfismos, en los codones 1016 y 1037. En la figura 1, se muestra el orden de los exones e intrones de la región amplificada por los iniciadores kdrD2T6 en tres clonas de un pool de ADN de *Aedes aegypti*.

La secuenciación del fragmento obtenido por los iniciadores kdrD2T6, permitió el diseño de tres pares de iniciadores con mayor especificidad: kdr2, kdr3 y kdr4. Los iniciadores kdr2 (5'-ATGTGGGATTGTATGCTTG-3' y 5'-GATGAACCGAAATTGGAC-3') amplificaron un fragmento de 370 a 385 pares de bases, incluyendo parte del exón 20, intrón 20 y exón 21. El par de iniciadores kdr3 (5'-GGGTGACGTGTCCTGTAT-3' y 5'-GTYGGTTAGCACGAWAGA-3') amplificó al exón 20 y parte del intrón 20 (270-285 pares de bases). Por último, el iniciador kdr4 (5'-GTGGGATTGTATGCTTGT-3' y 5'-YAGAWGAACTYCCAAACG-3') amplificó un fragmento de 107 pares de bases del exón 20. Las secuencias de los iniciadores aparece en la tabla 4.

6.2.2. Análisis de polimorfismos-SSCP del exón 20 en el gen *para*

Debido a que la región amplificada por los iniciadores *kdr4* contiene las dos mutaciones asociadas con la resistencia tipo *kdr* a piretroides y DDT en *Ae. aegypti* (Bregues *et al.*, 2003), decidimos iniciar la búsqueda de polimorfismos en esta región del gen. Los productos de PCR (107 pb) de ~400 mosquitos *Ae. aegypti* de las poblaciones de Loreto, Tecate, Cd. Constitución, Islas Mujeres F2 y la cepa susceptible de referencia New Orleans, fueron analizados mediante la técnica SSCP.

En los ~400 individuos, fueron detectados ocho distintos patrones-SSCP. En la figura 2, se muestra un gel con los distintos patrones de bandas obtenidos a partir de la amplificación del par de iniciadores *kdr4*. La secuencia de dos productos de PCR por cada patrón-SSCP fue analizada, sin embargo, no fueron encontradas diferencias a nivel de nucleótidos. Estos resultados sugirieron que ésta región es muy conservada, o bien, que estas poblaciones de mosquitos no son polimórficas en el exón 20.

Fue hipotetizado que los distintos patrones-SSCP en el exón 20, fueron ocasionados por los polimorfismos presentes en el iniciador de cadena negativa (5'-YAGAWGAACTYCCAAACG-3'). Este iniciador reverso fue diseñado en el inicio del intrón 20 e incluye tres polimorfismos. Si se asume que el número de posibles nucleótidos en cada uno de los tres locus es dos (2^3), entonces pueden obtenerse 8 distintas combinaciones de nucleótidos, esto coincide con los 8 patrones-SSCP encontrados en las cuatro colecciones de mosquitos.

6.2.3. Análisis de polimorfismos-SSCP del exón 21 en el gen *para*

El análisis SSCP de la región amplificada por los iniciadores *kdr2* fue realizado en la cepa resistente a permetrina IMU5-F4 y en la cepa susceptible de New Orleans. Tres distintos haplotipos fueron obtenidos. Las secuencias de ADN de cuatro individuos de la cepa IMU5-F4 y dos de la cepa New Orleans fueron comparadas y alineadas utilizando Clustalw (clustalw.genome.ad.jp).

En ambas cepas de mosquitos, las secuencias de nucleótidos fueron conservadas a lo largo del exón 20 y algunos polimorfismos fueron encontrados en el intrón 20. Sin embargo, la cepa resistente IMU5-F4 presentó un simple polimorfismo en el exón 21, éste consistió en un cambio de guanina a adenina en la primera posición del codón Valina_{1,016} (GTA→ATA), ocasionando una sustitución de aminoácidos de valina (*Val*)

a isoleucina (*Iso*). Esta mutación fue denominada *Val1,016Iso*. En la figura 3 se muestra la posición de ésta mutación junto con las mutaciones reportadas por Brengues *et al.* (2003).

El aminoácido *valina* en el codón 1,016 es considerado un aminoácido silvestre, ya que varias de las librerías de ADN de *Aedes aegypti* han coincidido con éste aminoácido en esta posición. Una de las secuencias de los mosquitos de Islas Mujeres fue homocigota silvestre G/G (*Val1,016/ Val1,016*) y tres fueron heterocigotas A/G (*Val1,016/Iso1,016*). Ninguna de las secuencias provenientes de New Orleans presentó al alelo mutante *Iso1,016*, sugiriendo que la mutación *Val1,016Iso* podría estar relacionada con la resistencia a la permetrina en la cepa de Islas Mujeres.

6.2.4. Sistemas de PCR para Detección de Alelos en los Codones *Iso1,011* y *Val1,016* del gen *para* mediante Curva de Desnaturalización

En esta sección se describe el diseño de un ensayo-molecular mas específico y sencillo, que detecta las mutaciones *Iso1,011Met* y *Val1,016Gly* reportados por Brengues *et al.*, (2003). Por otro lado, también las mutaciones *Iso1,011Val* reportada por Black (2006 no publicada) y la mutación *Val1016Iso* encontrada en este trabajo. Los iniciadores específicos para detectar estas cuatro mutaciones se muestran en la tabla 4. Las frecuencias genotípicas para las mutaciones *Iso1,011Met*, *Iso1,011Val* y *Val1016Iso* se muestran en la tabla 5.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

6.2.4.1. Sistema *Iso1,011Met*

Los iniciadores diseñados para identificar la mutación de adenina a guanina en la tercera posición del codón *Iso1,011*, amplificaron productos de PCR-específicos que pudieron ser discriminados por curva de desnaturalización, a la temperatura de 79°C para el alelo silvestre adenina (*Iso1,011*) y de 84°C para el alelo mutante guanina (*Met1,011*).

En las 32 colecciones de mosquitos evaluadas, detectamos al genotipo homocigoto silvestre *Iso1,011/Iso1,011*, heterocigoto *Iso1011/Met1,011* y al genotipo homocigoto mutante *Met1,011/Met1,011*. Los tres genotipos estuvieron presentes en las cepas

susceptibles de referencia New Orleans y Rockefeller, sugiriendo que esta mutación es neutral, es decir, no tiene ningún efecto en la resistencia a insecticidas.

Por otro lado, la cepa seleccionada con propoxur por 14 generaciones (Bisset *et al.*, 2006) presentó una alta frecuencia del alelo mutante *Met1,011/Met1,011*. Los piretroides y propoxur tienen mecanismos de acción muy distintos y la presencia de éste alelo, probablemente se debe a la reducción de la variabilidad genética desde las primeras generaciones de selección de ésta cepa.

La frecuencia del alelo mutante *Met1,011* no varió entre la cepas de Santiago de Cuba (anterior a selección) y la generación 12 seleccionada con deltametrina (Delta12), sin embargo, se vió reducida en la generación 13 seleccionada con deltametrina (Delta13). Con la misma tendencia, la frecuencia del alelo *Met1,011* en la cepa de Islas Mujeres F2 (anterior a selección) se vió disminuida después de cinco generaciones de selección con permetrina (IMU5F-8). Estos resultados sugirieron que esta mutación no se encuentra asociada con la resistencia a la permetrina.

6.2.4.2. Sistema *Iso1,011Val*

El sistema que detecta la mutación adenina a guanina que ocurre en la primera posición del codón *Iso1,011*, discriminó al alelo silvestre *Iso1,011* (adenina) a la temperatura de desnaturalización de 79°C y al alelo mutante *Val1,011* (guanina) a la temperatura de 84°C. No fueron encontrados homocigotos mutantes *Val1,011/Val1,011*, en ninguna de las colecciones; cerca de 20 colecciones de mosquitos presentaron heterocigotos *Iso1,011/Val1,011*.

La frecuencia del alelo mutante *Val1,011* varió entre 0.01 y 0.188 en las 20 colecciones de mosquitos. La frecuencia de este alelo disminuyó de la generación 12 a la generación 13, de la cepa seleccionada con deltametrina. El alelo mutante se presentó en una frecuencia de 0.044 en la colección de Islas Mujeres y después de cinco generaciones de selección con permetrina desapareció. Estos resultados sugieren que esta mutación no está implicada en la resistencia tipo *kdr* en las cepas seleccionadas con piretroides.

6.2.4.3. Sistema *Val1,016Iso*

El sistema diseñado para identificar la mutación guanina a adenina que ocurre en la primera posición del codón 1,016, detectó al alelo silvestre guanina (*Val1,016*) a una temperatura de 84°C y al alelo mutante adenina (*Iso1,016*) a la temperatura de 79°C. En la figura 4, una gráfica muestra los picos de temperatura de desnaturalización para cada alelo en el sistema *Val1,016Iso*.

Dos colecciones de mosquitos de campo presentaron homocigotos mutantes *Iso1,016/Iso1,016* (Ciudad Habana y Panamá) y 20 de las colecciones o cepas seleccionadas, presentaron heterocigotos *Val1,016/Iso1,016*. La frecuencia del alelo mutante *Iso1,016* varió entre 0.01 a 0.22 en colecciones de campo. Las cepas seleccionadas con insecticidas tuvieron frecuencias del alelo *Iso1,1016* entre 0.4 y 1.0.

Las cepas seleccionadas con permetrina (IMU5-F8), deltametrina (Santiago de Cuba F12 y F13) y la cepa seleccionada con propoxur (Santiago de Cuba F14) mostraron mayores frecuencias del alelo mutante *Iso1,016*. La cepa de Santiago de Cuba resistente a deltametrina, tuvo una frecuencia que aumentó de 0.56 a 0.86, de la generación F12 a F13 respectivamente. En la cepa de Islas Mujeres, la frecuencia del alelo *Iso1,1016* aumentó de 0.22 en la población de campo, a 1.0 después de cinco generaciones de selección. La cepa seleccionada con propoxur presentó una frecuencia del alelo *Iso1,1016* de 0.4.

El aumento en la frecuencia del alelo *Iso1,016*, conforme a la selección con piretroides, sugirió la implicación de ésta mutación en la resistencia tipo *kdr* del mosquito *Ae. aegypti*. En el análisis de QTL se muestra la asociación de este alelo con la resistencia a la permetrina.

6.2.4.4. Sistema *Val1,016Gly*

Este sistema discriminó al alelo silvestre guanina (*Val1,016*) y al alelo mutante timina (*Gly1,016*) que ocurren en la primera posición del codón 1,016, a una temperatura de 79 y 84°C, respectivamente. El alelo mutante *Gly1,011* no fue encontrado en ninguna de las 32 colecciones de mosquitos, indicando que esta mutación no ocurre en poblaciones de *Ae. aegypti* de América. La prueba fue estandarizada con ADN de mosquitos provenientes de Tailandia.

6.2.4.5. Sistemas de PCR de alelos específicos son resueltos en geles de agarosa

Una desventaja de la detección de alelos específicos mediante curva de desnaturalización, es el alto costo de las máquinas de PCR-tiempo Real. Una de los propósitos de éste proyecto es desarrollar pruebas-diagnóstico económicas y sencillas para detección de alelos resistentes. Para reunir este objetivo, los productos de las reacciones de PCR alelo-específico, fueron fragmentados por electroforesis en geles de agarosa al 3.5 y 4.0 % disuelto en buffer TBE 1X.

En la figura 5 se muestra un gel de agarosa de alta resolución (GenePure HiRes agarose). Los productos de PCR alelo-específico para el sistema *Val1,016Iso* fueron fragmentados, una banda de 68 pares de bases (bp) a partir de un mosquito homocigoto para el alelo resistente *Iso1,1016/ Iso1,1016 (A/A)* fue amplificada por el iniciador de cadena corta. Una banda de 85 pb fue obtenida a partir de mosquitos homocigotos susceptibles *Val1,1016/ Val1,1016 (G/G)* y ambas bandas se detectaron en los mosquitos heterocigotos *Val1,1016/ Iso1,1016*. Los sistemas *Iso1,011Met* e *Iso1,011Val* también fueron resueltos en geles de agarosa al 4 %.

6.2.4.6. Evolución de las mutaciones *kdr*

Hubo un total de 274 sitios en las 88 secuencias alineadas (utilizando a *An. gambiae* como un grupo externo), incluyendo al intrón y las regiones que lo rodean (exón 20 y 21). En las secuencias de *Ae. aegypti*, hubo 114 sitios segregativos y 31 de estos sitios presentaron inserciones/delecciones. Hubo 31 haplotipos, una diversidad de nucleótidos de $\pi=0.146$, el número promedio de diferencia de nucleótidos fué $k=35.58$. Sin embargo, la diversidad no estuvo distribuida uniformemente a lo largo del intrón. Los primeros 100 nucleótidos del intrón estuvieron relativamente conservados, al igual que los últimos 75 nucleótidos.

El número mínimo de eventos de recombinación fue $R_m=33$, indicando abundante recombinación entre los sitios segregantes dentro del intrón. Sin embargo, hubo una gran cantidad de desequilibrio de unión entre los sitios segregantes. De 5,356 comparaciones de pares entre los sitios segregantes, 2,409 (45%) fueron significativos usando la prueba exacta de Fisher, y 1,803 (34%) fueron significativas al usar la corrección de Bonferroni.

El desequilibrio de unión no estuvo distribuido uniformemente en todos los sitios segregantes. Los alelos en las posiciones 1 y 3 del codón *Iso1,011*, estuvieron en desequilibrio significativo con 4 de los 103 sitios, y la magnitud del desequilibrio fue baja. En contraste, las posiciones 1 y 3 del codón *Val1,016* estuvieron en desequilibrio significativo en 59 y 36 de los 103 sitios respectivamente, mientras que la posición 2 del codón estuvo en desequilibrio significativo con 3 de los 103 sitios.

La filogenia de máxima parsimonia del intrón 20 y de las regiones que lo rodean, a partir de 87 mosquitos con diferentes genotipos en los codones 1011 y 1016 fue analizada. El análisis bootstrap indicó la presencia de 3 cladas, con un soporte mayor al 80%. Esta fueron denominadas cladas 1, 2 y 3. En la figura 6 se muestra la alineación de las tres cladas obtenidas a partir del análisis del intrón 20 del gen *para*.

Las frecuencias de alelos *Iso1,011*, *Met1,011*, *Val1,011*, *Iso1,016* y *Gly1,016* fueron comparadas entre las tres cladas. La frecuencia de *Iso1,011* estuvo distribuida independientemente entre las tres cladas (prueba de Fisher $P=0.1654$), así como *Val1,011* ($P= 0.0874$) y *Met1,011* ($P=0.7465$). Sin embargo, hubo un evidente exceso de *Val1,016* en la clada 1 ($P= 3.38 \times 10^{-6}$) y un exceso de *Iso1,016* en la clada 2 ($P= 7.39 \times 10^{-10}$). El alelo *Gly1,016* estuvo independientemente distribuido entre las tres cladas ($P= 0.4629$).

6.3. Mapeo de QTL que controlan la resistencia a la permetrina en *Ae. aegypti*

6.3.1. Fenotipo de la familia de mapeo

Cinco familias de mapeo F3 fueron seleccionadas en base al número de huevecillos que fueron obtenidos. Las LC50 de permetrina para las familias de mapeo-F3: 1.1, 3.5, 5.1, 6.4 y 14.3, estuvieron entre un rango de 0.7 a 1.5 μg de permetrina por botella. La familia F31.1, con una LC50 de 1.2 μg /botella fue elegida para realizar el mapeo de QTLs.

Alrededor de 780 adultos de la familia de mapeo F31.1, fueron expuestos a una concentración de permetrina de 1.2 μg /botella. Después de la hora de exposición, fue registrado un total de 127 (16%) mosquitos vivos. El restante 84 % de los mosquitos cayeron derribados a la hora de exposición, sin embargo, a las cuatro horas post-exposición se registraron 293 (39 %) mosquitos recuperados y 351 (45%) mosquitos muertos. El ADN de cada uno de los individuos fue extraído, registrando el sexo del mosquito.

6.3.2. Marcadores-SSCP informativo en la familia de mapeo F31.1

De un total de 107 pares de iniciadores de los genes de resistencia que fueron optimizados con el pool de ADN de Puerto Rico, 15 no pudieron ser amplificados. Esto posiblemente se debe a errores en el diseño de iniciadores, o bien, a la presencia de intrones lo suficientemente grandes como para evitar la amplificación. En la tabla 6, se muestra una lista de los genes analizados en la familia de mapeo junto con la secuencia de iniciadores y temperatura de alineamiento

Las regiones amplificadas por los 92 genes de resistencia restantes, fueron sometidas al análisis SSCP con la finalidad de identificar polimorfismos. Los patrones de bandas-SSCP fueron comparados entre abuelos-P1, padres-F1 y 10 individuos de la progenie F31.1. Se obtuvo un total de 31 marcadores monomórficos (no informativos) y 61 marcadores polimórficos (informativos).

Por otro lado, se utilizaron marcadores-SSCP obtenidos de ADN complementario de genes previamente mapeados (Fulton, 2000; Gomez-Machorro, 2004). Alrededor de 43 marcadores genómicos fueron amplificados y analizados por la técnica de SSCP en los abuelos-P1, padres-F1 y 10 individuos de la progenie-F3. En el cromosoma I, siete marcadores fueron monomórficos y 11 polimórficos. En el cromosoma II, analizamos 16 marcadores, de estos ocho fueron polimórficos. Por último, en el cromosoma III, de nueve marcadores analizados, ocho resultaron polimórficos. En suma, obtuvimos 16 marcadores monomórficos y 27 polimórficos. En la tabla 7, se muestran los marcadores-SSCP utilizados en el mapeo de la familia F31.1. La secuencia de los iniciadores fue tomada de las publicaciones de Fulton *et al.*, (2001) y Gomez-Machorro *et al.*, (2004).

En total, obtuvimos 88 marcadores-SSCP informativos en la familia F31.1 (61 marcadores de resistencia y 27 marcadores genómicos). Las secuencias de ADN amplificadas por 51 genes de resistencia y 19 marcadores genómicos fueron obtenidas a partir de los abuelos P1 y padres F1 de la familia F31.1.

La reducción en el número de marcadores analizados, se debió a que fue necesario elegir a los marcadores genómicos que estuvieran lo suficientemente alejados en el mapa genético (10cM). Por otro lado, debido a que los genes de resistencia no habían sido previamente mapeados, decidimos que si dos o más genes de resistencia compartían el mismo *contig*, solo uno de ellos sería enviado a secuenciar. Esto fue para evitar la

redundancia de marcadores en la misma posición genética, ya que se espera que los genes de un mismo *contig* segreguen juntos debido a su proximidad.

6.3.3. Marcadores-SNP informativos usando los sistemas de detección de alelos específicos en la familia de mapeo F31.1

Las secuencias de la abuela-P1, abuelo-P1, madre-F1 y padre-F1 de la familia de mapeo, fueron analizadas en 51 genes de resistencia, solo 34 genes resultaron parcial o completamente informativos. A partir de estos 34 genes, se diseñaron sistemas para detección de SNPs. Un total de 21 sistemas de genes de resistencia trabajaron conforme a la segregación esperada, siete sistemas no desarrollaron curvas definidas y seis sistemas no segregaron como marcadores informativos.

Por otro lado, las secuencias de los 27 marcadores-genómicos fueron analizadas, 19 genes resultaron completa o parcialmente informativos. Los sistemas para detección de SNPs de estos 19 marcadores fueron analizados en los abuelos-P1 y padres-F1. En total, nueve sistemas segregaron conforme a lo esperado y diez no presentaron curvas de desnaturalización definidas.

Los marcadores-SNP de los genes previamente mapeados están distribuidos en todo el genoma, tres sistemas en el cromosoma I (*cathepsin*, *ARC2* y *APN*), dos sistemas en el cromosoma II (*mucin* y *chymotrypsin*) y 5 sistemas en el cromosoma III (*maltase*, *vitelogeninC*, *UGALS*, *Val1016Iso* y *apyrase2*). El *sexo* es un marcador fenotípico visible, dicho marcador se encuentra en el cromosoma I.

En total, 32 marcadores-SNP basados en sistemas de PCR específico para alelos fueron informativos en la familia de mapeo F31.1. Nueve sistemas de detección de SNPs se basaron en genes previamente mapeados (Fulton *et al.*, 2001). Los 21 sistemas restantes, se diseñaron a partir de genes de resistencia que nunca han sido mapeados y su rol exacto en la resistencia es desconocido.

En la tabla 8, se muestra el nombre de los marcadores-SNP, el gen a partir del cual se diseñó el sistema de detección de alelos, la secuencia del iniciador y el cromosoma donde fue mapeado cada marcador. Los genes que inician con el prefijo *CYP* corresponden a genes de monoxidasas del citocromo-P450, los genes que inician con el prefijo *CCE*

pertencen a la familia de las carboxi-esterasas y los genes que inician con el prefijo *GST* corresponden a los genes de la familia glutatión-s-transferasas.

El genotipo de cada uno de los 441 individuos de la familia F31.1, fue determinado para cada uno de los 32 marcadores-SNP. Los alelos específicos de cada marcador-SNP fueron discriminados mediante la lectura visual de las gráficas de la curva de desnaturalización.

6.3.4. Posición de los marcadores de resistencia en el mapa genético

La posición genética de nueve marcadores genómicos y de 21 nuevos marcadores de resistencia fue estimada utilizando el programa JoinMap. El umbral LOD donde los marcadores fueron separados en tres grupos de unión (cromosomas) fue LOD= 3.1. A partir del umbral 5.9, un solo marcador del cromosoma III formó un cuarto grupo de unión, indicando una buena consistencia en el mapa genético.

La posición de los marcadores genómicos coincidió en su mayor parte con las posiciones del mapa genético previamente publicado (Black y Severson, 2005). Sin embargo, fue necesario hacer algunos ajustes en el cromosoma I y III. Para el cromosoma I, se dió un orden fijo a los marcadores genómicos *cathepsinB*, *sex*, *ARC2* y *APN*. Para el cromosoma II no se hicieron ajustes ya que el orden de los marcadores fue consistente.

Por último, en el cromosoma III, utilizamos un orden fijo de marcadores genómicos (*malt*, *vitgconv*, *UGALS* y *Apyr2*) y manualmente se asignaron valores LOD altos (~90) a cada marcador. Con estos ajustes, el mapa genético obtenido en el programa JMMAP, fue consistente con los mapas genéticos previamente publicados.

La posición genética de los marcadores de resistencia se basó en los valores LOD más altos para las comparaciones entre pares de genes. Valores LOD mayores a tres, por lo general soportan fuertemente la veracidad de la distancia genética entre pares de marcadores. En la figura 7 se muestra la posición genética de los marcadores-SNP mapeados a partir de la familia de mapeo F31.1.

Siete de los 22 marcadores de resistencia fueron mapeados en el cromosoma I. La posición genética de los marcadores *CYP4C52*, *CYP4G35*, *CYP6P12v2*, *CYP6P12v1*, *CYP9AE1*, *CYP6AL3* Y *CYP6BB2.1* estuvo en los 26, 28, 32, 36, 42, 59 y 66 centimorgans (cM) respectivamente.

En el cromosoma II, seis marcadores-SNP de genes de resistencia: *CCEbe20*, *CYP12F5*, *CCEAe1D*, *GSTe7*, *CYP9M8* y *CYP9J32* fueron mapeados en las posiciones 25, 31, 33, 37, 49 y 52 cM, respectivamente. Por último, nueve genes de resistencia: *CYP4H30*, *Val1,016Iso (para)*, *CYP4H32*, *CYP325R1*, *CCEunk0*, *CCEae10*, *CYP9J19*, *CYP9J29* y *CYP6BY1* fueron mapeados en el cromosoma III, exactamente en las posiciones 23, 32, 33, 37, 37, 48, 52 y 53, respectivamente.

6.3.5. Asociación genotipo-fenotipo en los 32 marcadores-SNP

Una prueba de contingencia chi-cuadrada indicó que los genotipos de 18 marcadores-SNP, no estuvieron distribuidos independientemente del fenotipo (*vivo*, *recuperado* y *muerto*), dando una pista de cuales genes podrían estar asociados con la resistencia. En la familia de mapeo F31.1, la variación en la susceptibilidad a la permetrina, exhibió una asociación significativa con los genotipos de los marcadores *CYP6P12v1* y *CYP6BB2.1* en el cromosoma I, con valores de probabilidad *F* de 9.27×10^{-5} y 1.64×10^{-14} , respectivamente.

En el cromosoma II, los genotipos de cuatro marcadores-SNP: *Mucin*, *CYP12F5*, *Chymo* y *CYP9M8* estuvieron significativamente asociados con el fenotipo. Los valores de probabilidad *p* variaron entre 5.4810×10^{-4} y 7.11×10^{-5} . Estos cuatro marcadores se encontraron distribuidos a lo largo del cromosoma II, a 28, 31, 43 y 49 cM, respectivamente.

Los marcadores con probabilidades (*p*) menores, es decir aquellos más fuertemente asociados con la resistencia estuvieron en el cromosoma III. A excepción del marcador *Apyr1* localizado a 57 cM, todos los marcadores analizados en el cromosoma III, estuvieron significativamente asociados con el fenotipo. Los marcadores más fuertemente asociados con la susceptibilidad a insecticidas fueron: *Val1,016Iso (para ó kdr)*, *CCEunk0*, *CYP325R1* y *CYP4H32*, sugiriendo que estos controlan en cierto grado la respuesta a la exposición a la permetrina.

La asociación genotipo-fenotipo más evidente, fue exhibida por el marcador *Val1,016Iso* ($p = 9.14 \times 10^{-89}$) en el gen *para*. La presencia de dos alelos mutantes A/A (*Iso1,016/Iso1,016*) heredados por la abuela resistente a la permetrina (IMU5-F4) fue correlacionado con el fenotipo *vivo* en un 100%. Estos mosquitos no fueron derribados

por el insecticida, indicando que estos mosquitos presentan el mecanismo de resistencia tipo kdr.

La presencia de un solo alelo heredado por la abuela (*Iso1,016/Val1,016*), determinó la sobrevivencia del 43% de los mosquitos, por otro lado, la presencia de dos alelos heredados por el abuelo susceptible *Val1,016/Val1,016* se correlacionó con la sobrevivencia del 13% de los mosquitos de la familia de mapeo. Este patrón indica la dominancia del alelo *Val1,016* (susceptible) sobre el alelo *Iso1,016* (resistente), ya que para que un mosquito no sea derribado por la permetrina, se requieren dos copias del alelo resistente *Iso1,016*. En otras palabras, una sola copia del alelo resistente no es suficiente para evitar el derribe a la exposición a la permetrina.

