UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

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 BIOLOGICAS

JULIO, DE 2007

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

KLSR

TD
Z5320
FCB
2007
.S22

2007

1020160702

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)

Por

KARLA LIZET SAAVEDRA RODRIGUEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS

Julio, 2007

1045597

TD
Z5320
FCB
2007
.S22

CAPILLA ALFONSINA
UANL
FONDO
TESIS
170908

4-Septiembre-08
Guadalupe de la Cruz.

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

Comité de Tésis

Director: Dra. Adriana Elizabeth Flores Suárez

Secretario: Dr. Gustavo Ponce García

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. *Aedes aegypti:* 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. Glutatión-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 *kdr* en el mosquito *Ae. aegypti* 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 *para* Asociadas con la Resistencia Tipo *kdr* 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 *kdr* 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 *Iso*1,011 y *Val*1,016. 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 *Iso*1,011 y *Val*1,016 en Poblaciones de *Ae. aegypti*. 49
5.1.5.4. Evolución de las mutaciones en el DIIS6 del gen *para* 49
5.2. Mapeo de QTL que Controlan la Resistencia a la Permetrina en *Ae. aegypti*. 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 *Ae. aegypti* Resistente a la Permetrina 62
6.2. Búsqueda de Polimorfismos-SSCP en la Región DIIS6 del gen *para* de *Ae. aegypti* 63
6.2.1. Regiones de ADN Amplificadas 63
6.2.3. Análisis de Polimorfismos-SSCP del Exón 21 en el Gen *para* 65
6.2.4. Sistemas de PCR para Detección de Alelos en los Codones *Iso*1,011 y *Val*1,016 del gen *para* mediante Curva de Desnaturalización 66
6.2.4.1. Sistema *Iso*1,011*Met* 66
6.2.4.2. Sistema *Iso*1,011*Val* 67
6.2.4.3. Sistema *Val*1,016*Iso* 68
6.2.4.4. Sistema *Val*1,016*Gly* 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 *Ae. aegypti*. 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 *Iso*1,016/*Iso*1,016 para el Marcador *Val*1,016*Iso*..... 78
6.3.6.3. Análisis MI y MIC: QTLs al omitir a los Mosquitos *Vivos* (resistentes al derribe)..... 79
6.3.7. Asociación entre la Segregación de la Mutación *Met*1,011 e *Iso*1,016 en el Gen *para* en la Familia de Mapeo F31.1..... 80

7. DISCUSIONES..... 81

8. CONCLUSIONES 93

9. LITERATURA CITADA 134

INDICE DE FIGURAS

Figura Página

1. Alineación de las secuencias de ADN amplificadas con los iniciadores kdrR2T6 en tres clonas provinientes de un pool de ADN de *Ae. aegypti*..... 98

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*. 99

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..... 100

4. Gráfica de las temperaturas de desnaturalización para detección de alelos específicos en el sistema *Val*1,016*Iso* del gen *para* de *Ae. aegypti*. El genotipo mutante *Iso*1,016/*Iso*1,016 produjo una curva a 77°C. El genotipo silvestre *Val*1,016/*Val*1,016 produjo una curva a 84°C. El genotipo heterocigoto *Iso*1,016/*Val*1,016 presentó ambas curvas..... 105

5. Fragmentación de productos de PCR alelo-específicos del sistema *Val*1,016*Iso* 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 *Iso*1,016/*Iso*1,016 (A/A). La banda de 85 pb en los carriles 5 y 6 corresponden al genotipo silvestre *Val*1,016/*Val*1,016 (G/G). El genotipo heterocigoto *Iso*1,016/*Val*1,016 (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 *para* de *Ae. aegypti*. Tres cladas fueron obtenidas del análisis de 87 secuencias. Las regiones sombreadas corresponden a sitios polimórficos segregantes. Los primeros 100 nucelotidos del intrón son conservados, asi como también los últimos 75 nucleótidos..... 107

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. 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: *Val*1,016*Iso*, *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: *Val*1,016*Iso*, *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: *CCEae1o, 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: *CCEae1o, 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, CCEae1D, 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 *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. 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

INDICE DE TABLAS

Tabla Página

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 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 *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. 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 *para*. 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-estabilizacion del tercer nucleótido se encuentra subrayada..... 101

5. Frecuencias de alelos y genotipos *Iso*1,016, *Met*1,011, y *Val*1,011 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..... 102

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..... 108

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 posicion genetica 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'-GCGGGCAGGGCGGCGGGGGCGGGGCC-3' y la cadena corta consiste en 5'- GCGGGC-3'. 118

9. Análisis de chi-cuadrada para las frecuencias genotípicas de dos marcadores (*Iso*1,011*Met* y *Val*1,016 *Iso*) 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 *Iso* 1,011/*Iso* 1,016 en una de las copias del cromosoma y el genotipo *Met*1,011/*Iso*1,016 en la segunda copia. El valor de chi-cuadrada no fue significativo. 133

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 Tésis...
Mis más sinceros agradecimientos a la Dra. Adriana Flores, por confiar en mí, ayudarme y revisar éste proyecto.
Gracias al comité de tésis 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 recibirnos 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 del 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 estan asociadas al fenotipo resistencia a la permetrina, mediante una mapeo de loci de rasgos cuantitativos (mapeo de QTL).

En este trabajo, seleccionamos una cepa de *Ae. aegypti* resistente a la permetrina proviniente 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 *Val*1,016*Iso*, incrementó conforme la selección de cepas resistentes a piretroides (Cuba e Islas Mujeres-F8), mientras que la frecuencia de las mutaciones en el codón *Iso*1,011 disminuyó o no se vió afectada.

Una familia de intercruza F3 fue utilizada para mapear la posición genética de 21 genes pertenecientes a los tres grupos de enzimas detoxificadoras: mono-oxidasas, esterasas y glutation-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 esterasas en el brazo inferior de cromosoma III. La segregación de alelos del marcador del gen *para* (*Val*1,016*Iso)* indicó que la presencia de dos alelos provinientes de la línea resistente (*Iso*1,016) estuvo signficativamente asociada con el 100% de sobrevivencia a la exposción a la permetrina. La presencia de dos alelos provinientes 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 diagnóstico 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 camapañas 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 *Val*1,016*Iso* mutation frequency increased after resistant strain selection with permethrin (Cuba and Islas Mujeres-F8). Meanwhile, the frequency of mutations at codon *Iso*1,011 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 (*Val*1,016*Iso)* indicated that the presence of two alleles (*Iso*1,016) segregating from the resistant line was significantly associated with 100% survival following permetrhin 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 mas 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 eficáces contra la enfermedad del dengue. Desde principios del siglo XX, la forma de combate mas 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; Rodriguez *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 (ffrench-Constant, 1995), por lo cual, el desarrollo de pruebas diagnóstico-moleculares es una 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 *Val*1016*Iso* 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.

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.