RESULTADOS

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

Los adultos de las generaciones de mosquitos F_2, F_3 ó F_4 provinientes de Cd. Constitución, Coatzacoalcos, Mazatlán, Islas Mujeres y la cepa susceptible de referencia New Orleans, fueron sometidos a varias concentraciones de permetrina para determinar la LC_{50}. La proporción de resistencia (RR) fue calculada dividiendo las LC_{50} obtenidas, entre la LC_{50} de la cepa de New Orleans.

En la tabla 2, se muestran las LC_{50} para las colecciones evaluadas. La LC_{50} de la población de Islas Mujeres fué 25 veces mayor a la cepa susceptible New Orleans. Las LC_{50} de las colecciones de Mazatlán y Cd. Constitución fueron ~2.5 veces mayores a la de New Orleans.

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

Las colecciones de Cd. Constitución, Mazatlán e Islas Mujeres fueron seleccionadas con su respectiva LC_{50} de permetrina durante tres generaciones. La mortalidad de las cepas de Cd. Constitución y Mazatlán no se vió afectada por la selección, sin embargo, la mortalidad de Islas Mujeres disminuyó drásticamente después de tres generaciones de selección.

La cepa resistente a permetrina fue designada IMU5 (Islas Mujeres seleccionada con 5.0 μg de permetrina), seguido por la generación filial. Los mosquitos adultos de la generación F_2 de Islas Mujeres fueron expuestos a la concentración de permetrina de 5.0

μg/botella por un tiempo de 1 hora. El derribe registrado a la hora (knockdown) y la mortalidad a las 24 horas fue de 88.7 y 78.5 % respectivamente.

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

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

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

6.2.1. Regiones de ADN amplificadas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

a isoleucina (*Iso*). Esta mutación fue denominada *Val*1,016*Iso*. En la figura 3 se muestra la posición de ésta mutación junto con las mutaciones reportadas por Brengues *et al.* (2003).

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

6.2.4. Sistemas de PCR para Detección de Alelos en los Codones *Iso*1,011 y *Val*1,016 del gen *para* mediante Curva de Desnaturalización

En esta sección se describe el diseño de un ensayo-molecular mas específico y sencillo, que detecta las mutaciones *Iso*1,011*Met* y *Val*1,016*Gly* reportados por Brengues *et al.*, (2003). Por otro lado, también las mutaciones *Iso*1,011*Val* reportada por Black (2006 no publicada) y la mutación *Val*1016*Iso* encontrada en este trabajo. Los iniciadores específicos para detectar estas cuatro mutaciones se muestran en la tabla 4. Las frecuencias genotípicas para las mutaciones *Iso*1,011*Met*, *Iso*1,011*Val* y *Val*1016*Iso* se muestran en la tabla 5.

6.2.4.1. Sistema *Iso*1,011*Met*

Los iniciadores diseñados para identificar la mutación de adenina a guanina en la tercera posición del codón *Iso*1,011, amplificaron productos de PCR-específicos que pudieron ser discriminados por curva de desnaturalización, a la temperatura de 79°C para el alelo silvestre adenina (*Iso*1,011) y de 84°C para el alelo mutante guanina (*Met*1,011).

En las 32 colecciones de mosquitos evaluadas, detectamos al genotipo homocigoto silvestre *Iso*1,011/*Iso*1,011, heterocigoto *Iso*1011/*Met*1,011 y al genotipo homocigoto mutante *Met*1,011/*Met*1,011. Los tres genotipos estuvieron presentes en las cepas

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

Por otro lado, la cepa seleccionada con propoxur por 14 generaciones (Bisset *et al.*, 2006) presentó una alta frecuencia del alelo mutante *Met*1,011/*Met*1,011. Los piretroides y propoxur tienen mecanismos de acción muy distintos y la presencia de éste alelo, probablemente se debe a la reducción de la variabilidad genética desde las primeras generaciones de selección de ésta cepa.

La frecuencia del alelo mutante *Met*1,011 no varió entre la cepas de Santiago de Cuba (anterior a selección) y la generación 12 seleccionada con deltametrina (Delta12), sin embargo, se vió reducida en la generación 13 seleccionada con deltametrina (Delta13). Con la misma tendencia, la frecuencia del alelo *Met*1,011 en la cepa de Islas Mujeres F2 (anterior a selección) se vió disminuida después de cinco generaciones de selección con permetrina (IMU5F-8). Estos resultados sugirieron que esta mutación no se encuentra asociada con la resistencia a la permetrina.

6.2.4.2. Sistema *Iso*1,011*Val*

El sistema que detecta la mutación adenina a guanina que ocurre en la primera posición del codón *Iso*1,011, discriminó al alelo silvestre *Iso*1,011 (adenina) a la temperatura de desnaturalización de 79°C y al alelo mutante *Val*1,011 (guanina) a la temperatura de 84°C. No fueron encontrados homocigotos mutantes *Val*1,011/*Val*1,011, en ninguna de las colecciones; cerca de 20 colecciones de mosquitos presentaron heterocigotos *Iso*1,011/*Val*1,011.

La frecuencia del alelo mutante *Val*1,011 varió entre 0.01 y 0.188 en las 20 colecciones de mosquitos. La frecuencia de este alelo disminuyó de la generación 12 a la generación 13, de la cepa seleccionada con deltametrina. El alelo mutante se presentó en una frecuencia de 0.044 en la colección de Islas Mujeres y despúes de cinco generaciones de selección con permetrina desapareció. Estos resultados sugieren que esta mutación no esta implicada en la resistencia tipo kdr en las cepas seleccionadas con piretroides.

6.2.4.3. Sistema *Val*1,016*Iso*

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

Dos colecciones de mosquitos de campo presentaron homocigotos mutantes *Iso*1,016/*Iso*1,016 (Ciudad Habana y Panamá) y 20 de las colecciones o cepas seleccionadas, presentaron heterocigotos *Val*1,016/*Iso*1,016. La frecuencia del alelo mutante *Iso*1,016 varió entre 0.01 a 0.22 en colecciones de campo. Las cepas seleccionadas con insecticidas tuvieron frecuencias del alelo *Iso*1,1016 entre 0.4 y 1.0.

Las cepas seleccionadas con permetrina (IMU5-F8), deltametrina (Santiago de Cuba F12 y F13) y la cepa seleccionada con propoxur (Santiago de Cuba F14) mostraron mayores frecuencias del alelo mutante *Iso*1,016. La cepa de Santiago de Cuba resistente a deltametrina, tuvo una frecuencia que aumentó de 0.56 a 0.86, de la generación F12 a F13 respectivamente. En la cepa de Islas Mujeres, la frecuencia del alelo *Iso*1,1016 aumentó de 0.22 en la población de campo, a 1.0 después de cinco generaciones de selección. La cepa seleccionada con propoxur presentó una frecuencia del alelo *Iso*1,1016 de 0.4.

El aumento en la frecuencia del alelo *Iso*1,016, conforme a la selección con piretroides, sugirió la implicación de ésta mutación en la resistencia tipo *kdr* del mosquito *Ae. aegypti*. En el análisis de QTL se muestra la asociación de este alelo con la resistencia a la permetrina.

6.2.4.4. Sistema *Val*1,016*Gly*

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

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

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

En la figura 5 se muestra un gel de agarosa de alta resolución (GenePure HiRes agarose). Los productos de PCR alelo-específico para el sistema *Val*1,016*Iso* fueron fragmentados, una banda de 68 pares de bases (bp) a partir de un mosquito homocigoto para el alelo resistente *Iso*1,1016/ *Iso*1,1016 (A/A) fue amplificada por el iniciador de cadena corta. Una banda de 85 pb fue obtenida a partir de mosquitos homocigotos susceptibles *Val*1,1016/ *Val*1,1016 (G/G) y ambas bandas se detectaron en los mosquitos heterocigotos *Val*1,1016/ *Iso*1,1016. Los sistemas *Iso*1,011*Met* e *Iso*1,011*Val* también fueron resueltos en geles de agarosa al 4 %.

6.2.4.6. Evolución de las mutaciones kdr

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

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

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

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

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

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

6.3.1. Fenotipo de la familia de mapeo

Cinco familias de mapeo F3 fueron seleccionadas en base al número de huevecillos que fueron obtenidos. Las LC_{50} de permetrina para las familias de mapeo-F3: 1.1, 3.5, 5.1, 6.4 y 14.3, estuvieron entre un rango de 0.7 a 1.5 μg de permetrina por botella. La familia F31.1, con una LC_{50} de 1.2 μg/botella fue elegida para realizar el mapeo de QTLs.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Los marcadores-SNP de los genes previamente mapeados están distribuidos en todo el genoma, tres sistemas en el cromosoma I (*cathepsin, ARC2 y APN*), dos sistemas en el cromosoma II *(mucin y chymotrypsin)* y 5 sistemas en el cromosoma III *(maltase, vitelogeninC, UGALS, Val*1016*Iso y apyrase2)*. El *sexo* es un marcador fenotípico visible, dicho marcador se encuentra en el cromosoma I.

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

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

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

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

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

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

La posición de los marcadores genómicos coincidió en su mayor parte con las posiciones del mapa genético previamente publicado (Black y Severson, 2005). Sin embargo, fue necesario hacer algunos ajustes en el cromosoma I y III. Para el cromosoma I, se dió un orden fijo a los marcadores genómicos *cathepsinB, sex, ARC2 y APN.* Para el cromosoma II no se hicieron ajustes ya que el orden de los marcadores fue consistente. Por útlimo, en el cromosoma III, utilizamos un orden fijo de marcadores genómicos (*malt, vitgconv, UGALS y Apyr2*) y manualmente se asignaron valores LOD altos (~90) a cada marcador. Con estos ajustes, el mapa genético obtenido en el programa JMMAP, fue consistente con los mapas genéticos previamente publicados.

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

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

En el cromosoma II, seis marcadores-SNP de genes de resistencia: *CCEbe20, CYP12F5, CCEAe1D, GSTe7, CYP9M8 Y CYP9J32* fueron mapeados en las posiciones 25, 31, 33, 37, 49 y 52 cM, respectivamente. Por último, nueve genes de resistencia: *CYP4H30, Val*1,016*Iso (para), CYP4H32, CYP325R1, CCEunk0, CCEae10, CYP9J19, CYP9J29* y *CYP6BY1* fueron mapeados en el cromosoma III, exactamente en las posiciones 23, 32, 33, 37, 37, 48, 52 y 53, respectivamente.

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

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

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

Los marcadores con probabilidades (*p*) menores, es decir aquellos más fuertemente asociados con la resistencia estuvieron en el cromosoma III. A excepción del marcador *Apyr1* localizado a 57 cM, todos los marcadores analizados en el cromosoma III, estuvieron significativamente asociados con el fenotipo. Los marcadores mas fuertemente asociados con la susceptibilidad a insecticidas fueron: *Val*1,016*Iso (para ó kdr), CCEunk0, CYP325R1 y CYP4H32*, sugiriendo que estos controlan en cierto grado la respuesta a la exposición a la permetrina.

La asociación genotipo-fenotipo más evidente, fue exhibida por el marcador *Val*1,016*Iso* ($p = 9.14 \times 10^{-89}$) en el gen *para*. La presencia de dos alelos mutantes A/A (*Iso*1,016/*Iso*1,016) heredados por la abuela resistente a la permetrina (IMU5-F4) fue correlacionado con el fenotipo *vivo* en un 100%. Estos mosquitos no fueron derribados

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

La presencia de un solo alelo heredado por la abuela (*Iso*1,016/*Val*1,016), determinó la sobrevivencia del 43% de los mosquitos, por otro lado, la presencia de dos alelos heredados por el abuelo susceptible *Val*1,016/*Val*1,016 se correlacionó con la sobrevivencia del 13% de los mosquitos de la familia de mapeo. Este patrón indica la dominancia del alelo *Val*1,016 (susceptible) sobre el alelo *Iso*1,016 (resistente), ya que para que un mosquito no sea derribado por la permetrina, se requieren dos copias del alelo resistente *Iso*1,016. En otras palabras, una sola copia del alelo resistente no es suficiente para evitar el derribe a la exposición a la permetrina.

En la figura 8, se muestra una gráfica donde puede observarse la correlación entre el fenotipo sobrevivencia en función al número de alelos heredados por el padre susceptible (New Orleans). Los marcadores *CCEunk0, CYP4H32 y CYP325R1,* siguieron un patrón similar al marcador *Val*1,016*Iso*. Para los marcadores *CYP4H32 y CCEunk0,* el 75 y 92% de los mosquitos con dos alelos heredados por la abuela sobrevivieron a la exposición de permetrina, mientras que los mosquitos con dos alelos heredados por el abuelo susceptible tuvieron una sobrevivencia del 18 y 14%, respectivamente.

En la figura 9, se muestra el efecto de los genotipos de los marcadores *Val*1,016*Iso CCEunk0, CYP4H32 y CYP325R1* en la recuperación a las 4 horas de la exposición a la permetrina. Para los marcadores *CYP4H32 y* CYP325R1, la presencia de uno o dos alelos provenientes de la línea resistente, estuvo asociada con ~50-65% de la recuperación de los mosquitos. La presencia de dos alelos provenientes del padre susceptibe estuvo correlacionada con el ~20-40% de la recuperación.

En el cromosoma III, encontramos un segundo grupo de marcadores: *CCEae10, CYP9J19, CYP9J29* y *CYP6BY1* asociados significativamente con el fenotipo. Los valores de probabilidad *p* se encontraron en un rango de 1.06 $x10^{-12}$ a 3.36 $x10^{-20}$. En estos marcadores, la presencia de dos alelos heredados por la abuela resistente estuvo asociada con la resistencia al derribe en el ~50% de los mosquitos. La presencia de un solo alelo heredado por la abuela resistente estuvo correlacionado con el ~17 al 20% de la sobrevivencia, mientras que la carencia de alelos heredados por la abuela resistente,

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

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

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

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

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

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

Uno de estos QTL se encuentra entre 30-33 cM, este loci corresponde al marcador *Val*1,016*Iso (kdr)* y tuvo el valor LOD más alto (LOD=31). El segundo QTL se encontró

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

Cuando la totalidad de datos se analizó en el programa de Mapeo Compuesto de Intervalos (MIC), obtuvimos dos QTL asociados al rasgo resistencia en el cromosoma III. El primer QTL se compone del marcador *Val*1,016*Iso* a 31 cM. El segundo QTL se formó por los genes *CYP4H32, CCEunk0 y UGALS*. En éste análisis, los valores LOD de los marcadores *CCEae1o, CYP9J19, CYP9J29 y CYP6BY1* no sobrepasaron al umbral calculado de 2.3.

Los resultados de ambos análisis indicaron una fuerte correlación entre el marcador *Val*1,016*Iso (kdr)* con el fenotipo resistencia. La intensidad de ésta asociación podría estar enmascarando el efecto de otros genes que quizás tengan importancia en la sobrevivencia o recuperación a la exposición a la permetrina en la familia de mapeo. Para evadir este problema, fueron creados distintos sets de datos para analizarse independientemente en ambos programas. Los datos se formateron en el programa Fortran.