En la figura 8, se muestra una gráfica donde puede observarse la correlación entre el fenotipo sobrevivencia en función al número de alelos heredados por el padre susceptible (New Orleans). Los marcadores *CCEunk0*, *CYP4H32* y *CYP325R1*, siguieron un patrón similar al marcador *Val1,016Iso*. Para los marcadores *CYP4H32* y *CCEunk0*, el 75 y 92% de los mosquitos con dos alelos heredados por la abuela sobrevivieron a la exposición de permetrina, mientras que los mosquitos con dos alelos heredados por el abuelo susceptible tuvieron una sobrevivencia del 18 y 14%, respectivamente.

En la figura 9, se muestra el efecto de los genotipos de los marcadores *Val1,016Iso*, *CCEunk0*, *CYP4H32* y *CYP325R1* en la recuperación a las 4 horas de la exposición a la permetrina. Para los marcadores *CYP4H32* y *CYP325R1*, la presencia de uno o dos alelos provenientes de la línea resistente, estuvo asociada con ~50-65% de la recuperación de los mosquitos. La presencia de dos alelos provenientes del padre susceptible estuvo correlacionada con el ~20-40% de la recuperación.

En el cromosoma III, encontramos un segundo grupo de marcadores: *CCEae10*, *CYP9J19*, *CYP9J29* y *CYP6BY1* asociados significativamente con el fenotipo. Los valores de probabilidad p se encontraron en un rango de 1.06×10^{-12} a 3.36×10^{-20} . En estos marcadores, la presencia de dos alelos heredados por la abuela resistente estuvo asociada con la resistencia al derribe en el ~50% de los mosquitos. La presencia de un solo alelo heredado por la abuela resistente estuvo correlacionado con el ~17 al 20% de la sobrevivencia, mientras que la carencia de alelos heredados por la abuela resistente,

estuvo asociado con el ~6-10% de la sobrevivencia a la exposición a la permetrina (ver Figura 10).

Por otro lado, la presencia de uno o dos alelos heredados por la abuela resistente, en los marcadores *CCEae10*, *CYP9J19*, *CYP9J29* y *CYP6BY1*, estuvo relacionada con el ~48-55% de la recuperación de los mosquitos a las 4 horas post-exposición. La carencia de alelos resistentes en el marcador *CCEae10*, estuvo relacionada con el 0% de la recuperación, mientras que en los otros marcadores, la presencia de dos alelos del padre susceptible estuvo asociado con el 15-40% de la recuperación (ver Figura 11).

En el cromosoma II, los marcadores *CYP12F5*, *CCEaE1D*, *GSTe7* y *Chymo*, estuvieron asociados con el fenotipo recuperación en los mosquitos expuestos a la permetrina. Entre el 58 al 88% de los mosquitos que presentaron dos alelos heredados por la abuela se recuperaron a las 4 horas de exposición a la permetrina. Entre el 42 al 60% de los mosquitos con un solo alelo heredado por la abuela fueron capaces de recuperarse. Por otro lado, de los mosquitos que carecen de alelos heredados por la abuela, solo el ~35% se recuperó (ver Figura 12).

6.3.6. Mapeo de QTL que controlan la resistencia a la permetrina

La evidencia de la asociación del fenotipo con cierto marcador, es medida mediante los valores LOD. El valor LOD (log of odds ratio) se refiere a la probabilidad de rechazar la hipótesis nula (H_0 = la correlación entre fenotipo y genotipo es equivalente a 0). Un valor LOD equivalente a 3.0, indica que la probabilidad de que un marcador se correlacione con el fenotipo (H_a), es 1000 veces más grande que la hipótesis nula (H_0). En cada análisis, un valor LOD umbral, es calculado a partir de 1000 permutaciones en el programa Cartographer. Todas las probabilidades bajo esta línea umbral son consideradas no-significativas.

El mapeo de intervalos (MI) y mapeo de intervalos compuestos (MIC) fue realizado con el programa Cartographer. El análisis de Mapeo de Intervalos utilizando al set completo de datos, identificó tres loci que sobrepasan significativamente al umbral LOD (2.1). Los tres loci fueron encontrados en el cromosoma III.

Uno de estos QTL se encuentra entre 30-33 cM, este loci corresponde al marcador *Val1,016Iso (kdr)* y tuvo el valor LOD más alto (LOD=31). El segundo QTL se encontró

entre los 37-47 cM, con valores LOD de ~20, los marcadores presentes en éste QTL fueron *CYP4H32*, *CCEunk0*, *UGALS* y *CCEae1o*. El tercer QTL se encontró a 51-53 cM (LOD=22), incluyendo a los marcadores *CYP9J19*, *CYP9J29* y *CYP6BY1*.

Cuando la totalidad de datos se analizó en el programa de Mapeo Compuesto de Intervalos (MIC), obtuvimos dos QTL asociados al rasgo resistencia en el cromosoma III. El primer QTL se compone del marcador *Val1,016Iso* a 31 cM. El segundo QTL se formó por los genes *CYP4H32*, *CCEunk0* y *UGALS*. En éste análisis, los valores LOD de los marcadores *CCEae1o*, *CYP9J19*, *CYP9J29* y *CYP6BY1* no sobrepasaron al umbral calculado de 2.3.

Los resultados de ambos análisis indicaron una fuerte correlación entre el marcador *Val1,016Iso (kdr)* con el fenotipo resistencia. La intensidad de ésta asociación podría estar enmascarando el efecto de otros genes que quizás tengan importancia en la sobrevivencia o recuperación a la exposición a la permetrina en la familia de mapeo. Para evadir este problema, fueron creados distintos sets de datos para analizarse independientemente en ambos programas. Los datos se formatearon en el programa Fortran.

El primer grupo de datos fue separado en dos subgrupos, machos y hembras. En el segundo grupo de datos, los individuos con un genotipo homocigoto resistente (*Iso1,016/Iso1,016*) para el marcador *kdr* fueron descartados. Y por último, el tercer análisis consistió en descartar a los individuos con fenotipo vivos y utilizar solamente los datos de los individuos recuperados y muertos.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

6.3.6.1. Análisis MI y MIC: QTL en hembras y machos

El análisis de Mapeo de Intervalos (MI) identificó tres loci significativos en el cromosoma III, para ambos sexos. El QTL-1 correspondió al marcador *Val1,016Iso* (gen para o *kdr*). El segundo QTL identificado correspondió a los marcadores *CYP4H32*, *CCEunk0*, *UGALS* y *CCEae1o* y el tercer QTL correspondió a los marcadores *CYP9J19*, *CYP9J29* y *CYP6BY1*.

Los loci correspondieron a los mismos QTL encontrados en el análisis de mapeo de intervalos inicial, sin embargo, los valores LOD para machos fueron mayores al los valores LOD calculados para las hembras. Por ejemplo, para el QTL-1 que corresponde

al gen *kdr*, el valor LOD para hembras fue de 13.5, mientras que en los machos fue de 20.1. En la Figura 13, se muestra una gráfica de los valores LOD calculados a lo largo de los tres de cromosomas. Las curvas que sobrepasan al valor LOD-umbral (línea horizontal), indican la posición de los loci significativamente asociados al fenotipo (QTL). Se sugiere que los marcadores que rodean a estos loci, se encuentran asociados al QTL.

En el análisis de intervalos compuestos, encontramos el mismo patrón de QTLs identificados en el análisis MIC del set completo de datos. En este análisis se encontraron dos QTLs en el cromosoma III. El primero consistió en el gen *kdr* y el segundo QTL correspondió a los marcadores *CYP4H32*, *CCEunk0*, *UGALS* y *CCEae1o* (ver Figura 14).

Una diferencia consistente entre los análisis MI y MIC, es que éste último, descarta el efecto de los marcadores *CYP9J19*, *CYP9J29* y *CYP6BY* en el cromosoma III. Este último grupo de marcadores no sobrepasó el umbral LOD de 2.1 y 2.3 para hembras y machos, respectivamente. En el análisis MIC, también fue observado que los valores LOD de los machos fueron mayores a los valores LOD de las hembras.

6.3.6.2. Análisis MI y MIC: QTL al omitir el genotipo resistente *Iso1,016/Iso1,016* para el marcador *Val1,016Iso*

En éste experimento, se retiraron los datos de los individuos con genotipo *Iso1,016/Iso1,016* del marcador *Val1,016Iso*. En el mapeo de intervalos (MI), un solo QTL entre los 40-45 cM fue detectado en el cromosoma II. El marcador asociado al fenotipo en este loci, fue el marcador genómico *chymo*. El valor LOD calculado para este loci (2.3) fue ligeramente mayor al umbral LOD (2.2) (ver Figura 15).

En el análisis MI, el efecto del gen *kdr* fue nulo. Estos resultados corroboraron la fuerza del genotipo *Iso1,016/Iso1,016* al afectar el fenotipo resistencia. Por otro lado, en éste análisis el efecto de los genes *CYP9* (cromosoma III) en el fenotipo, fue más intenso que *kdr*, sin embargo no logró sobrepasar al umbral LOD. En éste análisis, el cromosoma I no tuvo ningún efecto en el fenotipo.

Para el análisis MIC, un solo QTL en el cromosoma I, entre los 50-53 cM fue identificado. Los marcadores genómicos que rodean a este loci fueron *APN* y *ARC2*, sin embargo, en el análisis de asociación por chi-cuadrada, ninguno de estos marcadores se

asoció significativamente al fenotipo. Probablemente, un gen “desconocido” asociado con la resistencia, se encuentra cerca de estos dos marcadores (Figura 16). En éste análisis, pudo observarse un pico no significativo en el cromosoma II, correspondiendo al marcador *chymo*. El valor LOD calculado para este marcador no fue lo suficientemente fuerte (LOD 2.0) como para sobrepasar el umbral (2.4).

Al retirar los mosquitos con el genotipo (*Isol,016/Isol,016*) de la base de datos, se redujo significativamente el número de mosquitos sobrevivientes, por lo cual, la implicación de los QTL identificados en éste análisis, constituyen una pista sobre los principales sitios que podrían estar afectando la resistencia, debida mecanismos distintos a *kdr* (por ejemplo, mecanismos enzimáticos).

6.3.6.3. Análisis MI y MIC: QTLs al omitir a los mosquitos *vivos* (resistentes al derribe)

En el mapeo de intervalos, después de descartar a los individuos con el fenotipo *vivos* (*kdr*), pudieron detectarse dos QTLs, el primero en el cromosoma II y el segundo en el cromosoma III. El QTL de cromosoma II, se encuentra entre los 25-45 cM. Los marcadores que componen a éste QTL son *CYP12F5*, *CCEae1D*, *GSTe7* y *Chymo*. El valor LOD de éste QTL ligeramente sobrepasó al umbral-LOD calculado (2.0).

El segundo QTL identificado por el análisis MI, estuvo localizado entre los 52-53 cM en el cromosoma III. Los marcadores asociados a este QTL fueron *CYP9J19*, *CYP9J29* y *CYP6BY1*, con un valor LOD de 2.3 (Figura 17).

Por último, el análisis compuesto de intervalos, encontró un solo QTL en el cromosoma I, éste se localizó entre los 48-54 cM. Los marcadores que se asociaron a este QTL fueron *ARC2* y *APN*. El valor LOD obtenido sobrepasó ligeramente al umbral calculado por este programa (2.0) (Figura 18). Debido a que los genes *ARC2* y *APN* no han sido asociados con la resistencia a insecticidas, sugerimos que un gen de resistencia desconocido se encuentra cercano a éstos marcadores.

Los QTL del cromosoma II y III identificados en el análisis MI, no fueron significativos en el análisis MIC. Más aún, el análisis MIC identificó un QTL en el cromosoma I, que no fue detectado en el análisis IM. Estas diferencias quizás se deban a la reducción en el número de datos analizados. Sin embargo, el mapeo de intervalos

compuestos ha demostrado ser mas preciso en la detección de QTLs (Mackay, 2001), por lo tanto no podemos descartar la importancia de éste QTL en la recuperación de los mosquitos a la exposición a la permetrina.

6.3.7. Asociación entre la segregación de la Mutación *Met1,011* e *Iso1,016* en el Gen *para* en la Familia de Mapeo F31.1.

La segregación del marcador *Iso1,011Met* fue registrada en la familia de mapeo F31.1. El genotipo de la abuela-P1 (IMU-F4) fue heterocigoto *Iso1,011/Met1,011* para ésta substitución, mientras que el abuelo-P1 (New Orleans) fue homocigoto para el tipo silvestre *Iso1,011/Iso1,011*. La generación filial-1, resultó heterocigota *Iso1,011/Met1,011*.

Los genotipos homocigoto silvestre, homocigoto mutante y heterocigoto, fueron recuperados en los 400 individuos de la familia de mapeo-F31.1, con una proporción de 91, 29 y 300, respectivamente. La prueba de contingencia chi-cuadrada, no detectó asociación entre el fenotipo *vivo, muerto y recuperado* con los genotipos para este marcador, indicando que la mutación *Iso1,011Met* no está asociada con la resistencia a la permetrina.

Debido a la contigüidad de los marcadores *Iso1,011Met* y *Val1,016Iso* en el gen *para* (~270 pares de bases), fue esperado encontrar segregación dependiente de alelos entre éstos dos loci. Realizamos una prueba de contingencia chi-cuadrada para determinar si existe asociación entre los genotipos para ambos marcadores. Los resultados indicaron que los genotipos de los marcadores *Iso1,011Met* y *Val1,016Iso* segregaron en forma independiente. Una explicación a estos resultados es la presencia de recombinación entre ambos loci a pesar de su contigüidad.

La frecuencia de recombinación calculada entre los marcadores *Iso1,011Met* y *Val1,016Iso*, mediante JoinMap, fue de 0.21. Sin embargo, el modelo de recombinación teórico (esperado), no se ajustó al modelo observado. En la tabla 9, aparecen los genotipos esperados y observados para ambos loci. En este modelo, se aplicó una proporción de recombinación de 0.001. Sin embargo el valor de chi cuadrada observada nunca fue menor al valor chi-cuadrada calculado en el modelo de recombinación.

DISCUSIONES

La fuerte presión de selección ejercida en la generación F2 de la población de Islas Mujeres (sobrevivientes ~20%), parece haber seleccionado el mecanismo de resistencia por insensibilidad del sitio blanco (resistencia kdr). De la misma forma, en el estudio realizado por Rodríguez *et al.*, (2005), la cepa Delta-13, fue seleccionada con la LC90 para deltametrina durante 12 generaciones, obteniendo una cepa con resistencia cruzada a todos los piretroides.

Por lo general, la mayoría de los estudios utilizan este tipo de estrategia para seleccionar cepas resistentes, sin embargo, una desventaja importante surge al eliminar a gran parte de la población, disminuyendo la variabilidad genética y por ende, otros posibles mecanismos de resistencia. Es posible que una presión de selección del 50%, permita la selección de otros mecanismos de resistencia además de la resistencia tipo kdr.

El fenotipo kdr se refiere a la capacidad de un mosquito a no ser derribado durante la exposición a la permetrina. Actualmente, este mecanismo es inferido mediante bioensayos de resistencia cruzada piretroide-DDT y por el uso de los inhibidores de enzimas PBO y TPE. Los kits (WHO) para detección de la resistencia, consisten en papeletas impregnadas con 0.25% y 1.0% de permetrina. El tiempo de exposición recomendado es de una hora. Los datos que comúnmente se registran, son el tiempo knockdown 50 y la proporción de mosquitos vivos, después de una hora y 24 horas post-exposición.

Se ha inferido que los mosquitos sobrevivientes a este tiempo de exposición, son homocigotos para la mutación kdr. Sin embargo, los resultados de este trabajo indican que la frecuencia del genotipo homocigoto-resistente es muy baja (0.0 a 0.2) en las poblaciones de campo de *Ae. aegypti*. Esto coincide con los estudios de la frecuencia del

genotipo resistente en poblaciones de *An. gambiae* resistentes a piretroides (Ranson *et al.*, 2000b; Chandre *et al.*, 1999).

Si tomamos en cuenta que los bioensayos son capaces de detectar el mecanismo de resistencia *kdr* únicamente en organismos homocigotos-resistentes y además, la frecuencia de este genotipo en la población de campo es muy baja, entonces podemos inferir que la detección de este mecanismo de resistencia mediante bioensayos, podría estar sub-estimando la magnitud de la resistencia en campo.

En éste trabajo, la exposición de los mosquitos de la familia F31.1 a una concentración de permetrina de 1.2 µg resultó en la resistencia tipo *kdr* del 15% y recuperación del 35% de los mosquitos después de 4-24 horas. En forma interesante, pudimos observar que la mitad de los mosquitos recuperados después de 4 horas resultaron heterocigotos para el alelo resistente. Por lo cual, podemos sugerir que la detección de la resistencia tipo *kdr*, estaría mejor fundamentada si el registro de mortalidad se realiza a las 24 horas, en vez de una hora post-exposición.

En éste trabajo, se desarrolló la primera técnica para detección de alelos asociados significativamente a la resistencia tipo *kdr* en el mosquito *Ae. aegypti*. La mutación Iso1,016 puede ser fácilmente detectada en geles de agarosa a partir de ADN de mosquitos colectados en campo. Sin embargo, la prueba diagnóstico molecular debe realizarse en conjunto con bioensayos de susceptibilidad, ya que esta prueba solo es capaz de detectar la resistencia por sitio blanco.

En retrospectiva, una posible estrategia para la detección de este mecanismo de resistencia en poblaciones de campo, podría incluir bioensayos de botella a concentraciones LC50 de insecticidas piretroides, por ejemplo 1.0 µg de permetrina. Después de una hora de exposición, los mosquitos pueden ser colocados en un contenedor a temperatura ambiente; 24 horas después, puede tomarse una muestra de mosquitos vivos ~30-50 mosquitos, extraer ADN y correr el PCR de alelos específicos.

Además de calcular la frecuencia de genotipos heterocigotos y homocigotos en los organismos sobrevivientes, debe agregarse un número de genotipos susceptibles en la misma proporción a los organismos sobrevivientes evaluados. Por ejemplo, si la prueba diagnóstico se realiza en 30 mosquitos sobrevivientes, entonces, los datos de 30 mosquitos susceptibles deben agregarse a la base de datos, ya que los bioensayos se

realizaron con una LC50. Una vez que se calcule la frecuencia del genotipo/alelos kdr en poblaciones de *Ae. aegypti* con resistencia a piretroides, será posible realizar modelos donde se pueda calcular la evolución de la resistencia en base a la densidad real de mosquitos, presión de selección aplicada con el grupo de insecticidas, la frecuencia y viabilidad de los genotipos/alelos en la población.

La baja frecuencia de alelos resistentes en poblaciones naturales de mosquitos, en ausencia de presión de selección con insecticidas, podría estar relacionada con una menor viabilidad de éstos alelos. En el mosquito *Culex*, la resistencia por esterases elevadas esta relacionada con un mayor costo en la depredación, desarrollo larvario prolongado (Bourget *et al.*, 2004), competencia en la cópula (Berticat *et al.*, 2002), entre otros. Sin embargo, los mecanismos que provocan esta baja viabilidad no han sido estudiados en el mosquito *Ae. aegypti*.

La resistencia kdr es el resultado de una alteración en el canal de sodio, dicha alteración se debe a simples cambios de aminoácidos que cambian la estructura del poro del canal de sodio y permiten una más rápida disociación entre el insecticida y el poro del canal. El poro del canal se forma principalmente de aminoácidos con carga negativa, los cuales atraen una corriente de iones de sodio (+) hacia el interior de la membrana (Soderlund y Knipple, 2003).

Las sustituciones encontradas en el canal de sodio de *Ae. aegypti* en los codones *Iso1,011Met* e *Iso1,011Val* incluyen cambios de aminoácidos no-polares a aminoácidos aniónicos. Por otro lado, la mutación encontrada en Tailandia *Val1,016Gly*, consiste en un cambio de aminoácido aniónico a aniónico. La mutación *Val1,016Iso* encontrada en poblaciones de mosquitos de América, consistió en un cambio de aminoácido aniónico a un aminoácido no-polar. Aún se desconoce la forma en que estas mutaciones pueden alterar al poro del canal.

La respuesta neurofisiológica a piretroides en larvas de *Ae. aegypti* con la mutación *Iso1,011Met* fue evaluada por Brengues, *et al.*, (2003). Se requirió ~1400 veces mas concentración de permetrina para inducir descargas repetitivas en las cepas resistentes, sugiriendo la asociación entre la resistencia kdr y la mutación *Iso1,011Met* en cepas resistentes de América del Sur, sin embargo, el estudio manejó una muestra no significativa (n=10).

Los resultados de nuestro estudio, indicaron que la frecuencia de los alelos *Val1,011* y *Met1,011* no incrementó conforme a la selección con piretroides en las cepas de Islas Mujeres y Santiago de Cuba, sugiriendo que esta mutación no se encuentra asociada con la resistencia a los piretroides. Más aún, la presencia de la mutación *Met1,011* en las cepas susceptibles de referencia soporta la hipótesis de la neutralidad de esta mutación en los canales de sodio.

Una hipótesis que puede explicar la diferencia entre los resultados de Brengues *et al.*, y los resultados obtenidos en nuestro estudio, es que la mutación *Met1,011* reportada para las cepas resistentes a piretroides de Brazil, estuvo acompañada de una segunda mutación en el codón *Gly923* confiriendo un cambio a valina (*Val923*). La evaluación de la sustitución *Val923* en conjunto con *Met1,011* podría ayudar a determinar la importancia de estas mutaciones en la resistencia en *Ae. aegypti*.

La mutación *kdr* que realmente estuvo asociada con la resistencia a piretroides en las poblaciones de mosquitos de América, fue *Val1,016Iso*. La primera evidencia, fue el incremento en la frecuencia del alelo *Iso1,016* en las cepas seleccionadas con piretroides. La segunda evidencia consistió en el análisis de asociación entre los genotipos A/A (*Iso1,016/Iso1,016*), A/G (*Iso1,016/Val1,016*) y G/G (*Val1,016/Val1,016*) con la respuesta a la exposición a la permetrina en la familia de mapeo.

El marcador *Iso1,011Met* fue mapeado en la familia F31.1. Debido a que éste codón se encuentran a solo ~300 pb de distancia de marcador *Val1,016Iso*, fue esperado obtener una asociación similar entre los genotipos de ambos marcadores y el fenotipo. Sin embargo, los genotipos del marcador *Iso1,011* no estuvieron asociados con la resistencia.

Una explicación a estos resultados, es la hipótesis que implica la ocurrencia de recombinación entre ambos marcadores. Diseñamos un modelo de recombinación entre los dos loci, sin embargo, los datos observados no se ajustaron significativamente al modelo. Se han reportado sitios de alta recombinación en varios organismos (levadura, humanos, etc) sin embargo, las bases bioquímicas o biológicas para estos eventos no están totalmente elucidadas (Jeffreys *et al.*, 2004).

En forma interesante, la mutación más común en las cepas resistentes a piretroides de Tailandia es la mutación *Val1,016Gly* (Brengues *et al.*, 2003). Dicha mutación no fue encontrada en las poblaciones de *Ae. aegypti* de América y el análisis del intrón indicó

que estas mutaciones tienen un distinto origen filogenético. La presencia de dos distintas substituciones en el codón *Val1,016* en poblaciones de *Ae. aegypti* aisladas geográficamente, es una evidencia de que muy pocas mutaciones son permitidas en el gen del canal de sodio (*para*). A pesar de que el gen *para* mide ~2100 aminoácidos, solo un par de substituciones pueden ocurrir sin afectar las funciones fisiológicas de la proteína.

El fuerte desequilibrio de unión entre las mutaciones *Iso1,016* y *Gly1,016* y las regiones intrónicas indican que estas mutaciones ocurrieron recientemente y no ha transcurrido tiempo suficiente para restaurar el equilibrio en el gen. La resistencia *kdr* en mosquitos es posiblemente una respuesta a la exposición a piretrinas naturales de las plantas. Una vez que incrementó la presión de selección durante la campaña de erradicación de *Ae. aegypti*, mediante el uso del DDT (1940), distintas mutaciones pudieron haber sido seleccionadas. Actualmente, las mutaciones *kdr* que encontramos en las poblaciones de *Ae. aegypti* son consideradas una secuela de la presión de selección por el DDT.

Por otro lado, se ha sugerido que el DDT y los piretroides se unen a distintos sitios en el canal de sodio. En un estudio realizado en *Cx. pipiens* y *An. gambiae*, fueron encontradas distintas substituciones en el mismo codón. La mutación más común en estas especies ocurre el residuo *Leucina1,014* donde una mutación A→T confiere un cambio a fenilalanina (Martínez-Torres *et al.*, 1998), sin embargo, un estudio independiente encontró una segunda substitución en el mismo codón, dicho cambio consiste de *Leucina1,014.Serina* (Luleyap *et al.*, 2002; Ranson *et al.*, 2000b). Los autores concluyeron que esta última mutación podría estar asociada con cepas altamente resistentes a DDT y poco resistentes a piretroides. Si esto es cierto, sería interesante investigar si las mutaciones en el codón *Val1,016*, confieren distintos rangos de resistencia al DDT y piretroides, ya que la cepa resistentes estudiadas de Tailandia son altamente resistentes al DDT.

Hasta la fecha, no habían existido pruebas diagnóstico-moleculares para la detección de las mutaciones *kdr* en el mosquito *Ae. aegypti*. Aunque dos de las mutaciones habían sido identificadas desde el 2003, las técnicas capaces de determinar el genotipo en poblaciones naturales resultaba muy laboriosas y costosas.

En este trabajo, desarrollamos pruebas para detectar cuatro mutaciones *kdr* a partir de sistemas de PCR específico para alelos. Esto permite identificar individuos homocigotos y heterocigotos. Mejor aún, la identificación de los genotipos puede realizarse mediante fragmentación de productos de PCR en geles de agarosa con un porcentaje entre 3.0 al 4.0 %. Otros tipos de agarosa de alta resolución pueden ser utilizados, pero el costo de la detección incrementa significativamente.

La prueba de detección es sencilla y no requiere de mucha inversión. Para realizar esta prueba se requiere 1) un laboratorio donde pueda extraerse ADN, 2) un termociclador y 3) una cámara de electroforesis para geles de agarosa. La capacidad de identificar homocigotos resistentes y heterocigotos, será un gran soporte en la toma de decisiones sobre los insecticidas que deberán ser utilizados para las campañas de control.

La segunda parte del estudio consistió en tres objetivos: 1) diseñar marcadores-SNP a partir de genes de resistencia, 2) identificar la posición de los marcadores de resistencia en el mapa genético, y 3) detectar los loci que controlan significativamente la resistencia a la permetrina.

