

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DISEÑO Y VALIDACIÓN DE UN CHIP BIOSENSOR DE ADN PARA LA
DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE MUTACIONES *KDR* EN
POBLACIONES DE *Aedes aegypti* (L.) DE MÉXICO.

Por:

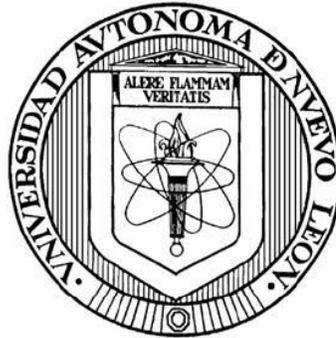
LBG. FRANCISCO JAVIER GONZÁLEZ SANTILLÁN

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN ENTOMOLOGÍA
MÉDICA Y VETERINARIA

Julio, 2020.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**DISEÑO Y VALIDACIÓN DE UN CHIP BIOSENSOR DE ADN PARA LA
DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE MUTACIONES *KDR* EN
POBLACIONES DE *Aedes aegypti* (L.) DE MÉXICO.**

Por:

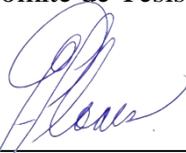
LBG. FRANCISCO JAVIER GONZÁLEZ SANTILLÁN

Como requisito parcial para obtener el Grado de
**MAESTRO EN ENTOMOLOGÍA
MÉDICA Y VETERINARIA**

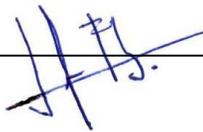
Julio, 2020.

DISEÑO Y VALIDACIÓN DE UN CHIP BIOSENSOR DE ADN PARA LA
DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE MUTACIONES *KDR* EN
POBLACIONES DE *Aedes aegypti* (L.) de MÉXICO.

Comité de Tesis



Dra. Adriana E. Flores Suárez
Presidente



Dr. Idelfonso Fernández Salas
Secretario



Dra. Beatriz López Monroy
Vocal



Dr. Gustavo Ponce García
Vocal



Dra. Susana Favela Lara
Vocal

DISEÑO Y VALIDACIÓN DE UN CHIP BIOSENSOR DE ADN PARA LA
DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE MUTACIONES *KDR* EN
POBLACIONES DE *Aedes aegypti* (L.) de MÉXICO.

Dirección de Tesis



Dra. Adriana Elizabeth Flores Suárez
Director

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CONACYT PN-2016 No. de proyecto 2134, por haber otorgado el financiamiento para este proyecto, además por haberme proporcionado beca para los estudios de Maestría en Entomología Médica y Veterinaria (CVU: 928023) en el período de agosto de 2018 a julio del 2020.

A la Dra. Adriana E. Flores Suárez por la confianza y oportunidad de participar en este proyecto. Gracias por el apoyo y tiempo proporcionado, por compartir su conocimiento y consejo en las cuestiones académicas y personales. Gracias por su amistad, por la paciencia, por siempre preocuparse por mi aprendizaje y por motivarme a ser mejor estudiante.

Al Dr. Gustavo Ponce García por las enseñanzas, apoyo y consejo brindado, gracias por la aceptación, por la amistad y compañía, sobre todo en la última etapa del posgrado.

A la Dra. Beatriz López Monroy por la confianza, paciencia y por siempre estar en la mejor disposición de enseñarme y apoyarme académica y personalmente.

A la Dra. Susana Favela Lara por formar parte de mi comité de tesis. Gracias por el apoyo académico. Gracias por ser una figura de admiración, por vivir sin miedo y con orgullo abriendo camino para nuevas generaciones.

Al Dr. Idelfonso Fernández Salas por formar parte de mi comité de tesis. Gracias por el apoyo y por compartir conmigo su conocimiento y experiencia.

A la M.C. Selene M. Rodríguez Gutiérrez por la amistad, por tanta confianza y apoyo durante mis estudios en el laboratorio de Entomología Médica. Gracias por siempre preocuparte por mí.

Al M.C. Alan Esteban Juache Villagrana por la amistad, compañía, paciencia y tantos consejos, experiencias y enseñanzas compartidos. Gracias por siempre escucharme y guiarme, por estar ahí en los peores y mejores momentos y por siempre motivarme a continuar.

A la Dra. Olga Karina Villanueva Segura por esforzarse tanto para apoyarme durante el primer año del posgrado.

Al M.E.M.V. Esteban de Jesús Mora Jasso por tu amistad y por tanto apoyo académico y personal brindado durante el posgrado. Gracias por siempre preocuparte por mi y por hacer más llevaderos los días de trabajo.

Al L.B.G Omar Reyes González por tu amistad y apoyo académico y personal. Gracias por siempre preocuparte por mi y por hacer más llevaderos los días de trabajo.

A la I.B. Rocío Rodríguez Servín por la amistad y compañía durante las jornadas largas de trabajo, gracias por la comprensión, paciencia y por ser siempre digna de admiración.

A los Biólogos Heriberto Villegas y Mario Saucedo por su amistad durante el posgrado, gracias por la confianza y apoyo, y por hacer más llevaderos los días de trabajo.

A la Q.B.P. Delia Suárez por tu amistad, cariño y apoyo proporcionados durante la última etapa del posgrado.

Gracias a Cecilia Martínez, Magy Romero, Mitzi Bernal, Marta Rosales Palacios, Rafael Moreno, Daniela González, y Mizaél González por su amistad y apoyo durante la realización del posgrado.

DEDICATORIAS

Para mis padres, Francisco González Torres y Juany Santillán Bautista que me han apoyado incondicionalmente para continuar mi desarrollo profesional. Muchas gracias, por tanto, amor.

Para mis hermanas; Alicia G. González Santillán y Lucía Janeth González Santillán.

Para Adrián Rodríguez, que me has apoyado incondicionalmente durante el posgrado. Gracias por ser un ejemplo a seguir y sobre todo gracias por tanto amor.

ÍNDICE

RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	II
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
2.- ANTECEDENTES.....	3
2.1.- Bionomía de <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762).....	3
2.2.- <i>Ae. aegypti</i> como vector de enfermedades.....	3
2.3.- Control de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> en México.....	4
2.4.- Insecticidas piretroides.....	5
2.4.1- Canal de sodio.....	6
2.5.- Resistencia a insecticidas.....	6
2.5.1.-Resistencia kdr.....	7
2.5.1.1.- Mutaciones kdr reportadas en <i>Ae. aegypti</i>	9
2.6.- Detección de mutaciones kdr.....	12
2.6.1.-Técnicas moleculares para el monitoreo de frecuencias kdr en <i>Ae. aegypti</i>	17
2.6.2.-Detección simultánea de mutaciones kdr.....	18
2.6.3.- Ensayo de mPCR/RLB para la detección simultánea de mutaciones puntuales.....	19
3.- JUSTIFICACIÓN.....	22
4.- HIPÓTESIS.....	23
5.- OBJETIVO DEL TRABAJO.....	23
5.1.- Objetivo general.....	23
5.2.- Objetivos particulares.....	23
6.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
6.1.- Área de estudio y material biológico.....	24
6.2 Análisis de mutaciones kdr F1534C, V410L y V1016I.....	26
6.2.1.- Extracción del ADN.....	26
6.2.2.- Genotipificación individual de F1534C, V410L y V1016I.....	27
6.3.- Diseño de iniciadores y sondas específicas.....	28
6.4.- Estandarización de la mPCR.....	30
6.5.- Estandarización del ensayo RLB.....	31
6.5.1.- Preparación de la membrana Biodyne C.....	31
6.5.2.- Hibridación de productos de mPCR y visualización de resultados.....	32
6.6.- Análisis de resultados.....	33
7.-RESULTADOS.....	34

7.1.- Estandarización del ensayo de mPCR	34
7.2.- Estandarización del ensayo RLB	38
7.3.- Validación del chip biosensor de ADN	46
8.-DISCUSIÓN	49
9.-CONCLUSIONES	57
10.- PERSPECTIVAS.....	58
11.- BIBLIOGRAFÍA	59
12.- RESUMEN BIBLIOGRÁFICO.....	94

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Coordenadas de los sitios de muestreo de <i>Ae. aegypti</i> de México.....	25
Tabla 2. Iniciadores alelo-específicos para la genotipificación individual de F1534C, V410L y V1016I.	28
Tabla 3. Iniciadores flanqueantes y sondas alelo-específicas diseñados para el ensayo mPCR/RLB.	29
Tabla 4. Escala de interpretación del índice de concordancia kappa propuesto por Landis y Koch (1977)	33
Tabla 5.- Efecto de distintas condiciones de hibridación y lavados post-hibridación en la especificidad del ensayo RLB.....	38
Tabla 6.- Frecuencias genotípicas de F1534C, V410L y V1016I de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de México consideradas para el ensayo mPCR/RLB.....	46
tabla 7. Porcentaje total de acuerdo e índice de concordancia kappa entre AS-PCR punto final y el chip biosensor para detección de haplotipos asociados a los loci 1534, 410 y 1016 del vgsc en <i>Ae. aegypti</i>	47
Tabla 8. Porcentaje total de acuerdo e índice de concordancia kappa entre AS-PCR punto final y el chip biosensor para detección de genotipos individuales SS, SR y RR en los loci 1534, 410 y 1016 del vgsc en <i>Ae. aegypti</i>	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Canal de sodio dependiente de voltaje.....	6
Figura 2. Mecanismos de resistencia a piretroides.....	7
Figura 3. Sitios de muestreo de <i>Ae. aegypti</i> en México.....	24
Figura 4.- Amplificación individual de las regiones del vgsc que flanquean las mutaciones de interés.	34
Figura 5.- Amplificación individual de las regiones de interés del vgsc aumentando la concentración de iniciadores para vgsc-1016.	34
Figura 6.- Amplificación individual de las regiones de interés del vgsc y β -actina.	356
Figura 8.- Efecto de la cantidad de templado en la amplificación simultánea de las regiones de interés del vgsc y β -actina.	36
Figura 9.- Efecto de la cantidad de ciclos de reacción en la amplificación simultánea de las regiones de interés del vgsc y β -actina.	377
Figura 10.- Productos de mPCR de las regiones de interés del vgsc y β -actina.	37
Figura 11.- Ensayo RLB preliminar.....	38
Figura 12.- Ensayo RLB para detección de WT-F1534 y MT-C1534.....	39
Figura 13.- Efecto de la concentración de sonda en la intensidad de la señal de hibridación	40
Figura 14.- Efecto de la cantidad de templado utilizado en la mPCR sobre la intensidad y especificidad del resultado.	41
Figura 15.- Ensayo RLB realizado a mayor temperatura de hibridación y lavados post hibridación.....	42
Figura 16.- Efecto del volumen de buffer de lavado en la especificidad del ensayo RLB	42
Figura 17.- Ensayo RLB probando distintas concentraciones de buffer de lavado..	43
Figura 18.- Ensayo RLB probando distintas concentraciones de buffer de lavado y tiempos de revelado.	44
Figura 19.- Distribución de las sondas en la membrana y resultado representativo del ensayo RLB.....	44
Figura 20.- Interpretación del índice de concordancia kappa entre AS-PCR punto final y el chip biosensor para detección de haplotipos en los loci 1534, 410 y 1016 del vgsc de <i>Ae. aegypti</i> de acuerdo con la escala de Landis y Koch (1977).....	47
Figura 21.- Interpretación del índice de concordancia kappa entre AS-PCR punto final y el chip biosensor para detección individual de genotipos SS, SR y RR en los loci 1534, 410 y 1016 del vgsc de <i>Ae. aegypti</i> de acuerdo con la escala de Landis y Koch (1977).. ..	48

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

CDC: Centers for Disease Control

CENAPRECE: Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades

DDT: dicloro difenil tricloroetano

EDC: hidrocioruro de 1-etil-3-(3 dimetilaminopropil) carbodiimida

ETAS-PCR: Engineered-Tail Allele-specific-PCR

FRET/MCA: Fluorescence Resonance Energy Transfer/Melting Curve Analysis

HRM: High resolution melting curve

HOLA: Hot oligonucleotide ligation assay

KDR: Knock down resistance

MES: Ácido 2-morfolino etano sulfónico

mismatch: se refiere a un nucleótido mal apareado entre dos cadenas de ADN complementarias