El primer grupo de datos fue separado en dos subgrupos, machos y hembras. En el segundo grupo de datos, los individuos con un genotipo homocigoto resistente (*Iso*1,016/*Iso*1,016) para el marcador *kdr* fueron descartados. Y por último, el tercer análisis consistió en descartar a los individuos con fenotipo *vivos* y utilizar solamente los datos de los individuos *recuperados* y *muertos*.

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

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

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

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

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

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

6.3.6.2. Análisis MI y MIC: QTL al omitir el genotipo resistente *Iso*1,016/*Iso*1,016 para el marcador *Val*1,016*Iso*

En éste experimento, se retiraron los datos de los individuos con genotipo *Iso*1,016/*Iso*1,016 del marcador *Val*1,016*Iso*. En el mapeo de intervalos (MI), un solo QTL entre los 40-45 cM fue detectado en el cromosoma II. El marcador asociado al fenotipo en este loci, fue el marcador genómico *chymo*. El valor LOD calculado para este loci (2.3) fue ligeramente mayor al umbral LOD (2.2) (ver Figura 15).

En el análisis MI, el efecto del gen *kdr* fue nulo. Estos resultados corroboraron la fuerza del genotipo *Iso*1,016/*Iso*1,016 al afectar el fenotipo resistencia. Por otro lado, en éste análisis el efecto de los genes *CYP9* (cromosoma III) en el fenotipo, fue más intenso que *kdr*, sin embargo no logró sobrepasar al umbral LOD. En éste análisis, el cromosoma I no tuvo ningún efecto en el fenotipo.

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

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

Al retirar los mosquitos con el genotipo (*Iso*1,016/*Iso*1,016) de la base de datos, se redujo significativamente el número de mosquitos sobrevivientes, por lo cual, la implicación de los QTL identificados en éste análisis, constituyen una pista sobre los principales sitios que podrían estar afectando la resistencia, debida mecanismos distintos a kdr (por ejemplo, mecanismos enzimáticos).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Debido a la contigüidad de los marcadores *Iso*1,011*Met* y *Val*1,016*Iso* en el gen *para* (~270 pares de bases), fue esperado encontrar segregación dependiente de alelos entre éstos dos loci. Realizamos una prueba de contingencia chi-cuadrada para determinar si existe asociación entre los genotipos para ambos marcadores. Los resultados indicaron que los genotipos de los marcadores *Iso*1,011*Met* y *Val*1,016*Iso* segregaron en forma independiente. Una explicación a estos resultados es la presencia de recombinación entre ambos loci a pesar de su contigüidad.

La frecuencia de recombinación calculada entre los marcadores *Iso*1,011*Met* y *Val*1,016*Iso*, mediante JoinMap, fue de 0.21. Sin embargo, el modelo de recombinación teórico (esperado), no se ajustó al modelo observado. En la tabla 9, aparecen los genotipos esperados y observados para ambos loci. En este modelo, se aplicó una proporción de recombinación de 0.001. Sin embargo el valor de chi cuadrada observada nunca fue menor al valor chi-cuadrada calculado en el modelo de recombinación.

DISCUSIONES

La fuerte presión de selección ejercida en la generación F2 de la población de Islas Mujeres (sobrevivientes ~20%), parece haber seleccionado el mecanismo de resistencia por insensitividad del sitio blanco (resistencia kdr). De la misma forma, en el estudio realizado por Rodríguez *et al.*, (2005), la cepa Delta-13, fue seleccionada con la LC_{90} para deltametrina durante 12 generaciones, obteniendo una cepa con resistencia cruzada a todos los piretroides.

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

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

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

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

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

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

En éste trabajo, se desarrolló la primera técnica para detección de alelos asociados significativamente a la resistencia tipo kdr en el mosquito *Ae. aegypti*. La mutación *Iso*1,016 puede ser fácilmente detectada en geles de agarosa a partir de ADN de mosquitos colectados en campo. Sin embargo, la prueba diagnóstico molecular debe realizarse en conjunto con bioensayos de susceptibilidad, ya que esta prueba solo es capaz de detectar la resistencia por sitio blanco.

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

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

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

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

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

Las substituciones encontradas en el canal de sodio de *Ae. aegypti* en los codones *Iso*1,011*Met* e *Iso*1,011*Val* incluyen cambios de aminoácidos no-polares a aminoácidos aniónicos. Por otro lado, la mutación encontrada en Tailandia *Val*1,016*Gly,* consiste en un cambio de aminoácido aniónico a aniónico. La mutación *Val*1,016*Iso* encontrada en poblaciones de mosquitos de América, consistió en un cambio de aminoácido aniónico a un aminoácido no-polar. Aún se desconoce la forma en que estas mutaciones pueden alterar al poro del canal.

La respuesta neurofisiológica a piretroides en larvas de *Ae. aegypti* con la mutación *Iso*1,011*Met* fue evaluada por Brengues, *et al.*, (2003). Se requirió ~1400 veces mas concentración de permetrina para inducir descargas repetitivas en las cepas resistentes, sugiriendo la asociación entre la resistencia kdr y la mutación *Iso*1,011*Met* en cepas resistentes de América del Sur, sin embargo, el estudio manejó una muestra no significativa (n=10).

Los resultados de nuestro estudio, indicaron que la frecuencia de los alelos *Val*1,011 y *Met*1,011 no incrementó conforme a la selección con piretroides en las cepas de Islas Mujeres y Santiago de Cuba, sugiriendo que esta mutación no se encuentra asociada con la resistencia a los piretroides. Más aún, la presencia de la mutación *Met*1,011 en las cepas susceptibles de referencia soporta la hipótesis de la neutralidad de esta ésta mutación en los canales de sodio.

Una hipótesis que puede explicar la diferencia entre los resultados de Brengues *et al.*, y los resultados obtenidos en nuestro estudio, es que la mutación *Met*1,011 reportada para las cepas resistentes a piretroides de Brazil, estuvo acompañada de una segunda mutación en el codón *Gly*923 confiriendo un cambio a valina (*Val*923). La evaluación de la substitución *Val*923 en conjunto con *Met*1,011 podría ayudar a determinar la importancia de esta mutaciones en la resistencia en *Ae. aegypti.*

La mutación kdr que realmente estuvo asociada con la resistencia a piretroides en las las poblaciones de mosquitos de América, fue *Val*1,016*Iso*. La primer evidencia, fue el incremento en la frecuencia del alelo *Iso*1,016 en las cepas seleccionadas con piretroides. La segunda evidencia consistió en el análisis de asociación entre los genotipos A/A (*Iso*1,016/*Iso*1,016), A/G (*Iso*1,016/*Val*1,016) y G/G (*Val*1,016/ *Val*1,016) con la respuesta a la exposición a la permetrina en la familia de mapeo.

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

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

En forma interesante, la mutación mas común en las cepas resistentes a piretroides de Tailandia es la mutación *Val*1,016*Gly* (Brengues *et al.*, 2003). Dicha mutación no fue encontrada en las poblaciones de *Ae. aegypti* de América y el análisis del intrón indicó

que estas mutaciones tienen un distinto origen filogenético. La presencia de dos distintas substituciones en el codón *Val*1,016 en poblaciones de *Ae. aegypti* aisladas geográficamente, es una evidencia de que muy pocas mutaciones son permitidas en el gen del canal de sodio (*para*). A pesar de que el gen *para* mide ~2100 aminoácidos, solo un par de substituciones pueden ocurrir sin afectar las funciones fisiológicas de la proteína.

El fuerte desequilibrio de unión entre las mutaciones *Iso*1,016 y *Gly*1,016 y las regiones intrónicas indican que estas mutaciones ocurrieron recientemente y no ha transcurrido tiempo suficiente para restaurar el equilibrio en el gen. La resistencia kdr en mosquitos es posiblemente una respuesta a la exposición a piretrinas naturales de las plantas. Una vez que incrementó la presión de selección durante la campaña de erradicación de *Ae. aegypti*, mediante el uso del DDT (1940), distintas mutaciones pudieron haber sido seleccionadas. Actualmente, las mutaciones kdr que encontramos en las poblaciones de *Ae. aegypti* son consideradas una secuela de la presión de selección por el DDT.

Por otro lado, se ha sugerido que el DDT y los piretroides se unen a distintos sitios en el canal de sodio. En un estudio realizado en *Cx. pipiens* y *An. gambiae*, fueron encontradas distintas substituciones en el mismo codón. La mutación mas común en estas especies ocurre el residuo *Leucina*1,014 donde una mutación A→T confiere un cambio a fenilalanina (Martínez-Torres *et al.,* 1998), sin embargo, un estudio independietne encontró una segunda substitución en el mismo codón, dicho cambio consiste de *Leucina*1,014*Serina* (Luleyap *et al.,* 2002; Ranson *et al.,* 2000b). Los autores concluyeron que esta última mutación podría estar asocidada con cepas altamente resistentes a DDT y poco resistentes a piretroides. Si esto es cierto, sería interesante investigar si las mutaciones en el codón *Val*1,016, confieren distintos rangos de resistencia al DDT y piretroides, ya que la cepa resistentes estudiadas de Tailandia son altamente resistentes al DDT.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Los marcadores utilizados en el mapeo de QTL estuvieron distribuidos en los tres cromosomas. Solo una región en el cromosoma II, careció de marcadores (0 a 23 cM). Los análisis de mapeo de intervalos (IM) y mapeo de intervalos compuestos (MIC) utilizando al set completo de datos, identificaron tres QTL y dos QTL en el cromosoma III, respectivamente. En ambos análisis, el principal QTL estuvo asociado al marcador *Val*1,016*Iso* (kdr) en el gen *para*. Los valores LOD calculados para ambos análisis fueron

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

El análisis CIM de los individuos sin el genotipo homocigoto kdr, identificó un solo QTL en el cromosoma I. Los marcadores asociados a este QTL fueron *ARC*2 y *APN*, entre los 48-54 cM. Estos genes no han sido implicados en la resistencia a insecticidas, por lo tanto, podemos inferir que existe un gen asociado con la resistencia entre estos dos marcadores.

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

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

Otro gen sobre-expresado en la cepa resistente a permetrina IMU-F6, fue la glutatión-s-transferasa de la clase epsilon, la *GSTe2*. El desarrollo de un marcador para éste gen, no fue posible, sin embargo, fuimos capaces de mapear una GSTe presente en el mismo cluster, la *GSTe7*. La asociación del marcador *GSTe7* con el fenotipo no fue significativa en la familia de mapeo (F=0.0049). Por lo tanto, posteriores estudios requieren desarrollar un marcador para el gen *GSTe*2.

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

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

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

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

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

CONCLUSIONES

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

La frecuencia del alelo mutante *Iso*1,016 fue detectada en cerca de 16 poblaciones de *Ae. aegypti* de varios países de América. Además, la selección con piretroides de una cepa de Islas Mujeres, México y Santiago de Cuba, Cuba; resultó en un incremento en la frecuencia del alelo *Iso*1,016 después de varias generaciones de selección.

La mutación *Met*1,011, anteriormente reportada por Brengues *et al.*, (2003) y la mutación *Val*1,011 (Black, 2006 no publicado) no estuvieron correlacionadas con la resistencia a insecticidas, sin embargo, los alelos de éstas substituciones fueron detectadas en varias poblaciones de este mosquito. Por otro lado, la substitución *Gly*1,016 reportada en mosquitos resistentes de Tailandia no fue encontrada en América.

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

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

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

En forma general, el principal QTL que controló la resistencia a la permetrina en la familia F31.1, correspondió al marcador *Val*1016*Iso* en el gen *para* (kdr). El análisis de chi-cuadrada respaldó éste resultado, la presencia de dos alelos heredados por el padre resistente a la permetrina, estuvo correlacionado con el 100% de la sobrevivencia, mientras que la presencia de dos alelos provinientes del padre susceptible, se asoció con el 13% de la sobreviviencia. Estos resultados sugirieron la recesividad del alelo resistente *Iso*1,016.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Población	*Generación utilizada*	*LC50 (24 horas) permetrina µg/µl*
New Orleans	--	0.200
Cd. Constitución	F4	0.511
Coatzacoalcos	F3	0.210
Mazatlán	F4	0.500
Islas Mujeres	F2	2.500

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

Generación IMU5	*% Mortalidad 5 µg permetrina*	*Número de mosquitos seleccionados*	*LC50 permetrina (µg/ µl)*
F2	83.15	125/742	2.50
F3	9.70	857/950	17.0
F4	0.70	883/950	60.0

```
        EXON 20
        M  W  D  C  M  L  V  G  D  V  S  C  I  P  F  E  A  T  V
7.2     ATGTGGGATTGTATGCTTGTGGGTGACGTGTCCTGTATTCCGTTCTTTTTGGCCACCGTA
7.4     ATGTGGGATTGTATGCTTGTGGGTGACGTGTCCTGTATTCCGTTCTTTTTGGCCACCGTA
7.6     ATGTGGGATTGTATGCTTGTGGGTGACGTGTCCTGTATTCCGTTCTTTTTGGCCACCGTA
        ************************************************************
         V  F  G  N  L  V  V intron 20=========================
7.2     GTGATAGGAAATCTAGTAGTAAGTATTCCGTTTGGAAGTTCATCTGTAAGGCTGACTGA
7.4     GTGATAGGAAATCTAGTAGTAAGTATTCCGTTTGGAAGTTCATCTGTAAGGCTGACTGA
7.6     GTGATAGGAAATCTAGTAGTAAGTATTCCGTTTGGGAGTTCTTCTATAAGGCTGACTGA
        ********************************** ***** *** *************
        ============================================================
7.2     AAGTAAATTGGAGCGCACAACA-GACCTATTATGCTGTAA--TTCGTGATTCAACT----
7.4     AAGTAAATTGGAGCGCACAACA-GACCTATTATGCTGTAA--TACGTGATTCAACT----
7.6     AAGTAAATTGGAGCGCACAACAAGACCTGTTATGCTGTAAGTTCCAGCACTAAATTTCTC
        ********************** ***** ***********  * *   * * ** *
        ============================================================
7.2     ------AGTTAAAAAAGACCGTT---GATCTTGA--TAGCATCAACACTAAAGGCGTGCT
7.4     ------AGTTACAAAAGACCGTT---GATCTTGA--TAGCATCGATATTAGAGGCGTGCT
7.6     AGGTTGAATTGCAGTAGTTCAATCGAAATCTCGAACTTTCATTTTGATAACAGCAATACT
              * **  *  **  *  *    **** **  *  ***    *  * **   * **
        ============================================================
7.2     AGCAGCGAGCGAGGGGCGTACCAATTTACTTTTAGTCAGCCTTTCTTGCATTCTATCGTG
7.4     AGCAGCGAGCGAGGGGCGTACCAATTTACTTTTAGTCAGTCTTTCTTGCATTCTTTCGTG
7.6     AG--ACGCGCATAGAACATACAAATTTACATATAGTCAGCCTTTCATGCATTCTATCGTG
        **   ** **   *  * *** ******* * ******* ***** ******** *****
                                      EXON 21
        ============================== V  L  N  L  F  D  A  D  L  D
7.2     CTAACCGACAAATTGTTTCCCACCCGCACAGGTACTTAACCTTTTCTTAGCCTTGCTTTT
7.4     CTAACCGACAAATTGTTTCCCACTCGCACAGGTACTTAACCTTTTCTTAGCCTTGCTTTT
7.6     CTAACCAACAAATTGTTTCCCACCCGCACAGATACTTAACCTTTTCTTAGCCTTGCTTTT
        ****** *************** ******* ***************************
         S  N  F  G  S  S  S  L  S  A  P  T  A  D  N  E  T  N  K  L
7.2     GTCCAATTTCGGTTCATCCTCGCTGTCGGCACCGATGGCCGACAACGAAACGAACAAGA
7.4     GTCCAATTTCGGTTCATCCTCGCTGTCGGCACCGACGGCCGACAACGAAACGAACAAGA
7.6     GTCCAATTTCGGTTCATCCTCGCTGTCGGCACCGACGGCCGACAACGAAACGAACAAGA
        ***************************** *******************
```