Estos objetivos fueron alcanzados mediante el uso de una familia de mapeo, obtenida de una cruce de una hembra de la cepa resistente IMU5-F4 y un macho de la cepa susceptible New Orleans. La familia de mapeo-F3, fue considerada una línea de intercruza avanzada (AIL). Las ventajas de una AIL, son el incremento del tamaño de muestra y de los eventos de recombinación, dando mas poder a los análisis de recombinación y del mapeo de QTL (Darvasi y Soller, 1995).

El estudio de rasgos cuantitativos requiere mediciones precisas del fenotipo de interés. La resistencia a insecticidas es un rasgo complejo, sin embargo, la mayoría de los estudios de mapeo QTL se han enfocado en el fenotipo vivo/muerto (Ranson *et al.*, 2000; Ranson *et al.*, 2004; Wondji *et al.* 2007). Otra opción es utilizar un rasgo continuo asociado a la resistencia, tal como el nivel de enzimas detoxificadoras en la población de mapeo, sin embargo, esto excluiría a los mecanismos de resistencia por alteración del sitio blanco.

Una de las ventajas del mapeo de QTLs, es que no asume la implicación de mecanismos de resistencia antes del estudio. En este trabajo, la presencia del mecanismo de resistencia *kdr*, nos permitió separar el fenotipo de la familia de mapeo F31.1 en tres

categorías dependiendo de la respuesta a la exposición a la permetrina: *vivos* (una hora post-exposición), *recuperados* (cuatro horas) y *muertos* (cuatro horas).

En la familia de mapeo, la proporción de mosquitos *vivos* o con resistencia tipo *kdr* fue ~16% y la proporción de mosquitos recuperados fue de ~35%. En forma interesante, la proporción de mosquitos *vivos* en la primera selección con permetrina en la cepa de IslasMujeres-F2 fue de ~13 %. Aunque no conocemos la proporción de mosquitos de campo con este mecanismo, podemos ver que dos generaciones sin selección, no fueron capaces de eliminar este mecanismo.

En este trabajo, fueron desarrollados 32 sistemas para detección de SNP informativos para la familia de mapeo F31.1. De éstos sistemas, 21 marcadores-SNP fueron parcialmente informativos y 11 fueron completamente informativos. La capacidad de realizar la genotipificación de ~96 individuos/placa en un par de horas, incrementa la rapidez de los estudios de mapeo de QTL. Además, los genotipos de estos marcadores también pueden ser fragmentados en geles de agarosa al 4%, lo cual facilita la detección de SNPs en lugares donde no se posee una máquina de PCR-tiempo-real.

De los marcadores-SNP utilizados, 16 marcadores pertenecen a distintas familias de oxidetas-P450, cuatro marcadores fueron desarrollados a partir de genes de esterases y solo un marcador pertenece a las glutatión-s-transferasas. El sistema *Val1016Iso*, fue utilizado como marcador para el gen *para (kdr)* y los restantes nueve sistemas fueron desarrollados a partir de genes previamente mapeados (Fulton *et al.*, 2000; Gomez-Machorro *et al.*, 2004).

Los genes de resistencia mapeados en la familia F31.1, fueron identificados a partir de un estudio de microarreglos realizado en la cepa IMU5-F6 por el Dr. W. C. Black IV (Strode *et al.*, 2007 no publicado) En dicho estudio, se realizó la comparación de los patrones de expresión de genes de resistencia entre dos cepas resistentes a permetrina y la cepa susceptible New Orelans. Los genes *AaGSTs1-1*, *AaGSTs1-2*, *AaGSTe-2*, *AaGSTe-3*, *AaeCOE-9*, *CYP9J8*, *CYP9J10*, *CYP9J19*, *CYP9J23*, *CYP9J28* y *CYP9J32* estuvieron constitutivamente sobre-expresados en la cepa IMU5-F6.

El diseño de marcadores-SNP de los genes *AaGSTe-2*, *CYP9J8*, *CYP9J10* y *AaeCOE-9* sobre-expresados en el estudio de microarreglos no fue posible, ya que no existieron polimorfismos en varias regiones de los genes. Sin embargo, la posición genética de los

genes sobre-expresados pudo ser inferida mediante el mapeo de genes vecinos, debido a que los genes pertenecientes a las clases *GSTe* y *CYP9*, se encuentran en clusters compartiendo la misma región genómica (Lumjuan *et al.*, 2005; Ranson *et al.*, 2002).

En este trabajo, la posición genética de los 32 marcadores-SNP fue mapeada en base a los eventos de recombinación (mapa genético). La posición de los marcadores genómicos fue consistente con el mapa genético publicado por Severson y Black (2004), a excepción de los marcadores genómicos *APN* y *maltase*. Esto quizás se deba a que los mapas genéticos anteriores fueron obtenidos a partir de líneas de intercrusa F1 y/o F2. Los eventos de recombinación adicionales pudieron haber generado inconformidades en la posición genética, sin embargo, usamos estrategias que pudieron corregir la posición de estos marcadores en los cromosomas I y III, respectivamente.

Los marcadores de resistencia estuvieron distribuidos en los tres cromosomas. Siete genes en el cromosoma I, seis en el cromosoma II y 9 en el cromosoma III. El gen *para* fue mapeado en la posición esperada (cromosoma III, 32cM). Los genes de oxidasas estuvieron dispersados en los tres cromosomas. Los genes de oxidasas de la clase *CYP9* estuvieron distribuidos en los tres cromosomas. Sin embargo, tres de los cuatro genes *CYP6* se encontraron en el cromosoma I. Los genes de oxidasas *CYP4* se mapearon en el cromosoma II y III; por otro lado, la oxidasas de la clase *CYP12* y *CYP325* fueron identificadas en el cromosoma II y III, respectivamente.

Los marcadores de genes de esterasas y glutatión transferasas no estuvieron bien representados en el mapa genético. Dos genes de esterasas fueron mapeados en el cromosoma II y otros dos en el cromosoma III. Por otro lado, la única glutatión transferasa (*GSTe7*) se mapeó en el cromosoma II a 37 cM. Hasta este punto, podemos concluir que las clases de genes de resistencia se encuentran distribuidos aleatoriamente en los cromosomas y que no existe agrupación entre estos genes.

Los marcadores utilizados en el mapeo de QTL estuvieron distribuidos en los tres cromosomas. Solo una región en el cromosoma II, careció de marcadores (0 a 23 cM). Los análisis de mapeo de intervalos (IM) y mapeo de intervalos compuestos (MIC) utilizando al set completo de datos, identificaron tres QTL y dos QTL en el cromosoma III, respectivamente. En ambos análisis, el principal QTL estuvo asociado al marcador *Val1,016Iso* (*kdr*) en el gen *para*. Los valores LOD calculados para ambos análisis fueron

entre 12 a 15 veces más altos que el valor LOD-umbral calculado. Por otro lado, ningún QTL fue detectado en los cromosomas I y II.

El análisis IM detectó un segundo QTL representado por los marcadores entre los 36 a 53 cM, con un valor LOD~20. Por otro lado, el segundo QTL detectado por el análisis CIM incluyó a los marcadores de las posiciones 36 a 46 cM y excluyó a los marcadores encontrados entre los 52-53 cM (*CYP9J19* y *CYP9J29*).

En teoría, el mapeo CIM tiene más poder y precisión, ya que los efectos de otros QTL no están presentes como varianza residual. Mas aún, remueve el sesgo que normalmente puede ser causado por un QTL que se encuentra unido a la posición analizada. En el análisis CIM del set completo de datos, pudimos observar que los efectos de los marcadores *CYP9J19* y *CYP9J29* fueron considerados como varianza residual y se removieron del QTL.

El análisis de contingencia chi-cuadrada de los marcadores del cromosoma III, indicó que doce de los marcadores estuvieron asociados con el fenotipo. La asociación más fuerte ocurrió con el marcador *kdr*, seguido por los marcadores en el brazo inferior del cromosoma III. En este punto, es complejo decidir si los marcadores aledaños al gen *para* realmente tienen un efecto independiente, ó bien, si su asociación a la resistencia se debe al desequilibrio de unión esperado dentro del mismo cromosoma (Black y Severson, 2005).

El desequilibrio de unión entre los marcadores del cromosoma III, podría conferir una ventaja a los mosquitos resistentes, proveyendo mayor viabilidad durante la presión con insecticidas. Dicha hipótesis solo puede ser comprobada mediante un análisis de asociación de mapeo en poblaciones naturales de mosquitos. Por otro lado, la presencia de puntos de recombinación intensa está ocurriendo dentro del gen del canal de sodio, agregando una nueva fuente de variación genética en el cromosoma III.

En mapeo IM y mapeo CIM que analizó hembras y machos en dos grupos individuales, identificó los mismos dos QTLs (cromosoma III) obtenidos del set de datos completo. La única diferencia consistió en que el valor LOD fue mayor en los machos, indicando que existe mayor evidencia de la asociación del fenotipo con estos loci.

Según nuestros resultados, el gen *para* está controlando la resistencia a la permetrina en la familia de mapeo. Aunque éste gen no se encuentra ligado al sexo, pudimos

observar que los machos fueron ligeramente más susceptibles a la exposición a la permetrina. La proporción del genotipo homocigoto *kdr*, fue mayor en los mosquitos *machos-vivos* que en las *hembras-vivas*, sugiriendo que otros factores podrían estar controlando la sobrevivencia al menos en el ~20% de las hembras vivas.

Usualmente las hembras son de mayor tamaño, tienen mayor fuente de reservas y tienen una maquinaria de enzimas adaptadas para metabolizar sangre. Probablemente, estas cualidades permitan que la sobrevivencia de las hembras se vea intensificada, además de depender de la mutación *kdr*. Por otro lado, la sobrevivencia de los machos depende únicamente de las mutaciones *kdr* ya que carece de la maquinaria enzimática y las fuentes de reserva de las hembras.

Cuando los individuos con genotipo homocigoto *kdr* fueron omitidos de la base de datos, el análisis IM identificó un solo QTL en el cromosoma II entre los 31-46 cM. Este QTL incluyó a los genes *CCEae1D*, la oxidasa *CYP125* y la *GSTe7*, sin embargo, el pico más alto de éste QTL coincidió con el marcador *chymo*. Las tripsinas/quimotripsinas, son las principales enzimas envueltas en la digestión de proteínas. La sobre expresión de estos genes se ha reportado en cepas resistentes a insecticidas de *D. melanogaster* y *M. domestica* (Pedra *et al.*, 2004; Ahmed *et al.*, 1998). Por otro lado, tres genes de este tipo fueron sub-regulados en una cepa resistente a permetrina de *An. stephensi* (Vontas *et al.*, 2007).

Aunque no se ha estudiado el rol de las quimotripsinas en la resistencia a insecticidas, se ha sugerido que la actividad proteolítica incrementada podría jugar un rol importante para alcanzar las demandas de energía durante el estrés, balanceando la degradación o síntesis de proteínas. Las proteasas intracelulares podrían jugar un rol en la biosíntesis de proteínas o en la modificación de la conformación de enzimas como parte de un proceso inductivo (Pedra *et al.*, 2004).

Una segunda interpretación a la asociación entre el marcador *chymo* con el fenotipo, es asumir la presencia de un gen “desconocido” asociado a la resistencia en cercana proximidad a este marcador-loci. La segregación de alelos en ambos loci podría estar en desequilibrio, por lo que la regulación de uno de los genes podría estar correlacionada con el gen contiguo. Más investigación sobre el rol de las quimotripsinas y la generación

de mayor número de marcadores-SNP de resistencia son necesarias para entender a éste QTL.

El análisis CIM de los individuos sin el genotipo homocigoto *kdr*, identificó un solo QTL en el cromosoma I. Los marcadores asociados a este QTL fueron *ARC2* y *APN*, entre los 48-54 cM. Estos genes no han sido implicados en la resistencia a insecticidas, por lo tanto, podemos inferir que existe un gen asociado con la resistencia entre estos dos marcadores.

El análisis de intervalos realizado con los individuos recuperados y muertos de la familia, identificó un QTL asociado con el fenotipo en el cromosoma II y un segundo QTL en el cromosoma III. El QTL del cromosoma II correspondió a los marcadores *CYP12F5*, *GSTE7* y *chymo*. Por otro lado, el segundo QTL correspondió a los marcadores *CYPJ19* y *CYPJ29*.

El rol de las oxidasas *CYP9* en la cepa IMU5 ha sido demostrado en el estudio de microarreglos, donde la sobre-expresión de los genes *CYP9* en larvas y adultos fue identificada (Strode *et al.*, 2007, no publicado). La segunda evidencia del papel de las oxidasas en la cepa IMU5 fue el estudio realizado por Flores *et al.*, (2006), donde la población de Islas Mujeres, exhibió niveles elevados de oxidasas, comparándose con la cepa susceptible New Orleans.

Otro gen sobre-expresado en la cepa resistente a permetrina IMU-F6, fue la glutión-s-transferasa de la clase epsilon, la *GSTe2*. El desarrollo de un marcador para éste gen, no fue posible, sin embargo, fuimos capaces de mapear una GSTe presente en el mismo cluster, la *GSTe7*. La asociación del marcador *GSTe7* con el fenotipo no fue significativa en la familia de mapeo ($F=0.0049$). Por lo tanto, posteriores estudios requieren desarrollar un marcador para el gen *GSTe2*.

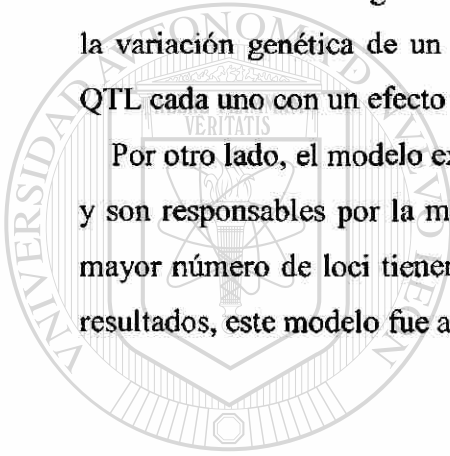
Aunque el principal rol de esta enzima es el metabolismo del DDT, las enzimas *GSTe2* de *Ae. aegypti* exhiben actividad peroxidasa elevada comparada con otras GSTs (Vontas *et al.*, 2001). Por lo tanto su rol en la detoxificación de insecticidas podría proveer un mecanismo importante de defensa contra el estrés oxidativo, constituyendo una segunda línea de defensa contra los efectos tóxicos de los insecticidas.

Los loci asociados con la recuperación en el análisis CIM difirieron del análisis IM. Aunque en el análisis CIM pueden observarse picos en los mismos loci del análisis de

intervalos (cromosomas II y III), ninguno de estos sobrepasó el umbral LOD. Por lo tanto, CIM detectó un solo QTL en el cromosoma I. El QTL correlacionado con la recuperación estuvo flanqueado por los marcadores *APN* y *ARC2*. Para dilucidar la importancia de estos genes en la sobrevivencia y recuperación de mosquitos expuestos a insecticidas, es necesario seleccionar cepas resistentes por otros mecanismos detoxificativos, excluyendo a la resistencia *kdr*.

En nuestro estudio, el fuerte efecto del gen *kdr* en la resistencia de la familia de mapeo, pudo haber escondido el efecto de otros genes de resistencia. Probablemente, la adición de nuevos marcadores no habría cambiado esta perspectiva. Existen dos modelos sobre los mecanismos genéticos que definen un rasgo. El modelo infinitesimal asume que la variación genética de un rasgo cuantitativo es condicionada por un gran número de QTL cada uno con un efecto pequeño y similar (Falconer y Mackay, 1996).

Por otro lado, el modelo exponencial asume que unos pocos loci tienen grandes efectos y son responsables por la mayoría de la variación en un rasgo cuantitativo. Es decir un mayor número de loci tienen menor efecto en el rasgo (Mackay, 2001). Según nuestros resultados, este modelo fue aceptado para la resistencia de la familia de mapeo.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CONCLUSIONES

Se identificó un polimorfismo no-sinónimo significativamente asociado con la resistencia tipo *kdr* en el mosquito *Ae. aegypti*. Una mutación de nucleótidos de guanina a adenina en la primera posición del codón 1,016 del gen *para*, confirió una substitución de valina a isoleucina (*Val,1,016Iso*). Esta substitución fue encontrada en el dominio II, segmento transmembranal 6.

La frecuencia del alelo mutante *Iso1,016* fue detectada en cerca de 16 poblaciones de *Ae. aegypti* de varios países de América. Además, la selección con piretroides de una cepa de Islas Mujeres, México y Santiago de Cuba, Cuba; resultó en un incremento en la frecuencia del alelo *Iso1,016* después de varias generaciones de selección.

La mutación *Met1,011*, anteriormente reportada por Brengues *et al.*, (2003) y la mutación *Val1,011* (Black, 2006 no publicado) no estuvieron correlacionadas con la resistencia a insecticidas, sin embargo, los alelos de éstas substituciones fueron detectadas en varias poblaciones de este mosquito. Por otro lado, la substitución *Gly1,016* reportada en mosquitos resistentes de Tailandia no fue encontrada en América.

Las mutaciones tipo *kdr* provienen de distinto origen filogenético y la secuencia intrónica sugiere que las mutaciones ocurrieron recientemente. Cuatro pruebas diagnósticas basadas en PCR de alelos específicos fueron desarrolladas para detectar alelos asociados con la resistencia tipo *kdr*, estos alelos pueden fragmentarse en geles de agarosa, facilitando su uso en países en vías de desarrollo. La capacidad de detectar alelos resistentes en campo en una forma más sencilla y económica, permitirá su implementación en las campañas de control de mosquitos.

En este proyecto, desarrollamos 32 marcadores-SNP e identificamos la posición de 21 genes de resistencia en el mapa genético de *Ae. aegypti*. El mapeo de QTL que controlan la resistencia a permetrina se basó en una familia de intercrucía avanzada, donde la

segregación de los 32 marcadores-SNP fue registrada. Los fenotipos fueron categorizados como mosquitos *vivos, recuperados y muertos*.

En forma general, el principal QTL que controló la resistencia a la permetrina en la familia F31.1, correspondió al marcador *Val1016Iso* en el gen *para* (*kdr*). El análisis de chi-cuadrada respaldó éste resultado, la presencia de dos alelos heredados por el padre resistente a la permetrina, estuvo correlacionado con el 100% de la sobrevivencia, mientras que la presencia de dos alelos provenientes del padre susceptible, se asoció con el 13% de la sobrevivencia. Estos resultados sugirieron la recesividad del alelo resistente *Iso1,016*.

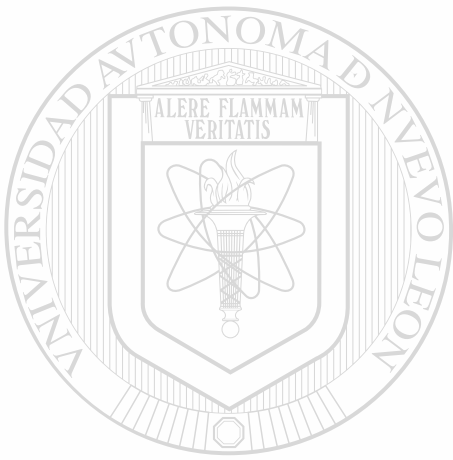
La susceptibilidad/resistencia es un rasgo cuantitativo, regulado por varios genes. En este trabajo pudimos identificar dos QTL en el cromosoma III, asociados con la susceptibilidad a la exposición de permetrina. El principal QTL corresponde a los genes *para*, *CYP4H32*, *CYP325R1* y *CCEunk0*. El segundo QTL correspondió a los genes *CCEae1o*, *CYP9J19*, *CYP9J29* y *CYP6BY1*.

La presencia altamente significativa del QTL1 (gen *para*), podría estar escondiendo el efecto de otros genes asociados a la resistencia. Al remover a los individuos con genotipo *kdr* homocigoto, pudimos observar la presencia de un QTL en el cromosoma I, flanqueado por los marcadores *APN* y *ARC2*, estos genes nunca han sido asociados con la resistencia, por lo que sugerimos que un gen de resistencia “desconocido” podría estar ubicado entre estos dos genes. Por otro lado, un QTL en el cromosoma II, estuvo controlando la recuperación a la exposición de permetrina. Los genes incluidos en este QTL fueron *CYP12F5*, *CCEae1D*, *GSTe7* y *Chymo*.

En este trabajo pudimos identificar los mecanismos genéticos de la resistencia por alteración de sitio blanco, en cepas de laboratorio *Ae. aegypti* seleccionadas con piretroides. Un estudio de mapeo de asociación en poblaciones de campo de *Ae. aegypti*, permitirá corroborar la presencia y correlación de esta mutación con la resistencia a piretroides.

La generación de marcadores-SNP de resistencia que permitan identificar alelos en forma sencilla y económica, facilitará la identificación de nuevos loci asociados con los distintos mecanismos de resistencia presentes en el mosquito *Ae. aegypti*. La identificación de los principales genes que controlan la resistencia es el primer paso para

continuar con la meta del manejo integrado de insecticidas: monitoreo de genes específicos en campo y diseño de modelos que eviten la evolución de la resistencia a los pesticidas en mosquitos transmisores de enfermedades.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 1. Cepas de *Ae. aegypti* analizadas en el estudio de frecuencia de mutaciones kdr. La ciudad, país y coordenadas de los sitios de colecta así como el número de mosquitos analizados están adjuntos. Para las cepas de Cuba seleccionadas con insecticidas, se agregó la publicación donde fue descrito la selección y sitios de colecta.

<i>Cepa</i>	<i>Localidad</i>	<i>País</i>	<i>Latitud</i>	<i>Longitud</i>	<i>Numero de muestra</i>
Rockefeller	Puerto Rico	USA		*	30
New Orleans	New Orleans	USA			30
PCHI	Puerto Chiapas	México	14.7142	-92.4152	48
CHID	Ciudad Hidalgo	México	14.6799	-92.0229	48
RIOF	Rio Florido	México	14.2611	-93.3361	48
PIJ	Pijijiapan	México	15.6811	-93.2069	48
HUET	Huehuatan	México	15.0155	-92.3860	48
HUIX	Huixtla	México	15.1376	-92.4696	48
MAZA	Mazatan	México	14.8676	-92.4496	48
MOTZ	Motuzintla	México	15.3638	-92.2431	48
ESQI	Esquintla	México	15.3268	-92.6587	48
MAPA	Mapastepec	México	15.4366	-92.9028	48
IMU5	Isla Mujeres	México	21.2345	-86.7316	30
Santiago de Cuba	Santiago de Cuba	Cuba		*	30
F12 Deltamethrin	Santiago de Cuba	Cuba		***	30
F13 Deltamethrin	Santiago de Cuba	Cuba		***	30
F14 Propoxur	Santiago de Cuba	Cuba		++	30
F6 Temephos	Santiago de Cuba	Cuba		**	30
Ciudad Habana	Ciudad de la Habana	Cuba		*	30
Nicaragua	Managua	Nicaragua			30
Costa Rica	Guanacaster	Costa Rica		*	30
Panama	Rio Abajo	Panama			30
Cumana	Sucre	Venezuela	10.4332	-64.1825	58
Barcelona	Anzoategui	Venezuela	8.9093	-64.6768	50
Barquisimeto	Lara	Venezuela	10.0781	-69.4010	50
Guanare	Portuguesa	Venezuela	9.5781	-69.2523	55
Caja Seca	Zulia	Venezuela	9.1944	-71.0033	51
La Fria	Tachira	Venezuela	8.1974	-72.2360	54
Los Teques	Miranda	Venezuela	10.1735	-65.8065	50
Cd. Bolivar	Bolivar	Venezuela	8.0688	-63.5565	55
San Fernando	Apure	Venezuela	7.8422	-67.5283	55

* Rodriguez *et al.*, 2000, ** Rodriguez *et al.*, 2002, *** Rodriguez *et al.*, 2005, + Bisset *et al.*, 2006

Tabla 2. Concentración letal media de cinco cepas de *Ae. aegypti* de México, expuestas a permetrina. Los bioensayos se realizaron con adultos expuestos a botellas impregnadas con el insecticida. La mortalidad se registró a las 24 horas.

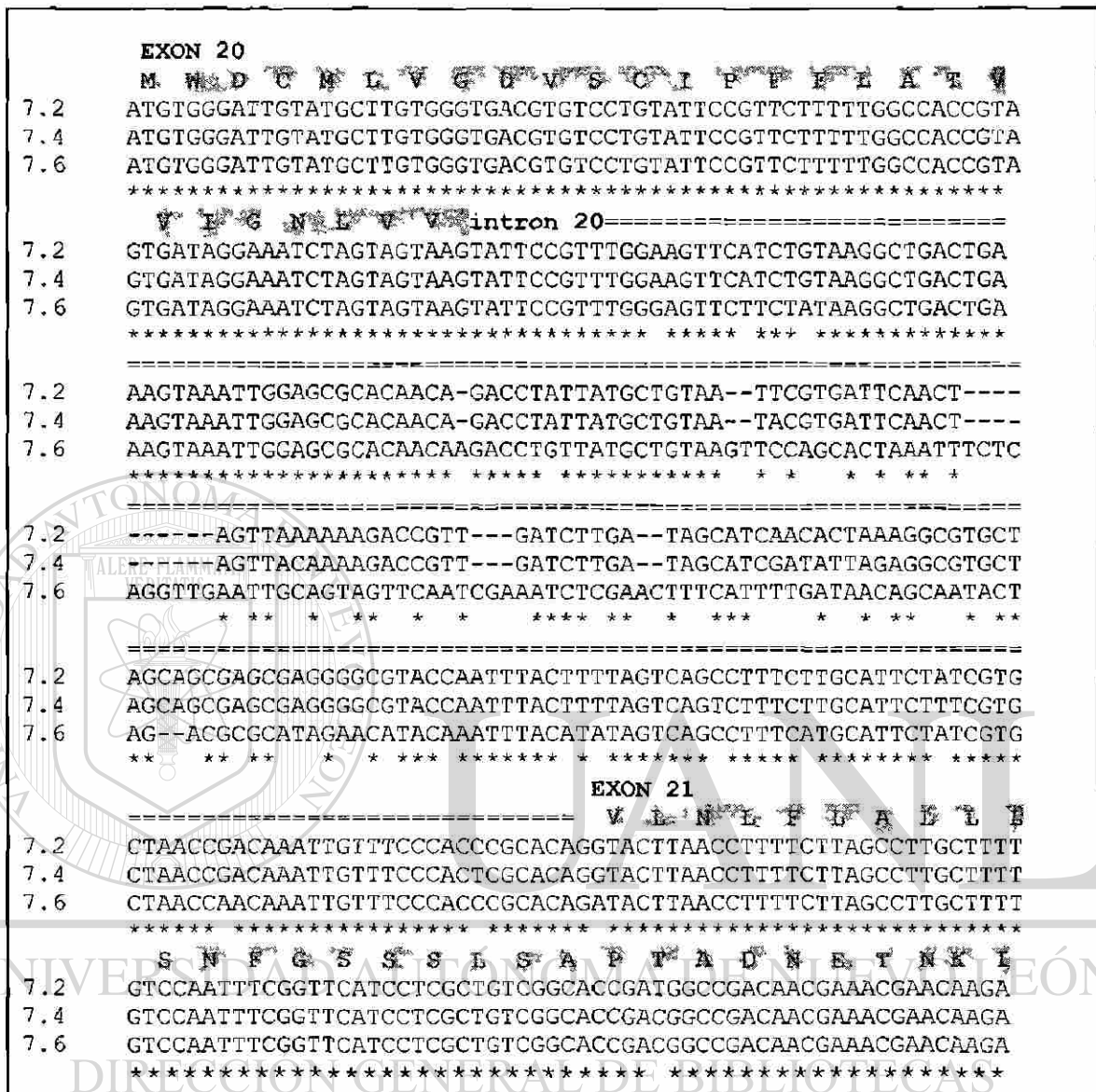
<i>Población</i>	<i>Generación utilizada</i>	<i>LC50 (24 horas) permetrina $\mu\text{g}/\mu\text{l}$</i>
New Orleans	--	0.200
Cd. Constitución	F4	0.511
Coatzacoalcos	F3	0.210
Mazatlán	F4	0.500
Islas Mujeres	F2	2.500

Tabla 3. Selección de la cepa Islas Mujeres (IMU5) resistente a permetrina. Cada generación fue expuesta a 5 μg de permetrina durante una hora. Los sobrevivientes de cada exposición fueron criados para obtener huevecillos de la próxima generación.