MGB: Minor groove binder

mPCR: Reacción en cadena de la polimerasa multiplex

MT: Alelo mutado

NBT: Nitroazul de tetrazolio

OLA: Oligonucleotide ligation assay

RFLP: Restriction fragment length polymorphism

RLB: Reverse line blot / Hibridación reversa en línea

RR: Homocigoto mutado

SSOP-ELISA: Sequence specific oligonucleotide probing / Enzyme-linked immunosorbent assay

SSPE: Sodium Chloride-Sodium Phosphate-EDTA / cloruro de sodio fosfato-EDTA

SS: Homocigoto silvestre

SR: Heterocigoto

T_A: Temperatura de alineamiento

T_h: Temperatura de hibridación

T_m: Temperatura de fusión

UBV: Ultra bajo volumen

V_{gsc}: Voltage gated sodium channel

WT: Alelo silvestre

RESUMEN

Aedes aegypti (L.) es el principal vector de los virus del dengue, chikungunya y Zika en México. Debido a su conducta antropofílica, este mosquito se encuentra ampliamente distribuido en zonas urbanas y suburbanas. El control químico a través de la aplicación de insecticidas piretroides ha constituido la herramienta más utilizada para combatir las enfermedades transmitidas por este vector. Sin embargo, la aplicación continuada e indiscriminada de piretroides y otros insecticidas como el DDT ha resultado en la selección de distintos mecanismos de resistencia, siendo este uno de los principales factores que conducen al fallo de los programas de manejo integrado de vectores. En la actualidad se han identificado una serie de mutaciones puntuales en el gen *para* (que codifica para el canal de sodio dependiente de voltaje) que sirven como marcadores moleculares para la detección de resistencia a insecticidas piretroides (*kdr*). En el presente trabajo se estandarizó un prototipo de chip biosensor de ADN constituido por una PCR multiplex adaptada a un ensayo de hibridación reversa en línea (mPCR/RLB) que permite la detección simultánea (en un solo ensayo) de las mutaciones *kdr* F1534C, V410L y V1016I en poblaciones de campo de *Ae. aegypti*. La validación de la técnica se llevó a cabo empleando individuos de poblaciones genotipificadas a través de PCR alelo-específica punto final (AS-PCR) que mostraron 22 haplotipos de los 27 posibles, de los cuales el chip biosensor fue capaz de detectar 16. El método propuesto mostró una concordancia moderada con la AS-PCR para la detección de haplotipos ocurriendo en 1534+410+1016 ($k=0.520$ IC 95%, 0.394-0.631) y en 1534+410 con una concordancia considerable de 75.7% ($k=0.703$; IC 95% 0.588-0.809). Por otra parte, la detección de genotipos individuales en los loci 410 y 1016 mostró concordancia considerable con porcentajes totales de acuerdo de 81.7% ($k=0.718$, IC 95%, 0.580-0.840) y 78% ($k=0.663$, IC 95% 0.517-0.791) y concordancia casi perfecta para detectar genotipos individuales en 1534 con un porcentaje total de acuerdo de 87.9% ($k=0.789$, IC 95% 0.628-0.888). Por lo tanto, el chip biosensor representa una alternativa viable para complementar las estrategias actuales de monitoreo y manejo de resistencia a plaguicidas en *Ae. aegypti*.

ABSTRACT

Aedes aegypti (L.) is the main vector of dengue, chikungunya and Zika virus in Mexico. Due to its anthropophilic behavior, this mosquito is widely distributed in urban and suburban zones. The chemical control through the implementation of pyrethroid insecticides has constituted the most used tool against the diseases transmitted by this vector. Nevertheless, the constant and indiscriminate use of pyrethroids and other insecticides as DDT has led to the selection of resistance mechanisms, which has diminished the effectiveness of vector control programs. More than a dozen mutations in the sodium channel gene have been reported to be associated with pyrethroid resistance (knock down resistance) in *Ae. aegypti* and have been used as molecular markers to monitoring kdr. In this study, we developed a prototype biosensor chip that integrates a multiplex PCR and a reverse line blot assay (mPCR/RLB) for the simultaneous detection of F1534C, V410L, and V1016I in field collections of *Ae. aegypti*. The validation of the technique was carried out using 82 mosquitos characterized for the three mutations through allele-specific PCR (AS-PCR) showing 22 out of 27 possible haplotypes, from which biosensor chip was able to detect 16. A moderate concordance with AS-PCR was found for the haplotype detection in 1534+410+1016 loci (55.6%, $\kappa = 0.520$; IC 95%, 0.394-0.631) and substantial concordance in 1534+410 (75.7%, $\kappa = 0.73$; IC 95% 0.558-0.809). On the other hand, individual detection of genotypes (SS, SR and RR) for loci 410 and 1016 showed substantial agreement (81.7%; $\kappa = 0.718$, IC 95 % 0.580-0.840 and 78%; $\kappa = 0.663$, IC 95% 0.580-0.791, respectively) and almost perfect agreement to detect genotypes in 1534 (87.9%; $\kappa = 0.789$, IC 95 % 0.628-0.888). Therefore, the standardized prototype biosensor chip represents a viable alternative to complement and strengthen current monitoring and resistance management strategies against *Ae. aegypti*.

1.- INTRODUCCIÓN

El mosquito *Aedes aegypti* es el principal vector del virus del dengue, chikungunya y Zika. La ausencia de vacunas efectivas contra estos virus ha llevado a las autoridades de salud pública a depender en gran medida del control químico para su combate en México. En la actualidad, las clases de plaguicidas químicos recomendadas por dichas autoridades varían en su modo de acción e incluyen organofosforados, carbamatos y neonicotinoides, sin embargo, los piretroides continúan siendo la clase preferida, debido a su velocidad de acción, alta actividad insecticida y baja toxicidad en mamíferos (Carvalho y Moreira, 2017; Secretaría de Salud, 2012). El sitio blanco de los piretroides son los canales de sodio dependientes de voltaje presentes en la membrana axónica de células nerviosas en insectos, estos producen un efecto “knockdown” o de derribo, es decir, parálisis instantánea en el insecto debido a la activación prolongada y al subsecuente bloqueo de los potenciales de acción de dichos canales (Narahashi *et al.* 1998; Dong *et al.* 2014; Silver *et al.* 2014; Carvalho y Moreira, 2017).

La aplicación continua y a veces inadecuada de plaguicidas, el uso de los mismos productos durante años consecutivos, la falta de organización con programas de control de plagas agrícolas, aunado a las características inherentes del mosquito ha resultado en el desarrollo de resistencia, siendo este uno de los factores más importantes que conducen al fallo de los programas de manejo integrado de vectores (Carvalho y Moreira, 2017). Los principales mecanismos que confieren resistencia a piretroides son la desintoxicación enzimática y en mayor medida las mutaciones no sinónimas denominadas kdr (por “knock-down resistance” o resistencia al derribo) que reducen la afinidad de los canales de sodio por la molécula de insecticida. En México, las mutaciones kdr presentes en poblaciones de *Ae. aegypti* resistentes a piretroides son F1534C y V1016I las cuales han aumentado su frecuencia durante los últimos 17 años, experimentando a la vez un proceso de coevolución. Recientemente se reportó por primera vez la mutación V410L encontrándose también en poblaciones de México, esta en combinación con las anteriores puede generar fenotipos más resistentes, añadiendo complejidad al fenómeno de la resistencia (Saavedra-Rodríguez *et al.* 2007; Ponce-García *et al.* 2009; Haddi *et al.* 2017).

Es fundamental monitorear la propagación de los alelos que confieren resistencia y utilizar esta información para formular estrategias de manejo que permitan elegir adecuadamente las clases de plaguicidas a aplicar. Existen varias metodologías de alto rendimiento disponibles para la genotipificación de mutaciones *kdr*, caracterizadas por su rapidez y alta sensibilidad, entre ellas la secuenciación de regiones específicas del canal de sodio dependiente de voltaje, la PCR cuantitativa (qPCR) con sondas TaqMan y el análisis de fusión de alta resolución (High Resolution Melt, HRM). Sin embargo, dada la necesidad de adquirir equipo e insumos especializados y la cantidad de muestras a procesar, el costo elevado de estos métodos constituye su mayor desventaja. Lo anterior ha posicionado a la AS-PCR punto final como una de las técnicas más utilizadas para este propósito, ofreciendo un bajo costo y baja tasa de error. A pesar de esto, para laboratorios en países de desarrollo o con bajo presupuesto se continúa recomendando el uso de otras técnicas basadas en la PCR alelo-específica, como el ensayo de PCR Dot-Blot, HOLA (Hot Oligonucleotide Ligation Assay) y SSOP-ELISA (Sequence-specific oligonucleotide probing), esto en función del costo, facilidad de uso y rendimiento (Kolaczinski *et al.* 2000; Lynd *et al.* 2005; Kulkarni *et al.* 2006; Bass *et al.* 2007).

Recientemente, la técnica de PCR multiplex (mPCR) punto final ha demostrado ser eficiente para la identificación de mutaciones *kdr* de manera simultánea en *Ae. aegypti* (Saingamsook *et al.* 2017). Además, es posible adaptarla a distintos ensayos bioquímicos que no solo permiten revelar los productos amplificados de manera óptima, sino que contribuyen a mejorar la seguridad, costo y rendimiento del monitoreo de resistencia (Henry-Halldin *et al.* 2012). El ensayo de PCR multiplex/hibridación reversa en línea (mPCR/RLB) se considera una herramienta epidemiológica y de diagnóstico efectiva que ha sido ampliamente utilizada con la finalidad de identificar serotipos de microorganismos patógenos y detectar polimorfismos de un solo nucleótido asociados a diversas enfermedades y a resistencia a fármacos en bacterias (Kong y Gilbert, 2006). En el presente trabajo se desarrolló un prototipo de chip biosensor de ADN, que incorpora una PCR multiplex adaptada de manera óptima a un ensayo RLB, el cual, permitió la detección simultánea de las mutaciones *kdr* F1534C, V410L y V1016I en poblaciones de *Ae. aegypti* de México, país donde las tecnologías de genotipificación de alto rendimiento no son costeables.

2.- ANTECEDENTES

2.1.- Bionomía de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)

Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) es un mosquito que pertenece al Orden Diptera, Familia Culicidae y subfamilia Culicinae, es una especie de origen silvícola y proveniente de África. Existen tres variantes en el continente africano: *Ae. aegypti* var. *aegypti*, *Ae. aegypti* var. *queenslandensis* y *Ae. aegypti* var. *formosus*, y aunque las primeras dos están presentes en el continente americano, la variante *aegypti* es la más distribuida en México (Nelson, 1986; Icaza, 2003).

Se trata de un insecto holometábolo, cuenta con un ciclo de vida de cuatro etapas: huevo, larva, pupa y adulto. Las hembras adultas son hematófagas, es decir, consumen sangre de vertebrados (con preferencia por el hombre), necesaria para la producción de huevos, los cuales generalmente son depositados alrededor de recintos domésticos dentro de criaderos que pueden ser charcos, neumáticos, o cualquier objeto que contenga agua (Nelson, 1986; Clements, 1992; Zettel y Kaufman, 2012).

La distribución de este mosquito es circumtropical y subtropical, normalmente se encuentra entre 35° de latitud norte y 35° de latitud sur, pero ha sido encontrado incluso a 45° de latitud norte (Bisset, 2002). Aunque su distribución altitudinal no excede los 1,200 m.s.n.m., existen registros de su presencia en localidades de hasta 2,200 m.s.n.m. de altitud. Estos patrones de distribución han cambiado a lo largo de los años, como consecuencia del calentamiento global y otros factores socioeconómicos regionales y locales (Ruiz-López *et al.* 2016). Actualmente se encuentra presente en África, Sudamérica, Centroamérica, en el sur de Norteamérica, Medio Oriente, en el Sureste de Asia, en las islas del Pacífico y de la India, en el norte de Australia y de forma esporádica en Europa (Smith, *et al.* 2016; Gil, Benítez y Gutiérrez, 2012).