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

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

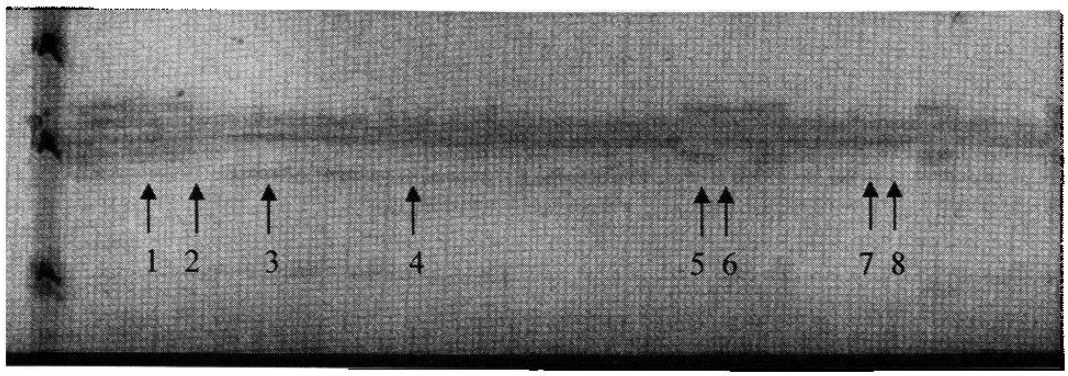

Figura 2. Gel de poliacrilamida mostrando los patrones-SSCP obtenidos a partir de productos amplificados con los iniciadores kdr4, del exón 20 del gen *para* de *Ae. aegypti.*

DIIS6 del gen *para*

Exón 20 →
Iniciador positivo Kdr2

5'-ATGTGGGATTGTATGCTTGTGGGTGACGTGTCCTGTATTCCGTTCTTTTTGGCCACCGT

Isoleucina
1,011 Intrón 20-→

AGTG**ATA**GGAAATCTAGTAgtaagtattccgtttggaagttcatctgtaaggctgactg

ATG → *Metionina*

GTA → *Valina*

aaagtaaattggagcgcacaacaagacctgttatgctgtaagttccagcactaaatttc

tcaggttgaattgcagtagttcaatcgaaatctcgaactttcattttgataacagcaat

accagacgcgcatagaacatacaaatttacatatagtcagcctttcatgcattctatcg

Exón 21 →
Valina
1,016

tgctaaccaacaaattgtttcccacccgcacag**GTA**CTTAACCTTTTCTTAGCCTTGCT

ATA → *Isoleucina**

GGA → *Glicina*

TTTGTCCAATTTCGGTTCATCCTCGCTGTCGGCACCGACGGCCGACAACGAAACGAAC-3'
Iniciador negativo kdr2

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

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

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

Iniciadores para PCR específico para alelos

Isol,011Val

```
Isol,011f     5'-ATTGTATGCTTGTGGGTGACG-3'
Isol,011Ir                        5'-GCGGGCTACTTACTACTAGATTTCCAAT-3'
Isol,011Vr    5'-GCGGGCAGGGCGGCGGGGGCGGGGCCTACTTACTACTAGATTTCCGAC-3'
```

Isol,011Met

```
Isol,011f     5'-ATTGTATGCTTGTGGGTGAC-3'
Isol,011Ir                 5'-[cadena corta]AATACTTACTACTAGATTTGCT-3'
Isol,011Mr                 5'-[cadena larga]AATACTTACTACTAGATTTACC-3'
```

Vall,016Iso

```
Vall,016Vf                 5'-[cadena larga]ACAAATTGTTTCCCACCCGCACCGG-3'
Vall,016If                 5'-[cadena corta]ACAAATTGTTTCCCACCCGCACTGA-3'
Vall,011r     5'-TGATGAACCSGAATTGGACAAAAGC-3'
```

Vall,016Gly

```
Vall,016f     5'-ACCGACAAATTGTTTCCC-3'
Vall,016Vr                 5'-[cadena corta]AGCAAGGCTAAGAAAAGGTTAATTA-3'
Vall,016Gr                 5'-[cadena larga]AGCAAGGCTAAGAAAAGGTTAACTG-3'
```

Iniciadores para la amplificación del intrón 20

```
kdr2+         5'-ATGTGGGATTGTATGCTTG-3'
kdr2-         5'-GATGAACCGAAATTGGAC-3'
```

Iniciadores para la amplificación del exón 20

```
Kdr3+         5'-GGGTGACGTGTCCTGTAT-3'
Kdr3-         5'-GTYGGTTAGCACGAWAGA-3'
Kdr4+         5'-GTGGGATTGTATGCTTGT-3'
Kdr4-         5'-YAGAWGAACTYCCAAACG-3'
```

Iniciadores para la amplificación del exón 20, intrón 20 y exón21

```
kdrR2T6+      5'-ATGTGGGATTGTATGCTTG-3'
kdrR2T6-      5'-TCTTGTTCGTTTCGTTGTC-3'
```

Tabla 5. Frecuencias de alelos y genotipos *Iso*1,016, *Met*1,011, y *Val*1,011 en 32 cepas de *Ae. aegypti*. También se proveen los tamaños de muestra, los intervalos de confianza 95% (CI) en los estimados de frecuencia alélica y los estimados FIS de cada cepa.

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

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

Tabla 5 (continuación) *Met*1,011

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

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

Tabla 5 (continuación) *Val*1,011

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

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

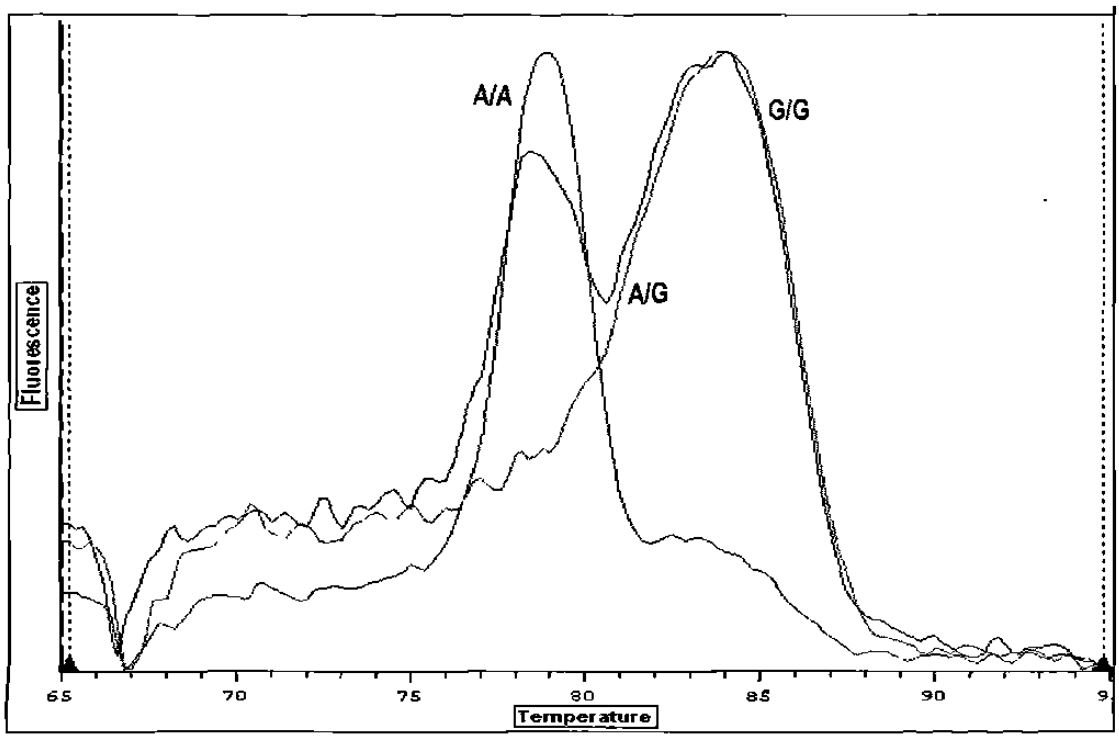

Figura 4. Gráfica de las temperaturas de desnaturalización para detección de alelos específicos en el sistema *Val*1,016*Iso* del gen *para* de *Ae. aegypti*. El genotipo mutante *Iso*1,016/ *Iso*1,016 produjo una curva a 77°C. El genotipo silvestre *Val*1,016/*Val*1,016 produjo una curva a 84°C. El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

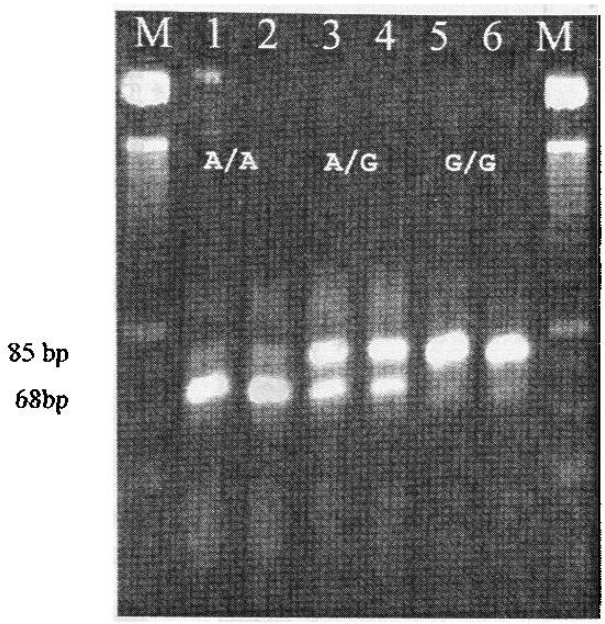

Figura 5. Fragmentación de productos de PCR alelo-específicos del sistema *Val*1,016*Iso* del gen para de *Ae. aegypti*, en geles de agarosa al 4%. La banda de 68 pares de bases (bp) presente en los carriles 1 y 2 corresponden al genotipo mutante *Iso*1,016/*Iso*1,016 (A/A). La banda de 85 pb en los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

```
Clade1 ATRGGAAATCTAGTAgtaagtattccgtttggaagttcatctgtaaggctgactgaaagtaaattggagcgcacaaca-g
Clade2 ATRGGAAATCTAGTAgtaagtattccgtttgggagttcttctataaggctgactgaaagtaaattggagcgcacaacaaa
Clade3 ATAGGAAATCTAGTAgtaagtattccgtttggaagttcatctgtaaggctgactgaaagtaaattggagcgcacaacaaa
       ** *************************** ***** *** ********************************

Clade1 acctattaagctgtaattcgtgattcaactatttacaaaataccgttgatcttgatagcatcaatattagaggcgtgcta
Clade2 acctgtaatgctgtaagtt-ccagcactaaatttctcaggtagaattgaactagttcaatccaaatctcgaactttgatt
Clade3 accagtaaggcggaaatct-cgattcaacaatttaaaaaggagaattgatcttgataactccaactctcaaagtttgctt
       ***  *   ** * ***     *        ****   *   *   **** ** * *     ***   *  *     * *

Clade1 tcaacga-------------gcgaggggcgtaccaatttacttttagtcagtctttcttgcattctttcttgctaacc
Clade2 ttgataacagaatactagacgcgcatataacatacaaatttacatatattcagcctttcatgcattctatctggctaacc
Clade3 ttgacaa-------------ccgaggggcgtacgactttaattatatacaacctttct-atattctatcttgctagcc
       *  *  *                 *        *** * ****  *  *  **  *****    ***** *** **** **

Clade1 gacaaattggttcccactcgcacagGTAC
Clade2 gacaaattggttcccacccgcacagGTAC
Clade3 tactaactggttcccccacgaattgGTTC
        ** **  ******* * ** *  *** *
```

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

.

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

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

Tabla 6 (continuación)

Gen	*Contig o numero acceso*	*Iniciadores(5'-3')*	*Ta°C*	*bp*	*SSCP*
CYP6AG5	1.231	CTAACGAAGTCGGAGGAACG GGGCAATGGACGAAATGA	57	384	P
CYP6AH1	.1.257	GTGGCGGATAATTTCCTGGAGT TGCTGGGTGAGCGTGTCGT	---		
CYP4H32	1.283	CGCTGCGATTACTTCCACC TCGAACGACCGTCATCTTCA	61	287	P
CYP4H29	1.285	TTCATCCATCCGTTCCAATCA TCTATCGTGGCACAATCTTCACA	61	393	M
CYP9M4	1.29	CGTCGCAGCCTTCTTAGTTT CCCAATGATAGGGTCCACCT	57	319	P
CYP4C52	1.295	TTCGACATCGTGCCCTTCAC TTCTTGCGACAGCAACTGGTTA	61	359	P
CYP4G35	1.318	GCTTGGCGATGGGCTGTT CATAATCAAATCCCTCCTTGCTCT	57	266	P
CYP49A1	1.338	CAGAACCCAGACAAGCAGGAA CCGTAACCGAAGGGCAAACTA	61	2000	M
CYP9J32	1.352	GCCACCGTTCCGCTCTT TTTCGTTGCCATCGTCTTCTT	61	259	M
CYP6AL1	1.354	GCGGCTCAGGTGTTTGTG CGGCTGTGCCTTTGTCTAT	61	304	P
CYP6N9	1.371	GAAAGCATCCGCCAGCAT GCAAGGTCGCCAATCCC	63	291	P
CYP9M8	1.41	ATTGAGTGGACCGATTACGACA GGATTCGGGAAGAAATGTGG	61	392	P
CYP6AL3	1.415	ATTTGATTACTTCGCTCCGTTTGG TGCCTGGATGTCCTGATGTCG	61	380	P
CYP307A1	1.427	GGCGAAGACGAACCAGAGCG GGCGATGAGGAGTACCGAAGGA	61	308	M
CYP9M9	1.43	CGGCACCAAGGTAACGG CATCGGCACATCGGTCTTT	61	280	M
CYP6AG8	1.4359	TGACTGTTCTCCCGAGTGTTG GGTTTAGCGAAAGGGTGGC	61	255	P
CYP302A1v1	1.4395	CGACATCGCCGCCGTAT CAAAGGCAAGAAGTTCCTCACA	61	211	P
CYP4J16	1.4503	CATTCATCTCCCGATTGATTACC AACCACATCCTCCCGCTTG	---		
CYP4AR2	1.457	CACTTCGCATGTTCCCTCC TCTTAGTGGCATTTCGTCCTG	61	389	P
CYP325Z1	1.467	GGTGGGCAACGAAACATCTAC AGCAGCAAACGGGACAGC	57	214	P
CYP12F5	1.47	TTTGGAAGTCACTGGCGTAAT TTGGGCATCGGTGTTTGT	57	277	P
CYP305A5	1.48	GGATTGTACGCTGGGAGGA AACTTTGTATGGCTTTGGTGAGA	61	340	P