<i>Generación IMU5</i>	<i>% Mortalidad 5 μg permetrina</i>	<i>Número de mosquitos seleccionados</i>	<i>LC50 permetrina ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)</i>
F2	83.15	125/742	2.50
F3	9.70	857/950	17.0
F4	0.70	883/950	60.0

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



(*) Muestran zonas conservadas y los espacios vacíos corresponden a polimorfismos. Los aminoácidos aparecen en la segunda posición de cada triplete.

Figura 1. Alineación de las secuencias de ADN amplificadas con los iniciadores kdrR2T6 en tres clones provenientes de un pool de ADN de *Ae. aegypti*.

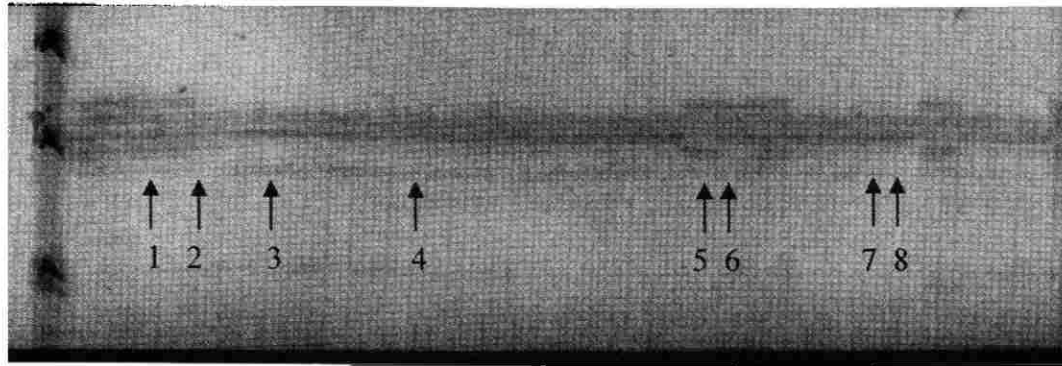
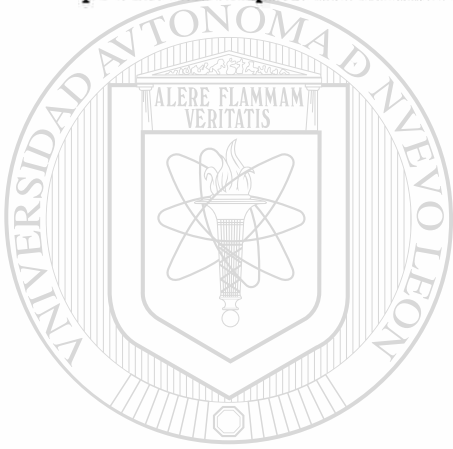


Figura 2. Gel de poliacrilamida mostrando los patrones-SSCP obtenidos a partir de productos amplificados con los iniciadores *kdr4*, del exón 20 del gen *para* de *Ae. aegypti*.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DIIS6 del gen *para*

Exón 20 →

Iniciador positivo Kdr2

5' -ATGTGGGATTGTATGCTTGTGGGTGACGTGTCTGTATTCCGTTCTTTTTGGCCACCGT

Isoleucina

1,011

Intrón 20-→

AGTGATAGGAAATCTAGTAGtaagatattccgtttggagttcatctgtaaggctgactg

ATG → *Metionina*

GTA → *Valina*

aaagtaaattggagcgcacaacaagacctgttatgctgtaagttccagcactaaatttc
tcaggttgaattgcagtagttcaatcgaaatctcgaactttcattttgataacagcaat
accagacgcgcatagaacatacaaatattacatatagtcagcctttcatgcattctatcg

Exón 21 →

Valina

1,016

tgctaaccaacaaattgtttcccaccgcacagGTACTTAACCTTTTCTTAGCCTTGCT

ATA → *Isoleucina**

GGA → *Glicina*

TTTGTCCAATTTCCGGTTCATCCTCGCTGTCCGGCACCGACGGCCGACAACGAAACGAAC-3'

Iniciador negativo kdr2

* La nueva mutación identificada en la cepa de Islas Mujeres. La secuencia del intrón aparece en letras minúsculas y la secuencia del exón en letras mayúsculas.

Figura 3. Esquema de las mutaciones en la región DIIS6 del gen *para*, asociadas a la resistencia tipo kdr en varias poblaciones de *Ae. aegypti*. Los aminoácidos silvestres *Isoleucina*1,011 y *Valina*1,016 aparecen subrayados y el aminoácido substituyente es especificado para cada mutación de nucleótidos.

Tabla 4. Secuencias de iniciadores utilizados para la detección de alelos específicos por PCR en los codones 1,011 y 1,016 del gen *para*. Las secuencias de la cadena larga y cadena corta se proveen solo para la primera secuencia. El alelo específico en la extremo 3' se encuentra sombreado y la des-estabilización del tercer nucleótido se encuentra subrayada. También se muestran los iniciadores para la amplificación de varias regiones del dominio II, segmento transmembranal 6.

<u>Iniciadores para PCR específico para alelos</u>	
<u>Isol,011Val</u>	
Isol, 011f	5'-ATTGTATGCTTGTGGGTGACG-3'
Isol, 011Ir	5'-[cadenas cortas]5'- <u>GCGGGC</u> TACTTACTACTAGATTTC CAA -3'
Isol, 011Vr	5'- <u>GCGGGCAGGGCGGGCGGGGGCGGGGC</u> TACTTACTACTAGATTTC CGA -3'
<u>Isol,011Met</u>	
Isol, 011f	5'-ATTGTATGCTTGTGGGTGAC-3'
Isol, 011Ir	5'-[cadena corta]AATACTTACTACTAGATTTC CA -3'
Isol, 011Mr	5'-[cadena larga]AATACTTACTACTAGATTTC CA -3'
<u>Vall,016Iso</u>	
Vall, 016Vf	5'-[cadena larga]ACAAATTGTTTCCCACCCGCAC CG -3'
Vall, 016If	5'-[cadena corta]ACAAATTGTTTCCCACCCGCAC TGA -3'
Vall, 011r	5'-TGATGAACCSGAATTGGACAAAAGC-3'
<u>Vall,016Gly</u>	
Vall, 016f	5'-ACCGACAAATTGTTTCCC-3'
Vall, 016Vr	5'-[cadena corta]AGCAAGGCTAAGAAAAGGTTA ATT -3'
Vall, 016Gr	5'-[cadena larga]AGCAAGGCTAAGAAAAGGTTA ACTG -3'
<u>Iniciadores para la amplificación del intrón 20</u>	
kdr2+	5'-ATGTGGGATTGTATGCTTG-3'
kdr2-	5'-GATGAACCGAAATTGGAC-3'
<u>Iniciadores para la amplificación del exón 20</u>	
Kdr3+	5'-GGGTGACGTGTCCTGTAT-3'
Kdr3-	5'-GTYGGTTAGCACGAWAGA-3'
Kdr4+	5'-GTGGGATTGTATGCTTGT-3'
Kdr4-	5'-YAGAWGAACTYCCAAACG-3'
<u>Iniciadores para la amplificación del exón 20, intrón 20 y exón21</u>	
kdrR2T6+	5'-ATGTGGGATTGTATGCTTG-3'
kdrR2T6-	5'-TCTTGTTCGTTTCGTTGTC-3'

Tabla 5. Frecuencias de alelos y genotipos *Iso1,016*, *Met1,011*, y *Val1,011* en 32 cepas de *Ae. aegypti*. También se proveen los tamaños de muestra, los intervalos de confianza 95% (CI) en los estimados de frecuencia alélica y los estimados FIS de cada cepa.

Cepa	A/A	A/G	G/G	Total	Frecuencia	95% CI	F _{IS}
Rockefeller	0	2	27	29	0.034	0.034	-0.071
New Orleans	0	0	30	30	0.000	0.000	-
PCHI	0	0	48	48	0.000	0.000	-
CHID	0	16	29	45	0.178	0.057	-0.216
RIOF	0	4	43	47	0.043	0.029	-0.044
PIJI	0	0	48	48	0.000	0.000	-
HUET	0	1	47	48	0.010	0.015	-0.011
HUIX	0	0	47	47	0.000	0.000	-
MAZA	0	9	39	48	0.094	0.042	-0.103
MOTZ	0	0	48	48	0.000	0.000	-
ESQI	0	7	39	46	0.076	0.039	-0.082
MAPA	0	0	48	48	0.000	0.000	-
IM	0	15	18	33	0.227	0.073	-0.294
F5 Permethrin	30	0	0	30	1.000	0.000	1.000
Santiago de Cuba	0	2	28	30	0.033	0.033	-0.077
F12 Deltamethrin	8	18	4	30	0.567	0.090	-
F13 Deltamethrin	23	6	1	30	0.867	0.062	-0.055
F14 Propoxur	2	20	8	30	0.400	0.089	-0.667 ***
F6 Temephos	0	1	27	28	0.018	0.025	-0.143
Ciudad Habana	3	11	15	29	0.293	0.085	-0.091
Nicaragua	1	4	25	30	0.100	0.055	-0.017
Costa Rica	0	5	24	29	0.086	0.052	-0.091
Panama	2	7	20	29	0.190	0.073	-0.053
Cumana	0	0	50	50	0.000	0.000	-
Barcelona	0	14	39	53	0.132	0.047	-0.163
Barquisimeto	0	1	49	50	0.010	0.014	-0.010
Guanare	0	0	55	55	0.000	0.000	-
Caja Seca	0	0	51	51	0.000	0.000	-
La Fria	0	0	54	54	0.000	0.000	-
Los Teques	0	0	50	50	0.000	0.000	-
Cd. Bolivar	0	2	53	55	0.018	0.018	-0.019
San Fernando	0	2	53	55	0.018	0.018	-0.019

El alelo *Iso1,016* corresponde a la sustitución isoleucina en el codón 1,016 del gen *para*.

Tabla 5 (continuación) *Mer1,011*

Cepa	G/G	A/G	A/A	TOTAL	Frecuencia	95% CI	F _{IS}	
Rockefeller	16	6	8	30	0.633	0.031	0.569	**
New Orleans	3	20	6	29	0.448	0.034	-0.394	*
PCHI	15	15	17	47	0.479	0.021	0.361	*
CHID	11	22	12	45	0.489	0.022	0.022	
RIOF	7	24	15	46	0.413	0.021	-0.076	
PIJI	3	30	14	47	0.383	0.020	-0.351	*
HUET	9	11	28	48	0.302	0.019	0.457	**
HUIX	1	15	28	44	0.193	0.018	-0.094	
MAZA	3	19	26	48	0.260	0.018	-0.028	
MOTZ	17	14	17	48	0.500	0.020	0.417	**
ESQI	14	16	16	46	0.478	0.021	0.303	*
MAPA	2	19	20	41	0.280	0.021	-0.148	
IM	0	19	11	30	0.317	0.030	-0.463	*
F5 Permethrin	1	4	19	24	0.125	0.027	0.238	
Santiago de Cuba	10	11	9	30	0.517	0.033	0.266	
F12 Deltamethrin	11	10	9	30	0.533	0.033	0.330	
F13 Deltamethrin	6	5	19	30	0.283	0.029	0.590	***
F14 Propoxur	27	3	0	30	0.950	0.014	-0.053	
F6 Temephos	11	14	4	29	0.621	0.033	-0.025	
Ciudad Habana	11	13	6	30	0.583	0.032	0.109	
Nicaragua	1	14	14	29	0.276	0.030	-0.208	
Costa Rica	5	10	10	25	0.400	0.038	0.167	
Panama	7	13	8	28	0.482	0.035	0.070	
Cumana	0	31	24	55	0.282	0.016	-0.392	**
Barcelona	3	28	20	51	0.333	0.018	-0.235	
Barquisimeto	3	27	19	49	0.337	0.019	-0.234	
Guanare	1	19	29	49	0.214	0.016	-0.152	
Caja Seca	2	31	18	51	0.343	0.018	-0.348	*
La Fria	13	18	12	43	0.512	0.023	0.162	
Los Teques	0	15	22	37	0.203	0.021	-0.254	
Cd. Bolivar	3	21	24	48	0.281	0.018	-0.082	
San Fernando	2	33	19	54	0.343	0.017	-0.357	**

El alelo *Mer1,011* corresponde a la sustitución metionina en el codón 1,011 del gen *para*.

Tabla 5 (continuación) *Val1,011*

<i>Cepa</i>	<i>G/G</i>	<i>A/G</i>	<i>A/A</i>	<i>TOTAL</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>95% CI</i>	<i>F_{IS}</i>
Rockefeller	0	6	24	30	0.100	0.055	-0.111
New Orleans	0	0	30	30	0.000	0.000	-
PCHI	0	2	43	45	0.022	0.022	-0.023
CHID	0	0	46	46	0.000	0.000	-
RIOF	0	0	47	47	0.000	0.000	-
PIJI	0	1	47	48	0.010	0.015	-0.011
HUET	0	18	30	48	0.188	0.056	-0.231
HUIX	0	2	46	48	0.021	0.021	-0.021
MAZA	0	0	47	47	0.000	0.000	-
MOTZ	0	2	46	48	0.021	0.021	-0.021
ESQI	0	1	45	46	0.011	0.015	-0.011
MAPA	0	0	48	48	0.000	0.000	-
IM	0	3	31	34	0.044	0.035	-0.046
F5 Permethrin	0	0	30	30	0.000	0.000	-
Santiago de Cuba	0	0	30	30	0.000	0.000	-
F12 Deltamethrin	0	0	28	28	0.000	0.000	-0.053
F13 Deltamethrin	0	2	28	30	0.033	0.033	-0.035
F14 Propoxur	0	0	30	30	0.000	0.000	-
F6 Temephos	0	1	28	29	0.017	0.024	-0.018
Ciudad Habana	0	0	30	30	0.000	0.000	-
Nicaragua	0	2	28	30	0.033	0.033	-0.035
Costa Rica	0	0	30	30	0.000	0.000	-
Panama	0	2	28	30	0.033	0.033	-0.035
Cumana	0	4	53	57	0.035	0.024	-0.036
Barcelona	0	9	43	52	0.087	0.039	-0.095
Barquisimeto	0	2	46	48	0.021	0.021	-0.021
Guanare	0	2	53	55	0.018	0.018	-0.019
Caja Seca	0	5	45	50	0.050	0.031	-0.053
La Fria	0	2	52	54	0.019	0.018	-0.019
Los Teques	0	0	49	49	0.000	0.000	-
Cd. Bolivar	0	9	46	55	0.082	0.037	-0.089
San Fernando	0	2	52	54	0.019	0.018	-0.019

El alelo *Val1,011* corresponde a la sustitución valina en el codón 1,011 del gen *para*.

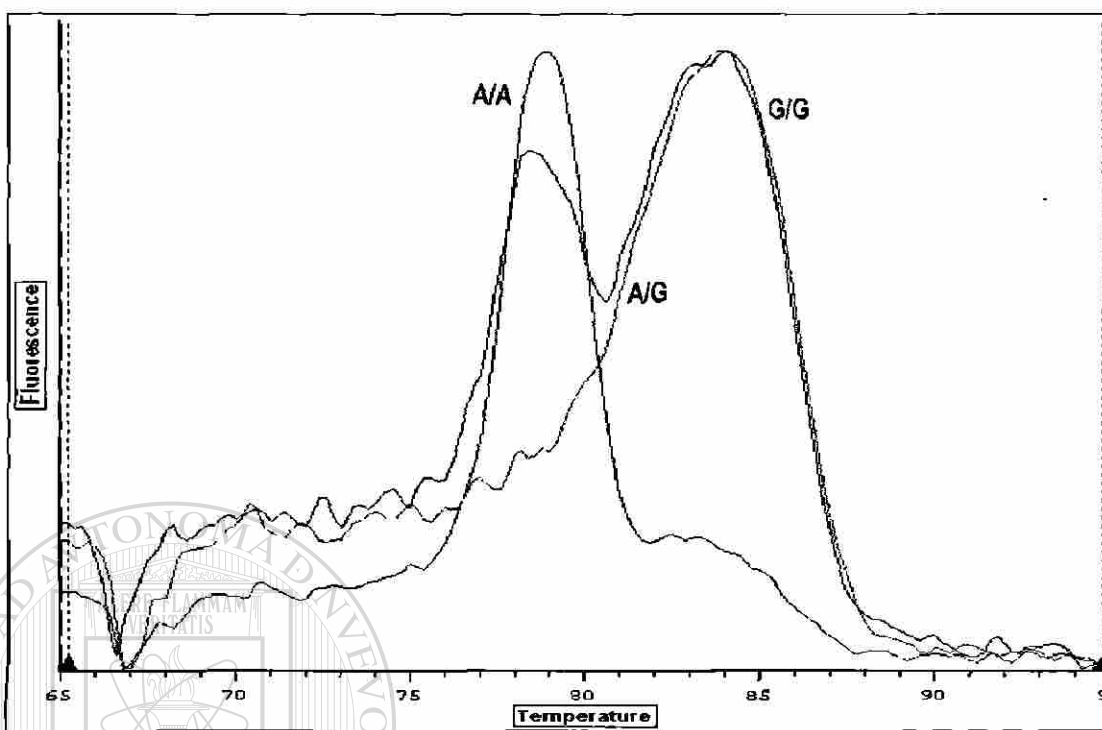


Figura 4. Gráfica de las temperaturas de desnaturalización para detección de alelos específicos en el sistema *Val1,016Iso* del gen *para* de *Ae. aegypti*. El genotipo mutante *Iso1,016/ Iso1,016* produjo una curva a 77°C. El genotipo silvestre *Val1,016/Val1,016* produjo una curva a 84°C. El genotipo heterocigoto *Iso1,016/Val1,016* presentó ambas curvas.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

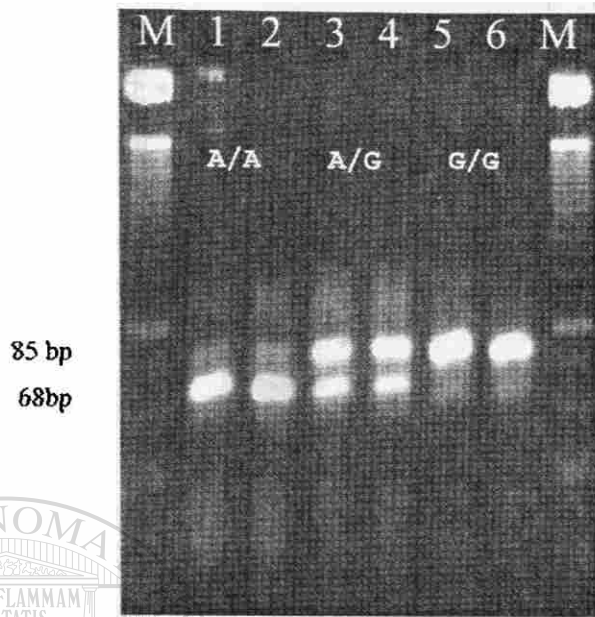


Figura 5. Fragmentación de productos de PCR alelo-específicos del sistema *Val1,016Iso* del gen para de *Ae. aegypti*, en geles de agarosa al 4%. La banda de 68 pares de bases (bp) presente en los carriles 1 y 2 corresponden al genotipo mutante *Iso1,016/Iso1,016* (A/A). La banda de 85 pb en los carriles 5 y 6 corresponden al genotipo silvestre *Val1,016/Val1,016* (G/G). El genotipo heterocigoto *Val1,016/Iso1,016* (A/G), de los carriles 3 y 4 presentó ambas bandas. La letra M corresponde al marcador de peso molecular de 25 pb.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

```

Clade1 ATRGGAAATCTAGTAGtaagtattccggtttgggaagtccatctgtaaggctgactgaaagtaaatggagcgcaacaaca-9
Clade2 ATRGGAAATCTAGTAGtaagtattccggtttgggaagtctctataaggctgactgaaagtaaatggagcgcaacaaca-9
Clade3 ATAGGAAATCTAGTAGtaagtattccggtttgggaagtccatctgtaaggctgactgaaagtaaatggagcgcaacaaca-9
** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
Clade1 accattaagctgaaatccgtgactcaagctatttaccagatcacccgcttgactggtggatggatcaaatattagaggcgtggtta
Clade2 accgtaaatgctgaaagtccagcactaataattctcagggagagattgaaactagttccaatccdaaatctcgaactttgatg
Clade3 accagtacggcggaatctccgatccaacaatttcaaaagggagaaattgactctggattactcgaactctcaaaatttgggtt
** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
Clade1 tcaacgaatgagaggggggtaccdaatttatcttttaggcagctcttcttgatcttcttgatcttcttgctaaacc
Clade2 ttgataacagaaatactagacgcacataaacatacaaatattatcattacagcccttccatggatctcttctggctaaacc
Clade3 ttgacaaatgagaggggggtaccactttaatttcaaacagccttctc-ataattctctcttgctagcc
* * * * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
Clade1 cacaaatgggttccccactcgcacagGTAC
Clade2 cacaaatgggttccccacccggacagGTAC
Clade3 tactaactggttccccccacgaattgGTC
** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **

```

Figura 6. Análisis de la secuencia del intrón 20 del gen *para de Ae. aegypti*. Tres cladas fueron obtenidas del análisis de 87 secuencias. Las regiones sombreadas corresponden a sitios polimórficos segregantes. Los primeros 100 nucleótidos del intrón son conservados, así como también los últimos 75 nucleótidos

Tabla 6. Lista de genes de resistencia de *Aedes aegypti* analizados por polimorfismos SSCP en la familia de mapeo F31.1. La temperatura de alineamiento óptima (Ta) y el tamaño del producto de PCR, se muestra junto con la secuencia de los iniciadores. La posición de los genes de resistencia no se conoce en el mapa físico o genético. La letra "M" denomina monomórfico y la letra "P" polimórfico.

