ANTECEDENTES

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

Aedes aegypti (L.) es un mosquito perteneciente al orden Díptera, familia Culícidae 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 metamorfósis 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 domiciliares y peridomiciliares (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 (Eldrigde, 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 metamorfósis 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 (Eldrigde, 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 una periodo de reposo y las ovariolas 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 vírus 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 hiper-endemicidad 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 útlimos 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 contededores 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*. Desafortunademente, 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-volúmen (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 útlimos 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 (Aquareslin ®) (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 súlfuro (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 descubrimieto 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 actuan 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 mas 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 intradomiciliares, 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.

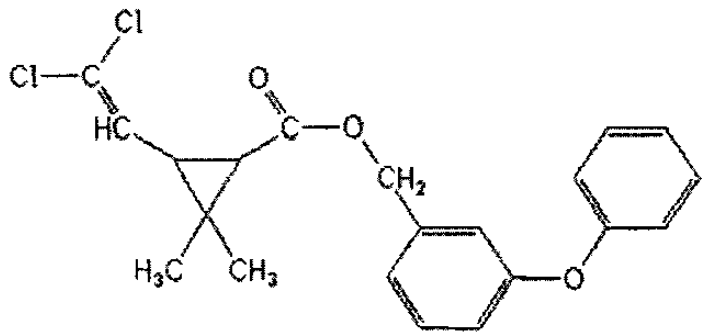
4.2.2. Permetrina

La permetrina pertence 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 del los piretroides en el campo (Bloomquist, 1999).

El nombre científico de la permetrina es 3-fenoxibenzil (1*RS*)-*cis-trans*-3-(2,2-dichlorovinil)-2,2-dimetilciclopropano carboxilato. Es un insecticida no sistémico con acción de contacto, estomacal y con un poco de efecto repelente. La dósis 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 (LD_{50} 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 enláces éster y el compuesto es eliminado como un conjugado glicosilado.



$C_{21}H_{20}Cl_2O$

Estructura química de la permetrina.

Los signos típicos de intoxicación por los piretroides del Tipo-1 incluyen hiper-excitabilidad 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 cién 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 ffrench-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 culícidos y anofelinos (Chandre *et al.*, 1998, 1999). La resistencia cruzada entre piretroides y DDT en *Anopheles gambie* ha generado una gran preocupación, ya que los piretroides son el único grupo disponible para la implementación de la estrategia más eficáz 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 et al.*, 2003), ó bien, mediante mecanismos métabolicos relacionados con la resistencia a organofosforados y carbamatos (Rodriguez *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 dósis 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

sensitividad 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 mas 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 varian 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 *dósis-respuesta* a insecticidas, muestras de insectos son expuestas a un rango de dósis de insecticidas, produciendo un rango de mortalidades en la muestra tratada. Al graficar los datos de mortalidad contra la dósis, una curva sigmoide es obtenida. Esta curva es transformada en una línea de respuesta recta, al transformar el logaritmo de la dósis 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 dósis letal que mata al 50% (LD_{50}) ó 95% (LD_{95}) de los individuos. Por otro lado, cuando la dósis exacta que entra al organismo no se conoce, se puede calcular la concentración letal (ejemplo, LC_{50} ó LC_{95}).

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 mas 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 dósis LD50 de la cepa "investigada" dividida entre la dósis 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 dósis-respuesta. Para *Ae. aegypti,* las 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 mas reciente se mantiene en los laboratorios de CDC (Center of Disease Control, Atlanta, E.U.A.) y es denominada "New Orleans".