2.2.- *Ae. aegypti* como vector de enfermedades

De los cientos de arbovirus (arthropod-borne-viruses) que existen se sabe que al menos 30 son capaces de causar enfermedades en humanos (Cleton *et al.* 2012). *Ae. aegypti* es el principal vector de cuatro de estos arbovirus. Tres son miembros del género Flavivirus, el virus de la fiebre amarilla (YFV), virus del dengue (DENV), y el virus del Zika (ZIKV) y sólo uno pertenece al género Alfavirus, el virus del chikungunya (CHIKV).

Todos producen una sintomatología similar en humanos caracterizada por fiebre de duración de 4 a 14 días y dolor en coyunturas. Aunque cada uno posee patología única, YFV y DENV producen altas tasas de mortalidad, siendo este último el de mayor relevancia (Souza-Neto y Bonizzoni, 2018).

2.3.- Control de mosquitos *Ae. aegypti* en México

El combate contra estas arbovirosis recae en las acciones de control del vector, pudiendo clasificarse como de tipo físico, químico o biológico. A pesar del enfoque integrado que se maneja actualmente, el uso de plaguicidas se ha destacado de entre dichas medidas de control. El primer plaguicida en ser utilizado para el combate contra mosquitos vectores de enfermedades en México fue el DDT en 1945 como parte de los esfuerzos para la erradicación de la malaria siendo aplicado para rociados en interiores de 1950 a 1960 y utilizado en algunas localidades hasta 1999. Por otra parte, el organofosforado malatión fue aplicado de 1981 a 1999 en rociados espaciales de ultra bajo volumen. A partir de 1999 se sustituyó el malatión por permetrina, siendo este el único adulticida utilizado por más de una década. A partir de 2011, en la NOM-032-SSA2-2010 se estableció que la elección de los plaguicidas utilizados para el control de vectores en México debía considerar la resistencia del vector a dichos productos, efectividad y seguridad con relación a la exposición (Flores *et al.* 2006).

Actualmente la NOM-032-SSA2-2014, clasifica las estrategias de control químico de vectores en tratamientos focales, perifocales, residuales y aspersiones aéreas, sin embargo, establece que la aplicación de adulticidas contra mosquitos debe realizarse mediante los siguientes métodos; rociados espaciales terrestres con nieblas frías de UBV o térmicas aplicadas en espacios abiertos con equipos pesados, rociados intradomiciliarios con neblina térmica, rociados espaciales aéreos con neblina fría, rociado residual y adulticidas incorporados en pabellones/mallas de cama o cortinas. Por otra parte, cada año se publica una lista de productos recomendados por el CENAPRECE, y en la actualidad, para el combate de mosquitos adultos esta incluye en su mayoría insecticidas piretroides; 1 para rollos de malla y pabellones impregnados, 5 para tratamientos espaciales UBV en exteriores, 4 para rociado en interiores con acción residual, 1 en pintura para tratamientos en interiores con acción residual, 2 para tratamientos espaciales UBV en interiores con

equipos térmicos y 1 para para tratamientos espaciales UBV en exteriores con equipos térmicos. Cabe destacar que, en México, el método más utilizado para aplicar insecticidas piretroides es el tratamiento espacial UBV en exteriores (Secretaria de Salud, 2020).

2.4.- Insecticidas piretroides

Los piretroides son una clase de insecticidas sintéticos que han sido optimizados con base en las estructuras de las piretrinas, las cuales son constituyentes del piretro, un compuesto natural obtenido de las flores de *Chrysanthemum cinerarifolium* (Elliot, 1995). A pesar de la efectividad del piretro como insecticida, su uso se ve limitado por su inestabilidad a la luz y aire, impidiendo su aplicación en estrategias de control de plagas en las que la actividad residual es esencial (Soderlund, 2010). El proceso de modificación de las piretrinas surgió con el objetivo de obtener compuestos fotoestables que retuvieran la potente y rápida actividad insecticida y la baja toxicidad aguda en mamíferos. Por lo que el desarrollo de insecticidas piretroides sintéticos modernos se ha llevado a cabo considerando la modificación de sitios expuestos al ataque fotoquímico y metabólico (Elliot *et al.* 1978; Soderlund, 2010). Los piretroides sintéticos actúan principalmente por contacto, son de amplio espectro y muestran mayor efectividad a bajas temperaturas ya que al igual que el DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) poseen un coeficiente térmico invertido. Esto los ha llevado a ser utilizados ampliamente para el control de una gran variedad de plagas agrícolas y en las campañas de salud pública (Soderlund, 2010).

Comúnmente se clasifican dentro de dos subgrupos, piretroides tipo I y tipo II, esto con base en los síntomas de intoxicación que producen, estructura química, signos de envenenamiento en insectos y en su acción sobre preparaciones nerviosas de insectos. Los piretroides tipo II contienen el grupo α -ciano-3-fenoxbenzil mientras que los tipo I incluyen compuestos con un amplia variedad estructural pero que carecen del grupo α -ciano-3-fenoxbenzil. Los signos típicos de intoxicación por piretroides tipo I en insectos incluyen hiperexcitabilidad y convulsiones, mientras que los piretroides tipo II producen movimientos atáxicos y descoordinados (Lawrence y Casida, 1982; Gammon *et al.* 1981; Barnes y Verschoyle, 1974).

La acción insecticida de los piretroides radica en su capacidad para unirse e interrumpir los canales de sodio dependientes de voltaje presentes en la membrana del

axón de neuronas en insectos (Soderlund, 2005). Los piretroides tipo I producen una serie prolongada de potenciales de acción (ráfaga de descargas) seguidas de un solo estímulo con poco o ningún efecto en el potencial de reposo. En contraste, los piretroides tipo II no inducen descargas repetitivas, en cambio reducen la amplitud del potencial de acción debido a la despolarización de la membrana del axón. Por otra parte, algunos compuestos exhiben propiedades intermedias, produciendo una ráfaga de descargas de amplitud decreciente conduciendo eventualmente a la despolarización y bloqueo (Lund y Narahashi, 1983; Sonderlund, 2010).

2.4.1- Canal de sodio

El sitio blanco del DDT e insecticidas piretroides es el canal de sodio dependiente de voltaje (figura 1), el cual se compone de 4 dominios homólogos (I, II, III y IV) y cada dominio consiste en seis segmentos transmembranales (S1, S2, S3, S4, S5 y S6). Para conducir el estímulo eléctrico a lo largo del sistema nervioso, deben generarse potenciales de acción a través de la membrana. Los canales de sodio pasan por 3 fases o estados: cerrado, abierto e inactivo. El estado inactivo se da cuando la membrana se encuentra en potencial de reposo y el canal de sodio se encuentra cerrado. Durante la activación del canal la membrana se despolariza, causando la apertura del canal de sodio y la generación de un flujo de iones de sodio. Después de milisegundos ocurre la inactivación debido al cambio conformacional del canal de sodio, bloqueando el paso de iones a través de la membrana. Cuando el potencial de membrana regresa al estado de reposo, el canal se cierra nuevamente (Dong *et al.* 2014).

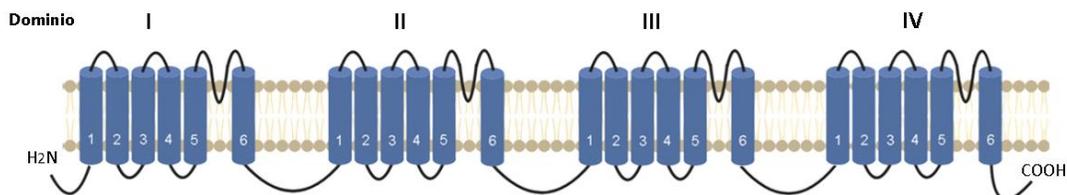


Figura 1. Canal de sodio dependiente de voltaje (Creado con Biorender.com).

2.5.- Resistencia a insecticidas

Aunque durante las últimas décadas, los insecticidas piretroides han sido parte importante del control de adultos de *Ae. aegypti* en el mundo, el desarrollo de resistencia debido al uso continuado del DDT e insecticidas piretroides ha mermado el éxito de los programas de control (Ponce-García *et al.* 2009). El concepto de resistencia es complejo

ya que éste es siempre un fenómeno relativo. Actualmente, puede considerarse un proceso inevitable, dada la presión de selección que sigue produciéndose con las aplicaciones continuas de plaguicidas (Brattsen, 1989). La OMS (Brown y Pal, 1971) describe la resistencia como el desarrollo de la habilidad en una raza de insectos de tolerar dosis de tóxicos que han probado ser letales en la mayoría de los individuos en una población normal de la misma especie. Adicionalmente, Lagunes y Villanueva (1994) mencionan que se trata de una habilidad complementaria y hereditaria, que ocurre gracias a mecanismos metabólicos y no metabólicos.

Los principales mecanismos de resistencia a insecticidas descritos hasta la fecha son la desintoxicación metabólica, modificaciones en sitios blanco, la reducción en la penetración de componentes a través del integumento del insecto (figura 2) y la resistencia por comportamiento. Estos mecanismos pueden presentarse de manera simultánea dentro de las poblaciones generando fenotipos resistentes a más de un insecticida (Kliot y Ghanim, 2012; Rivero *et al.* 2011; Nkya *et al.* 2013).

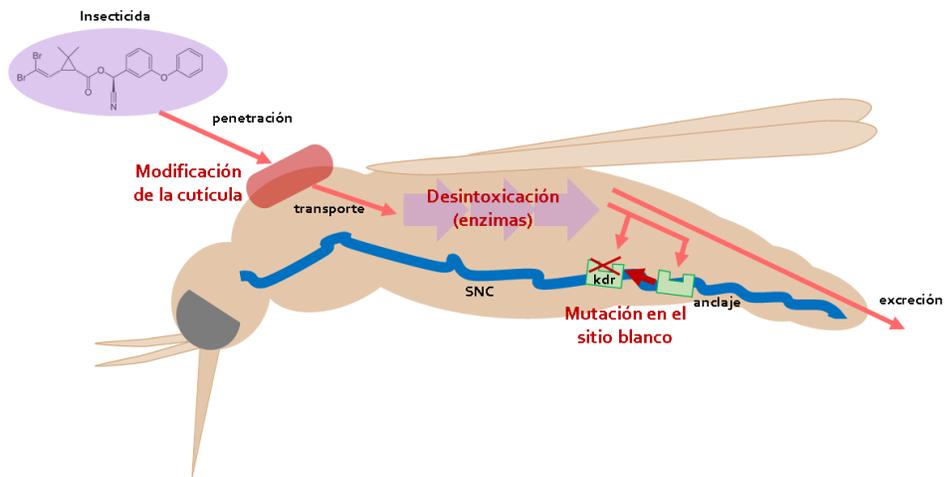


Figura 2. Mecanismos de resistencia a piretroides. La molécula representada es la deltametrina (modificado de Nkya *et al.* 2013).