<i>Gen</i>	<i>Contig o número acceso</i>	<i>Iniciadores (5'-3')</i>	<i>Ta</i> °C	<i>bp</i>	<i>SSCP</i>
<i>CYP325A1</i>	1.105	AACGATGCGGCTCTACCCA GAACTTCAAATCCTTTTCGAGTCAAT	57	346	M
<i>CYP4G36</i>	1.106	TTGGCTGGGAAATGGACTG ACGCTTGGCATACTGGGAC	---		
<i>CYP304C1</i>	1.1104	CTTCCATTTCGGTGC GGGTAA TGTCGTCGTGGTTAAAGGGTTAGTT	61	263	P
<i>CYP301A1</i>	1.1181	CAAGAGTGCCACAAAGCGTATGA CAATCACGGTACTGTAAACCCCTAAGAA	61	338	P
<i>CYP9J29</i>	1.1188	ATGGTTTCCAATTCACGGTCTT CTCGGAGCCGCAACTCAA	61	311	P
<i>CYP6F2</i>	1.1219	CGAACGCAGCAAACAATGGC CGTGTGTAGCGGGCAAGGAT	61	358	P
<i>CYP6BB2</i>	1.1327	GTAGTCGCTAAGGACGGAGGAGA GATCGTGGTGCATCGAGTGG	61	211	P
<i>CYP18A1</i>	1.133	ACCTGCCGATAACGGAGACCA CCTCAGCATCCAGGAAACGACTT	---		
<i>CYP6CB2</i>	1.1337	ATTGCCCATTCGTGCTCTG TCTCCTCCGTGTTCCCTTTT	57	282	M
<i>CYP6AK1</i>	1.136	TCTCGAAAGACAATGCAGACAAC TCCAAATCGGCGTACAATCC	61	229	M
<i>CYP6CD1</i>	1.138	GAAGTTGACCGTTGGATGCG TGGTGTAATCCGTAGGCTTTCC	61	354	P
<i>CYP325x1</i>	1.17	TGATACCGAGGAGGAATACAATAAAC GGGCCACATAAGGCACAACC	61	335	M
<i>CYP325R1</i>	1.174	GTGCTACGGTGTTCCTTGGT CCTTTCGGTTGGGTTTCC	61	252	P
<i>CYP325Q1</i>	1.187	GAATGATGAAACCGATGACG GCACTCCTCCGCAAAGC	61	386	M
<i>CYP325Y1</i>	1.197	AAGTGTGAGCCGCCACG TTTCCTTCCCATTCTGACCC	---		
<i>CYP9J15</i>	1.221	AAGGGCAACCTGAAGCACTCTG TCCTCGTACAAAACGGGACTGAA	61	233	P
<i>CYP12F8</i>	1.222	GCGGCAGCGAGATTGGA GGTGTCAACGCAGAGTCCTTATT	---		
<i>CYP307B1v2</i>	1.224	CTCAACAACACTACGACCTCAGCAT GAGCCCACCGGAACGAA	61	248	M

Tabla 6 (continuación)

<i>Gen</i>	<i>Contig o número acceso</i>	<i>Iniciadores(5'-3')</i>	<i>Ta°C</i>	<i>bp</i>	<i>SSCP</i>
<i>CYP6AG5</i>	1.231	CTAACGAAGTCGGAGGAACG GGGCAATGGACGAAATGA	57	384	P
<i>CYP6AH1</i>	1.257	GTGGCGGATAATTTCTGGAGT TGCTGGGIGAGCGTGTCTGT	---		
<i>CYP4H32</i>	1.283	CGCTGCGATTACTTCCACC TCGAACGACCGTCATCTTCA	61	287	P
<i>CYP4H29</i>	1.285	TTCATCCATCCGTTCCAATCA TCTATCGTGGCACAATCTTCACA	61	393	M
<i>CYP9M4</i>	1.29	CGTCGCAGCCTTCTTAGTTT CCCAATGATAGGGTCCACCT	57	319	P
<i>CYP4C52</i>	1.295	TTCGACATCGTGCCTTCCAC TTCTTGCGACAGCAACTGGTTA	61	359	P
<i>CYP4G35</i>	1.318	GCTTGGCGATGGGCTGTT CATAATCAAATCCCTCCTTGCTCT	57	266	P
<i>CYP49A1</i>	1.338	CAGAACCCAGACAAGCAGGAA CCGTAACCGAAGGGCAAATA	61	2000	M
<i>CYP9J32</i>	1.352	GCCACCGTTCCGCTCTT TTTCGTTGCCATCGTCTTCTT	61	259	M
<i>CYP6AL1</i>	1.354	GCGGCTCAGGTGTTTGTG CGGCTGIGCCTTTGTCTAT	61	304	P
<i>CYP6N9</i>	1.371	GAAAGCATCCGCCAGCAT GCAAGGTCGCCAATCCC	63	291	P
<i>CYP9M8</i>	1.41	ATTGAGTGGACCGATTACGACA GGATTCCGGGAAGAAATGTGG	61	392	P
<i>CYP6AL3</i>	1.415	ATTTGATTACTTCGCTCCGTTTGG TGCTTGGATGTCCTGATGTCG	61	380	P
<i>CYP307A1</i>	1.427	GGCGAAGACGAACCAGAGCG GGCGATGAGGAGTACCGAAGGA	61	308	M
<i>CYP9M9</i>	1.43	CGGCACCAAGGTAACGG CATCGGCACATCGGTCCTT	61	280	M
<i>CYP6AG8</i>	1.4359	TGACTGTTCTCCCGAGTGTG GGTTTAGCGAAAGGGTGGC	61	255	P
<i>CYP302A1v1</i>	1.4395	CGACATCGCCGCCGTAT CAAAGGCAAGAAGTTCCTCACA	61	211	P
<i>CYP4J16</i>	1.4503	CATTCATCTCCCGATTGATTACC AACCACATCCTCCCCTTG	---		
<i>CYP4AR2</i>	1.457	CACTTCGCATGTTCCCTCC TCTTAGTGGCATTTCGTCCTG	61	389	P
<i>CYP325Z1</i>	1.467	GGTGGGCAACGAAACATCTAC AGCAGCAAACGGGACAGC	57	214	P
<i>CYP12F5</i>	1.47	TTTGAAGTCACTGGCGTAAT TTGGGCATCGGTGTTTGT	57	277	P
<i>CYP305A5</i>	1.48	GGATTGTACGCTGGGAGGA AACTTTGTATGGCTTTGGTGAGA	61	340	P

Tabla 6 (continuación)

<i>Gen</i>	<i>Contig o numero acceso</i>	<i>Iniciadores(5'-3')</i>	<i>Ta°C</i>	<i>bp</i>	<i>SSCP</i>
<i>CYP314A1</i>	1.524	TCCGATACAATCACCAACAATG AATGGAAGCACCAAAGACGA	57	305	M
<i>CYP302A1v2</i>	1.581	AAAAGACTGCCGTTGAGTTGG GAGATAGGGTTGAGCCGAAGAG	61	370	P
<i>CYP325S1</i>	1.6	TGAATTTCTACGGAATATGGAAGG AACGGACGACTGCTGTGG	57	279	M
<i>CYP325L1</i>	1.61	TCCGACGACCTTACCCAACC CACAGCCGCATAACTTCCTTC	61	305	P
<i>CYP9J31</i>	1.62	CCGTGAAACAACGCCAGAC ACTCGCTACTTCCTCGTACAATC	---		
<i>CYP315A1</i>	1.622	TTTGAAAGGATAGTGCCAGAA GGAGCAATAGGGAACAGACG	57	323	M
<i>CYP303A1</i>	1.66	TTGGTGAAGGCAGGAAACG TGAATGGAAAGTGGCTGAAAA	57	202	P
<i>CYP4C38</i>	1.673	TCTACAATGGTGGGTCAAGCG CAGGAAGTCATAGCCGTGGG	---		
<i>CYP6BY1</i>	1.7	TCACGCCGCTGTTCCTATT CCGCCACTTGTTACCTTCG	61	350	P
<i>CYP6P12v1</i>	1.702	GGACAGTCGGAAGCGGGAGT GCAGCAGCAAGTTCATAAAGTCGT	61	338	P
<i>CYP325M1</i>	1.738	TTGCCGACGGGCTCAA TGGCGGGTCCTAAAGATGA	61	240	P
<i>CYP4H30</i>	1.85	CAATCCGCATGTTCAAGACAA AATCGCTGACCAATACAGTTCC	61	381	P
<i>CYP4J13</i>	1.869	ATGGAGTCTACAATCTGTTTGGGTAT AACCTGCTGCGGTGCTGTC	61	282	P
<i>CYP4H33</i>	1.923	CCTGATTCGCACTACCTGTG AACTCATCCTTTCCTGCCTTA	61	395	M
<i>CYP9AE1</i>	1.96	CATCCTTATCGGCTTCCAGTTT AAGGTGGCGAGGTTTCTGCT	61	208	P
<i>CYP4J17</i>	1.985	CCAGGAGGAATGCGACAAACT ACCTAACAGGCGGTAGGGAAAT	57	250	M
<i>NS-COE1</i>	??	TATGACTAATCTTCCCATCACTCCA GATAATGACCCGCAACCAAGT	57	212	P
<i>CCEae4B</i>	1.55	AAACCCGAAGTGGCTTGT GCTCTTGGTAACCGTGGC	61	359	P
<i>CCEae6B</i>	1.55	CCATCGAAAGCACCAG TCAATAGCAAGCATTCCCTC	61	205	P
<i>ACE-1</i>	1.9	GAATCTGCGAGTTTCCATTTGTA CGAACACGATAGCCTGCCTC	61	267	M
<i>ACE-2</i>	1.659	ATGCTGCGGGAAGCCAATC CCCACCTGCTGCTGGTTCTG	---		
<i>CCEjhe1F</i>	1.145	TTGTGATGAGTGGGAATGCG TCGGTACAGTGTCAATGGGTCT	57	218	P

Tabla 6 (continuación)

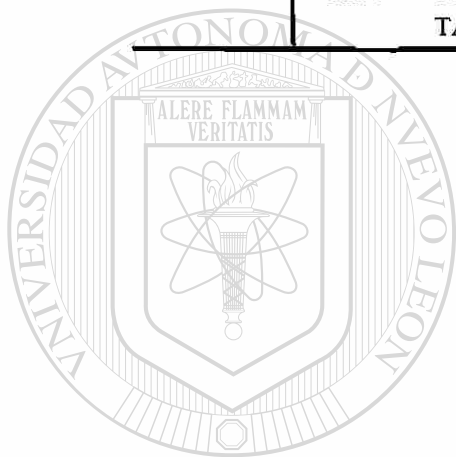
<i>Gen</i>	<i>Contig o numero acceso</i>	<i>Iniciadores(5'-3')</i>	<i>Ta°C</i>	<i>bp</i>	<i>SSCP</i>
<i>NS-COE7</i>	1.145	CCTTCAAACCCTCACAACGG ACTAGCTTCACATAGTAATCCACCAG	---		
<i>CCEunk0</i>	1.347	ACGGAGTCTTTCTTGAAGGGTAA CACTAACTGCACGAAGCGATG	61	318	P
<i>CCEbe20</i>	??	AGAAATCCGCCGAGAAAGC GGAGTAAGGGAACCTGATGGAA	61	267	P
<i>CCEunk40</i>	1.35	CTGCTGCTGCCACATAACC CGCCGTGCTTCCAATC	57	347	P
<i>CCEae1D</i>	1.474	CGAGCGATTGTTATGTCTGG AGCCCTTCTTCCGAGTTTC	57	344	P
<i>CCEae2D</i>	1.3489	TTTTGTGCTGCCAATCTCC CCCATCAGTTTCTCCTGGTTAT	61	382	M
<i>CCEunk50</i>	1.1	CACGGAGATGATCTGGGCTAC GCTTCAAGACGGGAACACCTAT	57	308	M
<i>CCEbe10</i>	1.754	TCCGTTCCCGCCAGTTGTG GGGCATCTTCGTGGTGGTCATAG	---		
<i>AaeCOE-15</i>	1.105	GATGACGGGCGTGGATTG GGCTGTTACTATGGCAGGAAGAT	61	372	M
<i>CCEgH13</i>	1.89	TCAAGCTGACAACGGAAACTAAA CGGCAGGTCGGAAGAATGG	---		
<i>CCEae10</i>	1.115	AGGTCCAGAAGCCAAACAGG GGAAGCAGGTGTAGGTTCCAGAGTA	61	394	P
<i>CCEae1A</i>	1.142	CAAGAGTTGCCACTGGATGA ATAGGCTGCCATTACGAACA	52	147	P
<i>CCEae5A</i>	1.142	ACTTGGCTTTCTTTGCCTACC CCGCTTIGAGCGATTACTTTAT	52	222	P
<i>CCEae4A</i>	1.142	CGAACTGACTCGGCTACTTTC TGCTGCCCTTCTTTACGG	50	248	M
<i>CCEae6A</i>	1.1678	GGTAATCAACCGATAACCACAAA TGGAGCCATCCGAAATAGAAA	---		
<i>NS-COE24</i>	1.18	TGGTGTGCTGTCGCTGTTTCTG CGTAAGGGTATCCACGGCTAAT	61	275	M
<i>CCEae3B</i>	1.55	GCAACCCTCCAAGCCTTAA CACCATTGTCCTTCTACGC	57	359	M
<i>GSTd2</i>	1.22	TGGCGTTGAGTTGAATCCG TGCTCCGCAAAATCGTG	61	268	P
<i>GSTe7</i>	1.291	CACGATACCGACCATTGACGA CCTCCATAGGGCAAACCTCCA	61	371	M
<i>GSTs1-1F</i>	1.607	TGTCGGTGGACGGCAAGAA GTACATATCGGCCCATGTGAGTTT	---		
<i>GSTi3F</i>	1.362	CAGAACGTGAACCGCTTTGGG ACCTTCGCCTGATTGACTTCCA	61	260	P
<i>GSTi4F</i>	1.111	CCAACGGCGTCACCATTCTC GCTGATTCAAGTTCTGCTCCATCT	61	246	M

Tabla 6 (continuación)

<i>Gen</i>	<i>Contig o número acceso</i>	<i>Iniciadores(5'-3')</i>	<i>Ta°C</i>	<i>bp</i>	<i>SSCP</i>
<i>GSTu1F</i>	1.608	GCCGCTTGGGAAGTAAGTTTG TGATGGGATGAATTGGGTGCT	61	255	M
<i>GSTu2F</i>	1.1	CCCAAATCAACCGAGTTCTTCA GCCTGGTCCTCCTCGIATCCT	61	322	P
<i>GSTu3F</i>	1.481	CGAGGCATCATCAACCAACGG TCGGCAGATCACTCAGGTCAACA	63	268	M
<i>GSTz1F</i>	1.632	AGCGTGCCAAGTTTCGGGAGA GGATGATCGGATACGGGCGTAGAT	61	276	P
<i>CYP9J32</i>	1.352	TCGGGTAATGGGACTAA GACTCCGTTGTTTCTTGTT	52	210	P
<i>CYP9J28</i>	1.1188	TTTGC GAACGATGTGAT GTTCCCGCTCCCTAAT	52	247	P
<i>CYP9J24</i>	1.1188	ACTTCGCTGCTCTACACTT TACTTGATTCCGTTTCCTT	52	245	P
<i>CYP9J19</i>	1.221	TGGACGGATAATGAGTTGA TGCTATGGTCCGGAGGC	57	256	P
<i>GSTe3</i>	1.291	ATGACGCCCTGTATCCG CAACGAGTCGCCAACC	57	221	M
<i>GSTe4</i>	1.291	GCCCGTTTGCGGTTCT CCTCCTGGTTGGTTCCT	57	283	M
<i>GSTe6</i>	1.291	CTGGGAAATGATACCCTAAA CTGCTIGAATCCACGAAT	57	264	M
<i>GSTe7</i>	1.291	TGTTCCGAGACTGCG TGACTGTCCATCCGTTTA	52	260	P
<i>CYP9J10</i>	1.221	AGGGTTCGTTGAGGCA GGTTTACCGTTCAGTGATTT	57	271	P
<i>CYP12F6</i>	1.472	ATGATTCTGGCAGGTGTC GGTTTCCTACTATGGGTGG	52	220	M
<i>CYP6BB2</i>	1.1327	GGCAGTGCTGGTTATCG TCCTTCAGGCAATTCTCC	57	264	M
<i>CYP9J8</i>	1.221	CTTCGCTGCCGTTATCT TTGACACCGATTGCTTG	57	264	P
<i>CYP9J26</i>	1.1188	GAAACGGCGGAGCAT GTCCACCTTGATTCCAAAA	61	276	P
<i>CYP9J27</i>	1.1188	GATTCGCCACCGTTCA GAGTTTCGGATACCACCAT	61	282	P
<i>CYP6AA5</i>	1.702	GCCCGTCATTCGCACAGT TTCAACATCCAGCCAAAGTCC	61	210	M
<i>CYP6P12v2</i>	1.327	GGCAGGTCACCAACAAGCA ATCACCGATTCCCGCTCCC	57	376	P
<i>GSTel</i>	1.291	TTTCCTTCCCTAAGTTCCGTCTC CAGCACAAACCCATCATCGTC	49	179	M
<i>GSTe2</i>	1.291	CACCCTGTCGGGCAGTGGAA TTGGCTTGCTTAACCAGTTCTTTC	52	308	P

Tabla 6 (continuación)

<i>Gen</i>	<i>Contig o numero acceso</i>	<i>Iniciadores(5'-3')</i>	<i>Ta'C</i>	<i>bp</i>	<i>SSCP</i>
<i>GSTe3</i>	1.291	CTGGTACAGAAATACGGCAAAGA GAACAGGGCATTTCAGAGTGGA	57	297	M
<i>GSTe4</i>	1.291	TATTGGTTTGGACCTGGATGTT ATAGATGATGATGGCGTGGC	57	229	P
<i>GSTe5</i>	1.291	TATGGGAAGGACGATAGTTTGTA AAGTCATCGGTCAGGGCATC	57	279	P
<i>GSTe6</i>	1.291	CGATGCGGTTCTGCCGATAA GCCAATTTCTTTGCACCTTCTC	52	208	P
<i>GSTe7</i>	1.291	GCATACAACCCGTCGCACCC CACGCAGTCTCGGAAACAAAA	61	372	P
<i>GSTe8</i>	1.291	TTCGGACAAGATGGTGATT TACGCTTCTGAACGGGTTT	-		



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 7. Lista de marcadores-SSCP genómicos de *Aedes aegypti* analizados en la familia de mapeo F31.1. La posición genética de los marcadores genómicos se presenta. La temperatura de alineamiento óptima (Ta) y el tamaño del producto de PCR, se muestra junto con la secuencia de los iniciadores. La letra "M" denomina monomórfico y la letra "P" polimórfico. La abreviatura "Pos" denomina la posición genética y distancia en centimorgans.

<i>Gen</i>	Contig o número acceso	Iniciadores	Ta °C	bp	SSCP	Pos.
<i>Hemepoly</i> (hemolymph polypeptide)	U11235	CGACAAGCGCCAGCAGAAGG AGTGGCCGGGTCCACTTCG	60	385	M	I, 0
<i>Sialokin1</i> (salivary vasodilatory protein-sialokinin1)	AF108099	CCCGATAAAATCCCTTCCTTC AAATGGGTATCCCTTTCCTG	60	298	M	I, 4
<i>CatHbp</i> (cathepsin b-like thiol protease)	L41940	CAAATTCGGAACTCACCAG TATCCACCCCTTGCAATCCATC	60	343	P	I, 5
<i>LF090</i>	T58320	AGCAGAAATGGCTCCCCGTAA ATGGTTCCCTTGCCGGACAG	48	145	M	I, 13
<i>VitgRecp</i> (vitellogenin receptor)	AI650188	CCTCTGCAAGAGAGCCGATGT ACCCAGTCGTGGCTGTTGAT	60	308	P	I, 13
<i>Transfer</i> (transferrin precursor)	AF019117	ATGCGGCCATCCAGGTTTCAG CCCCCGGACTTCAGTTTCGT	60	309	P	I, 14
<i>Ribopt11</i> (Ribosomal protein L1)	AI658439	AGAATCTTGGCTTGCCCGTAC GCTTCAGGGTTCACGTTGAT	56	285	P	I, 30
<i>Amy2</i> (α-amylase 2)	U01208	ATGACGTTGGAGTGCGAAATC ACCAGGTTGCCGTAGATGAA	60	330	P	I, 32
<i>BMIOP</i> (blood meal-induced ovarian protein)	U84248	TTGAAGTCGTGCTGTCIGTT CTGCCCTTGTTCATGTTTGCT	60	337	P	I, 32
<i>Chitan 1</i> (chitinase 1)	AF026491	AAACTGACCTACGCCCAAAG GTCTACGCCCGATGAACGGAAT	60	327	M	I, 33
<i>PPalost</i> (preproallatostatin)	U66841	AAGAAGAAGATTACGACGAT CAATTTCCACATACACTTA	60	326	P	I, 36
<i>Actin 1</i>	U20287	CTCTATCTACCTCCAGGCTAT GACGCTGACAAGTATACAA	50	295	P	I, 31

Tabla 7 (continuación)

<i>Gen</i>	<i>Contigo numero acceso</i>	<i>Iniciadores</i>	<i>Ta°C</i>	<i>bp</i>	<i>SSCP</i>	<i>Pos.</i>
<i>LF397</i>	BM378051	AGCCAGTCATCATCAAGC TCCTCGTCATCGTCGTCT	57	193	M	I,38.5
<i>LF231</i> (ribosomal protein L36)	BM005478	CCCTGAAAGTTCCTGAAGC AGAGCGAACGGTGTAAAG	52	155	M	I,38.6
<i>DccI</i>	AF288384	CGICTACATCTCCGATTTGC TGAAGTCGTCTCCGTGATAG	56	470	P	I,42.2
<i>ARC2</i>	BH214538	ACTACTGAGATAGGACGGAAGA CCACTTGGACTTGGAGGT	57	260	P	I,48.3
<i>APN</i> (aminopeptidase N)	AF378117	TCCATCACGGCAATCACA AGATCCAGCCAGCATTCG	57	203	P	I,53.6
<i>AniC</i> (antennapedia C)	A1650010	GATGCTAATGGGAAACAAT TGATACCGTTTAAAGGCAAAG	50	258	M	I,70
<i>Rdl</i> (dioldren resistance)	U28803	GGGGTGACCAATAAAGCAAG TGGTCGTCTAAATGGATGG	60	461	M	II,17.8
<i>InsReep</i> (insulin receptor)†	U72939	AGCAGCGGCAGGATCGGTAG CGCGGAACACAGCAGCAGGTAC	46	313	M	II,23
VCP (vitellogenic carboxypeptidase precursor)	L46594	GCCCGCTACCAAGGACAATCA CTGAAACGGCCCCAGCAGGAT	57	380	P	II,23.7
<i>LF98</i>	T58313	GCCCTCCAATCCAAGCAC CCGTAATAATCGTTCACCCGTAT	57	168	M	II,27.2
<i>Mucin</i>	AF125984	GACAGCACCCACAGGCAAAT GCTCCTTTCAACGGGACCTT	60	408	P	II, 28.1
<i>ADPATP1a</i> (ADP/ATP translocase)	A1657540	CTGGCGCTACTTCATGGGTA ATCGAGGTGTTCTTCGGGGTC	57	284	M	II,30
<i>AmyI</i> (α-amylase I)		GGACTTTGTACCGCAATCTG TAAAGCTGGAGCATGTGGATC	57	437	M	II,31.5
<i>TrypB</i> (trypsin–Barillas Mury)	M77814	ACGGTACCCTCGGTTCAGTT CTACCTCGCGGTCCGGTAAAG	60	339	P	II,31.8

Tabla 7 (continuación)

Gen	Contig o numero acceso	Iniciadores	Ta°C	bp	SSCP	Pos.
Hsp83 (heat shock protein 83)	AI658441	AAGGACAACAACGCTCAA TCAACTCACGCAGGAAGAT	50	144	P	II,32.1
PGK (phosphoglycerate kinase)	AY043171	TGTTGGGTCGTGATGTGA CCAGAGCTTGGCAGAAAGT	53	342	P	II,37.7
Fxa (FXA-directed anticoagulant precursor)	AF050133	TTAGCACCAATCCAGCCTCA TGGCACAACCTGTTGGGAAGA	46	200	M	II,41.0
Chymotrp (chymotrypsin)	AI618956	CCAGTTGGCACTCGCTTCC GACGGCAAATGTCATCGGGAC	60	319	M	II,43.3
RpL17A (ribosomal protein L17A)	AF315597	CAATCGCTTGGICTGCC CGGTTACCCCTTCTTGACG	57	311	P	II,43.3
LF357	BM005495	GGTCTATCGTCGTTTCAGC AATCACCCGCATTCAGTT	50	214	P	II,48.3
D7 (D7 salivary gland protein)	M33156	CCTAGATTTGGCCCAGTTGT ACTCGGGCTCTGATTTGGTA	60	342	M	II,54.1
Sin3 (transcription factor, sin3)	AI561370	GTATCTGTTCCCTGGGGTTGC CCTGAAGTGTCTGCTTCTGCT	58	454	P	II,70
AEG128 III	BI096849	GGGTGATGAAAGTTGACGG GATTTCCCTTTGTTGGGTTT	57	195	M	III,14.6
LF253 (ribosomal protein L30)	TS8331	CGCCAGGGAAGGCTAAG GCATCGGTGATCGACACAGG	56	182	P	III,16.7
Malt (maltase)	M30442	GGACTGGTGGGAACATGGAA CTTATCGGACAACCCGTGGA	48	234	P	III,21.2
VitgConv (vitellogenin convertase)	L46373	TGCACAGAAAGACCACCAATG TCGACTGTTCCCGCTGAGTTA	60	287	P	III,25.7
ldr2	AY663385	ATGTGGGATTTGATGCTTG GATGAACCCGAAATTTGGAC	56	370	P	III, 31.6
UGALS (UGALS vitellogenin)	U02548	AGGGCTACAATCCTGGCTAT GTATTCTGGCTGCTTGACCGT	60	328	P	III,46

Tabla 7 (continuación)

<i>Gen</i>	Contig o numero acceso	Iniciadores	Ta°C	bp	SSCP	Pos.
<i>DefA1</i> (defensinA1)	AF156088	CAATTTGTTTCCTGGCTCTGT GAGCAGCACAAAGCACTATC	54	193	P	III,47,2
<i>Dynein</i> (cytoplasmic dynein)	A1618900	ATGGGATGCTTTGGTACTC TACTTTCTCAGCGTTGTTGG	56	276	P	III,48
<i>Apyr2</i> (apyrase2)	L41391	TGATTGCATCGTCGTTGATT CAACTTGGCGCTGTTTGTIT	54	317	P	III,57

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 8. Lista de marcadores-SNP mapeados en la familia F31.1. Los iniciadores específicos para detectar cada alelo en el marcador-SNP, se muestran junto con el cromosoma y distancia genética (cM) estimada. La cadena larga consiste en 5'-GCGGGCAGGGCGGGCGGGGGCGGGGCC-3' y la cadena corta consiste en 5'-GCGGGC-3'.