Tabla 6 (continuación)

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

Tabla 6 (continuación)

Gen	*Contig o numero acceso*	*Iniciadores(5'-3')*	*Ta°C*	*bp*	*SSCP*
NS-COE7	1.145	CCTTCAAACCCTCACAACGG ACTAGCTTCACATAGTAATCCACCAG	---		
CCEunk0	1.347	ACGGAGTCTTTCTTGAAGGGTAA CACTAACTGCACGAAGCGATG	61	318	P
CCEbe20	??	AGAAATCCGCCGAGAAAGC GGAGTAAGGGAACCTGATGGAA	61	267	P
CCEunk4o	1.35	CTGCTGCTGCCACATACC CGCCGTGCTTCCAATC	57	347	P
CCEae1D	1.474	CGAGCGATTGTTATGTCTGG AGCCCTTCTTCCGAGTTTC	57	344	P
CCEae2D	1.3489	TTTTGTGCTGCCAATCTCC CCCATCAGTTTCTCCTGGTTAT	61	382	M
CCEunk5o	1.1	CACGGAGATGATCTGGGCTAC GCTTCAAGACGGGAACACCTAT	57	308	M
CCEbe1o	1.754	TCCGTTCCCGCCAGTTGTG GGGCATCTTCGTGGTGGTCATAG	---		
AaeCOE-15	1.105	GATGACGGGCGTGGATTG GGCTGTTACTATGGCAGGAAGAT	61	372	M
CCEgH13	1.89	TCAAGCTGACAACGGAAACTAAA CGGCAGGTCGGAAGAATGG	---		
CCEae10	1.115	AGGTCCAGAAGCCAAACAGG GGAAGCAGGTGTAGGTTCAGAGTA	61	394	P
CCEae1A	1.142	CAAGAGTTGCCACTGGATGA ATAGGCTGCCATTACGAACA	52	147	P
CCEae5A	1.142	ACTTGGCTTTCTTTGCCTACC CCGCTTTGAGCGATTACTTTAT	52	222	P
CCEae4A	1.142	CGAACTGACTCGGCTACTTTC TGCTGCCCTTCTTTACGG	50	248	M
CCEae6A	1.1678	GGTAATCAACCGATAACCACAAA TGGAGCCATCCGAAATAGAAA	---		
NS-COE24	1.18	TGGTGCTGTCGCTGTTTCTG CGTAAGGGTATCCACGGCTAAT	61	275	M
CCEae3B	1.55	GCAACCCTCCAAGCCTTAA CACCATTGTCCTTCCTACGC	57	359	M
GSTd2	1.22	TGGCGTTGAGTTGAATCCG TGCCTCCGCAAATCGTG	61	268	P
GSTe7	1.291	CACGATACCGACCATTGACGA CCTCCATAGGGCAAACTCCA	61	371	M
GSTs1-1F	1.607	TGTCGGTGGACGGCAAGAA GTACATATCGGCCCATGTGAGTTT	---		
GSTt3F	1.362	CAGAACGTGAACCGCTTTGGG ACCTTCGCCTGATTGACTTCCA	61	260	P
GSTt4F	1.111	CCAACGGCGTCACCATTCTC GCTGATTCAGGTTCTGCTCCATCT	61	246	M

Tabla 6 (continuación)

Gen	*Contig o numero acceso*	*Iniciadores(5'-3')*	*Ta°C*	*bp*	*SSCP*
GSTu1F	1.608	GCCGCTTGGGAAGTAAGTTTG TGATGGGATGAATTGGGTGCT	61	255	M
GSTu2F	1.1	CCCAAATCAACCGAGTTCTTCA GCCTGGTCCTCCTCGTATCCT	61	322	P
GSTu3F	1.481	CGAGGCATCATCAACCAACGG TCGGCAGATCACTCAGGTCAACA	63	268	M
GSTz1F	1.632	AGCGTGCCAAGGTTCGGGAGA GGATGATCGGATACGGGCGTAGAT	61	276	P
CYP9J32	1.352	TCGGGTAATGGGACTAA GACTCCGTTGTTTCTTGTT	52	210	P
CYP9J28	1.1188	TTTGCGAACGATGTGAT GTTCCCGCTCCCTAAT	52	247	P
CYP9J24	1.1188	ACTTCGCTGCTCTACACTT TACTTGATTCCGTTTCCTT	52	245	P
CYP9J19	1.221	TGGACGGATAATGAGTTGA TGTCTATGGTCGGAGGC	57	256	P
GSTe3	1.291	ATGACGCCCTGTATCCG CAACGAGTCGCCAACC	57	221	M
GSTe4	1.291	GCCCGTTTGCGGTTCT CCTCCTGGTTGGTTCCCT	57	283	M
GSTe6	1.291	CTGGGAAATGATACCCTAAA CTGCTTGAATCCACGAAT	57	264	M
GSTe7	1.291	TGTTTCCGAGACTGCG TGACTGTTCCATCCGTTTA	52	260	P
CYP9J10	1.221	AGGGTTCGTTGAGGCA GGTTTACCGTTCAGTGATTT	57	271	P
CYP12F6	1.472	ATGATTCTGGCAGGTGTC GGTTTCCTACTATGGGTGG	52	220	M
CYP6BB2	1.1327	GGCAGTGCTGGTTATCG TCCTTCAGGCAATTCTCC	57	264	M
CYP9J8	1.221	CTTCGCTGCCGTTATCT TTGACACCGATTTGCTTG	57	264	P
CYP9J26	1.1188	GAAACGGCGGAGCAT GTCCACCTTGATTCCAAAA	61	276	P
CYP9J27	1.1188	GATTCGCCACCGTTCA GAGTTTCGGATACCACCAT	61	282	P
CYP6AA5	1.702	GCCCGTCATTCGCACAGT TTCAACATCCAGCCAAAGTCC	61	210	M
CYP6P12v2	1.327	GGCAGGTCACCAACAAGCA ATCACCGATTCCCGCTCCC	57	376	P
GSTe1	1.291	TTTCCTTTCCCTAAGTTCCGTCTC CAGCACAAACCCATCATCGTC	49	179	M
GSTe2	1.291	CACCCTGTCGGGCAGTGGAA TTGGCTTGCTTAACCAGTTCTTTC	52	308	P

Tabla 6 (continuación)

Gen	*Contig o numero acceso*	*Iniciadores(5'-3')*	*Ta°C*	*bp*	*SSCP*
GSTe3	1.291	CTGGTACAGAAATACGGCAAAGA GAACAGGGCATTCAGAGTGGA	57	297	M
GSTe4	1.291	TATTGGTTTGGACCTGGATGTT ATAGATGATGATGGCGTGGC	57	229	P
GSTe5	1.291	TATGGGAAGGACGATAGTTTGTA AAGTCATCGGTCAGGGCATC	57	279	P
GSTe6	1.291	CGATGCGGTTCTGCCGATAA GCCAATTTCTTTGCACCTTCTC	52	208	P
GSTe7	1.291	GCATACAACCCGTCGCACCC CACGCAGTCTCGGAAACAAAA	61	372	P
GSTe8	1.291	TTCGGACAAGATGGTGATTT TACGCTTCCTGAACGGGTTT	–		

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

Gen	*Contig o numero acceso*	*Iniciadores*	*Ta°C*	*bp*	*SSCP*	*Pos.*
Hemepoly (hemolymph polypeptide)	U11235	CGACAAGCGCCAGCAGAAGG AGTTGGCCGGGTCCACTTCG	60	385	M	I, 0
Sialokin1 (salivary vasodilatory protein-sialokinin1)	AF108099	CCCGATAAATCCTTTCCTTC AAATGGGTATCCCTTTCCTG	60	298	M	I,4
Cathbp (cathepsin b-like thiol protease)	L41940	CAAATTCGGAACCTCACCAG TATCCACCCTTGCATCCATC	60	343	P	1,5
LF090	T58320	AGCAGAATGGCTCCCCGTAA ATGGTTTCCTTGCCGGACAG	48	145	M	I,13
VitgRecp (vitellogenin receptor)	AI650188	CCTCTGCAAGAAGCCGATGT ACCCAGTCGTGGCTGTTGAT	60	308	P	I,13
Transfer (transferrin precursor)	AF019117	ATGCGGCCATCCAGGTTCAG CCCGCCGACTTCAGTTTCGT	60	309	P	I,14
Riboptl1 (Ribosomal protein L1)	AI658439	AGAATCTTGCGTTGCCGTAC GCTTCAGGGTTCACGTTGAT	56	285	P	I,30
Aamy2 (a-amylase 2)	U01208	ATGACGTTGGAGTGCGAATC ACCAGGTTGCCGTAGATGAA	60	330	P	I,32
BMIOP (blood meal-induced ovarian protein)	U84248	TTGAAGTCGTCGTTGCTGTT CTGCCTTTGTCATGTTTGCT	60	337	P	I,32
Chitan 1 (chitinase 1)	AF026491	AAACTGACCTACGCCCAAAG GTCTACGCCGATGAACGAAT	60	327	M	I,33
PPallost (preproallatostatin)	U66841	AAGAAGAAGATTACGACGAT CAATTTCCCACTATCACTTA	60	326	P	I, 36
Actin I	U20287	CTCTATCTACCTTCCAGGCTAT GACGCTGACAAGTATCACAA	50	295	P	I,31

Tabla 7 (continuación)

Gen	*Contig o numero acceso*	*Iniciadores*	*Ta°C*	*bp*	*SSCP*	*Pos.*
LF397	BM378051	AGCCAGTCATCATCAAGC TCCTCGTCATCGTCGTCT	57	193	M	I,38.5
LF231 (ribosomal protein L36)	BM005478	CCCTGAAGTTCCTGAAGC AGAGCGAACGGTGTAAAG	52	155	M	I,38.6
Dce1	AF288384	CGTCTACATCTCCGATTTGC TGAAGTCGTCTCCGTGATAG	56	470	P	I.42.2
ARC2	BH214538	ACTACTGAGATAGGACGGAAGA CCACTTGGACTTGGAGGT	57	260	P	I,48.3
APN (aminopeptidase N)	AF378117	TCCATCACGGCAATCACA AGATCCAGCCAGCATTCG	57	203	P	I,53.6
AntC (antennapedia C)	AI650010	GATGCTAATGGGAAACAAAT TGATACCGTTTAAGGCAAAG	50	258	M	I,70
Rdl (dieldren resistance)	U28803	GGGGTGACCAATAAAGCAAG TGCGTCGTCTAAATGGATGG	60	461	M	II,17.8
InsRecp (insulin receptor)†	U72939	AGCAGCGGCAGGATCGGTAG CGCGGAACAGCAGCAGGTAC	46	313	M	II,23
VCP (vitellogenic carboxypeptidase precursor)	L46594	GCCCGCTACCAGGACAATCA CTGAAACGGCCCAGCAGGAT	57	380	P	II,23.7
LF98	T58313	GCCCTCCAATCCAAGCAC CCGTAAATCGTTCACCGTAT	57	168	M	II,27.2
Mucin	AF125984	GACAGCACCCACAGGCAAAT GCTCCTTTCAACGGGACCTT	60	408	P	II, 28.1
ADPATPtla(ADP/ATP translocase)	AI657540	CTGGCGCTACTTCATGGGTA ATCGAGGTGTTCTTCGGGTC	57	284	M	II,30
Aamy1 (a-amylase 1)		GGACTTTGTACGCGAATCTG TAAGCTGGAGCATGTGGATC	57	437	M	II,31.5
TrypB (trypsin–Barillas Mury)	M77814	ACGGCTACCCTCGGTCAGTT CTACCTCGCGGTCGGTAAAG	60	339	P	II,31.8

Tabla 7 (continuación)

Gen	*Contig o numero acceso*	*Iniciadores*	*Ta°C*	*bp*	*SSCP*	*Pos.*
Hsp83 (heat shock protein 83)	AI658441	AAGGACAACAAACGCTCAA TCAACTCACGCAGGAAGAT	50	144	P	II,32.1
PGK (phosphoglycerate kinase)	AY043171	TGTTGGGTCGTGATGTGA CCAGAGCTTGCGAGAAGT	53	342	P	II,37.7
Fxa (FXA-directed anticoagulant precursor)	AF050133	TTAGCACCAATCCAGCCTCA TGGCACAACTGTTGGGAAGA	46	200	M	II,41.0
Chymotrp (chymotrypsin)	AI618956	CCAGTTTGGCACTCGCTTCC GACGGCAATGTCATCGGGAC	60	319	M	II,43.3
RpL17A (ribosomal protein L17A)	AF315597	CATCTCGCTTGGTCTGCC CGGTTTACCCTTCTTGACG	57	311	P	II,43.3
LF357	BM005495	GGTCTATCGTCGTTCAGC AATCACCCGCATTCAGTT	50	214	P	II,48.3
D7 (*D7* salivary gland protein)	M33156	CCTAGATTTGGCCCAGTTGT ACTCGGGCTCTGATTTGGTA	60	342	M	II.54.1
Sin3 (transcription factor, sin3)	AI561370	GTATCTGTTCCTGCGGTTGC CCTGAAGTGCTGCTTCTGCT	58	454	P	II,70
AEGI28 III	BI096849	GGGTGATGAAGTTGACGG GATTTCCTTTGTTGGGTTT	57	195	M	III,14.6
LF253 (ribosomal protein L30)	T58331	CGCCAGGGAAAGGCTAAG GCATCGGTGATCGACAGG	56	182	P	III,16.7
Malt (maltase)	M30442	GGACTGGTGGGAACATGGAA CTTATCGGACAACCGCTGGA	48	234	P	III,21.2
VitgConv (vitellogenin convertase)	L46373	TGCACAGAAGACCACCAATG TCGACTGTTCCGCTGAGTTA	60	287	P	III,25.7
kdr2	AY663385	ATGTGGGATTGTATGCTTG GATGAACCGAAATTGGAC	56	370	P	III, 31.6
UGALS (UGALS vitellogenin)	U02548	AGGGCTACAATCCTGGCTAT GTATTCTGGCTGCTTGACGT	60	328	P	III,46

Tabla 7 (continuación)

Gen	*Contig o numero acceso*	*Iniciadores*	*Ta°C*	*bp*	*SSCP*	*Pos.*
DefA1 (defensinA1)	AF156088	CATTTGTTTCCTGGCTCTGT GAGCAGCACAAGCACTATC	54	193	P	III,47.2
Dynein (cytoplasmic dynein)	AI618900	ATGGGATGCTTTGGTTACTC TACTTTCTCAGCGTTGTTCG	56	276	P	III,48
Apyr2 (apyrase2)	L41391	TGATTGCATCGTCGTTGATT CAACTTGCGCTGTTTGTTTT	54	317	P	III,57