2.5.1.-Resistencia kdr

La resistencia al derribo o knock down resistance (kdr) es el mecanismo principal que confiere resistencia a piretroides y DDT. Este es producto de mutaciones no sinónimas en el gen *para* (también denominado *AaNaV* en *Ae. aegypti*) que codifica para el canal de sodio dependiente de voltaje, estas mutaciones producen el cambio de un solo aminoácido lo que reduce la afinidad de la molécula de insecticida al sitio blanco. El rasgo que confiere

resistencia kdr se documentó por primera vez en *Musca domestica* L. en 1951 (Busvine, 1951) y fue genéticamente aislado en 1954 (Milani, 1954). Posteriormente, ensayos electrofisiológicos con preparaciones nerviosas de varios insectos adultos y en etapa larvaria que exhibían kdr (Bloomquist, 1986) proporcionaron evidencia directa de una reducción en la sensibilidad neuronal producto del rasgo kdr. Un segundo rasgo de resistencia en *M. domestica* denominado super-kdr fue aislado genéticamente y mapeado en el cromosoma 3 (al igual que kdr) y se observó que este confería un mayor grado de resistencia a DDT y piretroides en comparación con el observado en cepas con kdr (Sawicki, 1978; Farnham *et al.* 1987; Soderlund, 2005). A inicio de los años 90's la resistencia a piretroides fue ligada genéticamente a las secuencias del gen *DmNav-para* en *M. domestica* L. y *Blattella germanica* (Soderlund, 2005). Estos descubrimientos dieron lugar a una serie de estudios que resultaron en el aislamiento parcial o total de cADNs de genes ortólogos al *DmNav-para* de muchos artrópodos de importancia económica. Además, gracias al desarrollo y avance de las técnicas de secuenciación de genomas se han logrado obtener secuencias de genes de la familia *DmNav* de los canales de sodio de más especies de insectos. La comparación parcial y completa de secuencias de 15 cepas de *M. domestica* L. que exhibían fenotipos susceptibles, kdr y super-kdr permitió la identificación de dos mutaciones puntuales que fueron asociadas a los fenotipos resistentes: el reemplazo de leucina por fenilalanina en la posición aminoacídica 1014 (denominada L1014F) en todas las cepas kdr y super-kdr, y el reemplazo de metionina por treonina en la posición aminoacídica 918 (denominada M918T) en las cepas super-kdr (Ingles *et al.* 1996; Miyazaki *et al.* 1996; Williamson *et al.* 1996).

A partir de entonces se han reportado más de 50 mutaciones en el canal de sodio asociadas con la resistencia kdr en varias especies de artrópodos plaga y vectores de enfermedades. Algunas han sido detectadas en más de una especie mientras que otras se han encontrado exclusivamente en una especie (Dong *et al.* 2014). La presencia de mutaciones kdr limita en diversos grados la acción de los insecticidas piretroides, por lo que su presencia en campo tiene efectos negativos considerables sobre el uso sostenido de piretroides en el control de mosquitos vectores de enfermedades. Debido a esto se requiere realizar una detección y caracterización temprana de las mutaciones kdr para el desarrollo de estrategias efectivas para el manejo de resistencia (Saavedra-Rodríguez *et al.* 2007).

2.5.1.1.- Mutaciones kdr reportadas en *Ae. aegypti*

Hasta la fecha se han reportado 13 mutaciones kdr en *Ae. aegypti*: G923V, L982W, I1011M y V1016G en 2002 (Bregues *et al.* 2003), I1011V y V1016I en 2007 (Saavedra-Rodríguez, *et al.* 2007), D1763Y en 2009 (Chang *et al.* 2009), S989P y F1534C en 2010 (Srisawat *et al.* 2010; Yanola *et al.* 2010), T1520I en 2015 (Kushwah *et al.* 2015), V410L en 2017 (Haddi *et al.* 2017), A1007G en 2018 (Lien *et al.* 2018) y F1534L (Kushwah *et al.* 2019).

No obstante, de estas solamente en 5 se ha confirmado funcionalmente la capacidad de reducir la sensibilidad de los piretroides al canal de sodio dependiente de voltaje; incluidas S989P (IIL5–6), I1011M, V1016G (IIS6), F1534C (IIS6) y recientemente V410L (IS6) (Du *et al.* 2013; Haddi *et al.* 2017; Saavedra-Rodríguez *et al.* 2018).

En México, se ha observado que las poblaciones de *Ae. aegypti* resistentes a piretroides presentan al menos las mutaciones V1016I, F1534C y V410L. V1016I fue la primera en ser reportada en una población de *Ae. aegypti* de Isla Mujeres de Quintana Roo, México resistente a permetrina (Saavedra-Rodríguez *et al.* 2007). Posteriormente, Ponce-García *et al.* (2009) demostraron a través de un análisis retrospectivo realizado con 78 colecciones de *Ae. aegypti* provenientes de México que este reemplazo estaba prácticamente ausente en colecciones de 1996 a 2001 mostrando una frecuencia general de 0.04%, aumentando a un 2.7% entre 2003-2004 y a 3.6% en 2006, para finalmente mostrar un incremento dramático a 33% en las muestras obtenidas entre 2007 y 2009. Esta tendencia al aumento en la frecuencia de I1016 a lo largo de 12 años en los estados de Nuevo León, Veracruz, Yucatán, Quintana Roo y el sur de Chiapas coincide con la aplicación continuada de una formulación con base en permetrina que fue autorizada para el control de vectores en México (NOM-032-SSA2-2002). Adicionalmente, Siller *et al.* (2011) reportaron un aumento de la frecuencia alélica de I1016 en poblaciones de *Ae. aegypti* del 2009 llegando a fijarse en varias localidades de México.

Yanola *et al.* (2010) reportaron por primera vez el reemplazo de fenilalanina por cisteína en la posición 1552 en una cepa de *Ae. aegypti* resistente a DDT y permetrina. Los autores se refieren a esta mutación como F1534C en referencia a su equivalente en la

secuencia del *Vssc1* de *M. domestica* L. En 2013 se detectó el reemplazo F1534C en individuos de *Ae. aegypti* de Guerrero (Aponte *et al.* 2013) y en 2015 en Yucatán (Saavedra-Rodríguez *et al.* 2015), en ambos casos confiriendo resistencia a piretroides.

Vera-Maloof *et al.* (2015) realizaron un análisis de desequilibrio de ligamiento en poblaciones de México recolectadas entre 2000 y 2012 que contaban con la presencia de I1016 y C1534, y cuyos resultados sugirieron que para que se presentará resistencia a piretroides era necesaria la evolución secuencial de ambas mutaciones. Consideraron poco probable que I1016 hubiese evolucionado independientemente debido al bajo fitness exhibido por el haplotipo I1016/F1534, en su lugar hipotetizaron que C1534 evolucionó primero confiriendo un nivel bajo de resistencia de manera individual y que I1016 surgió a partir del haplotipo V1016/C1534 y se seleccionó rápidamente debido al alto nivel de resistencia conferido por el haplotipo doble mutante.

Haddi *et al.* (2017) reportaron por primera vez la presencia de la mutación *kdr* V410L (IS6) en una cepa de laboratorio de *Ae. aegypti* resistente a piretroides en Brasil. En este estudio se determinó que esta mutación reduce la susceptibilidad a piretroides tipo 1 (permetrina) y tipo 2 (deltametrina) en canales de sodio de mosquito expresados en oocitos de *Xenopus*, sin embargo, no lograron identificarla en colecciones de campo provenientes de Brasil.

Por último, Saavedra-Rodríguez *et al.* (2018) reportaron la mutación V410L en colecciones de 2002 a 2016 de *Ae. aegypti* provenientes de México observando una alta frecuencia de V410L en colecciones previamente genotipificadas con I1016 y C1534. El primer heterocigoto se detectó en 2002 en Coatzacoalcos, Veracruz, aumentando su frecuencia a más del 0.92 para 2016 en algunas poblaciones. Además, se realizó un análisis de desequilibrio de ligamiento entre los loci 410-1016, 410-1534 y 1016-1534, encontrando un mayor desequilibrio de ligamiento (mayor relación) de L410 con I1016 que con C1534. Entre 2006 y 2008 se observó un favorecimiento en la selección de individuos heterocigotos para V410L y V1016I, y heterocigotos y homocigotos mutados para F1534C, mientras que no se encontraron genotipos mutados para V410L y V1016I ocurriendo independientemente o bien, se presentaron con muy bajas frecuencias. Por otro lado, en los estudios de asociación de genotipo y fenotipo, los individuos con genotipo

triple homocigoto resistente (LL₄₁₀/II₁₀₁₆/CC₁₅₃₄) mostraron mayor supervivencia (resistencia knock down y recuperación) luego de ser expuestos a permetrina o deltametrina, mientras que individuos con el genotipo VL₄₁₀/VI₁₀₁₆/CC₁₅₃₄ presentaron alta mortalidad al ser expuestos a permetrina, pero alta supervivencia al exponerlos a deltametrina. En el último escenario se observó que la presencia de heterocigotos en los loci 410 y 1016 fue suficiente para presentar resistencia a deltametrina.

Tanto F1534C como V1016I se localizan en el sitio receptor PYR-1, pero solo F1534C reduce la sensibilidad del canal de sodio a la permetrina (Du *et al.* 2013). Por el contrario, a pesar de que V410L se presenta en IS6 no forma parte del sitio receptor PYR-2. Considerando que los piretroides suelen unirse al vgsc en su estado abierto y que la unión simultánea de piretroides a PYR-1 y PYR-2 prolonga la apertura del vgsc, aquellas mutaciones kdr que afecten la apertura del canal podrían neutralizar los efectos de estos insecticidas. Por lo que se cree que la contribución de V410L a la resistencia a piretroides es resultado de cambios en las propiedades de apertura del canal de sodio sin inhibir el acoplamiento de moléculas. Además, se plantea la posibilidad de que la co-ocurrencia de V410L y V1016I (a pesar de estar en distintos sitios receptores) otorgue ventajas en el fitness en presencia de piretroides, favoreciendo así su co-selección (Haddi *et al.* 2017; Du *et al.* 2013; Saavedra-Rodríguez *et al.* 2018).

Granada *et al.* (2018) reportaron la presencia de V410L en 3 poblaciones de *Ae. aegypti* de Colombia. En este estudio se observó una correlación positiva entre la frecuencia de L410 e I1016 y la resistencia a piretroides tipo II (λ -cialotrina) en contraste con la frecuencia de C1534, la cual fue similar en poblaciones susceptibles y resistentes. Cabe mencionar que las frecuencias de L410 e I1016 mostraron valores cercanos en las poblaciones.

Las mutaciones kdr F1534C, V1016I y V410L han evolucionado a la par en los últimos 17 años a tal grado que algunas han logrado fijarse en varias poblaciones de *Ae. aegypti* de México (Yanola, 2011; Ponce-García *et al.* 2009; Saavedra-Rodríguez *et al.* 2018). Si bien la coevolución y co-ocurrencia de F1534C y V1016I ha sido reportada en otros países del continente americano como son Brasil (Linss, 2014), Venezuela (Álvarez *et al.* 2015), Colombia (Maestre-Serrano *et al.* 2014), Puerto Rico (Ponce-García *et al.*

2016), Cuba (Bariami *et al.* 2012) y Jamaica (Francis *et al.* 2017), la presencia de V410L se ha reportado solamente en 3 países de Latinoamérica.

Recientemente, Kushwah *et al.* (2019) reportaron por primera vez la mutación F1534L en poblaciones de *Ae. aegypti* de la India recolectadas en 2014 y 2015, confiriendo resistencia a DDT, permetrina y deltametrina. F1534L se detectó en conjunto con F1534C, y V1016G/S989P, mostrando frecuencias del 17.48%, 50.61% y 18.27% respectivamente (Kushwah *et al.* 2019).

El reporte reciente de nuevas mutaciones kdr en colecciones de *Ae. aegypti* resistentes a piretroides y la presencia de varias mutaciones en una sola población de mosquitos añade complejidad a la detección y caracterización temprana de resistencia kdr y por lo tanto impacta negativamente en los programas de manejo integrado de resistencia y del vector. Por lo que es fundamental el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico molecular, así como su adaptación para la detección simultánea de mutaciones kdr de forma rápida y económica.

2.6.- Detección de mutaciones kdr

Actualmente, existe una gran cantidad de técnicas basadas en PCR para la detección de mutaciones kdr, las cuales ofrecen sensibilidad y especificidad elevada. Sin embargo, al realizar la elección de una de estas técnicas, es importante considerar los recursos económicos del laboratorio, el entrenamiento del personal técnico y el tiempo disponible (Martins y Valle, 2012). Este punto adquiere mayor relevancia al considerar la extensión geográfica que ocupa el vector, la cantidad de muestras a procesar y la dinámica y fluctuación de la resistencia kdr en cortos periodos de tiempo.