Los bioensayos *dósis-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 dósis diagnóstico predeterminadas para algunas especies de insectos. Estas dósis 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 dósis diagnóstico recomendadas para insectos vectores de enfermedades, así como kits estándar para evaluar la resistencia a varios insecticidas (WHO, 1981). El uso de las dósis diagnóstico 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, estan disponibles algunos ensayos bioquímicos simples para detectar la actividad elevada de los tres sistemas de enzimas (esterasas, glutation-s-transferasas y monoxigenasas) 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 insensitividad 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 cutílculas 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 influencían 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 substituciones 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 auscencia 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 substratos mediante la hidrolización de los enláces éster en presencia de

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

Muchos insecticidas contienen enláces 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 el 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 electroforésis 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 mas común es la co-amplificación de dos genes de esterasas: estα y estβ. Alrededor del 90% de las poblaciones resistentes de *Culex* presentan un genotipo estα2/estβ2 (Coleman *et al.*, 2002) aunque otras combinaciones han sido identificadas, por ejemplo la cepa Cyprus tiene entre 40 a 60 copias de los genes estα-5 y estβ-5, mientras que la cepa TEM-R de California solo presenta amplificación en el locus estβ-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-α2/est-β2 podría estar ligada a un tercer gen (aldehido 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 estα-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 estα-1. Las esterasas amplificadas pueden tambien ser expresadas en diferentes niveles, por ejemplo, existe cuatro veces mas estβ que estα en *Cx. quinquefasciatus* resistente, a pesar de que los genes estan 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 substrato. Las monoxidasas tienen un amplio rango de substratos, pero en general, estas enzimas metabolizan substratos 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 substratos (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. quinfefasciatus* 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. Glutatión-s-Transferasas

Las glutatión-s-transferasas (GSTs) son enzimas dímericas 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 bién, al facilitar la dehidr-clorinización 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, drosofílidos 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 introns 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 mas introns, uno de estos genes, aggst-1α, tiene un empalme alternativo produciendo cuatro transcriptos 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 anfifílico 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 acetil-colinesterasa clonada en *C. pipiens* es la *Ace2*, la cual no esta 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 localizen 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 estan 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 dieldrín 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 neurotranmisión en el sistema nervioso central del insecto y en uniones neuromusculares. El receptor GABA de los insectos esta 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 pre-tratamiento con picrotoxina, sugiriendo que estos insecticidas interacúan 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 (ffrench-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 dieldrín. La mutación fue identificada por primera vez en *Drosophila*, y desde entonces ha mostrado estar en un amplio rango de insectos resistentes a dieldrín, incluyendo *Ae. aegypti* (ffrench-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 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 sensitividad del canal de sodio dependiente de voltage 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; Martinez-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 substitución 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 (*Iso*1,011), 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 (Brengues *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 provinientes de Tailandia. Esta mutación ocurre en el codón 1,016 (*Val*1,016), 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). (Brengues *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 substitución 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 anáisis 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 secuencían 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 diagnóstico que detecten estos alelos, permitrá 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 linear 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 rapidamente 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), microsatélites, polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP) y polimorfismos de nucelótidos simples (SNPs), entre otros. La técnica de PCR permitie 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 cruza. Para ésto, 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 mas eventos de recombinación entre dos marcadores que se encuentran mas 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 intercruza F1 o retrocruzas 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 mas 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 intercruza F1, en una línea endogámica-recombinante (RIL), o bién en una retrocruza con un padre recurrente. Un requisito es deteminar el genoitpo 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 cruza dada.

Los loci donde los padres P1 no comparten ningún alelo en común, son considerados completamente informativos, debido a que puede trazarse el lineaje 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 mas grandes (Black y Severson, 2005).

Una vez que los genotipos son determinados para cada marcador, estos se colocan en un 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) cuales 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=-1xLog10 (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 utilizado 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 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?, ¿Cuales 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 linear (epistásis)?, ¿Cual 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?, ¿Cual 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, lineas 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=log10 (probabilidad de hipótesis alterna/ probabilidad de hipótesis nula). La hipóteis nula (Ho) 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*o* entonces, el valor del LOD sera mayor a 0. Por ejemplo, si la probabilidad de Ha equivale a 1000 veces la probabilidad de Ho, 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 qu 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 inervalo. 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 ooquinetos 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 intercruza 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 linea de intercruza 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 intercruza 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 diseminacion del virus y contribuyeron al 45% de la variación fentotípica. Las posiciones de los QTL que controlan al 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" (*Met*1,011, *Val*1,011, *Gly*1,016 e *Iso*1,016) 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 F_1 obtenidos, se repitió la misma metodología para obtener una segunda o tercera generación de huevecillos. Las papeletas con huevecillos de las generaciones F_2 y F_3 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 LC_{50}