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

GEN	*Iniciadores especificos (5'→ 3')*	*Posicion genomica*
Marcadores de resistencia		
CYP9J29	[cadena larga]-ATCGGGTCACGGTTTCCG [cardena corta]-ATCGGGTCACGGTTTTCA GAACGAAAATCTACGCAGCAT	III, 52
CYP6BB2	[cadena larga]-AGTTGAAATACGATACTGTG [cardena corta]-AGTTGAAATACGATACTATA TGARTGCCGATTTGATGG	I,66
CYP325R1	[cadena larga]-TGATTCTTTGGTTAATTTTCACTTA [cardena corta]-TGATTCTTTGGTTAATTTTCACCTT ATGGGTTGTTCTCGGCA	III,37
CYP4H32	[cadena larga]-GCTGAACGGAATGTAATCGTAYCGG [cardena corta]-GCTGAACGGAATGTAATCGTAYTGA CTATCCAGATCCAGAACG	III,36
CYP4C52	[cadena larga]-TGTAGAGTTTGAACATCMCGTG [cardena corta]-TGTAGAGTTTGAACATCMCATT GCCGATCCTGGAACAAGA	I,26
CYP4G35	[cadena larga]-AAGTTACGGTGGATATTCGGC [cardena corta]-AAGTTACGGTGGATATTCAGT CTCTCGCTCGTCCTCTGC	I,28
CYP9M8	[cadena larga]-CGATTACGACATAGCTGCCACAGA [cardena corta]-CGATTACGACATAGCTGCCACGGC CATAAATAGTAAAGCAAAGTAGCG	II,49
CYP6AL3	[cadena larga]-GGTAYGGAAGACGATAGAAGAT [cardena corta]-GGTAYGGAAGACGATAGAAAAC GAAGTAATAGCTGCATCATATCYTT	I,59
CYP12F5	[cadena larga]-GATTGTWAAGGTTGGTTTTCTTCAA [cardena corta]-GATTGTWAAGGTTGGTTTTCTTTAT GCTGGAATGATCTRAAGTT	II,31
CYP6BY1	[cadena larga]-GTTCCTAAAACCCCACTTCCCGGAC [cardena corta]-GTTCCTAAAACCCCACTTCCCGAAT CGGTTCTTCATCTCCTCGTAG	III,53
CYP6P12v1	[cadena larga]-AGCATCCGTAATCTTAACCCCCCAC [cardena corta]-AGCATCCGTAATCTTAACCCCCTAT GTTCATCTTTGCGTCGTTG	I,36
CYP4H30	[cadena larga]-GGAGCGATTTTCCCAC [cardena corta]-GGAGCGATTTTCCTAA CGCTGACCAATACAGTTCCTC	III,23
CYP9AE1	[cadena larga]-ATTGGTTAGCGAAACGATGCTGCAA [cardena corta]-ATTGGTTAGCGAAACGATGCTGTAC AGTAACTGAATCAAATCTGG	I,42

Tabla 8 (continuación)

GEN	*Iniciadores especificos (5'→ 3')*	*Posicion genomica*
CCEunk0	[cadena larga]-GCAAGGTTTGAATTATGTAAGTCTA [cardena corta]-GCAAGGTTTGAATTATGTAAGTTTT GTCGGCAAATAACTGAAA	III,37
CCEbe20	[cadena larga]-ACGGATGATTAGCCAGGTAT [cardena corta]-ACGGATGATTAGCCAGGCAA TACAAYCCATTCTCACCGC	II,25
CCEae1D	[cadena larga]-TTCACRTTTTCCGTTCGTCAA [cardena corta]-TTCACRTTTTCCGTTCGTTAG AAAGCCACCCCAGAAGATA	II,33
CCEae1o	[cadena larga]-ATCGTCTTACGCATTTTGA [cardena corta]-ATCGTCTTACGCATTTCGT TAGCAGAGGTGCCCGAATC	III,48
CYP9J32	[cadena larga]-ACTGCTTCCTTGATGATTGTG [cardena corta]-ACTGCTTCCTTGATGATTATT AAGTTTGATGATTAAGATGGG	II,52
CYP9J19	[cadena larga]-GCGACTCCTCTCAGRGACAC [cardena corta]-GCGACTCCTCTCAGRGATAT ACCACCATATCCAGATACTT	III,52
CYP6P12v2	[cadena larga]-CTTCGGGTTGTTATAGCTC [cardena corta]-CCTTCGGGTTGTTATAGTTT ACGATTCTGGTGCGGGATTTTGC	I,32
GSTe7	[cadena larga]-ACACGATACCGACCATGGA [cardena corta]-ACACGATACCGACCATAGT TACTTGGACACCAGATAG	I,37
KdrV1016I	[cadena larga]-ACAAATTGTTTCCCACCCGCACCGG [cardena corta]-ACAAATTGTTTCCCACCCGCACTGA TGATGAACCSGAATTGGACAAAAGC	III,32
Marcadores genómicos		
APN (aminopeptidase N	[cadena larga]-GCTGATTGATGACTCGATG [cardena corta]-GCTGATTGATGACTCGTTC GAATGAGTTTTAGAGTGATGTCGT	I,54
Apyrase	[cadena larga]-ATTTCCAGTTTGAATCTGA [cardena corta]-ATTTCCAGTTTGAATCAGT GCTTTTAAGTCTCGTTTTCG	III,57
Arc 2	[cadena larga]-CTTCTCTGGYTCATCTCCTAACATC [cardena corta]-CTTCTCTGGYTCATCTCCTAACGTG CGTCTGAACAAAACCCCC	I,48
Cathepsin B-like thiol	[cadena larga]-GTGATCCGTAACCAGCGA [cardena corta]-GTGATCCGTAACCAGTGT ATCGGTCATGGCYGAAGC	I,5
Chymotrypsin	[cadena larga]-GTCGTTTGGTTGCGGARTTCAGCG [cardena corta]-GTCGTTTGGTTGCGGARTTCAACA CGGGACTGACTCCYCCTTGATAG	II,43

Tabla 8 (continuación)

GEN	*Iniciadores especificos (5'→ 3')*	*Posicion genomica*
Maltase-like I	[cadena larga]-ACCGTCCARATCCCCGATAGCG [cardena corta]-ACCGTCCARATCCCCGATAACA GAAAYTTCTACCAAGTTTACCCAA	III,21
Mucin	[cadena larga]-GTTGAAGAGGGAGGAGCAATA [cardena corta]-GTTGAAGAGGGAGGAGCAGTG CACCACAACGGCACCAGC	II,28
UGALS vitellogeni	[cadena larga]-TGGATGCCGAACTACCAG [cardena corta]-TGGATGCCGAACTACTAA GAGCGGTCATGGTCTTGGA	III,46
Vitellogenin convertase	[cadena larga]-TGCCAAATGTAGCAAACG [cardena corta]-TGCCAAATGTAGCAAGCA TCCGCCATCACTTCTTCAGC	II,26

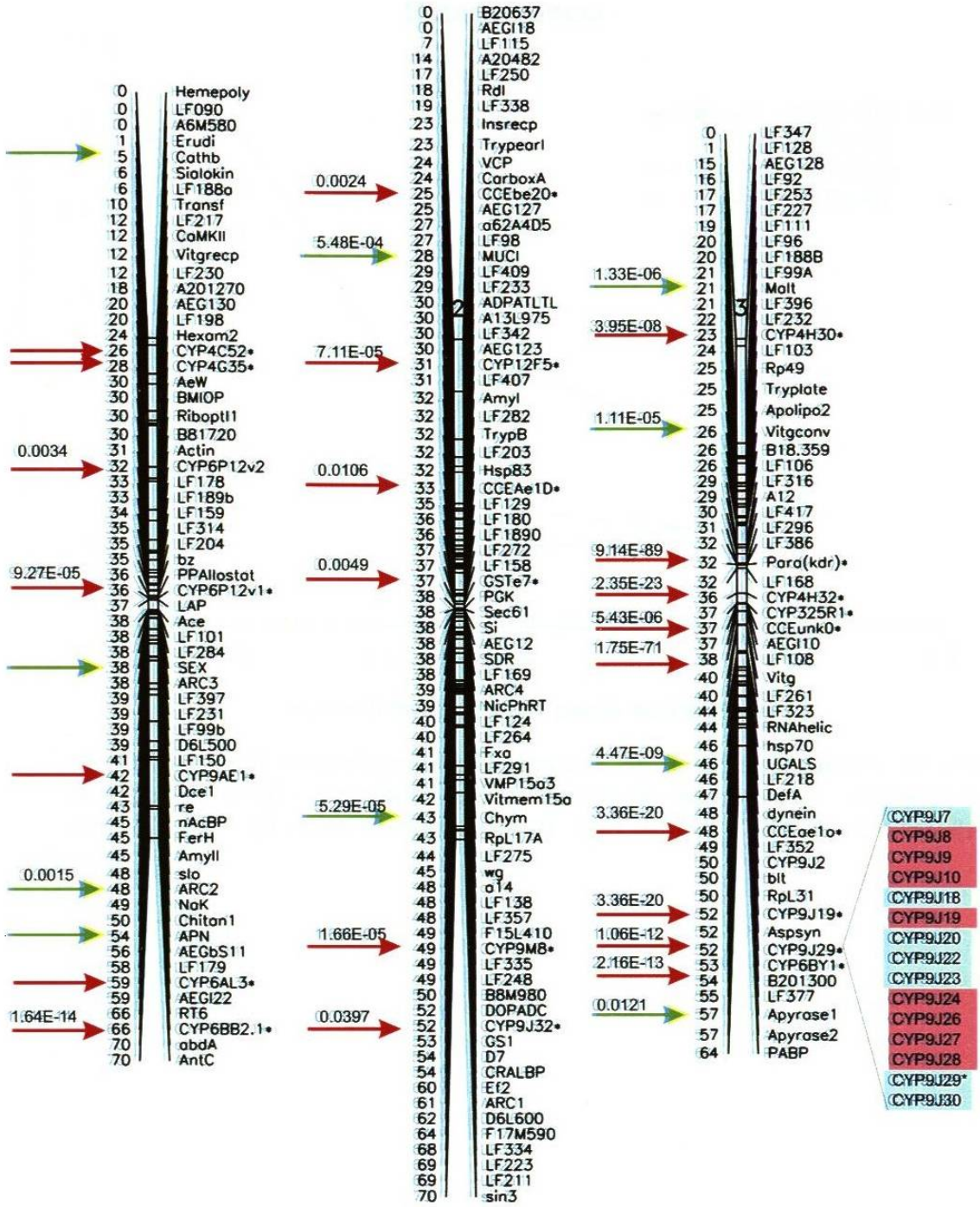

Figura 7. Mapa genético de *Ae. aegypti*. Las flechas indican a los genes mapeados en la familia F31.1, las flechas rojas indican a los genes de resistencia, las flechas verdes son genes previamente mapeados. Las probabilidades *F*, representan el grado de asociación entre los genotipos y la susceptibilidad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

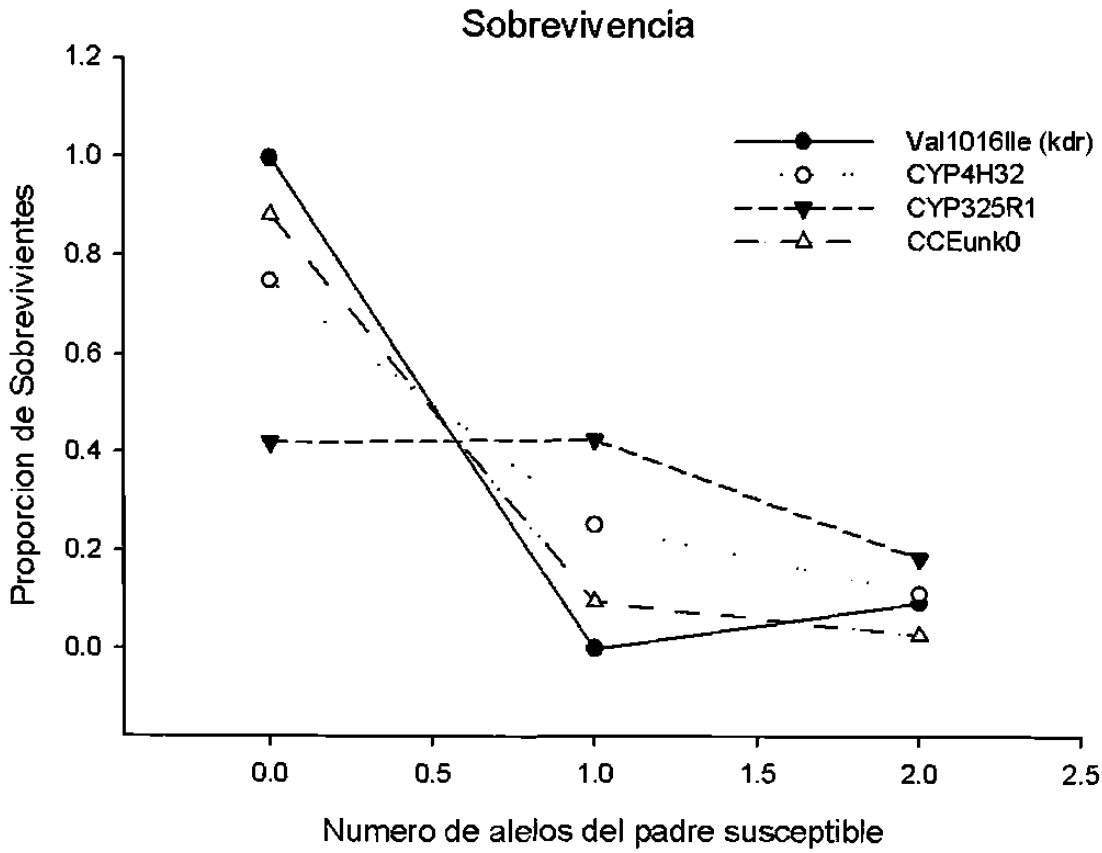

Figura 8. Gráfica de la proporción de sobrevivencia, en función del número de alelos heredados por el abuelo susceptible en la familia de mapeo F31.1. Aparecen los marcadores-SNP del QTL1 en el cromosoma III: *Val*1,016*Iso*, *CYP4H32*, *CYP325R1* y *CCEunk0*.