Martínez-Torres *et al.* (1998) desarrollaron una AS-PCR para distinguir entre los alelos kdr silvestres y resistentes que se encuentran en cepas de *Anopheles gambiae* del Oeste de África (L1014F), permitiendo la detección de individuos heterocigotos en poblaciones de campo. El ensayo utiliza los iniciadores AgD1 y AgD2 que flanquean la región que contiene la mutación kdr, este amplicón de ADN genómico es de 293 pb. Los iniciadores AgD3 y AgD4 son alelo-específicos e hibridan dentro de la región amplificada inicialmente. El iniciador AgD3 es específico para el alelo resistente y junto con AgD1 amplifica un fragmento de 195 pb. AgD4 es específico para el alelo silvestre y junto con

AgD2 amplifica un fragmento de 137 pb. Esta técnica fue adaptada por Ranson *et al.* (2000) para la detección de la mutación L1014S sustituyendo el iniciador AgD3 por AgD5, específico para S1014. En ambos casos se emplea electroforesis en geles de agarosa para revelar la presencia y ausencia de los alelos. La desventaja de esta técnica radica en la baja eficiencia de amplificación al utilizar muestras de ADN con baja concentración o calidad deficiente y en la necesidad de emplear reactivos riesgosos para el revelado de resultados por electroforesis (Tripet *et al.* 2006).

Kolaczinski *et al.* (2000) desarrollaron un ensayo de PCR-SSOP denominado también PCR-Dot Blot (Bass *et al.* 2007) para la detección de L1014F en *An. gambiae*. En esta técnica se utilizan dos iniciadores diseñados para amplificar una región de 216 pb dentro de la cual se presenta la mutación de interés, adicionalmente emplean sondas específicas para el alelo silvestre y mutado, marcadas con digoxigenina (DIG) en el extremo 3'. El producto de PCR es fijado en una membrana de nylon en un arreglo de 96 sitios para luego ser hibridado con cada sonda alelo-específica en ensayos separados. Posteriormente se expone la membrana a fragmentos Fab anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina y se añade un sustrato (CSPD) que permite revelar el resultado a través de quimioluminiscencia. Si bien esta técnica ofrece resultados satisfactorios y económicos (Bass *et al.* 2007), esta no ha sido extensivamente utilizada para la detección de mutaciones *kdr* como la AS-PCR punto final debido a la cantidad de pasos de hibridación requeridos luego de la amplificación (Tripet *et al.* 2006).

Lynd *et al.* (2005) propusieron el ensayo HOLA para la detección de L1014F y L1014S en *An. gambiae*. Esta técnica involucra la amplificación por PCR punto final de una región del *vgsc* que contiene las mutaciones de interés, seguida de una reacción de ligación utilizando una sonda específica para el alelo silvestre y otra para el mutado, ambas marcadas con un detector (biotina en el extremo 5') y una sonda común marcada con un reportero (fosforilación en el extremo 5' y fluoresceína en el extremo 3'), si la última base del extremo 3' de la sonda alelo-específica hibrida perfectamente con el ADN blanco se lleva a cabo la reacción de ligación con la sonda común marcada con el reportero, emitiendo señal. Por lo tanto, para la detección de una mutación *kdr* se requieren dos ensayos, uno con cada sonda alelo-específica. El ensayo HOLA emplea una ligasa

termoestable y ciclos de desnaturalización e hibridación a diferencia de su versión original (OLA) en la que se realizan pasos de desnaturalización y neutralización química. Esta técnica es más compleja y requiere más tiempo que la AS-PCR punto final, pero tiene la ventaja de no requerir revelado a través de electroforesis (Tripet *et al.* 2006). En 2008, el ensayo HOLA fue utilizado para la detección de L1014F en *Culex quinquefasciatus* provenientes de Sri Lanka arrojando resultados satisfactorios al validarlo por comparación con pirosecuenciación (Wondji *et al.* 2008)

Tripet *et al.* (2006) estandarizaron un ensayo de elongación de PCR con fluorescencia para la detección de L1014F y L1014S en *An. gambiae.*, el cual involucra el uso de dos iniciadores forward alelo-específicos cada uno con un marcaje de fluorescencia distinto (Hex y Fam en el extremo 5' para detectar el alelo mutante y silvestre, respectivamente) y un iniciador reverse común diseñados considerando dos sitios de unión altamente conservados en el vgsc. El revelado de resultados se realizó a través de un sistema de electroforesis capilar y la interpretación considerando picos de fluorescencia característicos de cada alelo. El autor reporta un aumento en la especificidad en comparación con las 3 técnicas antes descritas.

Kulkarni *et al.* (2006) propusieron un ensayo de SSOP-ELISA de alto rendimiento para la detección de L1014F en poblaciones de *An. arabiensis*. Este método combina un ensayo de PCR con visualización del producto amplificado utilizando sondas específicas (Sequence-Specific Oligonucleotide Probes) en un formato ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). La principal ventaja de este método es que utiliza equipo que muy probablemente se encuentra disponible en laboratorios de países en desarrollo, lo que implica reducción en los costos de aplicación.

Verhaeghen *et al.* (2006) realizaron la detección de L1014F y L1014S en *An. arabiensis* y *An. gambiae* a través de un ensayo basado en un análisis FRET/MCA (Fluorescence Resonance Energy Transfer/Melting Curve Analysis). Esta técnica amplifica una región de 293 pb del vgsc en la cual se presentan las mutaciones. Posteriormente se utiliza una segunda ronda de PCR para amplificar un fragmento de 121 pb el cual es marcado con el fluoróforo ROX conforme el iniciador forward es elongado. Luego de esta amplificación una sonda específica para cada alelo kdr marcada con FAM

hibrida, dando lugar al inicio del efecto FRET: FAM es excitado por la incidencia de luz y debido a que el aceptor ROX se encuentra cerca, el estado excitado de FAM se transfiere a ROX. El incremento progresivo de temperatura durante el análisis permite la disociación de la sonda y el amplicón, esto a una temperatura específica, haciendo que la fluorescencia de ROX disminuya. Durante este análisis de curva de disociación el cambio en la cantidad de fluorescencia para cada híbrido sonda-templado se contempla como un pico positivo distintivo. Una de las ventajas de esta técnica es que permite la detección de ambos alelos en un solo ensayo, además de ser más sensible y menos dependiente de la concentración del templado (a diferencia de los ensayos AS-PCR). No obstante, requiere de equipo y reactivos costosos, lo que representa su mayor desventaja.

Bass *et al.* (2007) reportaron por primera vez una comparación entre las principales metodologías disponibles hasta entonces incluyendo la AS-PCR, HOLA, SSOP-ELISA, PCR-DotBlot, FRET/MCA y elongación de PCR con fluorescencia contra dos ensayos de alto rendimiento basados en fluorescencia.

El primero fue un ensayo TaqMan tiempo real con sondas MGB (o sondas para ligandos de unión a surco menor), las cuales aumentan la robustez del ensayo. Estas fueron diseñadas para unirse a zonas conservadas del dominio II del canal de sodio, ya que la variación del intrón que se encuentra cerca del locus L1014 puede llegar a afectar el rendimiento de cualquier ensayo que utilice sondas específicas para variaciones en este sitio. La sonda específica para el alelo silvestre está marcada con VIC en el extremo 5' y las sondas específicas de los alelos mutados F1014 y S1014 están marcadas con 6-FAM, además, cada sonda lleva un extintor de fluorescencia (quencher) y un MGB (ligando de unión a surco menor). Este último aumenta la discriminación alélica al incrementar la T_m entre las sondas apareadas y mal apareadas. Este ensayo se realizó utilizando un equipo estándar de PCR seguido de mediciones punto final utilizando un fluorímetro (Bass *et al.* 2007).

El segundo fue un análisis de fusión de alta resolución o HRM (High Resolution Melting Curve) que analiza una pequeña región de ADN que contiene la mutación de interés previamente amplificada por una PCR que utiliza un reportero fluorescente para ADN de doble cadena como SYTO 9. Este tipo de reporteros son menos inhibitorios para

la PCR que los reporteros fluorescentes tradicionales, permitiéndoles ser empleados en altas concentraciones para alcanzar una saturación máxima del amplicón. Este ensayo incluye un paso de fusión de alta resolución, realizado a una T_m cercana a la del amplicón y utilizando equipo con alta precisión óptica y térmica. Conforme el ADN de doble cadena se disocia en cadenas individuales el reportero se libera y la fluorescencia disminuye, esto bajo un perfil de curva de fusión característico de la secuencia del amplicón, permitiendo la distinción de la presencia de uno u otro alelo (Liew *et al.* 2004).

El ensayo ciego de genotipificación mostró que el método de AS-PCR punto final tuvo una baja tasa de error, pero a comparación del ensayo TaqMan mostró una mayor tasa de reacciones fallidas (menor sensibilidad), además de una baja resolución comparado con el ensayo TaqMan y HRM. Por otra parte, los métodos con bajo costo inicial (no requieren equipos especializados costosos) como SSOP-ELISA, PCR-DotBlot y HOLA mostraron resultados similares entre ellos, ofreciendo sensibilidad y especificidad aceptables, además de tener la ventaja de no requerir el revelado a través de electroforesis, haciéndolos más seguros (en caso de que el revelado involucre el uso bromuro de etidio). Aunque el ensayo de SSOP-ELISA fue el mejor de los tres en cuestión de costos y rendimiento, se concluyó que los tres son adecuados para su aplicación en laboratorios de países en desarrollo con presupuesto limitado. En cuanto a la comparación de ensayos de alto rendimiento FRET/MCA, elongación de PCR con fluorescencia, HRM y el ensayo TaqMan, este último mostró la mayor especificidad y sensibilidad, además de considerarse un método simple y rápido de configurar que otorga mejores resultados al emplear muestras de ADN con baja calidad y cantidad. La principal desventaja de este método radica en el costo, el cual fue mayor en comparación con el ensayo HRM y el ensayo de AS-PCR (Bass *et al.* 2007).

A pesar de que, en los últimos años, debido a su facilidad de uso y mayor confiabilidad más científicos han recurrido a los ensayos de PCR tiempo real con sondas TaqMan y a los análisis de curva de disociación para detectar mutaciones kdr (Bass *et al.* 2007; Choi *et al.* 2010), la AS-PCR punto final continua posicionada como la técnica más utilizada en países en desarrollo donde las enfermedades transmitidas por mosquitos son endémicas, esto debido a su costo relativamente bajo en términos de equipo necesario,

costo por corrida y especificidad y sensibilidad relativamente adecuadas (Bai *et al.* 2014; Unwin *et al.* 2018).

2.6.1.-Técnicas moleculares para el monitoreo de frecuencias kdr en *Ae. aegypti*

Desde el desarrollo de la AS-PCR punto final por Martínez-Torres *et al.* (1998) la mayoría de las técnicas adaptadas para el estudio de frecuencias kdr se ha centrado en la detección de las mutaciones L1014F y L1014S en mosquitos del género *Anopheles*. Por otro lado, en el caso de *Ae. aegypti* este tipo de estudios se ha realizado a través de una variedad reducida de técnicas basadas en el ensayo de AS-PCR, las cuales serán descritas a continuación.

Saavedra-Rodríguez *et al.* (2007) desarrollaron un ensayo de AS-PCR tiempo real con curva de disociación o con revelado a través de electroforesis en geles de agarosa para la detección y el monitoreo de las frecuencias de I1011M, V1011I, V1016I y V1016G en poblaciones de *Ae. aegypti* de Latinoamérica. Además, Yanola *et al.* (2011) desarrollaron un ensayo de AS-PCR tiempo real con sondas TaqMan y un ensayo de AS-PCR punto final con revelado a través de electroforesis en geles de agarosa para la detección de F1534C en *Ae. aegypti* de Tailandia. Posteriormente, Stenhouse *et al.* (2013) estandarizaron la AS-PCR punto final para la detección de V1016G en *Ae. aegypti* de Tailandia, basándose en el ensayo reportado previamente para la detección de dicha mutación por AS-PCR tiempo real (Saavedra-Rodríguez *et al.* 2007).