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 LC_{50} 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 concentracion 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 húmedad 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 (LC_{50}) fue determinada para cada colonia de mosquitos. Las colecciones cuyas LC_{50} 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 (~LC_{50}). La colección de Islas Mujeres (F2), fue seleccionada con 5 µg de permetrina (~LC_{70}). 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 eclosianada 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 conistió 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* procediente 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'-TCTTGTTCGTTTCGTTGTC-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 extraido 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 nucléicos 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 cuidadosamene 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 alicuota 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 refirgerador 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 µl (volumen final). Esta reacción consitió en 4350 µl de agua bidestilada (ddH2O), 500 µl 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 µl de dNTP (20 mM Biorad), 5000 picomoles de cada iniciador y 40 µl de Taq-polimerasa termoestable (producida por el Laboratorio del Dr. William Black IV). Alrededor de 49 µl de la mezcla de la reacción fue distribuida en cada pocillo de la microplaca. La placa fue colocada en hielo y 1 µl 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 µl del producto de PCR con 4 µl 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 resúmen, 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 electroforésis 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-metacrioloxy-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 homogeneamente 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 dejo secar por dos minutos y despues 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 ddH20) fueron colocados dentro de una jeringa de 300 mL. Esta mezcla fue inyectada cautelosamente 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. Un 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 veritcal 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 µl del producto de PCR fueron mezclados con 4 µl 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 estándard (1kb ladder, Gibco BRL, Gaithesburg MD) fueron sometidos a electroforésis (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 electroforésis fueron detectados usando tinción con plata. Para ésto, 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 dH_2O) 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 ddH_2O por dos minutos en cada lavado.

Posteriormente, se agregaron dos litros de la solución de tinción [0.075% (w/v) nitrato de plata y formaldehido 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 ultimo paso fue agregar la solución reveladora [3% carbonato de sodio enfriado a 10°C, previamente tratada con formaldehido (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 dH_2O para remover los residuos de sales que pueden manchar al gel despues 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 µl 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 200µl 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 µl de buffer de elución, centrifugando por un minuto. El decantado fue desechado y se procedió a otro ciclo de centrifugación. Para elulir el ADN, se agregaron 30µl de ddH20 sobre la membrana, dejando reposar durante un minuto y posteriormente fue centrifugado por un minuto.

Alrededor de 28 µl de producto de PCR purificado a la concentración de 10 ng/µl/100pb fueron obtenidos de cada muestra. Este ADN se separó en dos alicuotas de 14µl 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 nucelótido presente en ese loci, se descartó ese sitio polimórfico.

5.1.5. Detección de alelos específicos en los codones *Iso*1,011 y *Val*1,016

Cuatro sistemas fueron desarrollados para detectar alelos específicos en cada SNP (single nucelotide 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 *Iso*1,011 y dos mutaciones en el codón *Val*1,016.

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 nucelotido de la región -3' correspondiera al alelo polimórfico. Para detectar a cada alelo especifico, 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 postitivo especifico *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 compañias 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 consitió en 11.85 µl de ddH20, 12.5 µl 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 $MgCl_2$, SYBR Green1, 20nM de fluoresceína) y ~0.05 µl de cada iniciador específico e iniciador reverso, completando una reacción con volumen final de 25 µl.