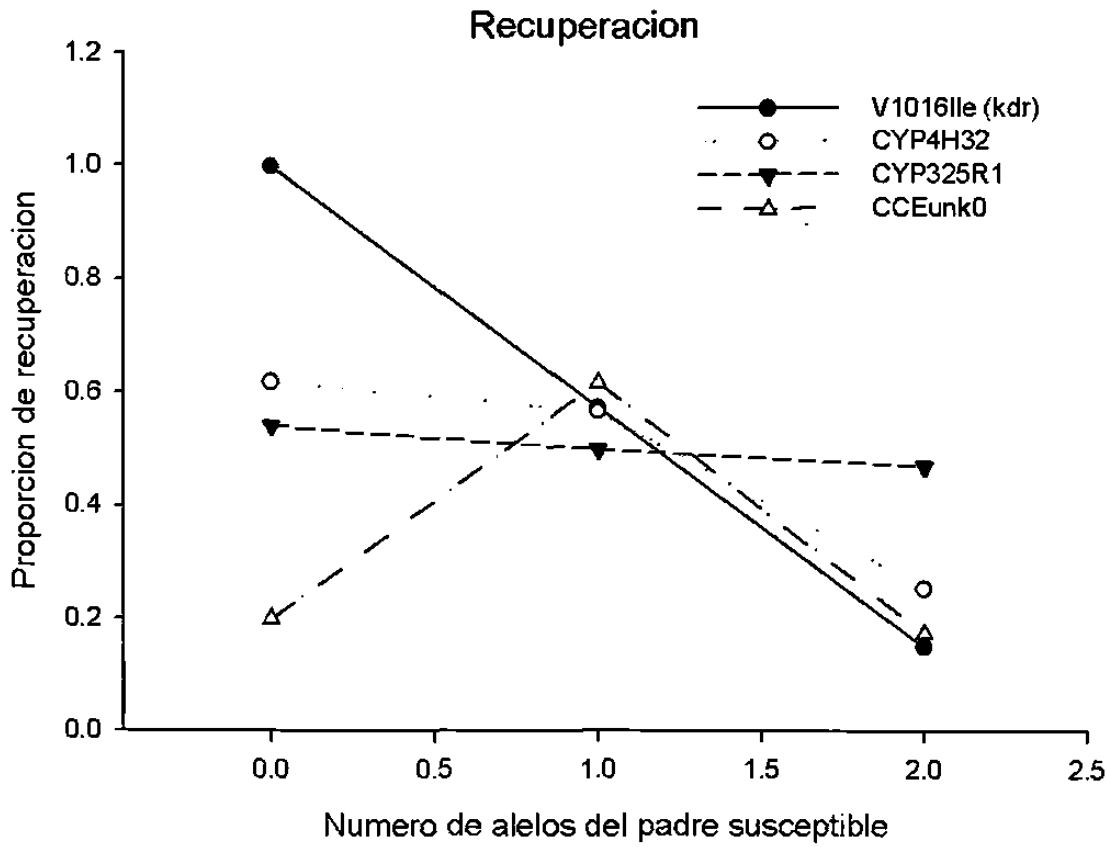

Figura 9. Gráfica de la proporción de recuperación, en función del número de alelos heredados por el abuelo susceptible en la familia de mapeo F31.1. Aparecen los marcadores-SNP del QTL1 en el cromosoma III: *Val*1,016*Iso*, *CYP4H32*, *CYP325R1* y *CCEunk0.*

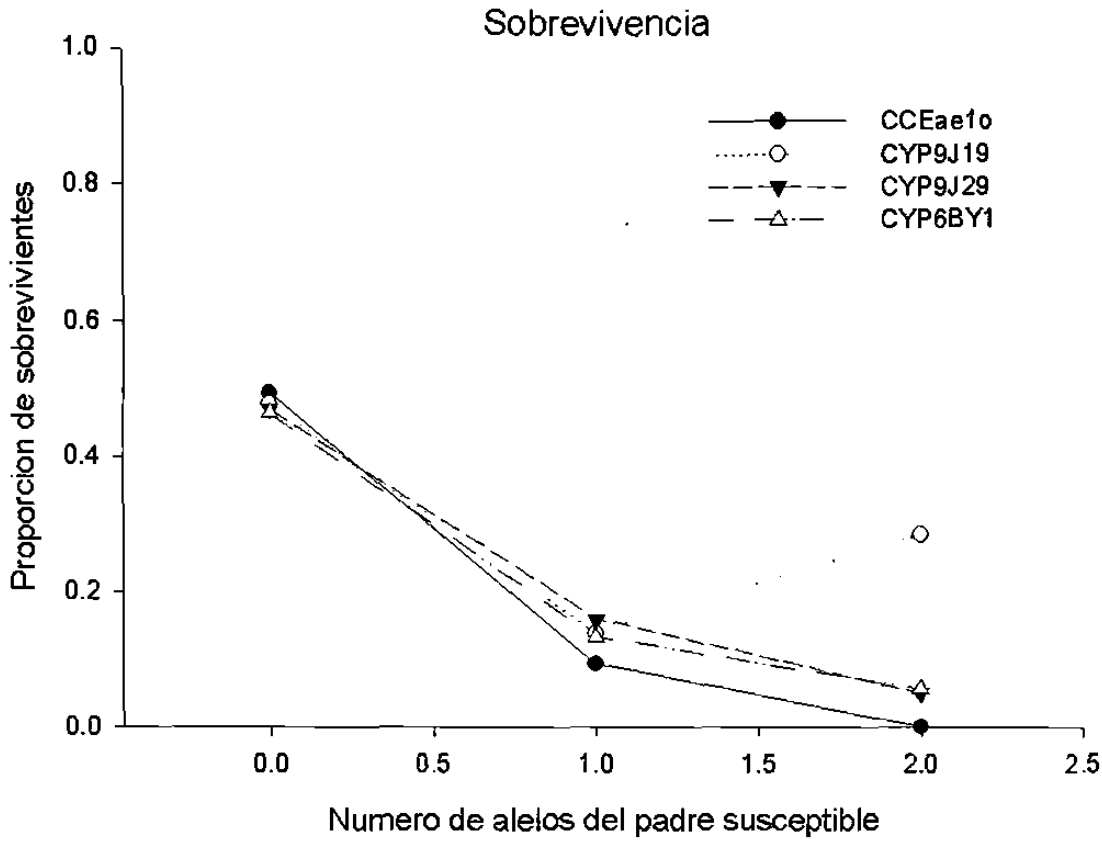

Figura 10. Gráfica de la proporción de sobrevivencia, en función del número de alelos heredados por el abuelo susceptible, en la familia de mapeo F31.1. Aparecen los marcadores-SNP del QTL2 en el cromosoma III: *CCEae1o, CYP9J19, CYP9J29* y *CYP6BY1*.

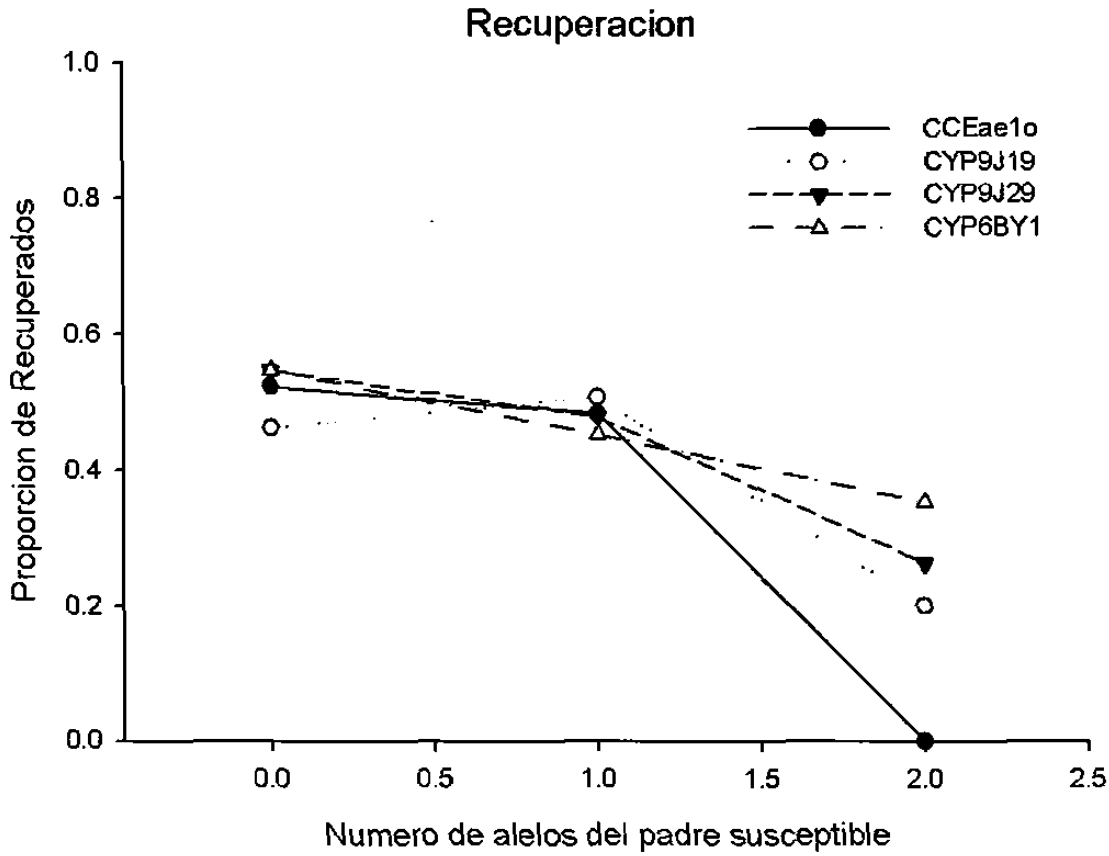

Figura 11. Gráfica de la proporción de recuperación, en función del número de alelos heredados por el abuelo susceptible, en la familia de mapeo F31.1. Aparecen los marcadores-SNP del QTL2 en el cromosoma III: *CCEae1o, CYP9J19, CYP9J29* y *CYP6BY1*.

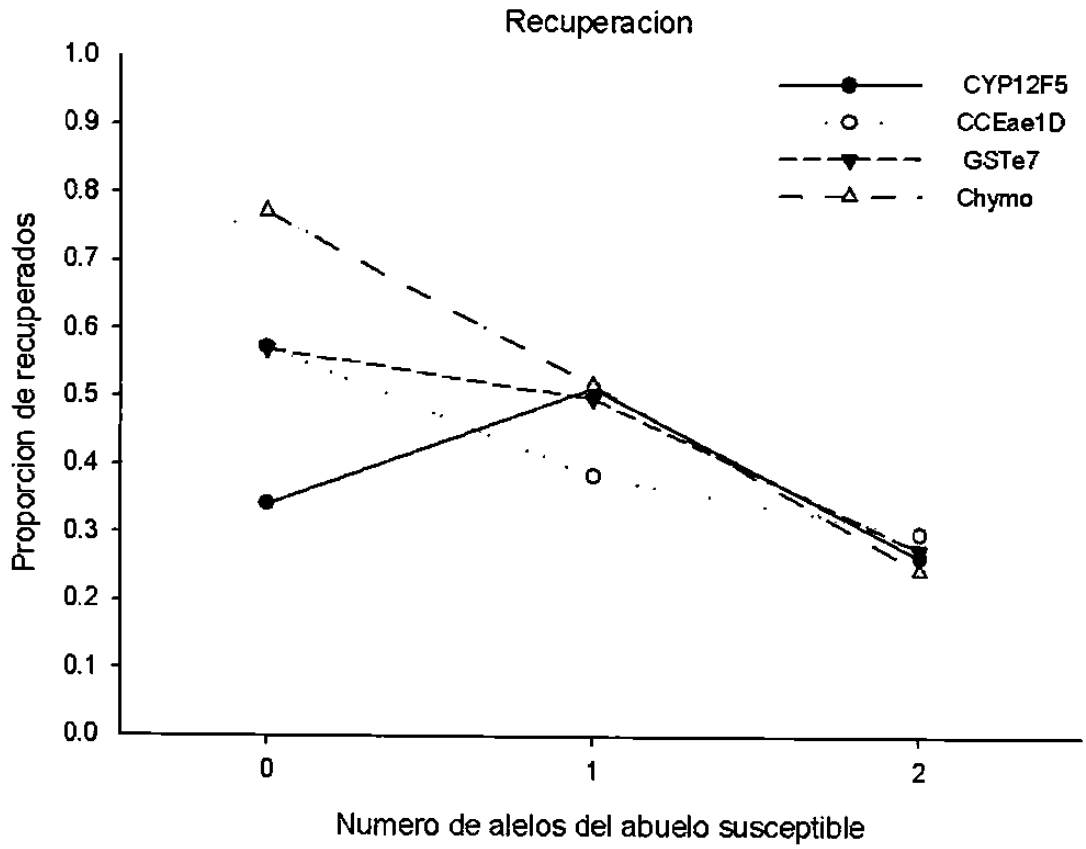

Figura 12. Gráfica de la proporción de recuperación, en función del número de alelos heredados por el abuelo susceptible en la familia de mapeo F31.1. Aparecen los marcadores-SNP DEL QTL1 en el cromosoma II: *CYP12F5, CCEae1D, GSTe7* y *Chymo*.

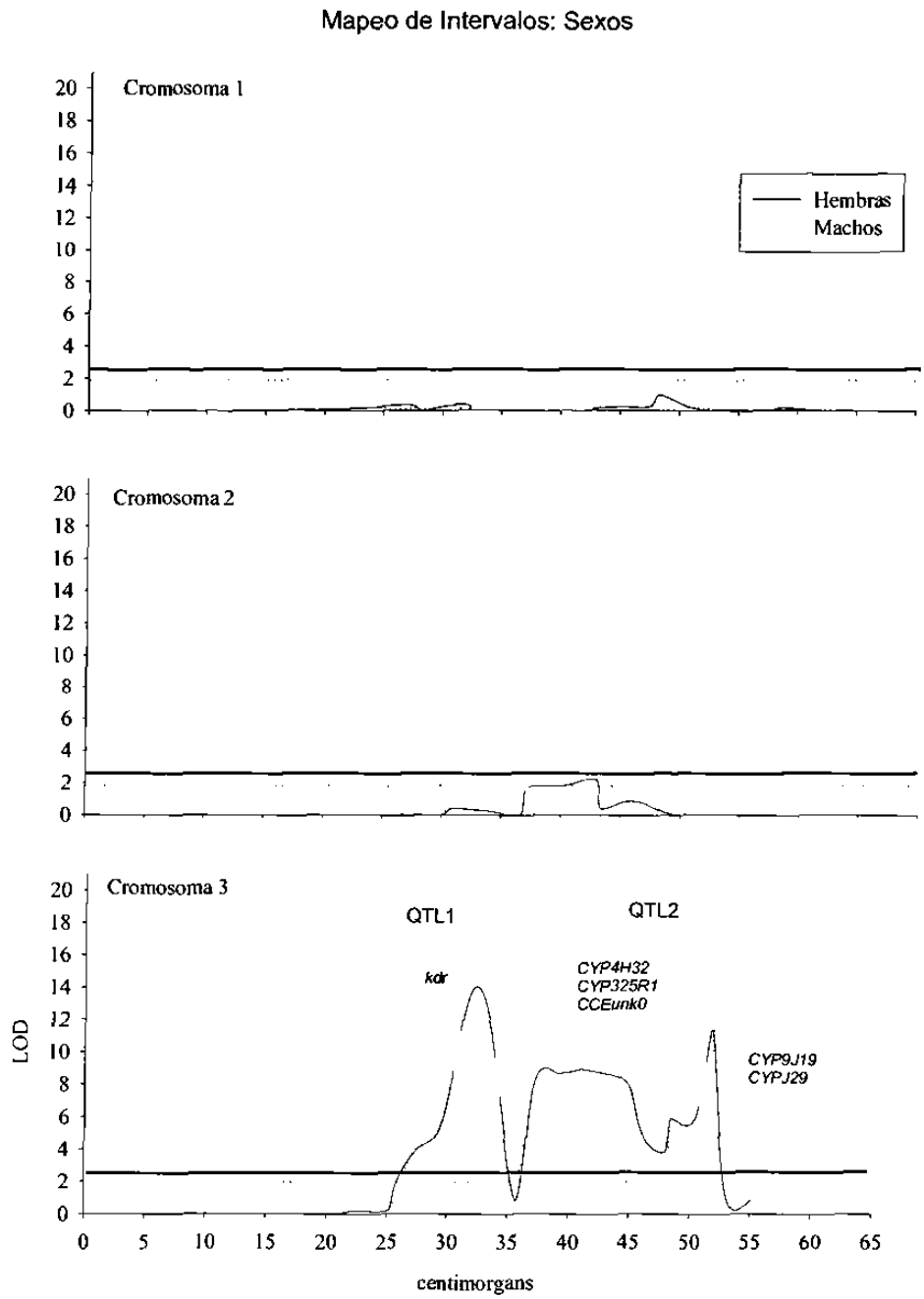

Figura 13 Gráfica de los valores LOD asociados con la resistencia a la permetrina en los cromosomas I, II y III, en la familia de mapeo F31.1. El análisis de Mapeo de Intervalos se realizó en hembras y machos por separado. Las líneas horizontales corresponden al umbral LOD. Los QTL asociados al fenotipo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