El ensayo de PCR tiempo real con análisis de curva de disociación ha sido utilizado para la detección de F1534C y V1016I en poblaciones de *Ae. aegypti* provenientes de Venezuela (Álvarez *et al.* 2015), Puerto Rico (Ponce-García *et al.* 2016), México (Deming *et al.* 2016), Jamaica (Francis *et al.* 2017), las Antillas Francesas (Goindin *et al.* 2017); F1534C en Brasil (Chapadense *et al.* 2015); y V410L en México (Saavedra-Rodríguez *et al.* 2018; Villanueva-Segura *et al.* 2020). Respecto a la PCR tiempo real con sondas TaqMan, esta se ha utilizado para detectar V1016G y D1763Y en *Ae. aegypti* de Taiwan (Lin *et al.* 2013) y F1534C en Arabia Saudita (Al Nazawi *et al.* 2017).

Por otra parte, el ensayo de AS-PCR punto final con electroforesis en geles de agarosa/poliacrilamida ha sido utilizado para el monitoreo de frecuencias kdr de V1016I en Brasil (Martins *et al.* 2009; Chapadense *et al.* 2015; Collet *et al.* 2016; Dolabella *et al.*

2016), México (Siller *et al.* 2011), Colombia (Maestre-Serrano *et al.* 2014; Aguirre-Obando *et al.* 2015), y Venezuela (Álvarez *et al.* 2014); F1534C en Gran Caimán (Harris *et al.* 2010) e India (Muthusamy y Shivakumar, 2015); V1016G en Malasia (Ishak *et al.* 2015); V410L en Colombia (Granada *et al.* 2018); I1011M y V1016I en Brasil (Lima *et al.* 2011); V1016G y F1534C en Vietnam (Kawada *et al.* 2009) y en Tailandia (Plernsub *et al.* 2016); V1016I y F1534C en México (Lopez-Monroy *et al.* 2018) y en Burkina Faso (Sombié *et al.* 2019); S989P y V1016G en Arabia Saudita (Al Nazawi *et al.* 2017) y en India (Kushwah *et al.* 2019); y S989P, V1016G y F1534C en Unión de Myanmar (Kawada *et al.* 2014), en el Sur de China (Li *et al.* 2015), en Colombia (Atencia *et al.* 2016) y en Sri Lanka (Saavedra-Rodríguez *et al.* 2018);

Rajatileka *et al.* (2008) estandarizaron el ensayo HOLA para la detección de I1011M, V1011I, V1016I y V1016G en poblaciones de *Ae. aegypti* de Tailandia. Posteriormente se utilizó este ensayo para la detección de V1016I en poblaciones de *Ae. aegypti* provenientes de Gran Caimán (Harris *et al.* 2010) y de México (Aponte *et al.* 2013). Sin embargo, al comparar los resultados del ensayo HOLA y pirosecuenciación se observó que esta técnica es más específica y sensible para la detección de L1014F en *Cx. quinquefasciatus* que para aquellas presentes en los loci 1011 y 1016 de *Ae. aegypti* (Martins y Valle, 2012).

Otras técnicas han sido empleadas en menor medida para este fin, entre ellas el ensayo HRM para la detección de F1534C, V1016G y S989P en Indonesia (Wuliandari *et al.* 2015); el ensayo PCR-RFLP para la detección de F1534C y T1520I en India (Kushwah *et al.* 2015) y posteriormente para F1534L en India (Kushwah *et al.* 2019); e incluso a través de secuenciación para detectar V1016I en Martinica (Marcombe *et al.* 2012) y para V1016I y F1534C en Gahana (Kawada *et al.* 2016).

2.6.2.-Detección simultánea de mutaciones kdr

En el caso de los estudios realizados en *An. gambiae* ha sido relativamente sencillo adaptar algunas de las técnicas mencionadas anteriormente para la detección simultánea de mutaciones kdr debido a que la mayoría se ha enfocado en L1014F y L1014S las cuales están presentes en un solo locus. Contrario a esto, las mutaciones kdr involucradas en la

resistencia a piretroides y DDT en otros géneros de mosquitos se encuentran en distintos loci, lo que ha dificultado el desarrollo de ensayos para detección simultánea.

Un ejemplo reciente de lo anterior es el ensayo de ETAS-PCR (Engineered-Tail Allele-specific-PCR) desarrollado por Martins *et al.* (2019) para la detección simultánea de tres variantes no sinónimas (TTA, TTT, TTC) que resultan en el reemplazo L1014F en poblaciones de campo de *Cx. quinquefasciatus* provenientes de Brasil, Tanzania y Uganda. La ETAS-PCR es un ensayo de PCR multiplex de una sola reacción seguido de una digestión con endonucleasas. Los iniciadores alelo-específicos forward se sintetizan con una cola de 56 pb en el extremo 5' que incluye un sitio de restricción para la enzima *Eco321* en distintas posiciones. La discriminación alélica se realiza a través de electroforesis en gel de agarosa, obteniendo bandas con un peso característico.

Recientemente, Saingamsook *et al.* (2017) desarrollaron un ensayo de mPCR punto final y electroforesis en gel de agarosa para la detección simultánea de V1016G y F1534C en *Ae. aegypti*. Este ensayo combina dos juegos de iniciadores, el primero diseñado para la detección de V1016G (Saavedra-Rodríguez *et al.* 2007) y el segundo diseñado para detectar F1534C, el cual consta de 4 iniciadores, dos de ellos amplifican una banda control de 368 pb y los otros dos son específicos para los alelos F1534 y C1534 generando productos amplificados de 232 pb y 180 pb respectivamente. Esta técnica ofrece reducción en el costo y tiempo de monitoreo de las frecuencias *kdr* en países donde ambas mutaciones están presentes. Si bien, nuestro equipo de trabajo ha logrado adaptar exitosamente esta técnica para la detección simultánea de F1534C, V410L y V1016I en un solo ensayo (Villanueva-Segura *et al.* 2020), el añadir una mutación extra a la reacción implicaría un incremento en la complejidad de los patrones de bandeo presentes en el gel de agarosa.

2.6.3.- Ensayo de mPCR/RLB para la detección simultánea de mutaciones puntuales

Lo anterior puede solucionarse adaptando la técnica de mPCR punto final a algún ensayo bioquímico o de hibridación que no solamente permita revelar los productos amplificados de manera óptima, sino que contribuya a mejorar la seguridad, costo y rendimiento del monitoreo *kdr* (Henry-Halldin *et al.* 2012).

En el presente estudio se propone la aplicación de un chip biosensor que integra un ensayo de PCR multiplex (mPCR) (Henegariu *et al.* 1997; Markoulatos *et al.* 2002), en el cual se pueden emplear hasta 43 pares de iniciadores marcados con biotina para producir amplicones marcados con biotina que posteriormente son utilizados en un ensayo de hibridación reversa en línea (RLB) en el que hibridan con sondas alelo-específicas marcadas con un grupo amino y unidas a una membrana de nylon cargada negativamente y cuyo resultado es revelado a través de una reacción colorimétrica simple que emplea un conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina (Gold, 2003; Kong y Gilbert, 2006). Entre las ventajas de la técnica está el hecho de que permite la detección simultánea de hasta 43 genes, regiones o alelos empleando una sola membrana, la cual luego del primer uso puede ser reutilizada entre 10 y 20 veces. Además, la realización del ensayo RLB implica una serie de pasos fáciles de realizar, haciéndolo versátil y fácilmente transferible a otros laboratorios (Kong y Gilbert, 2006).

La detección simultánea de varias mutaciones puntuales mediante RLB utilizando sondas específicas fue descrita inicialmente por Kaufhold *et al.* (1994) y aunque la mayoría de las aplicaciones reportadas incluyen la identificación/tipificación de microorganismos, tanto bacterias como virus, parásitos y hongos, se ha utilizado también para la identificación de alelos y polimorfismos en humanos (Kong y Gilbert, 2006).

Cao *et al.* (1999) emplearon esta técnica para desarrollar y comercializar un sistema de genotipificación de alta resolución y de resolución intermedia para los genes HLA clase I-A, B y C. En el sistema de alta resolución se emplearon 67 sondas de iniciadores alelo-específicas para el gen HLA-A, 99 para HLA-B y 57 para HLA-C, mientras que en el sistema de resolución intermedia de utilizaron 39 sondas de iniciadores alelo-específicos para el gen HLA-A y 59 para HLA-B.

Bunschoten *et al.* (2000) utilizaron el ensayo de mPCR/RLB para la detección simultánea de 4 alelos mutados en el gen *NAT1* y 5 alelos mutados en el gen *NAT2*. Estos genes codifican para N-acetiltransferasas 1 y 2 y se sabe que los alelos mutados antes mencionados contribuyen a la susceptibilidad a desarrollar cáncer en individuos expuestos a compuestos alquilantes. Los resultados concordaron con aquellos obtenidos por AS-PCR punto final y PCR-RFLP, concluyendo que esta técnica es más rápida y menos

costosa que estos últimos, además de que es fácil adaptarla para la detección de más variantes alélicas.

Mokrousov *et al.* (2004) con el ensayo de mPCR/RLB identificaron 6 alelos mutados en 6 genes distintos de *Mycobacterium tuberculosis* asociados a resistencia a fármacos. Este estudio representa el primer intento de combinar distintos blancos en un solo ensayo de RLB para la predicción de resistencia a fármacos anti-tuberculosis, confirmando la capacidad de la técnica para identificar alelos mutados.

Oh *et al.* (2018) emplearon una variación del ensayo de mPCR/RLB (la cual conserva el principio de la técnica) para detectar 9 polimorfismos presentes en el cromosoma Y de humanos y utilizaron dichos resultados para identificar 10 haplogrupos diferentes. El análisis de estos polimorfismos a partir de muestras de ADN obtenidas en escenas del crimen de homicidios permite a los investigadores reducir la cantidad de sospechosos al predecir la ascendencia biogeográfica a través de estos haplogrupos.

3.- JUSTIFICACIÓN

En México, el principal mecanismo asociado a resistencia a piretroides en *Ae. aegypti* son las mutaciones kdr F1534C, V410L y V1016I cuyas frecuencias han aumentado a través de los años por el uso continuado de esta clase de insecticidas, comprometiendo la efectividad de los programas de control del vector. Actualmente, la NOM-032-SSA2-2014 recomienda el monitoreo de susceptibilidad a piretroides en poblaciones de mosquitos a través de la técnica de bioensayo dosis/tiempo diagnóstico en botella utilizada en el CDC de Atlanta. Sin embargo, esta no brinda información suficiente sobre la dinámica y frecuencias de las mutaciones kdr, limitando el potencial de decisión de los programas de control de resistencia. Al elegir un método para detectar resistencia por mutaciones kdr se debe considerar la disponibilidad de recursos del laboratorio, técnicos capacitados y tiempo. Este último punto adquiere mayor peso al considerar la amplia distribución geográfica del vector en el país, la cantidad de muestras a procesar y la dinámica y fluctuación de la resistencia kdr en cortos periodos de tiempo. Aunque el ensayo TaqMan en tiempo real con curva de disociación y la AS-PCR punto final son las metodologías más utilizadas, en nuestro país, su costo de aplicación para identificar una mutación por mosquito es de ~3.50 USD y ~2.39 USD, respectivamente, haciendo poco viable el incorporarlas como práctica rutinaria. Por otra parte, la técnica de PCR multiplex ha demostrado agilizar el proceso de monitoreo a través de la detección simultánea de 3 mutaciones kdr sin la necesidad de aumentar cuantiosamente el costo de la AS-PCR punto final. Adicionalmente, se ha utilizado un grupo de metodologías convencionales (SSOP-ELISA, PCR Dot-Blot y HOLA) que son relativamente baratas, con sensibilidad y especificidad satisfactorias, y recomendadas para instituciones con presupuesto limitado. El desarrollo de un chip biosensor de ADN, conformado por un ensayo de mPCR/RLB, la cual es una herramienta epidemiológica y de diagnóstico efectiva ampliamente utilizada y comercializada, combina la practicidad (en cuestión de tiempo) de la PCR multiplex con la seguridad y adaptación de la RLB a presupuestos limitados para la detección simultánea de las mutaciones kdr F1534C, V410L y V1016I en poblaciones de *Ae. aegypti* de México. La sencillez de los pasos post-PCR de este ensayo y el hecho de que se propone como técnica rutinaria en un país en vías de desarrollo abre pauta a la contratación y capacitación módica de operadores no especializados en el área de biología molecular.