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 µl/rx, se utilizó una mezcla de 875 µl de IQ-sybergreen mix, 830 µl de ddH2O y 3.5 µl de cada iniciador. Posteriormente, se distribuyeron 18 µl de esta mezcla en cada pocillo de la microplaca y entre 0.5 a 1.0 µl 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 (sybrgreen) 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 *Ile*1,011 y *Val*1,016 en poblaciones de *Ae. aegytpi.*

La frecuencia de alelos en los cuatro sistemas desarrollados (*Iso*1,011*Met*, *Iso*1,011*Val*, *Val*1,016*Iso* y *Val*1,016*Gly)* 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 (Rodriguez *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 amplificados y secuenciados 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/deleciones 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 intercruza F_1 fue utilizado para obtener una familia de mapeo-F_3. Las cruzas parentales consistieron en cepas resistentes y susceptibles al insecticida permetrina. Una vez que obtuvimos la familia de mapeo-F_3 (441 individuos), cada uno de los individuos fué fenotipificado mediante la exposición a una LC_{50} de permetrina, separando el fenotipo en tres grupos: *vivos, recuperados* y *muertos*. 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 proviniente de la cepa resistente (A), homocigoto que proviniente 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 proviniente de la cepa de New Orleans.

Por otro lado, para determinar si la resistencia esta ligada al sexo, se realizaron otras 20 cruzas recíprocas, utilizando una hembra virgen proviniente 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 ~ 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

160702

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 intercruza 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 intercruza F2.

La línea avanzada consistió en realizar una cruza 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 intercruza 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 cilíndro 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 cilíndro etiquetado, estos mosquitos fueron registrados como *vivos*.

El resto de los mosquitos derribados, fueron colocados en una incubadora a 28°C y una humedad relativad 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 intercruza 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 µl de TE y el ADN de los machos se resuspendió en 150 µl de TE. Una alicuota de 80 µl 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 µl 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 µl 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 µl de la muestra de ADN resuspendida en TE (10 mMTris EDTA pH 8.0) fue agregada a 5 µl de buffer de muestra. El buffer de muestra consitió en 10 mM TE pH8.0 y 100 µM de hexámeros de tiofosfato resistentes a exonucleasas (5`-NpNpNpNpsNpsN-3`). Esta mezcla fue combinada con 5 µl de mezcla de reacción. La mezcla de reacción consistió en 74 mMTris-HCl (pH 7.5), 100 mM KCl, 20 mM $MgCl_2$, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 2 mM de dNTPs, 100 µM de hexámeros resistentes a exonucleasas y 0.2 unidades de pirofosfatasa de levadura (Roche Molecular Biochemicals).

Por último, la ADN-polimerasa ø29 (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 µl, al agregar 90 µl 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 µl 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 P_1 (abuela y abuelo), generación F_1 de intercruza (madre y padre) y cerca de 10 indiviuos de la generación F_3, 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 existeron 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 nucleotidos (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 nucelótido 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, tambien 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 cromatografias 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 inciadores 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 cromatografias 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 indivuido 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 proviniente 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 proviniente 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 provienientes 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 provinientes del abuelo suceptible, 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 mas 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 asscii. La base de datos contiene los nombres de los marcadores y los códigos de los genotipos (A, B, H) para cada indviduo 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 genéticoa 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 proviniente de la abuela-P1, se les asignó el número "1"; a los individuos con genotipo homocigoto provinientes 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 modulos 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 segregacion mendeliana en todos lo.s marcadores.

El segundo módulo es LRmapqtl, el cual ajusta los datos a un modelo de regresión linear simple, un marcador a la vez. Permite dar un vistazo al lugar donde puede encontrarser un QTL en el genoma,usando el modelo linear $y_i = b_0 + b_1 x_1 + e$, 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 regresón que pueden ser estimados y e es el error con distribución normal.

Para deteriminar en que grado un marcador esta 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 cuanto soporte existe para la H_0. Un menor valor de probabilidad F indica menor soporte para la H_o 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, performa los anáisis 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 estándard 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 estan presentes como varianza residual. Mas aun, remueve el sesgo que normalmente puede ser causadas por un QTL que esta unido a la posición que se esta analizando. Los marcadores de fondo usualmente estan entre 20 a 40 cM aparte.

QTL cartographer ofrece seis modelos para especificar cuales 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 cuales marcadores flanquearon al sitio prueba (qtl). Los umbrales de comparación (95 %) de cada intervalo se estimaron mediante 1000 permutaciones.