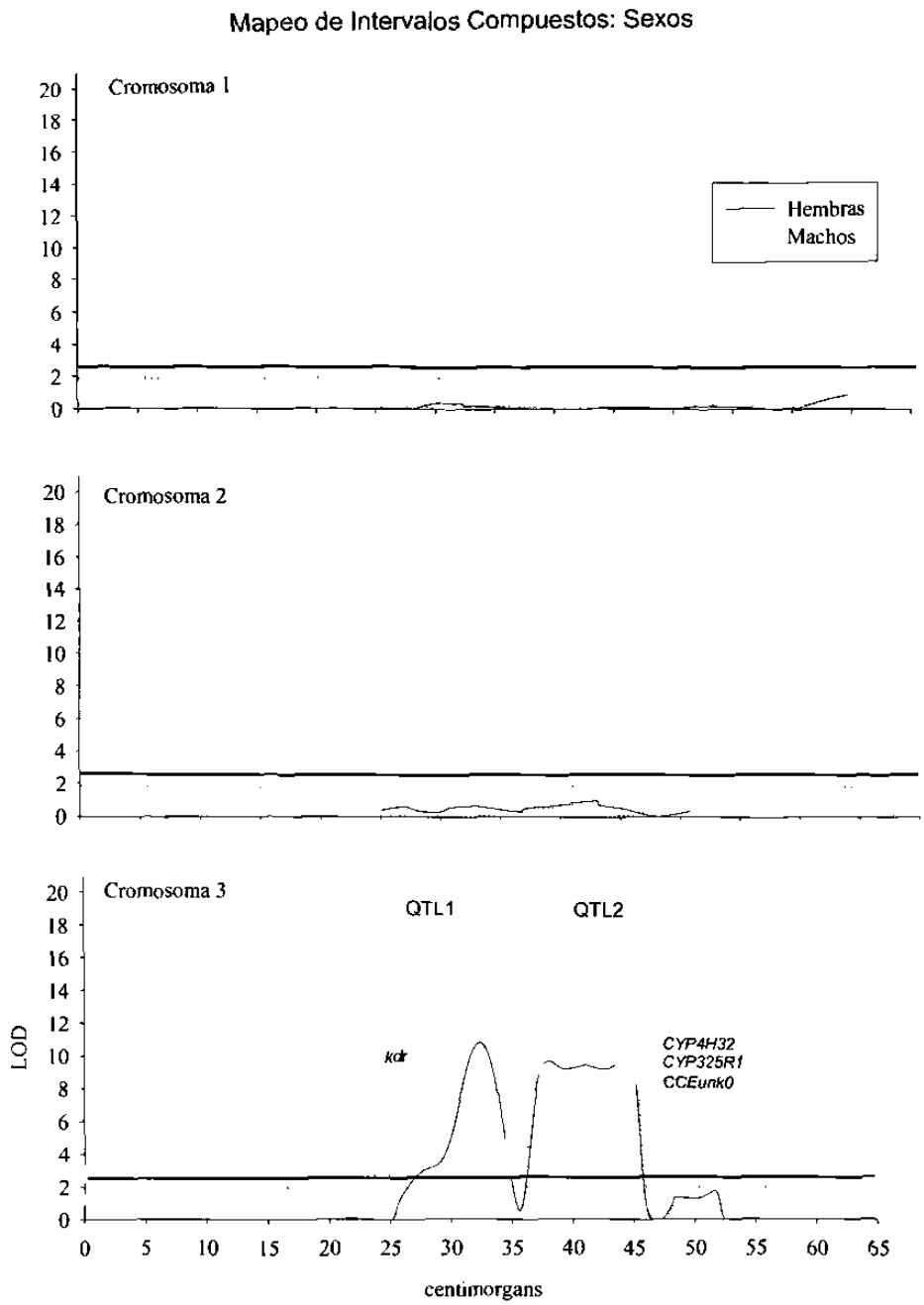

Figura 14. Gráfica de los valores LOD asociados con la resistencia a la permetrina en los cromosomas I, II y III, en la familia de mapeo F31.1. El análisis de Mapeo de Intervalos Compuestos se realizó en hembras y machos por separado. Las líneas horizontales corresponden al umbral LOD. Los QTL asociados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

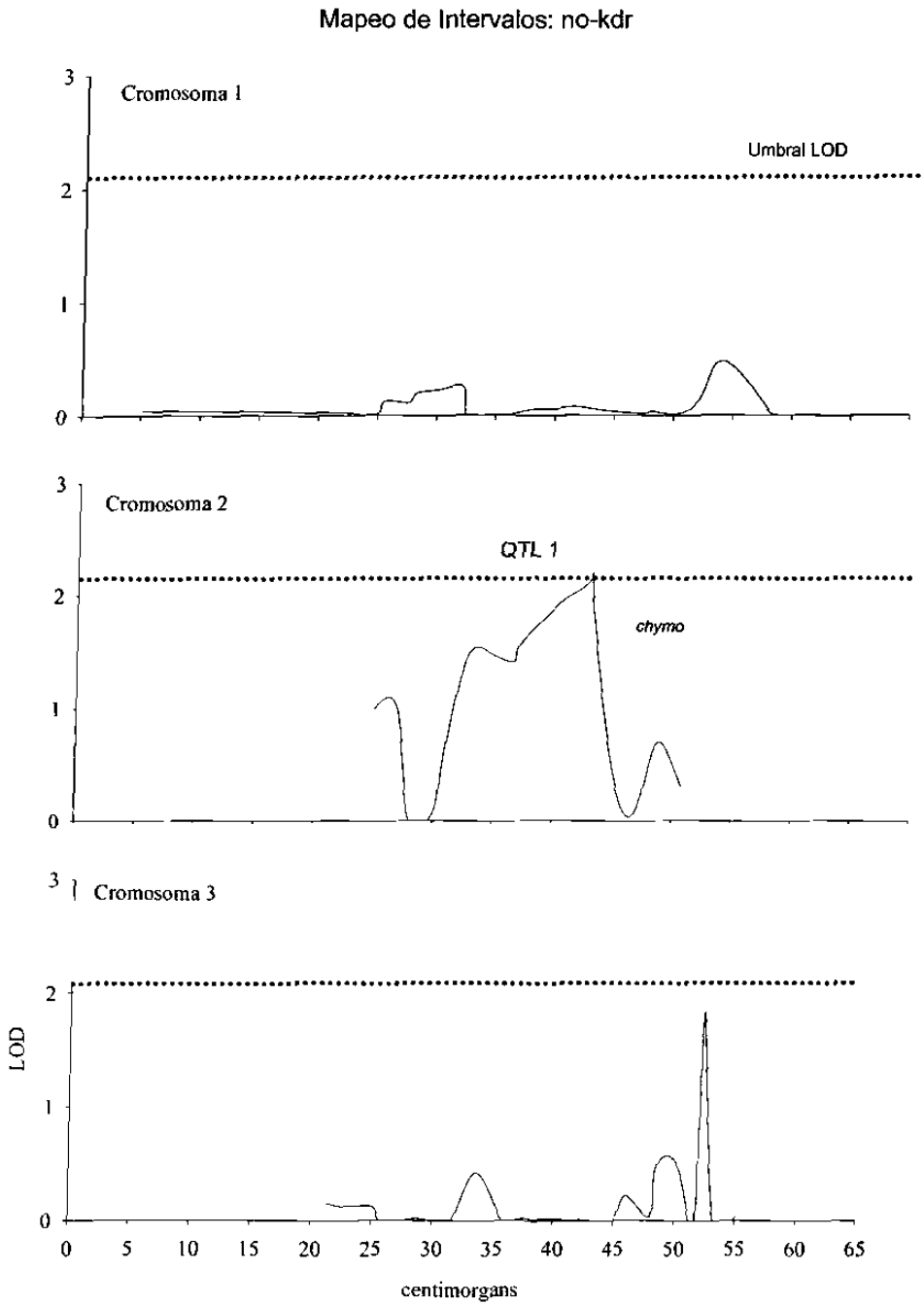

Figura 15. Gráfica de los valores LOD asociados con la resistencia a la permetrina en los cromosomas I, II y III, en la familia de mapeo F31.1. El análisis de Mapeo de Intervalos se realizó omitiendo a los individuos con genotipo homocigoto *kdr*. Las líneas horizontales corresponden al umbral LOD. Los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

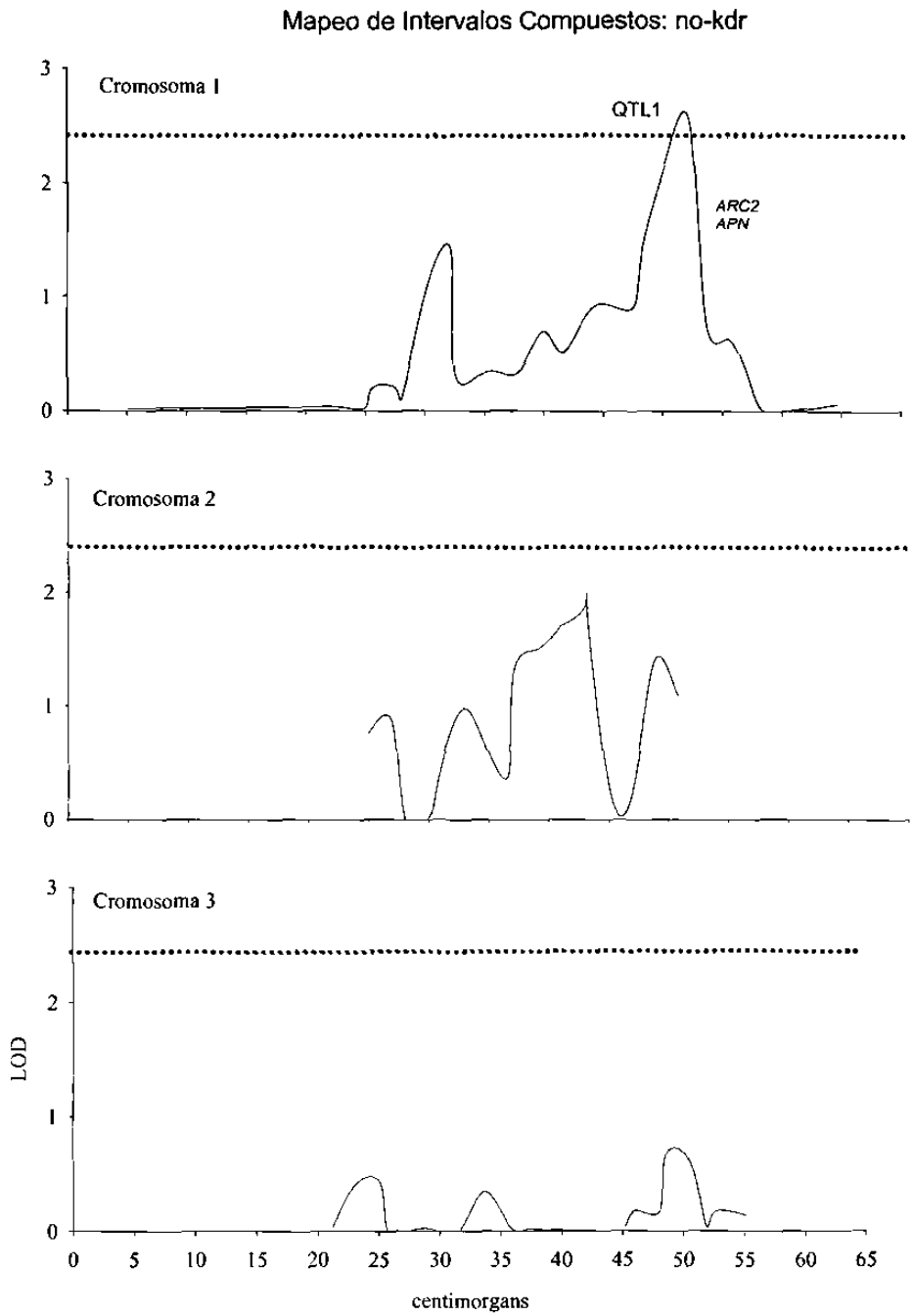

Figura 16. Gráfica de los valores LOD asociados con la resistencia a la permetrina en los cromosomas I, II y III, en la familia de mapeo F31.1. El análisis de Mapeo de Intervalos Compuestos se realizó omitiendo a los individuos con genotipo homocigoto *kdr*. Las líneas horizontales corresponden al umbral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

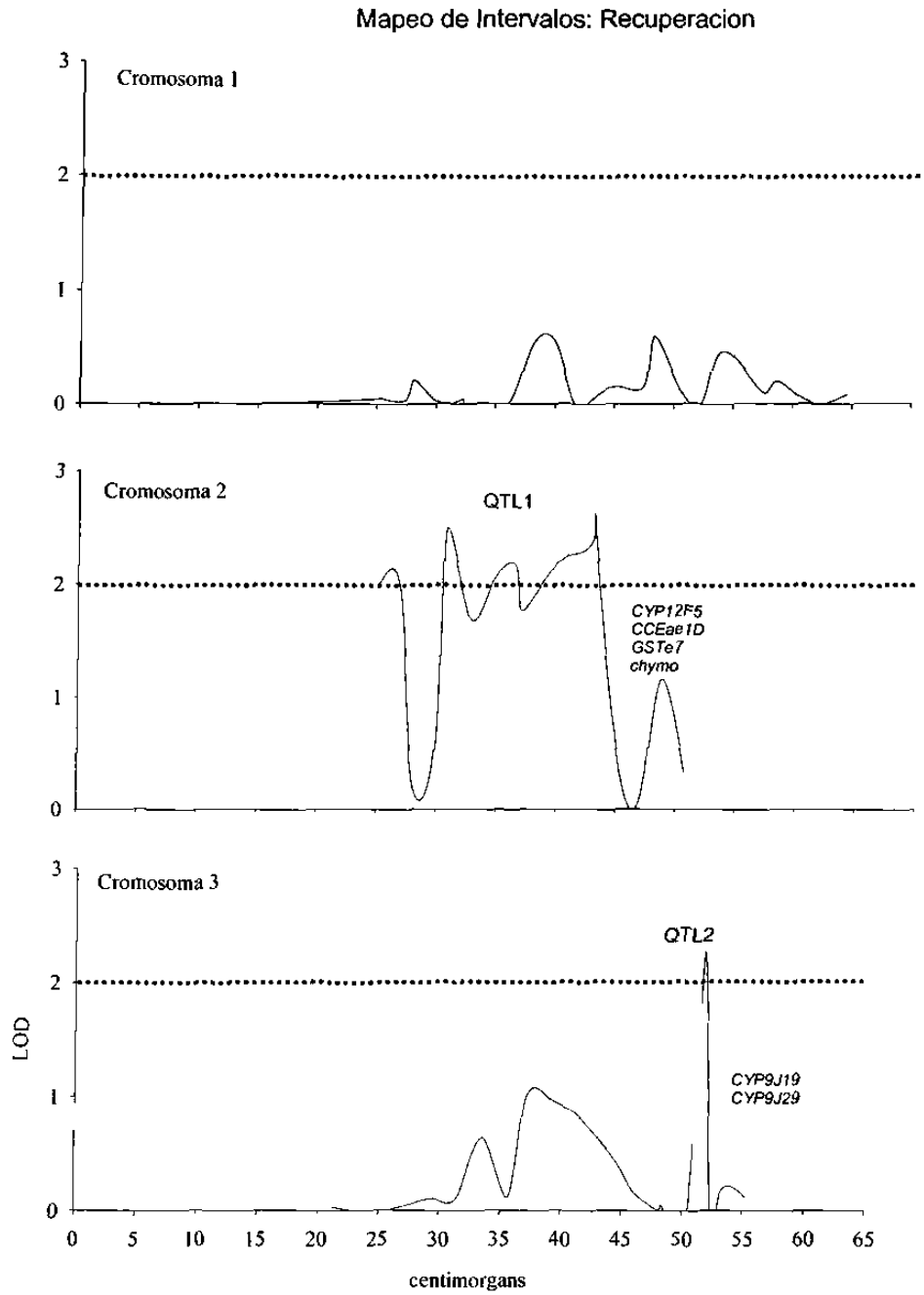

Figura 17. Gráfica de los valores LOD asociados con la recuperación a la exposición a la permetrina en los cromosomas I, II y III, en la familia de mapeo F31.1. El análisis de Mapeo de Intervalos se realizó omitiendo a los individuos con el fenotipo *vivo*. Las líneas horizontales corresponden al umbral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