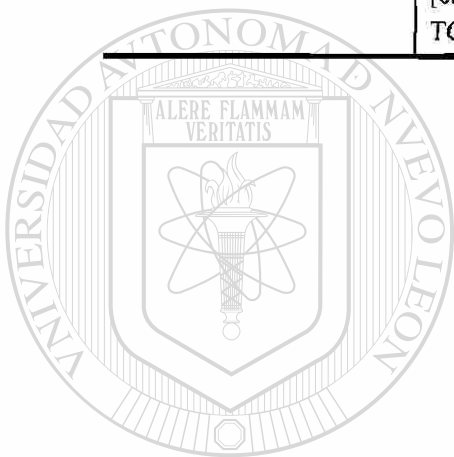
<i>GEN</i>	<i>Iniciadores específicos (5' → 3')</i>	<i>Posición genómica</i>
Marcadores de resistencia <i>CYP9J29</i>	[cadena larga]-ATCGGGTCACGGTTTCCG [cadena corta]-ATCGGGTCACGGTTTCA	III, 52
<i>CYP6BB2</i>	GAACGAAAATCTACGCAGCAT [cadena larga]-AGTTGAAATACGATACTGTG [cadena corta]-AGTTGAAATACGATACTATA	I,66
<i>CYP325R1</i>	TGARTGCCGATTTGATGG [cadena larga]-TGATTCTTTGGTTAATTTTCACTTA [cadena corta]-TGATTCTTTGGTTAATTTTCACTT	III,37
<i>CYP4H32</i>	ATGGGTGTTCTCGGCA [cadena larga]-GCTGAACGGAATGTAATCGTAYCGG [cadena corta]-GCTGAACGGAATGTAATCGTAYTGA	III,36
<i>CYP4C52</i>	CTATCCAGATCCAGAACG [cadena larga]-TG TAGAGTTTGAACATCMCGTG [cadena corta]-TG TAGAGTTTGAACATCMCATT	I,26
<i>CYP4G35</i>	GCCGATCCTGGAACAAGA [cadena larga]-AAGTTACGGTGGATATTCGGC [cadena corta]-AAGTTACGGTGGATATTCAGT	I,28
<i>CYP9M8</i>	CTCTCGCTCGTCTCTGC [cadena larga]-CGATTACGACATAGCTGCCACAGA [cadena corta]-CGATTACGACATAGCTGCCACGGC	II,49
<i>CYP6AL3</i>	CATAAATAGTAAAGCAAAGTAGCG [cadena larga]-GGTAYGGAAGACGATAGAAGAT [cadena corta]-GGTAYGGAAGACGATAGAAAAC	I,59
<i>CYP12F5</i>	GAAGTAATAGCTGCATCATATCYTT [cadena larga]-GATTGTWAAGGTTGGTTTTCTTCAA [cadena corta]-GATGTWAAGGTTGGTTTTCTTTAT	II,31
<i>CYP6BY1</i>	GCTGGAATGATCTRAAGTT [cadena larga]-GTTCTAAAACCCCACTTCCCGGAC [cadena corta]-GTTCTAAAACCCCACTTCCCGAAT	III,53
<i>CYP6P12v1</i>	CGGTTCTTCATCTCCTCGTAG [cadena larga]-AGCATCCGTAATCTTAACCCCCAC [cadena corta]-AGCATCCGTAATCTTAACCCCCTAT	I,36
<i>CYP4H30</i>	GTTTATCTTTGCGTCTGTTG [cadena larga]-GGAGCGATTTTCCCAC [cadena corta]-GGAGCGATTTTCTTAA	III,23
<i>CYP9AE1</i>	CGCTGACCAATACAGTTCTC [cadena larga]-ATTGGTTAGCGAAACGATGCTGCAA [cadena corta]-ATTGGTTAGCGAAACGATGCTGTAC	I,42
	AGTAACTGAATCAAATCTGG	

Tabla 8 (continuación)

<i>GEN</i>	<i>Iniciadores específicos (5' → 3')</i>	<i>Posición genómica</i>
<i>CCEunk0</i>	[cadena larga]-GCAAGGTTTGAATTATGTAAGTCTA [cadena corta]-GCAAGGTTTGAATTATGTAAGTTTT GTCGGCAAATAACTGAAA	III,37
<i>CCEbe20</i>	[cadena larga]-ACGGATGATTAGCCAGGTAT [cadena corta]-ACGGATGATTAGCCAGGCAA TACAAYCCATTCTCACCGC	II,25
<i>CCEae1D</i>	[cadena larga]-TTCACRTTTTCCGTTTCGTC [cadena corta]-TTCACRTTTTCCGTTTCGTTAG AAAGCCACCCAGAAGATA	II,33
<i>CCEaelo</i>	[cadena larga]-ATCGTCTTACGCATTTTGA [cadena corta]-ATCGTCTTACGCATTTTCGT TAGCAGAGGTGCCCGAATC	III,48
<i>CYP9J32</i>	[cadena larga]-ACTGCTTCCTTGATGATTGTG [cadena corta]-ACTGCTTCCTTGATGATTATT AAGTTTGATGATTAAGATGGG	II,52
<i>CYP9J19</i>	[cadena larga]-GCGACTCCTCTCAGRGACAC [cadena corta]-GCGACTCCTCTCAGRGATAT ACCACCATATCCAGATACTT	III,52
<i>CYP6P12v2</i>	[cadena larga]-CTTCGGGTTGTTATAGCTC [cadena corta]-CCTTCGGGTTGTTATAGTTT ACGATTCTGGTGCGGGATTTTGC	I,32
<i>GSTe7</i>	[cadena larga]-ACACGATACCGACCATGGA [cadena corta]-ACACGATACCGACCATAGT TACTTGACACCAGATAG	I,37
<i>KdrV1016I</i>	[cadena larga]-ACAAATTGTTTCCCACCCGCACCGG [cadena corta]-ACAAATTGTTTCCCACCCGCACTGA TGATGAACCSGAATTGGACAAAAGC	III,32
Marcadores genómicos		
<i>APN (aminopeptidase N)</i>	[cadena larga]-GCTGATTGATGACTCGATG [cadena corta]-GCTGATTGATGACTCGTTC GAATGAGTTTTAGAGTGATGTCGT	I,54
<i>Apyrase</i>	[cadena larga]-ATTTCCAGTTTGAATCTGA [cadena corta]-ATTTCCAGTTTGAATCAGT GCTTTTAAGTCTCGTTTTTCG	III,57
<i>Arc 2</i>	[cadena larga]-CTTCTCTGGYTCATCTCCTAACATC [cadena corta]-CTTCTCTGGYTCATCTCCTAACGTG CGTCTGAACAAAACCCCC	I,48
<i>Cathepsin B-like thiol</i>	[cadena larga]-GTGATCCGTAACCAGCGA [cadena corta]-GTGATCCGTAACCAGTGT ATCGGTCATGGCYGAAGC	I,5
<i>Chymotrypsin</i>	[cadena larga]-GTCGTTTGGTTGCGGARTTCAGCG [cadena corta]-GTCGTTTGGTTGCGGARTTCAACA CGGGACTGACTCCYCCTTGATAG	II,43

Tabla 8 (continuación)

<i>GEN</i>	<i>Iniciadores específicos (5' → 3')</i>	<i>Posicion genómica</i>
<i>Maltase-like I</i>	[cadena larga]-ACCGTCCARATCCCCGATAGCG [cadena corta]-ACCGTCCARATCCCCGATAACA GAAAYTTCTACCAAGTTTACCCAA	III,21
<i>Mucin</i>	[cadena larga]-GTTGAAGAGGGAGGAGCAATA [cadena corta]-GTTGAAGAGGGAGGAGCAGTG CACCACAACGGCACCAGC	II,28
<i>UGALS vitellogeni</i>	[cadena larga]-TGGATGCCGA ACTACCAG [cadena corta]-TGGATGCCGA ACTACTAA GAGCGGTCATGGTCTTGGA	III,46
<i>Vitellogenin convertase</i>	[cadena larga]-TGCCAAATGTAGCAAACG [cadena corta]-TGCCAAATGTAGCAAGCA TCCGCCATCACTTCTCAGC	II,26



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

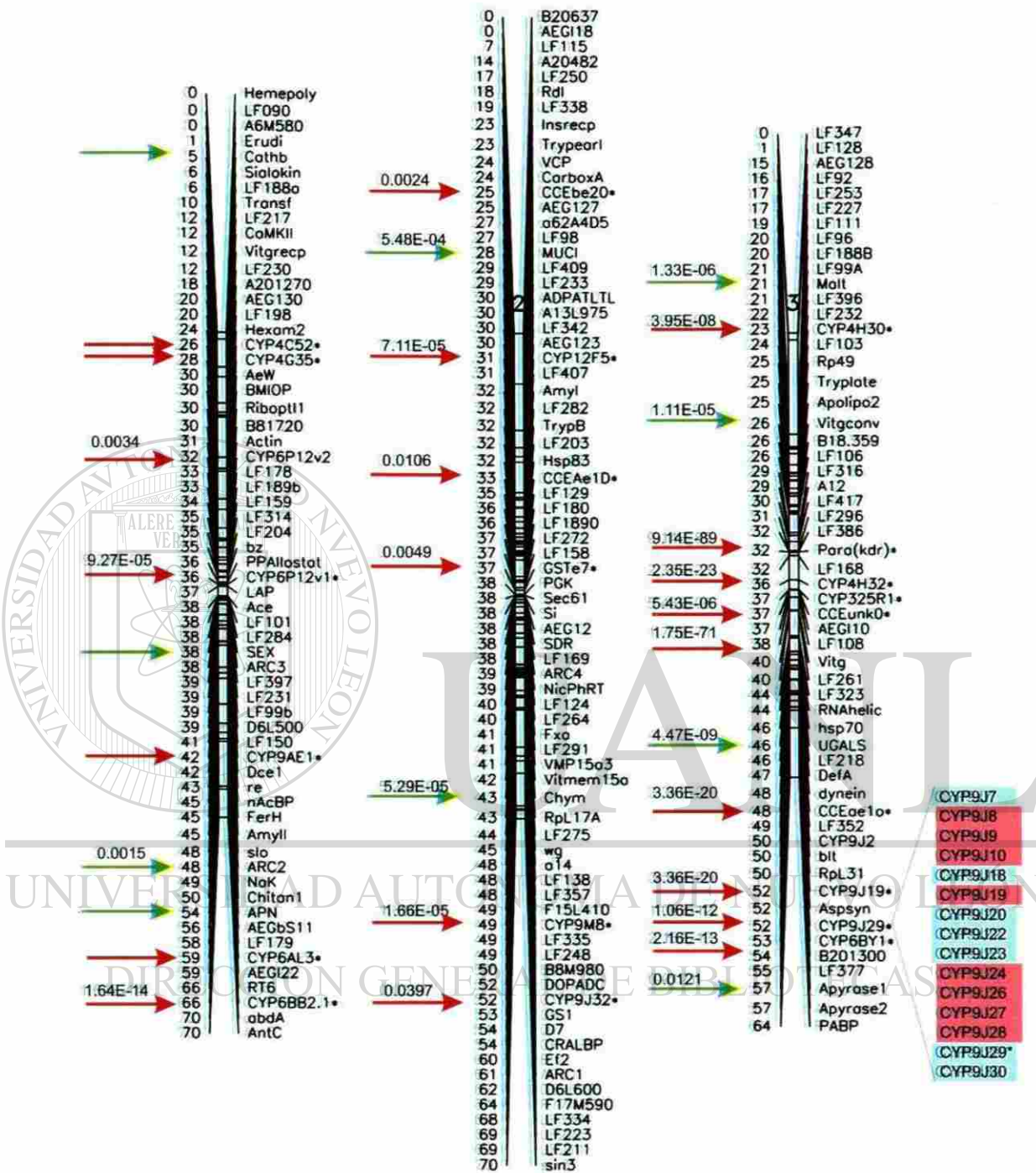


Figura 7. Mapa genético de *Ae. aegypti*. Las flechas indican a los genes mapeados en la familia F31.1, las flechas rojas indican a los genes de resistencia, las flechas verdes son genes previamente mapeados. Las probabilidades F , representan el grado de asociación entre los genotipos y la susceptibilidad para cada marcador evaluado. Los valores p más negativos indican una mayor asociación entre el genotipo y fenotipo.

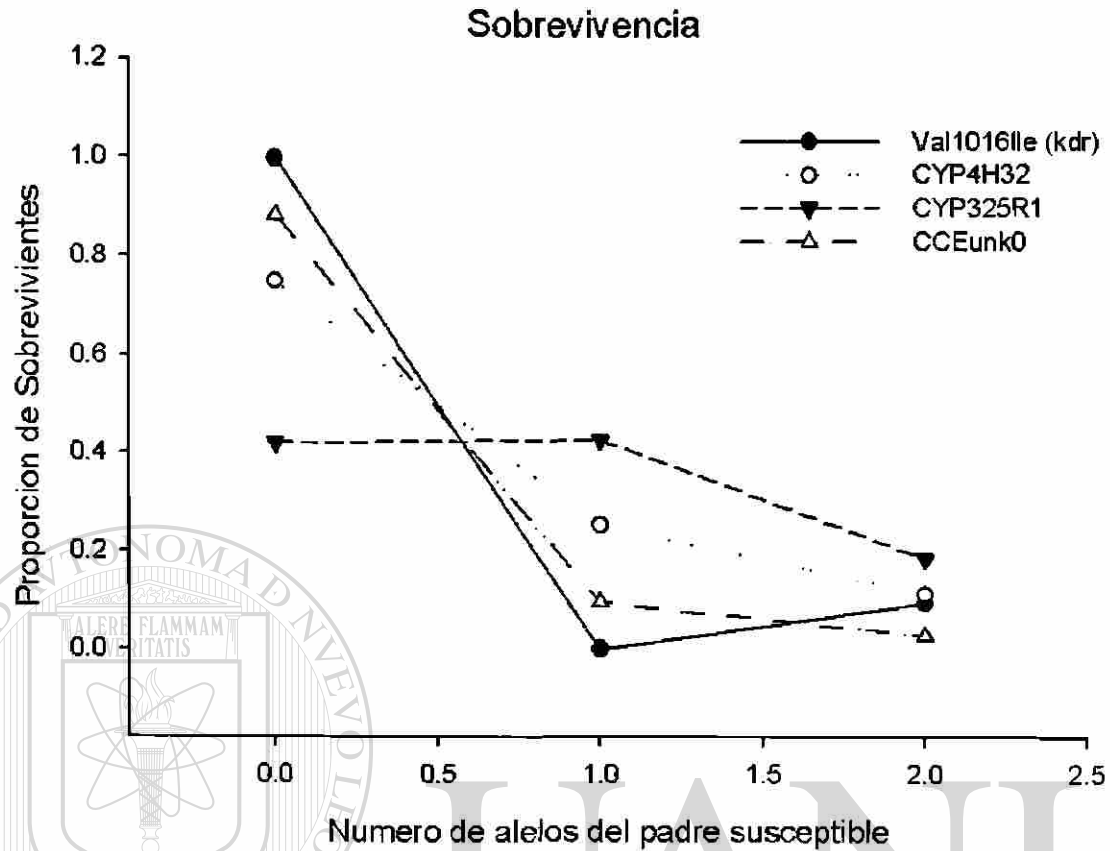


Figura 8. Gráfica de la proporción de sobrevivencia, en función del número de alelos heredados por el abuelo susceptible en la familia de mapeo F31.1. Aparecen los marcadores-SNP del QTL1 en el cromosoma III: *Val1,016Ile*, *CYP4H32*, *CYP325R1* y *CCEunk0*.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

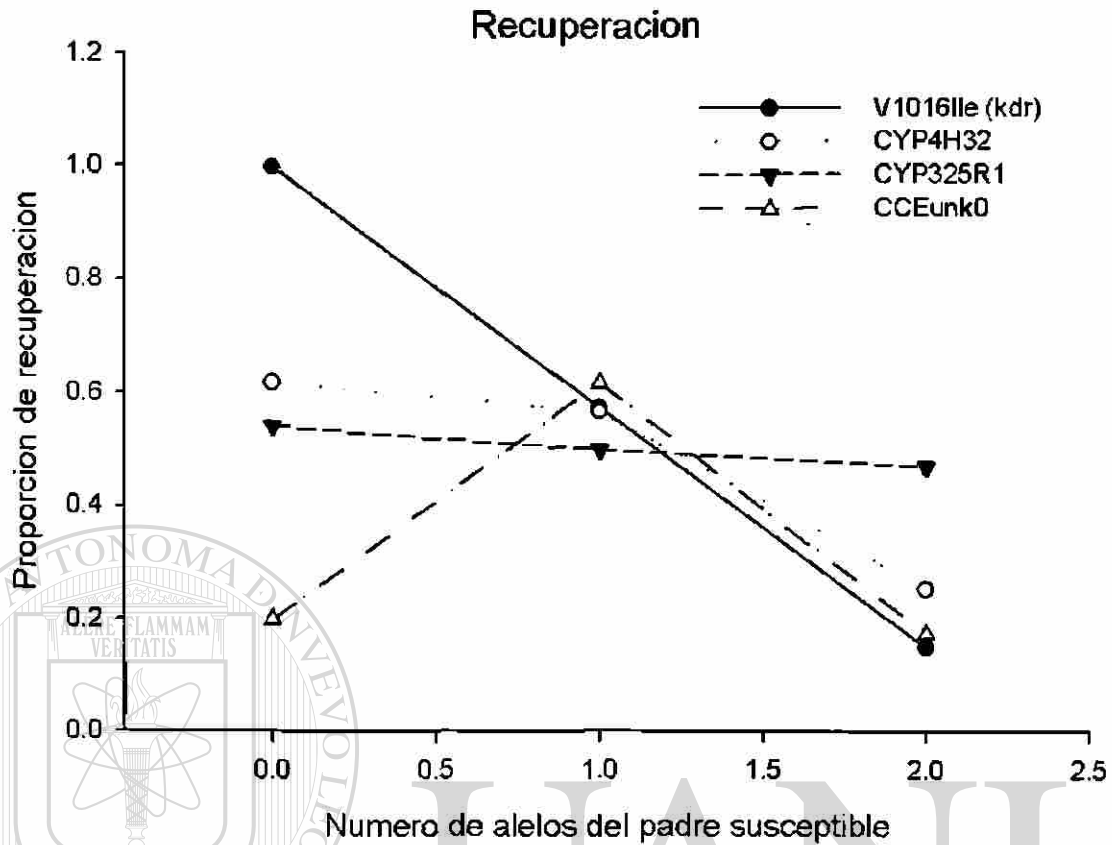


Figura 9. Gráfica de la proporción de recuperación, en función del número de alelos heredados por el abuelo susceptible en la familia de mapeo F31.1. Aparecen los marcadores-SNP del QTL1 en el cromosoma III: *Vall,016Iso*, *CYP4H32*, *CYP325R1* y *CCEunk0*.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

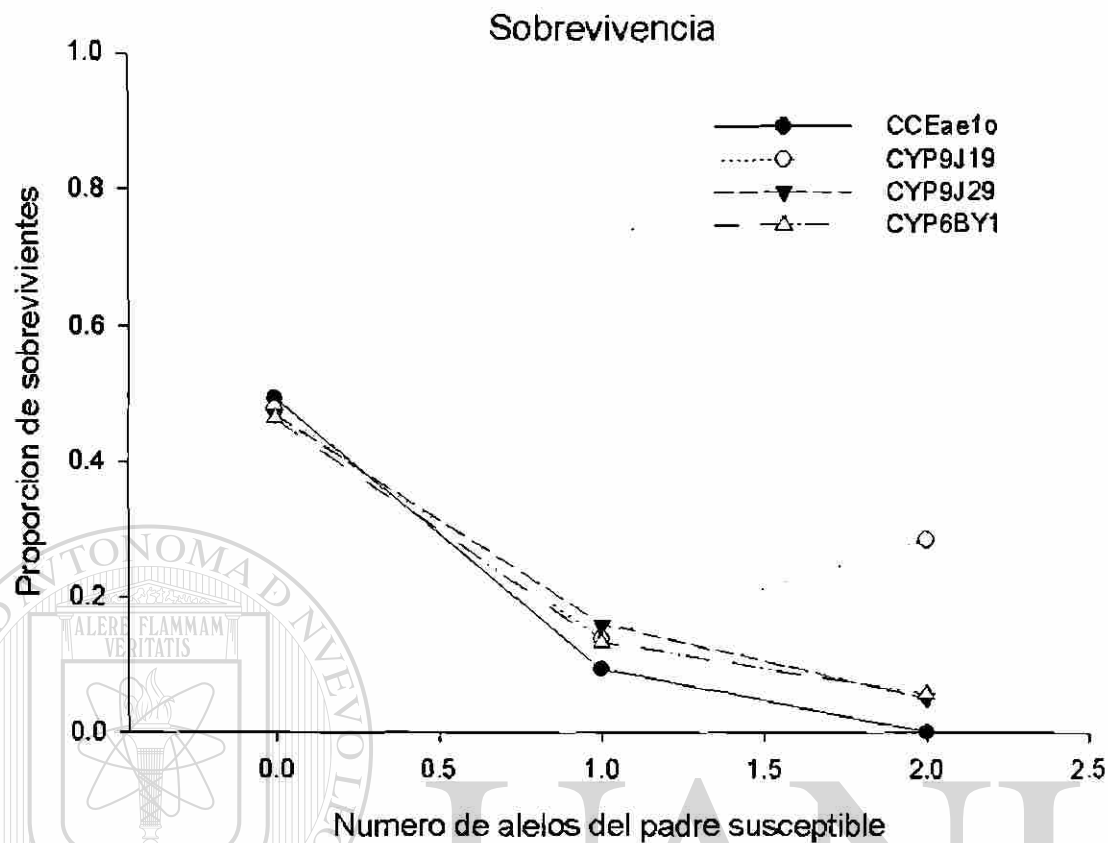


Figura 10. Gráfica de la proporción de sobrevivencia, en función del número de alelos heredados por el abuelo susceptible, en la familia de mapeo F31.1. Aparecen los marcadores-SNP del QTL2 en el cromosoma III: *CCEae1o*, *CYP9J19*, *CYP9J29* y *CYP6BY1*.

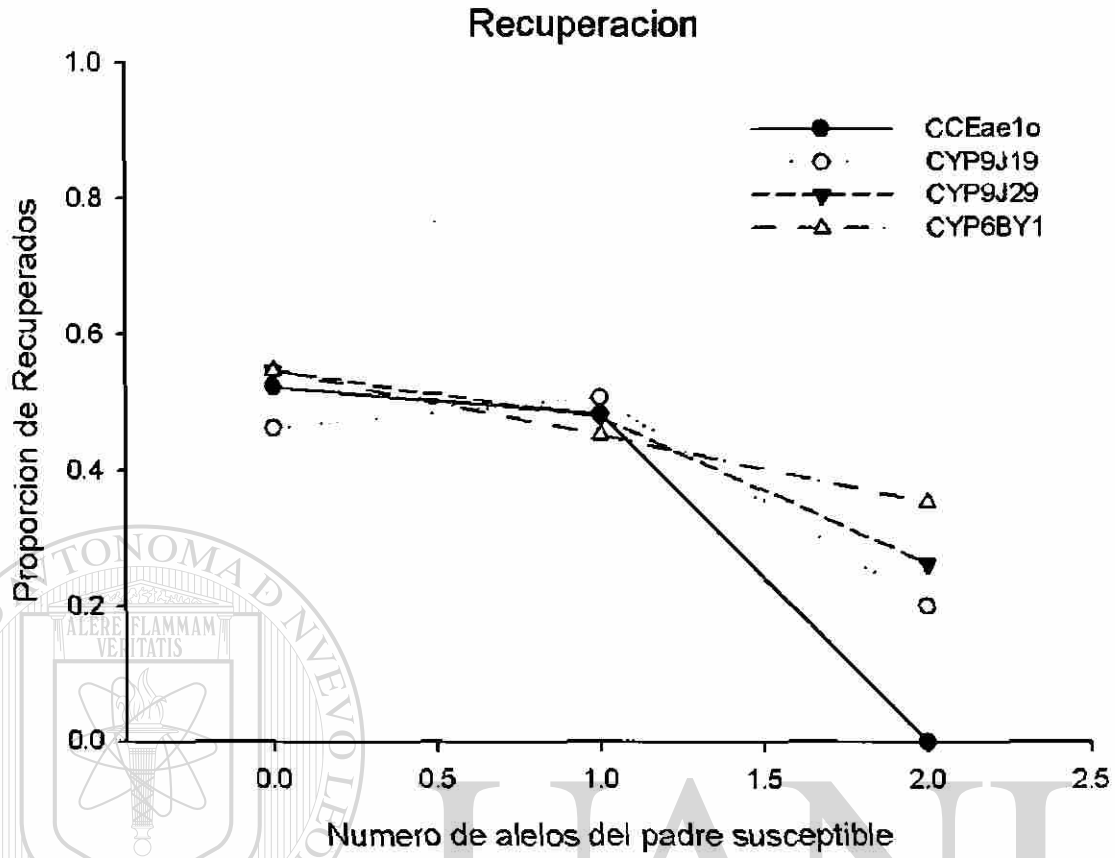


Figura 11. Gráfica de la proporción de recuperación, en función del número de alelos heredados por el abuelo susceptible, en la familia de mapeo F31.1. Aparecen los marcadores-SNP del QTL2 en el cromosoma III: *CCEae1o*, *CYP9J19*, *CYP9J29* y *CYP6BY1*.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

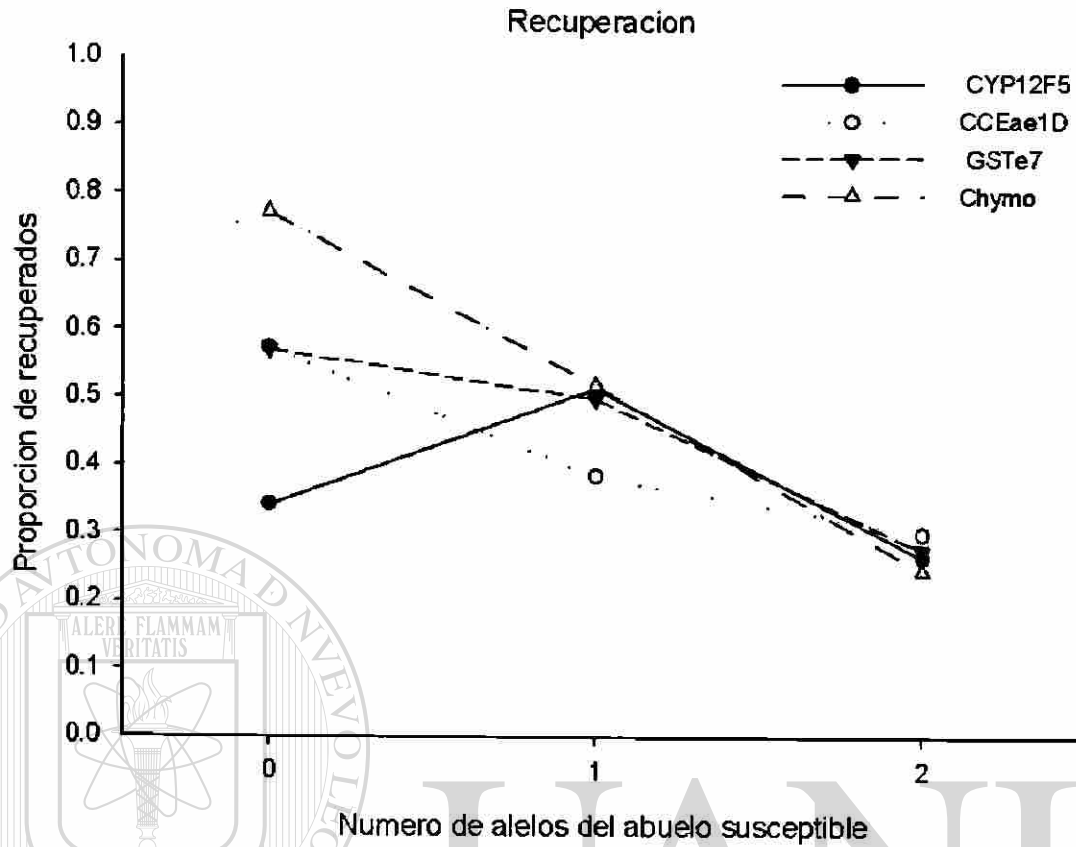


Figura 12. Gráfica de la proporción de recuperación, en función del número de alelos heredados por el abuelo susceptible en la familia de mapeo F31.1. Aparecen los marcadores-SNP DEL QTL1 en el cromosoma II: *CYP12F5*, *CCEae1D*, *GSTe7* y *Chymo*.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Mapeo de Intervalos: Sexos