4.- HIPÓTESIS

El chip biosensor de ADN detectará de manera eficiente los haplotipos asociados a las mutaciones kdr F1534C, V410L y V1016I en el canal de sodio dependiente de voltaje (vsgc) en mosquitos *Ae. aegypti*.

5.- OBJETIVO DEL TRABAJO

5.1.- Objetivo general

Diseñar y validar un chip biosensor basado en la técnica de hibridación reversa en línea que en conjunto con una PCR multiplex permitirá la detección simultánea de las mutaciones kdr F1534C, V410L y V1016I en el vsgc en mosquitos adultos de *Ae. aegypti*.

5.2.- Objetivos particulares

- Estandarizar las condiciones del ensayo de PCR multiplex y del ensayo de hibridación reversa en línea para la detección de haplotipos asociados a las mutaciones kdr F1534C, V410L y V1016I en mosquitos *Ae. aegypti*.
- Validar los ensayos de PCR multiplex e hibridación reversa en línea para la detección simultánea de las mutaciones kdr F1534C, V410L y V1016I en poblaciones de *Ae. aegypti* previamente caracterizadas por su resistencia a insecticidas piretroides y la frecuencia de las mutaciones de interés.

6.- MATERIAL Y MÉTODOS

6.1.- Área de estudio y material biológico

En julio de 2018 y en junio de 2019 se realizaron muestreos dirigidos en localidades de la costa del Golfo de México y del Pacífico, respectivamente (tabla 1, figura 3). Se recolectaron las fases inmaduras de *Ae. aegypti* en criaderos temporales donde se conoce que el vector se reproduce (agua limpia almacenada o estancada), mediante el uso de caladores estándar, charolas y pipetas plásticas, y aspiradores manuales. El material se colocó en bolsas Whirl-Pack® (Nasco Sampling, Wisconsin) debidamente etiquetadas, las cuales fueron resguardadas en termos y transportadas al insectario del Laboratorio de Entomología Médica de la Facultad de Ciencias Biológicas “Unidad B”, UANL.



Figura 3. Sitios de muestreo de *Ae. aegypti* en México.

Las larvas recolectadas se colocaron en charolas plásticas de 2.5 L de capacidad con agua a temperatura de 27 ± 1 °C. Las larvas se alimentaron con polvo de hígado bovino (Liver powder MP Biomedicals, LLC). Al llegar a la etapa de pupa estas se colocaron en cámaras de emergencia (BioQuip Products, Inc., Compton, CA, USA) para facilitar la identificación de adultos de *Ae. aegypti* y su traslado a jaulas entomológicas (BioQuip Products, Inc., Compton, CA, USA).

Tabla 1. Coordenadas de los sitios de muestreo de *Ae. aegypti* de México.

Recolecta julio 2018			
Localidad	Coordenadas	Localidad	Coordenadas
Zona Libre, Belice	N 18° 29' 06.8" W 88° 23' 36.5"	José Cardel, Ver.	N 19° 23' 4.728" W 96° 22' 44.478"
Campeche, Camp.	N 19° 49' 37.39" W 90° 33' 6.082"	Emilio Carranza, Ver.	N 19° 58' 26.505" W 96° 36' 26.595"
Chamotón, Camp.	N 19° 21' 51.786" W 90° 43' 17.701"	Poza Rica, Ver.	N 20° 30' 18.984" W 97° 28' 1.022"
Cd. del Carmen, Camp.	N 18° 39' 40.127" W 91° 49' 32.064"	Cosoleacaque, Ver.	N 17° 59' 36.78" W 94° 38' 36.4812"
Monterrey, N.L.	N 25° 42' 24.9" W 100° 21' 08.6"	Minatitlán, Ver.	N 18° 1' 10.105" W 94° 32' 52.559"
Guadalupe, N.L.	N 25° 38' 56. " W 100° 10' 49.2"	Acayúcan, Ver.	N 17° 57' 5.529' " W 94° 53' 57.908"
Heróica Cárdenas, Tab.	N 18° 32' 14.768" W 92° 38' 25.515"	Coatzacoalcos, Ver.	N 18° 4' 31.891 " W 94° 19' 15.999"
Frontera, Tab.	N 17° 59' 18.131" W 92° 55' 55.322"	Mérida Yuc.	N 20° 58' 51.926" W 89° 36' 59.438"
Villahermosa, Tab.	N 17° 59' 58.177" W 93° 21' 24.933"	San Antonio Kaua, Yuc.	N 20° 56' 28.867" W 89° 33' 46.369"
Tampico, Tamps.	N 22° 6' 38.124" W 97° 48' 11.336"	Umán, Yuc.	N 19° 49' 37.39" W 90° 33' 6.082"
Cancún, Q. Roo.	N 21° 8' 28.655" W 86° 52' 43.037"	Vergel, Yuc.	N 20° 57' 16.482" W 89° 34' 17.957"
Felipe Carrillo, Q. Roo.	N 19° 33' 37.072" W 88° 2' 39.1452"	Valladolid, Yuc.	N 20° 41' 26.717" W 88° 12' 11.044"
Chetumal, Q. Roo.	N 18° 31' 11.7624" W 88° 25' 33.1032"	Chiapas, Chis.	N 16° 45' 24" W 93° 7' 45"
Recolecta junio 2019			
Localidad	Coordenadas	Localidad	Coordenadas
Acapulco de Juárez, Gro.	N 16°, 53' 7.1934" W 99°, 50' 23.541"	San Blas, Nay.	N 21°, 32' 28.1" W 105°, 17' 18.3"
Coyuca de Benítez, Gro.	N 17°, 0' 9.18" W 100°, 4' 46.23"	Mazatlán, Sin.	N 23°, 11' 45.5" W 106°, 12' 16.8"
Zihuatanejo, Gro.	N 17°, 39' 1.85436" W 101°, 31' 50.772"	Guasave, Sin.	N 25°, 33' 47.2" W 108°, 27' 54.2"
Tecoman, Col.	N 18°, 54' 50.8" W 103°, 53' 09.4"	La Paz, B.C.S.	N 24°, 08' 29.9" W 110°, 16' 34.1"
Manzanillo, Col.	N 19°, 07' 06.5" W 104°, 20' 26.6"	Cd. Constitución, B.C.S.	N 25°, 01' 05.0" W 111°, 38' 58.7"
Colima, Col.	N 19°, 14' 45.3228" W 103°, 42' 26.5968"	Loreto, B.C.S.	N 26°, 1' 4.9872" W 111°, 21' 8.9604"
José María Morelos, Jal.	N 19°, 40' 18.075" W 105°, 10' 57.181"	San Luis Río Colorado, Son.	N 32°, 26' 59.8" W 114°, 43' 38.5"
Puerto Vallarta, Jal.	N 20°, 31' 51.8" W 105°, 17' 31.0"	Muzquiz, Coah.	N 27°, 52' 21.3" W 101°, 30' 36.6"
Compostela, Nay.	N 21°, 07' 13.6" W 105°, 10' 12.6"	Acuña, Coah.	N 29°, 19' 53.1" W 100°, 56' 52.5"

Por último, los adultos se mantuvieron a una temperatura de 26 ± 2 ° C con un fotoperiodo 12:12 L:O y posteriormente se separaron 30 hembras adultas de manera individual en tubos estériles de fondo cónico de 1.5 ml y se almacenaron a -20 °C para los análisis posteriores.

6.2 Análisis de mutaciones *kdr* F1534C, V410L y V1016I

Los individuos procesados con el chip biosensor se seleccionaron a partir de poblaciones de mosquitos previamente genotipificadas y poblaciones procesadas en el presente trabajo (poblaciones de la colecta 2018 y 2019, respectivamente), esto a través de AS-PCR punto final. Se tomaron en cuenta aquellas de poblaciones con frecuencias genotípicas variables para F1534C, V410L y V1016I y algunos individuos de otras poblaciones que mostraron haplotipos únicos, esto con la finalidad de demostrar la capacidad de la técnica para detectar la mayor cantidad de haplotipos presentes.

6.2.1.- Extracción del ADN

La extracción de ADN se realizó empleando la técnica modificada de precipitación con sales de Coen *et al.* (1982). Los mosquitos se maceraron de forma individual en 100 µl de buffer de lisis (NaCl 0.1 M, sacarosa 0.2 M, Tris-HCl 0.1 M pH 9.1, EDTA 0.05 M y SDS al 5%) utilizando pistilos plásticos de polipropileno (DWK Life Sciences Inc. Milville, NJ, USA) en tubos de fondo cónico de 1.5 ml. Se centrifugaron durante 1 min a 13,000 rpm y se incubaron a 65 °C durante 30 min.

Se añadieron 15 µl de acetato de potasio a cada tubo y estos se incubaron a -20 °C durante 40 min. Posteriormente se centrifugaron a 13,000 rpm durante 15 min y se transfirieron 80 µl de sobrenadante de cada muestra a tubos nuevos. Se añadieron 200 µl de etanol etílico absoluto, se aplicó agitación con vortex y los tubos se incubaron a -20 °C durante toda la noche. Los tubos se centrifugaron a 13,000 rpm durante 5 min y se decantó el sobrenadante. Se añadieron 200 µl de etanol etílico al 70 %, se aplicó agitación con vortex y los tubos se centrifugaron a 13,000 rpm durante 5 min, luego de decantar el sobrenadante se repitió este último lavado con etanol etílico al 70 %. Una vez obtenido el pellet de ADN los tubos abiertos se incubaron a 65 °C durante 1 a 3 min. Por último, la muestra se resuspendió en 50 µl de agua grado molecular (libre de nucleasas). La

concentración y pureza del ADN extraído se verificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000® (Woonstocken, RI, USA).

6.2.2.- Genotipificación individual de F1534C, V410L y V1016I

La genotipificación individual se realizó a través de AS-PCR punto final con electroforesis en gel de agarosa. Para la amplificación del locus V1016I el volumen final de reacción fue de 15 μ l e incluyó 1 μ l de ADN (~25- 250 ng/ μ l), 10 μ l de GoTaq® Master Mix (Promega, WI, USA) (5U), 3.55 μ l de H₂O libre de nucleasas y 0.15 μ l de cada uno de los iniciadores V1016 F, I1016 F e I1016 R (Saavedra-Rodríguez *et al.* 2007) para ajustarlos a una concentración final de 0.5 μ M. En el caso de la amplificación de F1534C el volumen final por reacción fue de 15 μ l e incluyó 1 μ l de ADN (~25- 250 ng/ μ l), 10 μ l de GoTaq® Master Mix (Promega, WI, USA) (5U), 3.775 μ l de H₂O libre de nucleasas y 0.075 μ l de cada uno de los iniciadores F1534 F, C1534 F y 1534 R (Yanola *et al.* 2011) para ajustarlos a una concentración final de 0.25 μ M. Por último, la amplificación de V410L se realizó en un volumen final de reacción de 25 μ l e incluyó 1 μ l de ADN (~25- 250 ng/ μ l), 12.50 de GoTaq® Master Mix (Promega, WI, USA) (5U) 11.35 μ l de H₂O libre de nucleasas y 0.05 μ l de cada uno de los iniciadores V410 F, L410F y 410 R (Saavedra-Rodríguez *et al.* 2018) para ajustarlos a una concentración final de 1 μ M.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador BioRad T-100 (BioRad, CA, USA) con las siguientes condiciones de reacción: para V410L 3 min a 95°C, 30 ciclos de 1 min a 95°C, 20 s a 56.1°C y 20 s a 72°C, seguido de una extensión final de 5 min a 72°C; para V1016I 5 min a 95°C, 29 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 60 °C, y 1 min 15 s a 72 °C, seguido de una extensión final de 10 min a 72 °C; y para F1534C 4 min a 95°C, 35 ciclos de 1 min a 95° C, 1 min a 57° C, 1 min a 72 °C, seguido de una extensión final de 4 min a 72°C.