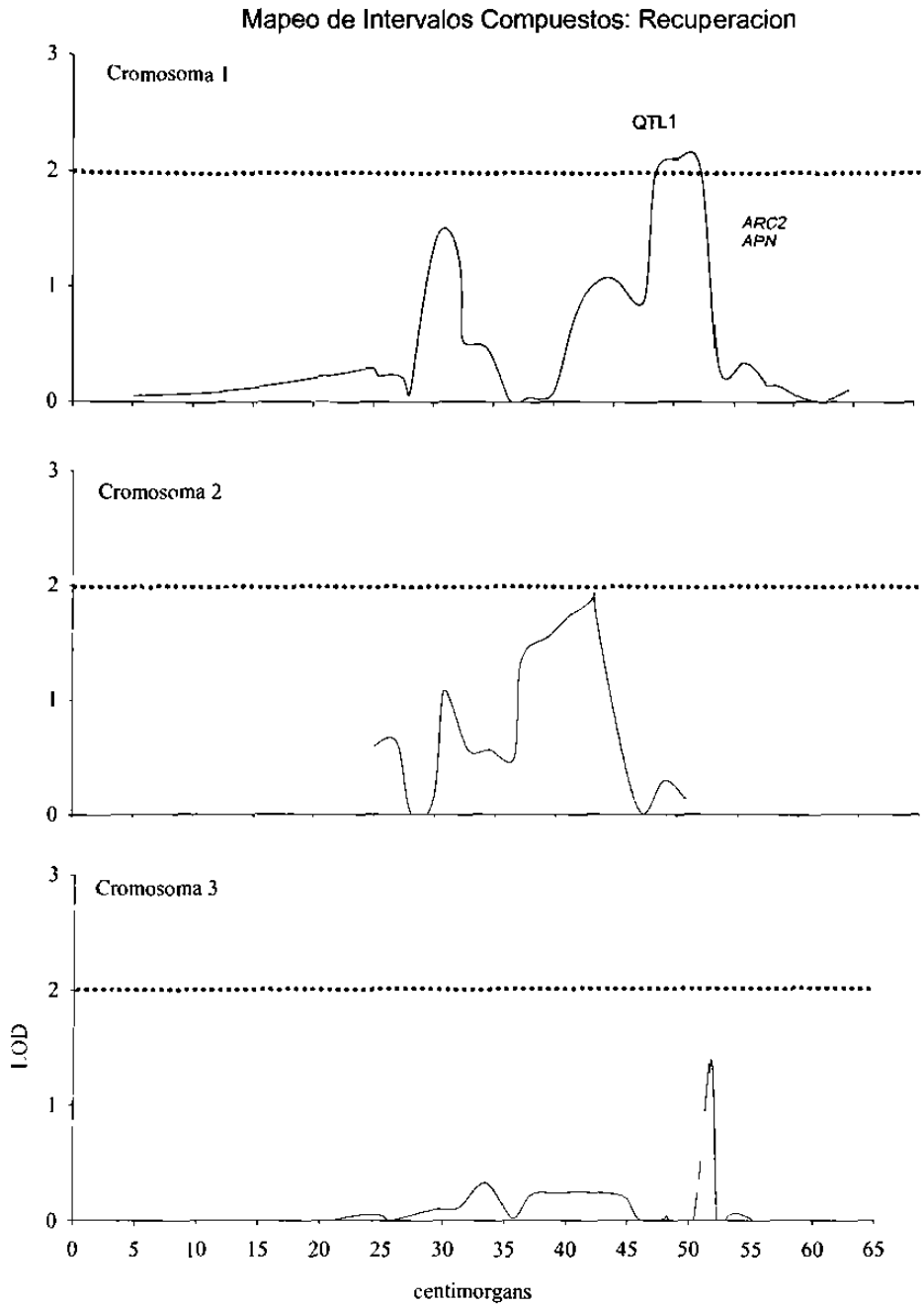

Figura 18. Gráfica de los valores LOD asociados con la recuperación a la exposición a la permetrina en los cromosomas I, II y III, en la familia de mapeo F31.1. El análisis de Mapeo de Intervalos Compuestos se realizó omitiendo a los individuos con el fenotipo *vivo*. Las líneas horizontales corresponden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

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

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

LITERATURA CITADA

Ahmed, S., Wilkins, R. M. & Mantle, D. (1998) Comparison of proteolytic enzyme activities in adults of insecticide resistant and susceptible strains of the housefly *Musca domestica* L. Insect Biochem. Mol. Biol. 28, 629–639.

Anthony N., Rocheleau T., Mocelin G., Lee Hwa-Jung, R. ffrench-Constant. 1995. Cloning, sequencing and functional expression of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti.* FEBS Letters 368: 461-465

Apperson and Georghiou. 1975. Changes in Cross-Resistance Spectrum Resulting from Methyl Parathion Selection of *Culex tarsalis* Coq. Am J Trop Med Hyg.; 24: 698-703

Ayesa P, Harrington LC, and JG. Scott. 2006. Evaluation of Novel Insecticides for Control of Dengue Vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 43(1): 55-60

Basten, C. J., B. S. Weir and Z.-B. Zeng, 2002 QTL Cartographer, pp. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.

Bennett KE, Flick D, Fleming KH, Jochim R, Beaty BJ, Black WC 4th. 2005. Quantitative trait loci that control dengue-2 virus dissemination in the mosquito *Aedes aegypti*. Genetics. 170(1):185-94.

Bennett KE., Olson KE, Munoz MdeL, Fernandez-Salas I. and JA. Farfan-Ale. 2002. Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. Am. J. Trop. Med. Hyg. 67: 85–92.

Berge J.B, Feyereisen R. and M. Amichot. 1998. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects Phil.Trans. R. Soc. Lond. B. 353, 1701-1705

Berticat C, Boquien G, Raymond M and C. Chevillon. 2002. Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. Genet. Res. Camb. 79:41-47.

Black C. W., Baer F.C., Antolin M.F and N. M. DuTeau. 2001. Population genomics: Genome-Wide Sampling of Insect Populations. Annu. Rev. Entomol. 46:441-469.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Brogdon GW and Janet McAllister. 1998a. Insecticide Resistance and Vector Control. Emerging Infectious Diseases. 4: 605-613

Brogdon GW. 1989. Biochemical Resistance Detection: an alternative to bioassay. Parasitology Today. 5(1):56-60

Brogdon, W. G. & McAllister, J. C. (1998b) Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. Journal of the American Mosquito Control Association, 14, 159-164

Brown AWA, 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. J. Am. Mosq. Control Assoc. 2:123-140.

Brown, AWA., and R. Pal. 1971. Insecticide resistance in arthropods. World Health Organization, Geneva, Switzerland

Callaghan A., T. Guillemaud, N. Makate andM. Raymond. 1998. Polymorphisms and Fluctuations in copy number of amplified esterase genes in *Culex pipiens* mosquitoes. Insect Molecular Biology 7(3), 295-300

Casida J, and G. Quistad. 1998 Golden Age of Insecticide Research: Past, Present or Future ?. Annu. Rev. Entomol. 43:1-16

Chandre F, Darriet F, Darder M, Cuani A and JMC Doannio. 1998. Pyretrhoid resistance in *Culex quinquefasciatus* from West Africa. Med. Vet. Entomol. 12:356-366.

Chandre F, Darriet F, Manga L, Akogbeto M, Faye O, Mouchet J, Guillet P. 1999. Status of pyrethroid resistance *in Anopheles gambiae sensu lato*. Bull World Health Organ, 77:230-234.

Coleman M., Vontas J.G. and J. Hemingway. 2002. Molecular characterization of the amplified aldehyde oxidase from insecticide resistant *Culex quinquefasciatus* Eur. J. Biochem. 269, 768-779.

Curtis, CF. 1989. Appropriate technology in vector control.CRC Press, Boca Raton, FL.

Darvasi, A. and Soller, M. 1995. Advanced intercross lines, and experimental population for fine genetic mapping. Genetics 141: 1199–1207.

Ding, Y., Ortelli, F., Rossiter, L.C., Hemingway, J. and Ranson, H. 2003. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase family: annotation, phylogeny and gene expression profiles. BMC Genomics 13: 35.

Eldrigde BF. 2005. Mosquitoes, the Culicidae. pp 95-11 en *Biology of Disease Vectors* (2nd ed) editado por W. C. Marquardt *et al.*. Elsevier Academic Press.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Germer, S. and Higuchi, R. 1999 Single-tube genotyping without oligonucleotide probes. Genome Research, **9,** 72-78

Gomez-Machorro, C., K. E. Bennett, M. L. Munoz and W. C. Black, 2004. Quantitative Trait Loci Affecting Dengue Midgut Infection Barriers in an Advanced Intercross Line of *Aedes aegypti*. Insect Molecular Biology 13: 637-648.

Gong M, Yan Gu, X Hu, Y Sun, L Ma, X Li, L Sun, J Sun, J Qian, and C Zhu. 2005. Cloning and Overexpression of *CYP6F1*, a Cytochrome P450 Gene, from Deltamethrin-resistant *Culex pipiens pallens*. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 37(5): 317–326

Gordon J. 1988. Health Education Research: Mixed strategies in health education and community participation: an evaluation of dengue control in the Dominican Republic. Oxford University Press 3(4): 399-419.

Gorrochotegui-Escalante N and W. C. Black IV. 2003. Amplifying whole insect genomes with multiple displacement amplification. Insect Molecular Biology. 12(2), 195–200

Gubler DJ. 1989. *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*-borne disease control in the 1990s: top down or bottom up. Am J Trop Med Hyg;40:571-578.

Gubler DJ. 1998 (b). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. Clinical Microbiology Reviews. 11(3): 480–496.

Gubler, D.J. & Trent, DW. 1994. Emergence of epidemic Dengue: Dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. Infectious Agents and Disease 2, 383-393.

Gubler, DJ. 1998 (a). Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. Emerg. Infect. Dis. 4, 442–450.

Guerrero, F.D., Jamroz, R.C., Kammlah, D.M., Kunz, S.E., 1997. Toxicological and molecular characterization of pyrethroid-resistant horn flies, *Haematobia irritans*: identification of *kdr* and *superkdr* point mutations. Insect Biochem. Mol. Biol. 27, 745–755.

Hardy, JL., 1988 Susceptibility and resistance of vector mosquitoes, pp. 87–126 in *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, edited by T. P. Monath. CRC Press, Boca Raton, FL

Hemingway and Ranson, 2000. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. Annu. Rev. Entomol. 45:371-391

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

and vater container covers: cluster randomized trials in Mexico and Venezuela. British Medicall Journal 332:1247-1252

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Murray B. Isman. 2006. Botanical Insecticides, Deterrents, And Repellents InModern Agriculture And An Increasingly RegulatedWorld. Annu. Rev. Entomol. 51:45–66

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Platt KB., Linthicum KJ., Myint KS., Innis BL., Lerdthusnee K., Vaughn, DW. 1997. Impact of dengue virus infection on feeding behavior of *Aedes aegypti*. Am Jour Trop Med Hyg. 57(2):119-25.

Prapanthadara, L., Promtet, N., Koottathep, S., Somboon, P.,Suwonkerd, W., McCarroll, L., Hemingway, J., 2002. Mechanisms of DDT and Permethrin Resistance in *Aedes aegypti* from Chiang Mai, Thailand. Dengue Bull. 26, 185–189.

Ranson H, Claudianos C, Ortelli F., Abgrall C, Hemingway J, Sharvakhova M, Unger M, Collins F,H, and Rene Freyereisen. 2002. Evolution of Supergene Families Associated with Insecticide Resistance. Science 298: 170-181

Ranson H, Paton M. G, Jensen B, McCarroll L, Vaughan A, Hogan J. R, Hemingway J, and FH Collins. 2004. Genetic mapping of genes conferring permethrin resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. Insect Molecular Biology 13(4), 379–386

Ranson, H., Jensen, B., Vulule, J.M., Wang, X., Hemingway, J., Collins, F.H., 2000b. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. Insect Mol. Biol. 9:491–497

Ranson, H., Jensen, B., Wang, X., Prapanthadara, L., Hemingway, J., Collins, F.H., 2000a. Genetic mapping of two loci affecting DDT resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. Insect. Mol. Biol. 9, 499–507.

Ranson, H., Prapanthadara, L., J., Hemingway. 1997. Cloning and characterization of two glutathione S-transferases from a DDT resistant strain of *Anopheles gambiae*. Biochem. J. 324 (1):97–102.

Rawlins, S. C. 1998. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. Pan Am. J. Public Health 4: 243Ð251.

Raymond, M., Fournier, D., Bride, J.-M., Cuany, A., Berge, J., Magnin, M., and Pasteur, N. 1986. Identification of resistance mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culcidae) from southern France: insensitive acetylcholinesterase and detoxifying oxidases. Journal of Economic Entomology 79: 1452–1458.

Roberts, DR., *et al.*. 1997. DDT, global strategies, and a malaria control crisis in South America. Emerging Infectious Diseases 3: 295.

Rodríguez M, Bisset J, Ruiz M, and A Soca. 2002. Cross-Resistance to Pyrethroid and Organophosphorus Insecticides Induced by Selection with Temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. J. Med. Entomol. 39(6): 882-888 (2002)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMEN BIOGRÁFICO

Karla Lizet Saavedra Rodriguez

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias Biológicas

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

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

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

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

Experiencia Profesional: Ninguna.