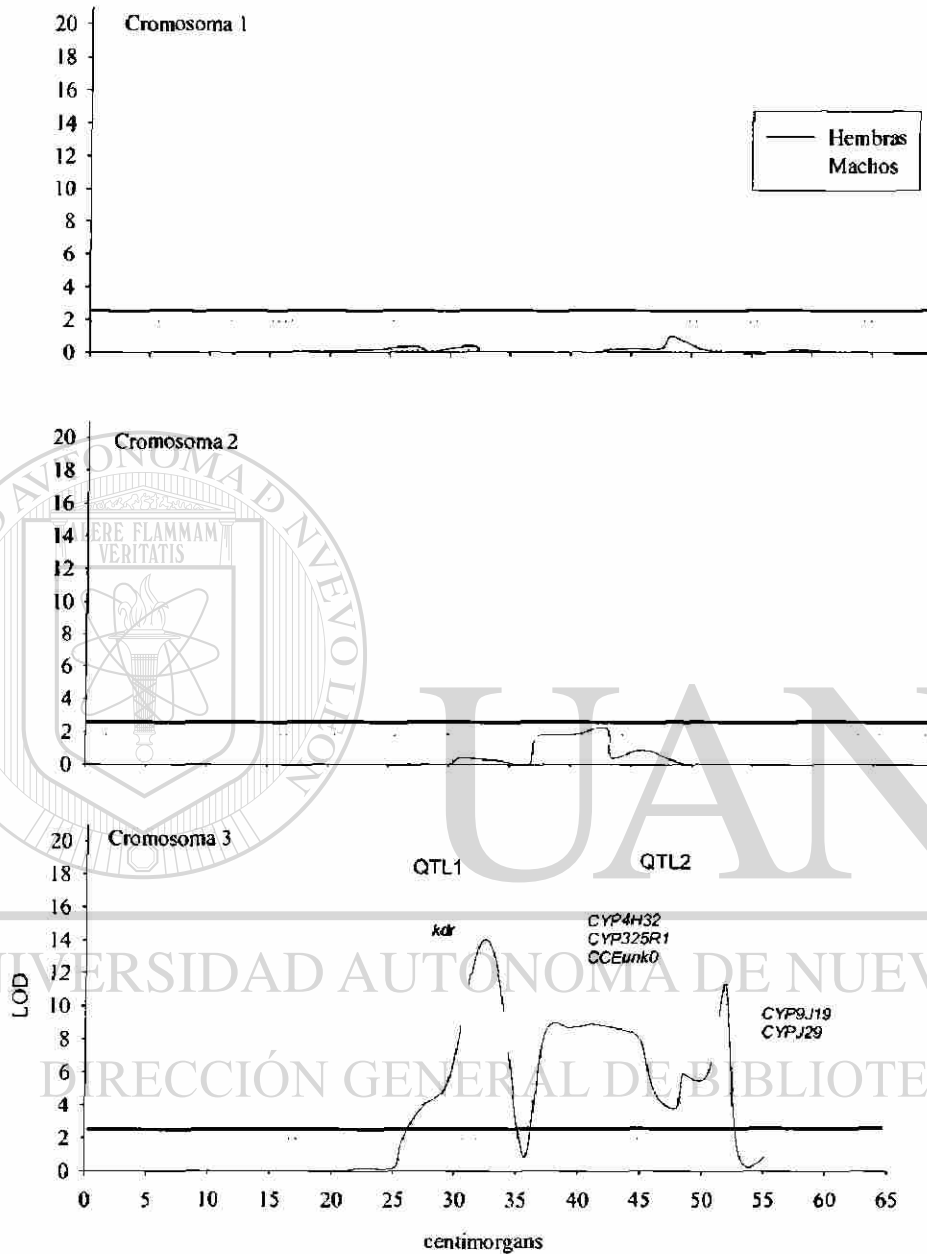


Figura 13 Gráfica de los valores LOD asociados con la resistencia a la permetrina en los cromosomas I, II y III, en la familia de mapeo F31.1. El análisis de Mapeo de Intervalos se realizó en hembras y machos por separado. Las líneas horizontales corresponden al umbral LOD. Los QTL asociados al fenotipo corresponden a las curvas que sobrepasan al umbral LOD. Los marcadores asociados a estos QTL se encuentran en la gráfica.

Mapeo de Intervalos Compuestos: Sexos

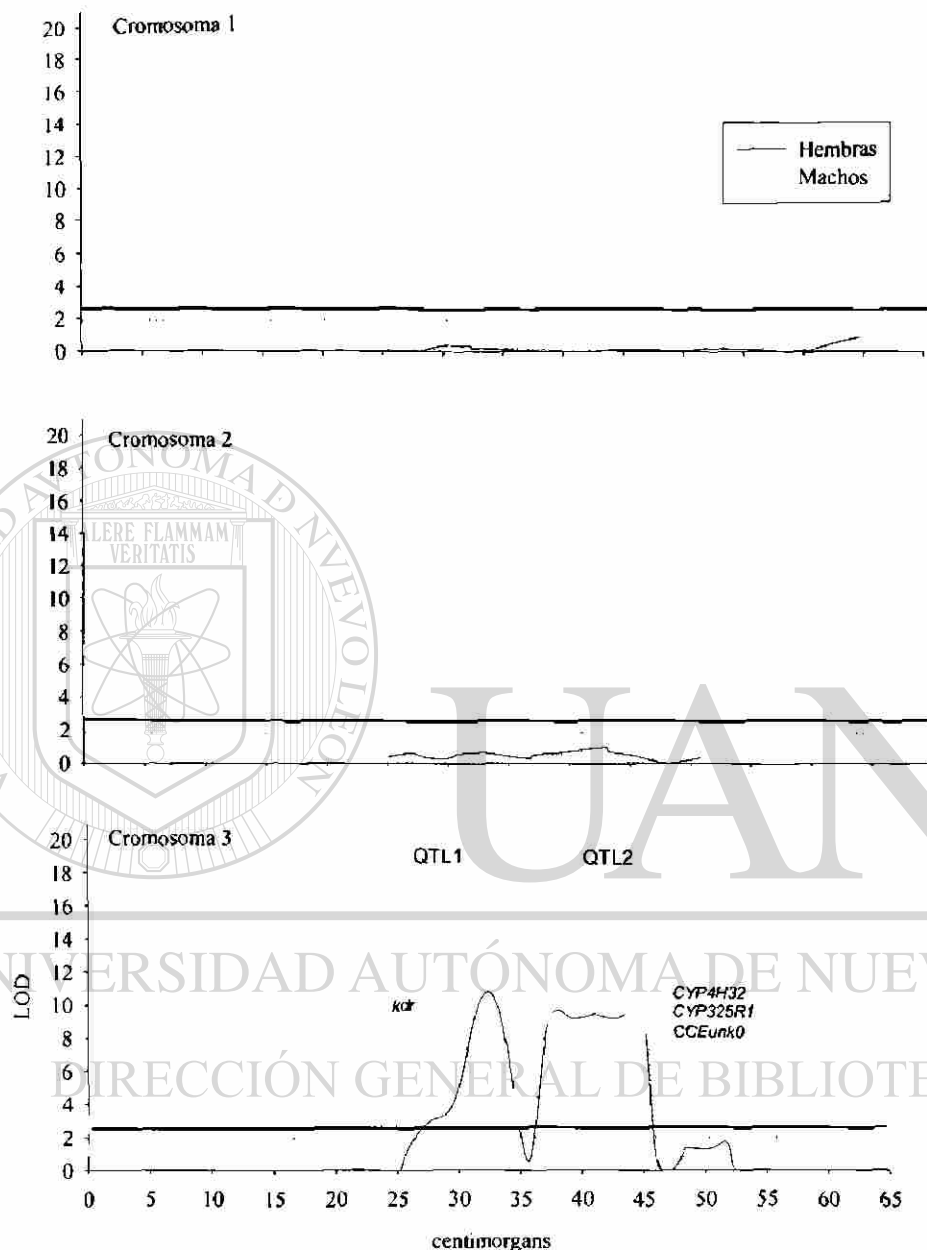


Figura 14. Gráfica de los valores LOD asociados con la resistencia a la permetrina en los cromosomas I, II y III, en la familia de mapeo F31.1. El análisis de Mapeo de Intervalos Compuestos se realizó en hembras y machos por separado. Las líneas horizontales corresponden al umbral LOD. Los QTL asociados al fenotipo corresponden a las curvas que sobrepasan al umbral LOD. Los marcadores asociados a estos QTL se encuentran en la gráfica.

Mapeo de Intervalos: no-kdr

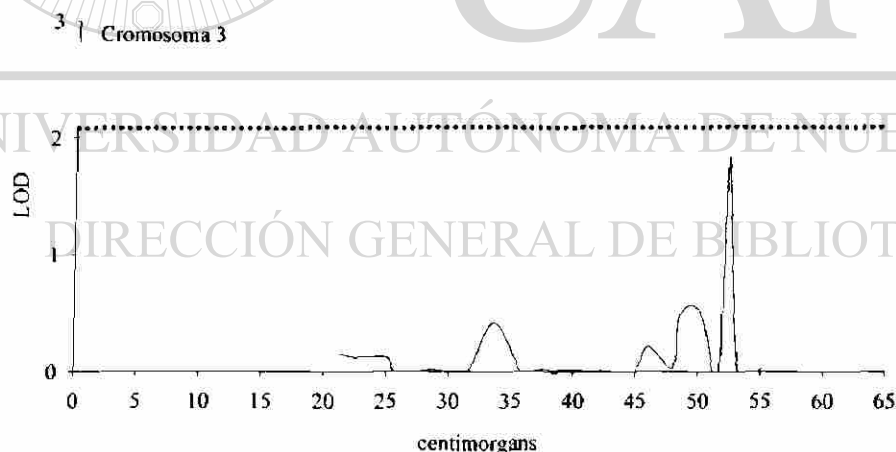
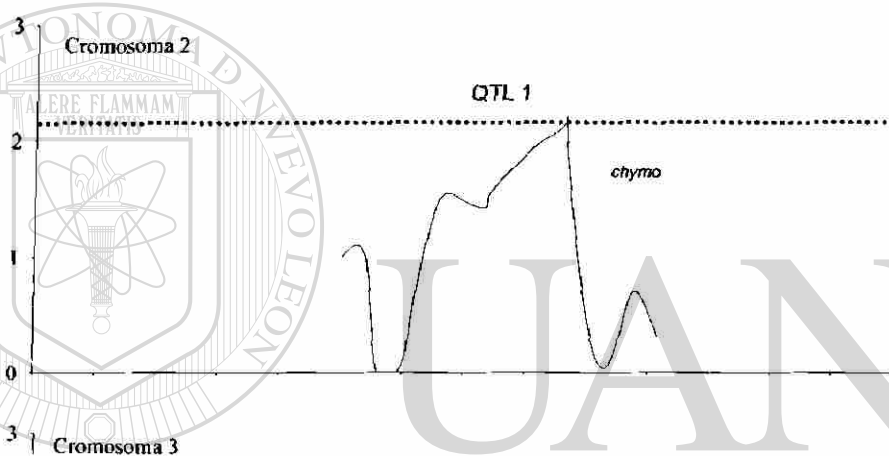
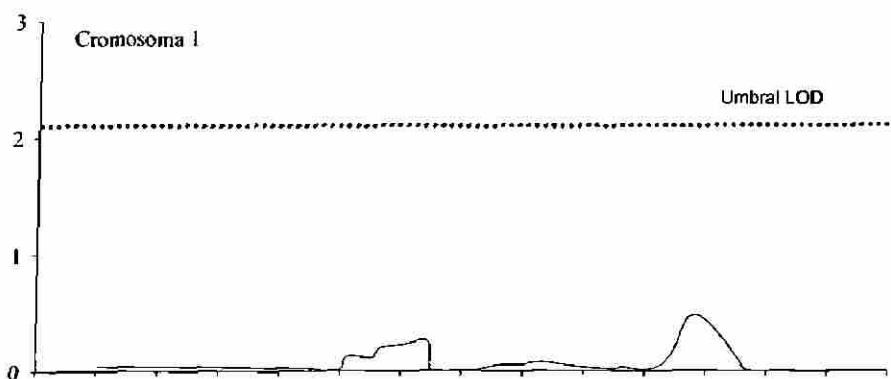


Figura 15. Gráfica de los valores LOD asociados con la resistencia a la permetrina en los cromosomas I, II y III, en la familia de mapeo F31.1. El análisis de Mapeo de Intervalos se realizó omitiendo a los individuos con genotipo homocigoto *kdr*. Las líneas horizontales corresponden al umbral LOD. Los QTL asociados al fenotipo corresponden a las curvas que sobrepasan al umbral LOD. Los marcadores genéticos asociados a estos QTL se encuentran en la gráfica.

Mapeo de Intervalos Compuestos: no-kdr

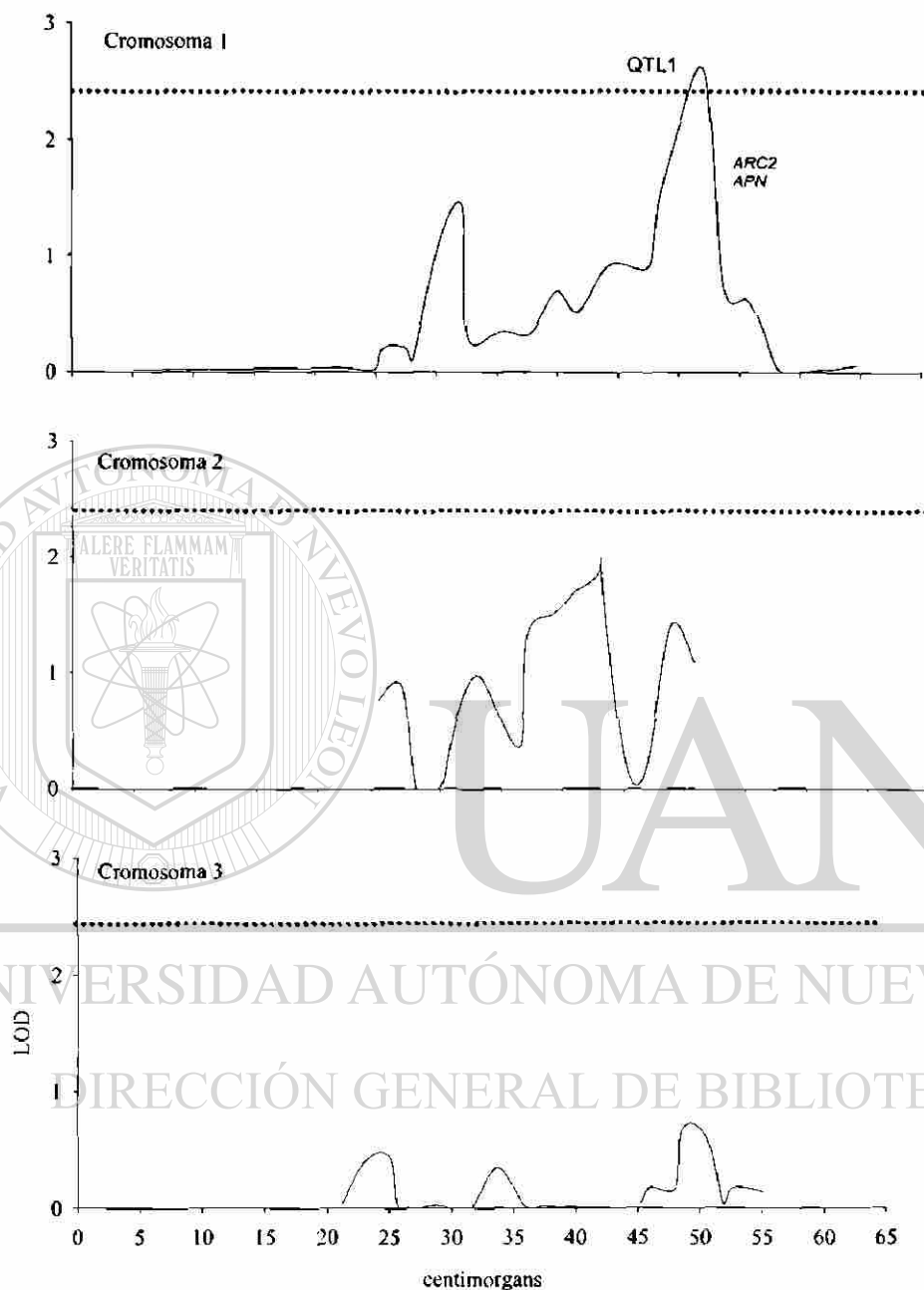


Figura 16. Gráfica de los valores LOD asociados con la resistencia a la permetrina en los cromosomas I, II y III, en la familia de mapeo F31.1. El análisis de Mapeo de Intervalos Compuestos se realizó omitiendo a los individuos con genotipo homocigoto *kdr*. Las líneas horizontales corresponden al umbral LOD. Los QTL asociados al fenotipo corresponden a las curvas que sobrepasan al umbral LOD. Los marcadores genéticos asociados a estos QTL se encuentran en la gráfica

Mapeo de Intervalos: Recuperación

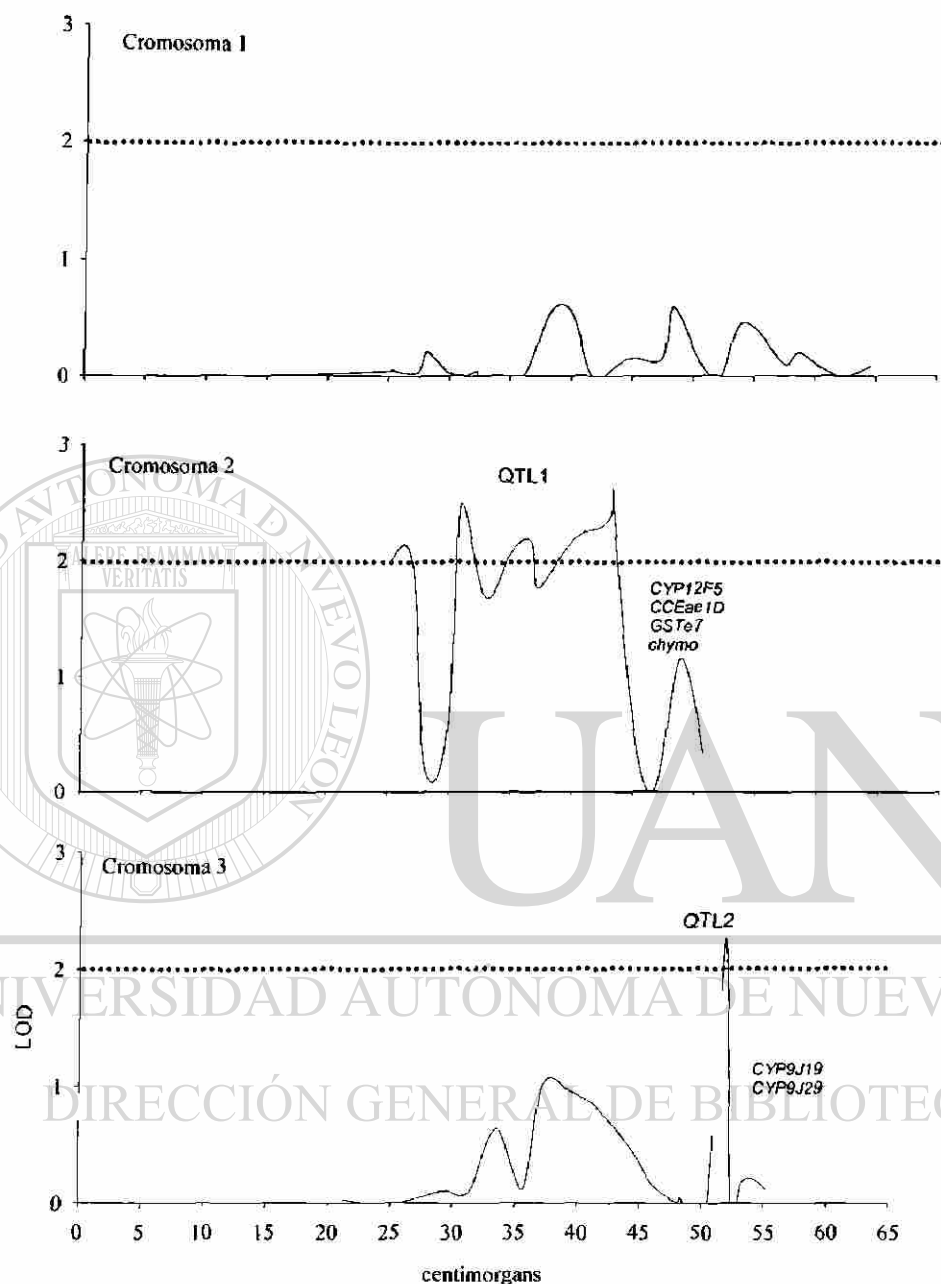


Figura 17. Gráfica de los valores LOD asociados con la recuperación a la exposición a la permetrina en los cromosomas I, II y III, en la familia de mapeo F31.1. El análisis de Mapeo de Intervalos se realizó omitiendo a los individuos con el fenotipo *vivo*. Las líneas horizontales corresponden al umbral LOD. Los QTL asociados al fenotipo corresponden a las curvas que sobrepasan al umbral LOD. Los marcadores genéticos asociados a estos QTL se encuentran en la gráfica

Mapeo de Intervalos Compuestos: Recuperación

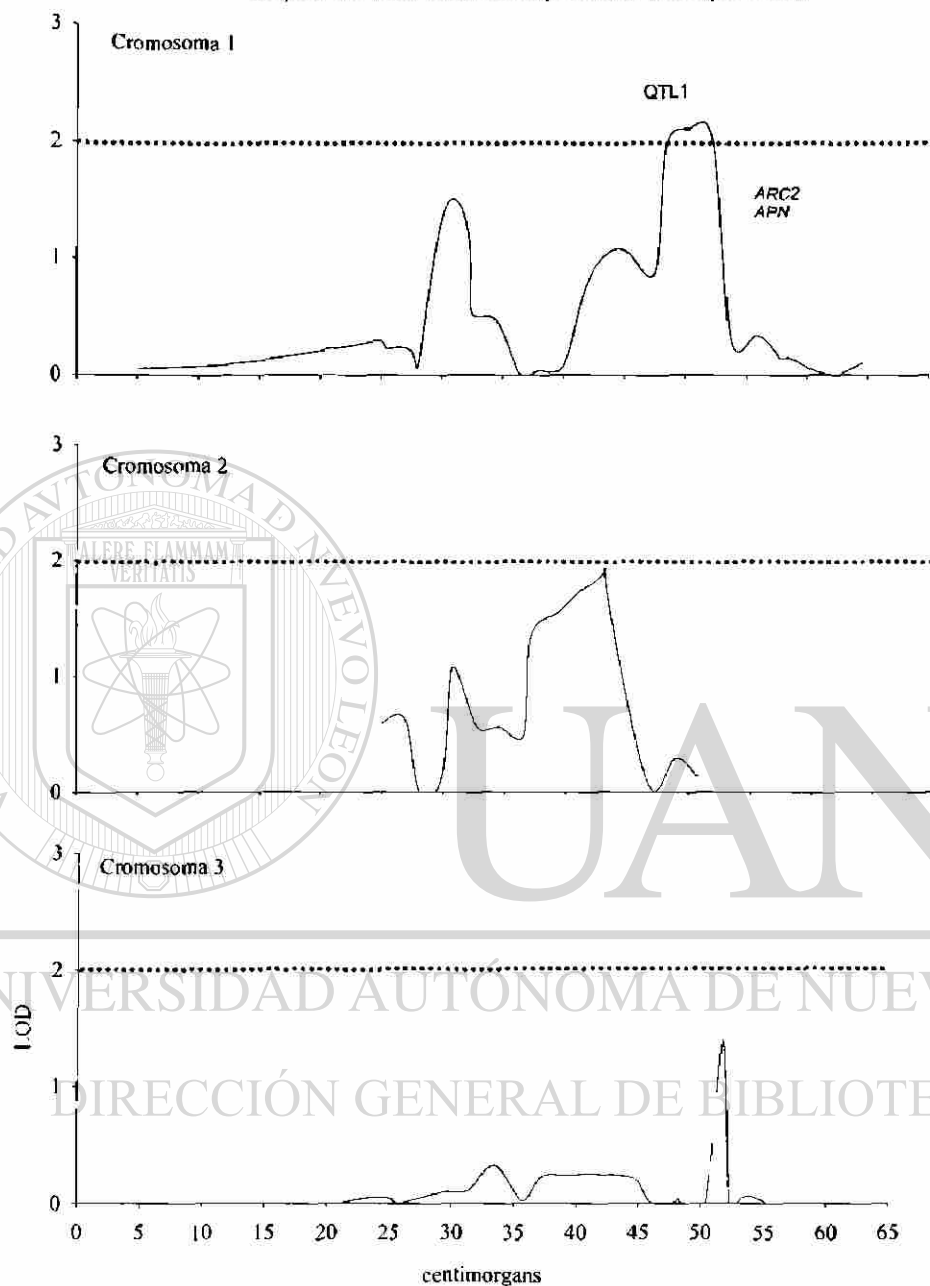


Figura 18. Gráfica de los valores LOD asociados con la recuperación a la exposición a la permetrina en los cromosomas I, II y III, en la familia de mapeo F31.1. El análisis de Mapeo de Intervalos Compuestos se realizó omitiendo a los individuos con el fenotipo *vivo*. Las líneas horizontales corresponden al umbral LOD. Los QTL asociados al fenotipo corresponden a las curvas que sobrepasan al umbral LOD. Los marcadores genéticos asociados a estos QTL se encuentran en la gráfica.

Tabla 9. Análisis de chi-cuadrada para las frecuencias genotípicas de dos marcadores (*Iso1,011Met* y *Val1,016Iso*) en el gen *para*. Las fórmulas de las frecuencias esperadas siguen un modelo de recombinación, utilizando una $r=0.001$. El genotipo esta representado en pares de locus por cromosoma homólogo, II/MI corresponde a un individuo con genotipo *Iso1,011/Iso1,016* en una de las copias del cromosoma y el genotipo *Met1,011/Iso1,016* en la segunda copia. El valor de chi-cuadrada no fue significativo.

Genotipo en dos locus	Modelo de Frecuencias Esperadas	r	Observado	Esperado	chi-sq
		$r= 0.001$			
MI/MI	$(1-r)^2$	0.2495	20	99.8	63.8
II/II	r^2	0.0000	11	0.0	1209978.0
II/MI	$2r(1-r)$	0.0005	80	0.1998	31872.2
MV/MV	r^2	0.0000	16	0.0001	2559968.0
IV/IV	$(1-r)^2$	0.2495	3	99.8001	93.9
MV/IV	$2r(1-r)$	0.0005	37	0.1998	6778.1
MI/MV	$2r(1-r)$	0.0005	49	0.1998	11919.2
II/IV	$2r(1-r)$	0.0005	13	0.1998	820.0
MI/IV	$2r^2 + 2(1-r)^2$	0.4990	171	199.6004	4.1
		1	400	400	12743.4

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LITERATURA CITADA

- Ahmed, S., Wilkins, R. M. & Mantle, D. (1998) Comparison of proteolytic enzyme activities in adults of insecticide resistant and susceptible strains of the housefly *Musca domestica* L. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28, 629–639.
- Anthony N., Rocheleau T., Mocelin G., Lee Hwa-Jung, R. French-Constant. 1995. Cloning, sequencing and functional expression of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *FEBS Letters* 368: 461-465
- Apperson and Georghiou. 1975. Changes in Cross-Resistance Spectrum Resulting from Methyl Parathion Selection of *Culex tarsalis* Coq. *Am J Trop Med Hyg.*; 24: 698-703
- Ayesa P, Harrington LC, and JG. Scott. 2006. Evaluation of Novel Insecticides for Control of Dengue Vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 43(1): 55-60
- Basten, C. J., B. S. Weir and Z.-B. Zeng, 2002 QTL Cartographer, pp. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.
-
- Bennett KE, Flick D, Fleming KH, Jochim R, Beaty BJ, Black WC 4th. 2005. Quantitative trait loci that control dengue-2 virus dissemination in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics.* 170(1):185-94. ®
- Bennett KE., Olson KE, Munoz Mdel, Fernandez-Salas I. and JA. Farfan-Ale. 2002. Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 67: 85–92.
- Berge J.B, Feyereisen R. and M. Amichot. 1998. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects *Phil.Trans. R. Soc. Lond. B.* 353, 1701-1705
- Berticat C, Boquien G, Raymond M and C. Chevillon. 2002. Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genet. Res. Camb.* 79:41-47.
- Black C. W., Baer F.C., Antolin M.F and N. M. DuTeau. 2001. Population genomics: Genome-Wide Sampling of Insect Populations. *Annu. Rev. Entomol.* 46:441-469.

Black W and LM Munstermann, 1996. Molecular taxonomy and systematic of arthropod vectors, pp. 438-470, en *Biology of Disease Vectors*, editado por W.C. Marquardt y B. Beaty. University Press of Colorado, Boulder, CO.

Black WC IV and NM DuTeau. 1997. RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetic studies. See Ref. 63a, pp. 361-73 Crampton JM, Beard CB, Louis C, eds. 1997. *The Molecular Biology of Insect Disease Vectors: A Methods Manual*. London: Chapman & Hall

Black y Severson, 2005. Genetics of Vector Competence. pp 415-447 en *Biology of Disease Vectors* (2nd ed) editado por W. C. Marquardt *et al.*. Elsevier Academic Press.

Black, W. C., and D. W. Severson, 2005. Genetics of vector competence. pp. 415-448 in *Biology of Disease Vectors*, edited by W. C. Marquardt. Elsevier Academic Press. Harcourt Academic Press, San Diego.

Bloomquist J. R. 1999. Insecticides: Chemistries and Characteristics. E. B. Radcliffe and W. D. Hutchison Editors. Radcliffe's IPM World Textbook, URL:<http://ipmworld.umn.edu>, University of Minnesota, St. Paul, MN.

Bloomquist J.R.. 1996. Ion Channels as Targets for Insecticides. *Ann. Rev. Entomol.* 41, 163-190.

Bloomquist, J.R. & Miller, T.A. (1986) Sodium channel neurotoxin as probes of the knockdown resistance mechanism. *Neurotoxicology*, 7.

Bosio, C. F., R. E. Fulton, M. L. Salasek, B. J. Beaty and W. C. T. Black, 2000. Quantitative trait loci that control vector competence for dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics* 156: 687-698.

Bourguet D., Guillemaud T, Chevillon C, and M Raymond. 2004. Fitness costs of insecticide resistance in natural breeding sites of the mosquito *Culex pipiens*. *Evolution*. 58(1):128-135.

Bregues, C., Hawkes, N.J., Chandre, F., McCarroll, L., Duchon, S., Guillet, P., Manguin, S., Morgan, J.C., Hemingway, J., 2003. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Med. Vet. Entomol.* 17, 87-94.

Brogdon G. W., McAllister J., Corwin A. M. and C. Cordon-Rosales. 1999. Oxidase-Based DDT-Pyrthroid Cross-Resistance in Guatemalan *Anopheles albimanus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 64:101-111.

- Brogdon GW and Janet McAllister. 1998a. Insecticide Resistance and Vector Control. *Emerging Infectious Diseases*. 4: 605-613
- Brogdon GW. 1989. Biochemical Resistance Detection: an alternative to bioassay. *Parasitology Today*. 5(1):56-60
- Brogdon, W. G. & McAllister, J. C. (1998b) Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 14, 159-164
- Brown AWA, 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2:123-140.
- Brown, AWA., and R. Pal. 1971. Insecticide resistance in arthropods. World Health Organization, Geneva, Switzerland
- Callaghan A., T. Guillemaud, N. Makate and M. Raymond. 1998. Polymorphisms and Fluctuations in copy number of amplified esterase genes in *Culex pipiens* mosquitoes. *Insect Molecular Biology* 7(3), 295-300
- Casida J, and G. Quistad. 1998 Golden Age of Insecticide Research: Past, Present or Future ?. *Annu. Rev. Entomol.* 43:1-16
- Chandre F, Darriet F, Darder M, Cuani A and JMC Doannio. 1998. Pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* from West Africa. *Med. Vet. Entomol.* 12:356-366.
- Chandre F, Darriet F, Manga L, Akogbeto M, Faye O, Mouchet J, Guillet P. 1999. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae sensu lato*. *Bull World Health Organ*, 77:230-234.
- Coleman M., Vontas J.G. and J. Hemingway. 2002. Molecular characterization of the amplified aldehyde oxidase from insecticide resistant *Culex quinquefasciatus* Eur. *J. Biochem.* 269, 768-779.
- Curtis, CF. 1989. *Appropriate technology in vector control*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Darvasi, A. and Soller, M. 1995. Advanced intercross lines, and experimental population for fine genetic mapping. *Genetics* 141: 1199-1207.
- Ding, Y., Ortell, F., Rossiter, L.C., Hemingway, J. and Ranson, H. 2003. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase family: annotation, phylogeny and gene expression profiles. *BMC Genomics* 13: 35.
- Eldridge BF. 2005. Mosquitoes, the Culicidae. pp 95-11 en *Biology of Disease Vectors* (2nd ed) editado por W. C. Marquardt *et al.*. Elsevier Academic Press.

Enayati A.A., Ranson H. and J. Hemingway. 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*. 14(1): 3-8.

Enayati, A.A., Vatandoost, H., Ladonni, H., Townson, H., J Hemingway. 2003. Molecular evidence for a kdr-like pyrethroid resistance mechanism in the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Med. Vet. Ent.* 17, 138–144

Falconer, D.S. and MacKay, T.F.C. 1996. Introduction to quantitative genetics. (4th Ed.) Longham Press.

Fernández-Salas I.1999. *Biología y Control de Aedes aegypti*. Manual de Operaciones. Editorial UANL. ISBN 968 7808 88 8, Monterrey, Mexico.

Feyereisen R, Anderson JF, Carino FA, Cohen MB, Koener JF. 1995. Cytochrome P450 in the house fly: Structure, catalytic activity and regulation of expression of CYP6A1 in an insecticide-resistant strain. *Pestic Sci*,43: 233–239

French-Constant, R. H. Rocheleau, T. A., Steichen, J. C., and A. E. Chalmers, 1993. A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature* 363, 449–451

French-Constant, R. H., Steichen J. C., and F. Shotkoski, 1994. Polymerase chain reaction diagnostic for cyclodiene insecticide resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. *Medical and Veterinary Entomology*, 8:99-100.

Flores Adriana E., Albeldano-Vazquez Walter, Ildefonso Fernandez Salas, Mohammad H. Badii, Haydee Loaiza Becerra, Gustavo Ponce Garcia, Saul Lozano Fuentes, William G. Brogdon, William C. Black IV and Barry Beaty. 2003. Elevated α -esterases levels associated with permethrin tolerance in *Aedes aegypti* (L.) from Baja California, Mexico. *Pesticide Biochemistry and Physiology*.82: 66-78.

Flores Adriana E., Grajales JS, Fernandez-Salas I, Ponce-Garcia G, Loaiza-Becerra Ma. H, Lozano S, Brogdon WG, Black IV WC, and B. Beaty. 2006. Mechanisms Of Insecticide Resistance In Field Populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern Mexico *Journal of the American Mosquito Control Association*: Vol. 22 (4): pp. 672–677.

Fulton R. E., Salasek M.L., DuTeau N. M. and W. C. Black IV. 2001. SSCP Analysis of cDNA Markers Provides a Dense Linkage Map of the *Aedes aegypti* Genome. *Genetics* 158: 715-726

Georghiou, G. P., M. Wirth, H. Tran, F. Saume, and A. B.,Knudsen. 1987. Potential for organophosphate resistance in *Aedes aegypti* in the Caribbean area and neighbouring countries. *J. Med. Entomol.* 24: 290-0294

- Germer, S. and Higuchi, R. 1999 Single-tube genotyping without oligonucleotide probes. *Genome Research*, 9, 72-78
- Gomez-Machorro, C., K. E. Bennett, M. L. Munoz and W. C. Black, 2004. Quantitative Trait Loci Affecting Dengue Midgut Infection Barriers in an Advanced Intercross Line of *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* 13: 637-648.
- Gong M, Yan Gu, X Hu, Y Sun, L Ma, X Li, L Sun, J Sun, J Qian, and C Zhu. 2005. Cloning and Overexpression of *CYP6F1*, a Cytochrome P450 Gene, from Deltamethrin-resistant *Culex pipiens pallens*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(5): 317–326
- Gordon J. 1988. Health Education Research: Mixed strategies in health education and community participation: an evaluation of dengue control in the Dominican Republic. Oxford University Press 3(4): 399-419.
- Gorrochotegui-Escalante N and W. C. Black IV. 2003. Amplifying whole insect genomes with multiple displacement amplification. *Insect Molecular Biology*. 12(2), 195–200
- Gubler DJ. 1989. *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*-borne disease control in the 1990s: top down or bottom up. *Am J Trop Med Hyg*;40:571-578.
- Gubler DJ. 1998 (b). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews*. 11(3): 480–496.
- Gubler, D.J. & Trent, DW. 1994. Emergence of epidemic Dengue: Dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. *Infectious Agents and Disease* 2, 383-393.
- Gubler, DJ. 1998 (a). Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 442–450.
- Guerrero, F.D., Jamroz, R.C., Kammlah, D.M., Kunz, S.E., 1997. Toxicological and molecular characterization of pyrethroid-resistant horn flies, *Haematobia irritans*: identification of *kdr* and *superkdr* point mutations. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27, 745–755.
- Hardy, J.L., 1988 Susceptibility and resistance of vector mosquitoes, pp. 87–126 in *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, edited by T. P. Monath. CRC Press, Boca Raton, FL
- Hemingway and Ranson, 2000. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. *Annu. Rev. Entomol.* 45:371-391

Hemingway J and H. Ranson. 2005. Chemical control of Vectors and Mechanisms of Resistance. pp 627-647 in *Biology of Disease Vectors* (2nd ed) edited by W. C. Marquardt *et al.*. Elsevier Academic Press.

Hemingway J, 1982. The biochemical nature of malathion resistance in *Anopheles stephensi* froma Pakistan. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 17, 149-155.

Hemingway J., Coleman M., M. Paton, L. McCarroll, A. Vaughan and D. DeSilva. 2000b. Aldehyde oxidase is co-amplified with the World's most common *Culex* mosquito insecticide resistance associated esterases. *Insect Molecular Biology*. (1), 93-99

Hemingway, J. 1983. The genetics of malathion resistance in *Anopheles stephensi* from Pakistan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77, 106-108.

Hemingway, J. and Karunaratne, S.H.P.P. 1998. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Med Vet Entomol* 12: 1-12.

Hemingway, J., R. G. Boddington, and J. Harris. 1989. Mechanisms of insecticide resistance in *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) from Puerto Rico. *Bull. Entomol.Res.* 79: 123-130

Hemingway, NJ Hawkes, L McCarroll, H Ranson. 2004 The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34:653-665

Hill, W. G. & Robertson, A. (1968) Linkage disequilibrium in finite populations. *Theor. Appl. Genet.*, 38, 226-231

Hudson, R. R. & Kaplan, N. L. (1985) Statistical Properties of the Number of Recombination Events in the History of a Sample of DNA-Sequences. *Genetics*, 111, 147-164

Jeffreys AJ, Holloway JK, Kauppi L., May CA, Neumann R, Slingsby MT and A J. Webb. 2004. Meiotic recombination hot spots and human DNA diversity. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 359, 141-152

Karch S; Asidi N, Manzambi Z, Salaun J and J. Mouchet. 1995. Impact of deltamethrin-impregnated bednets on biting rates of mosquitoes in Zaire. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 11(2):191-194.

Kroeger A, Lenhart A, Ochoa M, Villegas, Alexander N, Catillo CE, Levy M and P McCall. 2006. Effective dengue vector control with insecticide treated curtains

and water container covers: cluster randomized trials in Mexico and Venezuela. *British Medical Journal* 332:1247-1252

Lander ES, Botstein D: Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 1989, 121(1):185-199.

Lines, J.D., Myamba, J. and Curtis, C.F., 1987. Experimental hut trials of permethrin-impregnated mosquito nets and curtains against malaria vectors in Tanzania. *Med. Vet. Entomol.* 1, pp. 37-51.

Luleyap, H.U., Alptekin, D., Kasap, H., M. Kasap. 2002. Detection of knockdown resistance mutations in *Anopheles sacharovi* (Diptera: Culicidae) and genetic distance with *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) using cDNA sequencing of the voltage-gated sodium channel gene. *J. Med. Ent.* 39, 870-874.

Lumjuan N., McCarroll L., Prapanthadara L., Hemingway J., H. Ranson. 2005. Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 861-871

Lynd A, Ranson H, McCall P J, Randle N P, Black IV W, Walker E D and M J Donnelly. 2005. A simplified high-throughput method for pyrethroid knock-down resistance (*kdr*) detection in *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*, 4:16

Mackay T.F.C. 2001 Quantitative Trait Loci in *Drosophila*. *Nature*. 2:11-19.

Malcolm C. A., Bourguet D., Ascolillo A., Rooker S. J., Garvey C. F., Hall L. M. C., Pasteur N. and M. Raymond. 1998. A sex-linked Ace gene, not linked to insensitive acetylcholinesterase-mediated insecticide resistance in *Culex pipiens*. *Insect Molecular Biology* 7(2): 107-120

Martinez-Torres D., F. Chandre, M. S. Williamson, F. Darriet, J. B. Bergé, A. L. Devonshire, P. Guillet, N. Pasteur, D. Pauron, 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology* 7:179-184.

Martinez-Torres, D., Chevillon, C., Brun-Barale, A., Berge', J.B., Pasteur, N., Pauron, D., 1999a. Voltage-dependent Na⁺ channels in pyrethroid-resistant *Culex pipiens* L mosquitoes. *Pestic. Sci.* 55:1012-1020.

Mbogo, C.N.M., Baya, N.M., Ofulla, A.V.O., Githure, J.I. and Snow, R.W., 1996. The impact of permethrin-impregnated bednets on malaria vectors of the Kenyan coast. *Med. Vet. Entomol.* 10, pp. 251-259.

Ming An Shi,² Lougarre A., Alies C., Frémaux I., Tang Z. H., J. Stojan and D. Fournier. 2004. Acetylcholinesterase alterations reveal the fitness cost of mutations conferring insecticide resistance. *BMC Evolutionary Biology*, 4(5).

Mouches, C., Pauplin, Y., Agarwal, M., Lemieux, L., Herzog, M., Abadon, M., Beyssat-Arnaouty, V., Hyrien, O., De Saint-Vincent, B.R., Georghiou, G.P. and N. Pasteur. 1990. Characterization of amplification core and esterase B1 gene responsible for insecticide resistance in *Culex*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87: 2574–2578.

Murray B. Isman. 2006. Botanical Insecticides, Deterrents, And Repellents In Modern Agriculture And An Increasingly Regulated World. *Annu. Rev. Entomol.* 51:45–66

Mutero, A., Pralavorio, M., Bride, J.-M., and Fournier, D. 1994. Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 5922–5926.

Nei, M. & Miller, J. C. (1990) A Simple Method for Estimating Average Number of Nucleotide Substitutions within and between Populations from Restriction Data. *Genetics*, 125, 873-879

Nikou, D., Ranson, H. and J. Hemingway. 2003 An adult specific CYP6 P450 gene is overexpressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Gene* 318: 91–102

Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA-2-2002 para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector (D.O.F. 21 julio del 2003). Mexico.

Okimoto, R. & Dodgson, J. B. 1996. Improved PCR amplification of multiple specific alleles (PAMSA) using internally mismatched primers. *Biotechniques*, 21, 20-&

Ooijen Van, J. W., 1994. DrawMap: a computer program for drawing genetic linkage maps. *J. Hered.* 85:66

Pedra, J.H., McIntyre, L.M., Scharf, M.E. and B.R. Pittendrigh. 2004. Genome-wide transcription profile of field- and laboratory selected dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)-resistant *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 7034–7039

Philip CB, Rozenboom LE. 1973. Medico-veterinary entomology: a generation of progress. In: Smith RF, Mittler TE, Smith CN, editors. *History of entomology*. Palo Alto (CA): Annual Reviews Inc.

Phillips, RS. 1983. *Malaria*. Camelot Press, Southampton, United Kingdom.

- Platt KB., Linthicum KJ., Myint KS., Innis BL., Lerdthusnee K., Vaughn, DW. 1997. Impact of dengue virus infection on feeding behavior of *Aedes aegypti*. *Am Jour Trop Med Hyg.* 57(2):119-25.
- Prapanthadara, L., Promtet, N., Koottathep, S., Somboon, P., Suwonkerd, W., McCarroll, L., Hemingway, J., 2002. Mechanisms of DDT and Permethrin Resistance in *Aedes aegypti* from Chiang Mai, Thailand. *Dengue Bull.* 26, 185–189.
- Ranson H, Claudianos C, Ortellì F., Abgrall C, Hemingway J, Sharvakhova M, Unger M, Collins F.H, and Rene Freyereisen. 2002. Evolution of Supergene Families Associated with Insecticide Resistance. *Science* 298: 170-181
- Ranson H, Paton M. G, Jensen B, McCarroll L, Vaughan A, Hogan J. R, Hemingway J, and FH Collins. 2004. Genetic mapping of genes conferring permethrin resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology* 13(4), 379–386
- Ranson, H., Jensen, B., Vulule, J.M., Wang, X., Hemingway, J., Collins, F.H., 2000b. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol. Biol.* 9:491–497
- Ranson, H., Jensen, B., Wang, X., Prapanthadara, L., Hemingway, J., Collins, F.H., 2000a. Genetic mapping of two loci affecting DDT resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect. Mol. Biol.* 9, 499–507.
- Ranson, H., Prapanthadara, L., J., Hemingway. 1997. Cloning and characterization of two glutathione S-transferases from a DDT resistant strain of *Anopheles gambiae*. *Biochem. J.* 324 (1):97–102.
- Rawlins, S. C. 1998. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. *Pan Am. J. Public Health* 4: 243E251.
- Raymond, M., Fournier, D., Bride, J.-M., Cuany, A., Berge, J., Magnin, M., and Pasteur, N. 1986. Identification of resistance mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from southern France: insensitive acetylcholinesterase and detoxifying oxidases. *Journal of Economic Entomology* 79: 1452–1458.
- Roberts, DR., *et al.* 1997. DDT, global strategies, and a malaria control crisis in South America. *Emerging Infectious Diseases* 3: 295.
- Rodríguez M, Bisset J, Ruiz M, and A Soca. 2002. Cross-Resistance to Pyrethroid and Organophosphorus Insecticides Induced by Selection with Temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. *J. Med. Entomol.* 39(6): 882-888 (2002)

Rodríguez, M. M., Bisset, J. A., De Armas, Y. and F. Ramos. 2005. Pyrethroid insecticide-resistant strain of *Aedes aegypti* from Cuba induced by deltamethrin selection. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 21, 437-445

Rodríguez, M. M., J. Bisset, D. Molina, L. Lauzan, and Soca A. 2001. Detection of resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from Cuba and Venezuela. *J. Med. Entomol.* 38: 623-628.

Roush R. T and J.C. Daly. 1990. The role of populations genetics in resistance research and management. pp 97-143. *Pesticide Resistance in Arthropods* editada por Roush R. T. and Tabashnik B.E. Routledge Chapman & Hall Inc. Great Britain.

Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X. & Rozas, R. (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19, 2496-2497.

Scott J. A. 1995. The molecular Genetics of Resistance: Resistance as a Response to Stress. *Florida Entomologist*. 78 (3): 399-414.

Severson DW, Anthony NM, Andreev O, ffrench-Constant RH. 1997. Molecular mapping of insecticide resistance genes in the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). *J. Hered.* 88:520-24

Severson, D. W., A. Mori, Y. Zhang and B. M. Christensen, 1993. Linkage map for *Aedes aegypti* using restriction fragment length polymorphisms. *J. Hered.* 84: 241-247.

Shafer TJ., Meyer DA., and KM. Crofton. 2005. Developmental Neurotoxicity of Pyrethroid Insecticides: Critical Review and Future Research Needs. *Environmental Health Perspectives* 113 (2): 123-136

Soderlund D. and J. Bloomquist, 1990. Molecular Mechanisms of Insecticide Resistance. pp58-96 en *Pesticide Resistance in Arthropods* editada por Roush R. T. and Tabashnik B.E.. Routledge Chapman & Hall Inc. Great Britain

Soderlund D.M. and Knipple D.C., 2003. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 33, 563-577.

Soderlund, D.M., and Knipple, D.C., 2003. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 33, 563-577.

Stam, P., 1993. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *Plant Journal* 3: 739-744.

Stam, P. and J.W. Van Ooijen, 1995. JoinMap (tm) version 2.0: Software for the calculation of genetic linkage maps. CPRO-DLO, Wageningen.

Swofford, D. L. (1993) Paup - a Computer-Program for Phylogenetic Inference Using Maximum Parsimony. *Journal of General Physiology*, 102, A9-A9

Tajima, F. (1993) Simple Methods for Testing the Molecular Evolutionary Clock Hypothesis. *Genetics*, 135, 599-607

Thompson, J. D., Higgins, D. G. & T. J. Gibson. 1994 Clustal-W - Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680

Vaughan, A., and R. H. French-Constant. 1998. Biochemical monitoring of organophosphorous and carbamate insecticide resistance in *Aedes aegypti* mosquitoes from Trinidad. *Med. Vet. Entomol.* 12: 318-321.

Vaughan, A., Rocheleau, T. and French-Constant, R. 1997. Site-directed mutagenesis of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* confers insecticide insensitivity. *Exper Parasit* 87: 237-244.

Villani F, Hemingway J. 1987. The detection and interaction of multiple organophosphorus and carbamate insecticide resistance genes in populations of *Culex pipiens* from Italy. *Pest Bioche Physiol.* 27:218-228

Vontas J, David J.-P., Nikou D., Hemingway J., Christophides G. K., Louis C. and H. Ranson. 2007. Transcriptional analysis of insecticide resistance in *Anopheles stephensi* using cross-species microarray hybridization. *Insect Molecular Biology* 16(3), 315-32

Vontas, J.G., Small, G.J. and J. Hemingway. 2001 Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem J.* 357; 65-72

Vulule, J.M., Beach, R.F., Atieli, F.K., McAllister, J.C., Brogdon, W.G., Robets, J.M., Mwangi, R.W., Hawley, W.A. (1999) Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin-impregnated nets. *Med Vet Ent* 13: 239-244

Wang, J., Chuang, K., Ahluwalia, M., Patel, S., Umblas, N., Mirel, D., Higuchi, R. & Germer, S. 2005. High-throughput SNP genotyping by single-tube PCR with Tm-shift primers. *Biotechniques*, 39, 885-93

WHO, 1981. Instruction for Determining the Susceptibility or Resistance of Adult Mosquitoes to Organochlorine, Organophosphate and Carbamate Insecticide-Diagnostic Test. WHO/VBA/ 81.806, Geneva, Switzerland.

WHO, 1997. Dengue hemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention and Control, 2nd edition. Geneva.

WHO, 1997. Dengue hemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention and Control, 2nd edition. Geneva.

WHO, 1998. Techniques to detect insecticide resistance mechanisms (field and laboratory manual). Geneva, Switzerland.

WHO, 2002. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Fact sheet No. 117. World Health Organization, Geneva.

Williamson M.S Denhold I., Bell C. A., A. L Devonshire. 1993. Knockdown resistance (*kdr*) to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene in the housefly (*Musca domestica*). *Mol Gen Genet* 240:17-22

Williamson, M.S., Martinez-Torres, D., Hick, C.A., A.L., Devonshire. 1996. Identification of mutations in the housefly *para*-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides. *Mol. Gen. Genet.* 252, 51–60.

Wondji CS, Morgan J, Coetzee M, Hunt RH, Steen K, Black WC IV, Hemingway J, Ranson H. 2007. Mapping a Quantitative Trait Locus (QTL) conferring pyrethroid resistance in the African malaria vector *Anopheles funestus*. *BMC Genomics.*; 8: 34.

World Health Organization. 1992. *Vector resistance to pesticides*. Technical Report Series 818, Geneva.

Zeng ZB. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics.* 136(4):1457-1468

Zheng, L., Cornel, A.J., Wang, R., Erfle, H., Voss, H., Ansorge, W., Kafatos, F.C. and Collins F.H. (1997) Quantitative trait loci for refractoriness of *Anopheles gambiae* to *Plasmodium cynomolgi* B. *Science* 276: 425–428.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Karla Lizet Saavedra Rodriguez

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias Biológicas

Tesis: MAPEO CUANTITATIVO DE LOCI QUE CONTROLAN LA RESISTENCIA A LA PERMETRINA EN EL MOSQUITO *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)

Campo de Estudio: Biología de la Resistencia a Insecticidas en mosquitos vectores de Enfermedades

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León, México, el 10 de noviembre de 1976. Hija de Rosalinda Rodríguez Enriquez y Humberto Saavedra Guatemala.

Educación: Licenciada en Biología, egresada de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, desde 1999.

Experiencia Profesional: Ninguna.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