Se analizaron 4 μ l de cada producto de la reacción de PCR a través de electroforesis horizontal en gel de agarosa (Agarose Ultrapure, Invitrogen, CA, USA) al 4%, 3% y 2.5% para F1534C, V1016I, y V410L respectivamente. Las condiciones de electroforesis fueron 110 V durante 80 min empleando buffer SB 1X (buffer ácido bórico-

sodio, NaOH 200 mM, pH 8.0 y ácido bórico). Las muestras amplificadas se tiñeron con gel red (Biotium, Hayward, CA, USA) a la par de un marcador de peso molecular de 25 pb (HyperLadder™, Bioline, LDN, UK) para verificar el tamaño de los fragmentos. Los productos amplificados se visualizaron bajo luz ultravioleta (UV) y se fotografiaron en un transiluminador (UVITEC, Cambridge, UK).

El genotipo se determinó de acuerdo a los 3 patrones de bandeo dependiendo de la presencia o ausencia de alelos silvestres o mutados en los loci de interés: para el locus 410 se espera una banda de aproximadamente 160 pb y 180 pb correspondientes a individuos homocigotos para el alelo resistente y silvestre susceptible respectivamente, y la presencia de ambas para el caso de individuos heterocigotos; para el locus 1016 se espera una banda de 102 pb en individuos homocigotos para el alelo silvestre susceptible, 82 pb en individuos homocigotos para el alelo resistente, y la presencia de ambas para el caso de individuos heterocigotos; por último, para el locus 1534 se espera una banda de 93 pb en individuos homocigotos para el alelo silvestre susceptible, una de 113 pb individuos homocigotos para el alelo resistente, y la presencia de ambas para el caso de individuos heterocigotos.

Tabla 2. Iniciadores alelo-específicos para la genotipificación individual de F1534C, V410L y V1016I

Nombre	Secuencia de 5' a 3'	Referencia
C1534 F	GCGGGCAGGGCGGCGGGGGCGGGGCCTCTACTTTGTGTTCTTCATCATGTG	Yanola <i>et al.</i> 2011
F1534 F	GCGGGCTCTACTTTGTGTTCTTCATCATATT	
1534 R	TCTGCTCGTTGAAGTTGTCGAT	
V410 F	ATCTTCTTGGGTTTCGTTCTACCGTG	Rodríguez <i>et al.</i> 2018
L410 F	ATCTTCTTGGGTTTCGTTCTACCATT	
410 R	TCTTCTCGGCGGCCTCTT	
V1016 F	GCGGGCGGCGGGGGCGGGGCCACAAATTGTTTCCACCCGCACCGG	Saavedra- Rodríguez <i>et al.</i> 2007
I1016 F	GCGGGCACAAATTGTTTCCACCCGCACTGA	
I1016 R	TGATGAACCSGAATTGGACAAAAGC	

6.3.- Diseño de iniciadores y sondas específicas

Para el ensayo de mPCR/RLB se diseñaron 3 pares de iniciadores marcados con biotina en el extremo 5', utilizados para amplificar las regiones de ADN que flanquean las mutaciones F1534C, V410L y V1016I. Además, se diseñaron 6 sondas de iniciadores específicas para los alelos silvestres y mutados en los loci ya mencionados, las cuales

incluyeron un marcaje con un grupo amino en el extremo 5'. Como control interno se eligió el gen de la β -actina debido a que se ha demostrado que se expresa basalmente en todas las células y ha sido utilizado exitosamente con el mismo propósito en estudios previos. La amplificación de este se realizó utilizando iniciadores previamente reportados para su uso en *Ae. aegypti* (Villanueva-Segura *et al.* 2015), además se diseñó una sonda para su detección en el ensayo de hibridación reversa (tabla 3).

Los iniciadores y las sondas utilizadas en ambas pruebas se diseñaron considerando los siguientes parámetros: temperatura de fusión (T_m) dentro de un rango de 50-60 °C; contenido GC entre 30% y 60%; longitud de 18 a 30 pb; formación de estructuras secundarias moderada, baja o nula; sin formación de dímeros; tamaño de productos amplificados de 80 a 400 pb (Kong y Gilbert, 2006; Nasereddin *et al.* 2008; Giorgio, 2018). El ensayo de amplificación *in silico* y la determinación de los parámetros de los iniciadores y sondas se realizaron utilizando el software AmplifyX y la herramienta bioinformática OligoAnalyzer de IDT (Integrated DNA Technologies, Inc.), respectivamente. Todos los iniciadores y sondas fueron sintetizados por la empresa IDT (Integrated DNA Technologies, Inc.).

Tabla 3. Iniciadores flanqueantes y sondas alelo-específicas diseñados para el ensayo mPCR/RLB.

Iniciador/sonda	Secuencia de 5' a 3'	T_m (°C)	% GC
1016 F	TTCTTGCATTCTATCGTGCTAACC	55.3	41.7%
1016 R	GACAAAAGCAAGGCTAAGAAAAGG	54.8	41.7%
Sonda V1016	ACCCGCACAG <u>G</u> TACTTAACCTT	58.4	50%
Sonda I1016	ACACCCGCACAG <u>A</u> TACTTAACCTT	58.1	47.8%
1534 F	TCGCGGGAGGTAAGTTATTG	54.5	50%
1534 R	CGATGATGACACCGATGAA	52.2	47.4%
Sonda F1,534	TTCTTCATCATCT <u>T</u> CGGGTCGTTC	56.8	45.8%
Sonda C1,534	TTCTTCATCATCT <u>G</u> CGGGTCGTT	58.7	47.8%
410 F	TACGATCAGCTGGACCGTG	56.7	57.9%
410 R	TTCTTCCTCGGCGGCCTCTT	61.3	60%
Sonda V410	CGTTCTACCT <u>T</u> GTAATTTGATCTTGG	54.4	37%
Sonda L410	GTTCGTTCTACCT <u>T</u> TAAATTTGATCTTGG	55.1	33.3%
Control interno			
β-actina F	GATCTGGCACCACACCTTCT	57.1	55%
β-actina R	ATTGGGACAGTGTGGGAGAC	56.9	55%
Sonda β-actina	GAGACCTTCAACTCGCCAGC	58.3	60%

Los iniciadores se resuspendieron utilizando H₂O grado molecular y se almacenaron de acuerdo con lo sugerido por Kong y Gilbert (2006). Se realizaron alícuotas madre y de trabajo de los iniciadores biotinilados, las cuales se almacenaron a -80 °C y a -20 °C respectivamente, esto para asegurar la integridad del marcaje. Las sondas alelo-específicas se resuspendieron en H₂O grado molecular, se dividieron en alícuotas madre y de trabajo y se almacenaron a -20 °C.

6.4.- Estandarización de la mPCR

Se estandarizó la mPCR con el fin de utilizarse en conjunto con el ensayo de RLB. Para los fines descritos se utilizó el ADN de hembras adultas de campo y de la cepa de referencia New Orleans de *Ae. aegypti*.

Las primeras pruebas consistieron en la amplificación individual de las regiones que flanquean a los reemplazos F1534C, V410L, V1016I y β -actina utilizando los iniciadores marcados con biotina (tabla 3) y partiendo de las condiciones y volúmenes de reacción recomendados por el proveedor de la ADN polimerasa comercial utilizada y por lo reportado por Henegariu *et al.* (1997) considerando las características de los iniciadores. Una vez que se obtuvo amplificación individual satisfactoria utilizando una temperatura de alineamiento en común se procedió con la amplificación simultánea. Si alguna banda mostró reducción en la intensidad se optó por aumentar la concentración de iniciadores.

La amplificación simultánea de las 4 regiones se estandarizó a partir de una mezcla de reacción que contenía: 1 μ l de ADN (~10-250 ng/ μ l), 1 U de GoTaq® Master Mix (Promega, WI, USA), iniciadores β -actina F, β -actina R, F1534C fw, F1534C rev, V410L fw, V410L rev, V1016I fw y V1016I rev a una concentración de 0.2 μ M, así como H₂O libre de nucleasas. Las condiciones iniciales de reacción fueron las siguientes: 95°C durante 2 min, 30 ciclos de 95°C durante 30 s, 60 °C durante 30 s, 72°C durante 45 s y, por último, una extensión final a 72°C durante 5 min.

Tanto en la amplificación individual como en la simultánea se analizaron 4 μ l de cada uno de los productos de reacción a través de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2.5 %. Las condiciones de electroforesis fueron 110 V durante 80 min empleando buffer SB 1X (buffer ácido bórico-sodio, NaOH 200 mM, pH 8.0 y ácido bórico). Las muestras amplificadas se tiñeron con gel red (Biotium, Hayward, CA, USA)

a la par de un marcador de peso molecular de 25 pb (HyperLadder™, Bioline, LDN, UK) para verificar el tamaño de los fragmentos. Los productos amplificados se visualizaron en un analizador de imágenes (UVITEC, Cambridge, UK). Por último, la validación de la estandarización de la PCR multiplex se realizó comparando el patrón de bandeo obtenido de la amplificación individual y simultánea.

6.5.- Estandarización del ensayo RLB

6.5.1.- Preparación de la membrana Biotyne C

El ensayo de hibridación reversa se adaptó de las metodologías descritas por Kong y Gilbert (2006) y Giorgio (2018). Se utilizó la membrana Biotyne C® (0.45 µm) Pall Corporation, USA) adaptada a un tamaño de 7.3 x 10.3 cm, 9 hojas de papel filtro de poro cerrado de 7.3 x 10.3 cm y el aparato de microfiltración SF (BioRad, CA, USA). La membrana Biotyne C® fue activada en una bolsa plástica sellable, con EDC (Merck, CDMX, MX) al 16% (w/v) diluido en buffer MES (Merck, CDMX, MX) 0.5 M pH 5.5, en agitación durante 10 min y a temperatura ambiente. Posteriormente se enjuagó con H₂O bidestilada y se colocó en el empaque del aparato de microfiltración sobre las hojas de papel filtro (previamente humedecidas con H₂O bidestilada). Una vez ensamblado el aparato, se removió el exceso de líquido aspirándolo por vacío a través de la membrana.

Por otra parte, las sondas alelo-específicas fueron diluidas en NaHCO₃ 0.5 M (pH 8.4) a la concentración que se deseaba fijar y se distribuyeron en los respectivos pozos. Se depositó NaHCO₃ en los espacios no utilizados para evitar la difusión entre ranuras. La dilución de las sondas se incubó a 25 °C durante 1 hora y posteriormente se aplicó vacío para filtrar el líquido a través de la membrana. Se realizaron marcas en la membrana utilizando un lápiz de grafito antes de retirarla del aparato y se incubó con agitación dentro de un recipiente plástico en NaOH 0.1 M durante 7 min con la finalidad de inactivar la membrana. Después se enjuagó con SSPE 2X, se colocó en SSPE 2x / SDS 0.1% y se incubó con agitación durante 5 min a la misma temperatura en que se realizó la hibridación.

Si la membrana no se utilizó inmediatamente, esta se colocó en un recipiente plástico con EDTA 20 mM (pH 8) durante 20 min a temperatura ambiente para luego ser

almacenada a 4°C en una bolsa sellada en presencia de EDTA 20 mM. Durante este paso fue importante mantener las bolsas correctamente selladas para evitar deshidratación y el consecuente compromiso de las membranas.

6.5.2.- Hibridación de productos de mPCR y visualización de resultados

El producto de mPCR (marcado con biotina) fue diluido en SSPE 2x / SDS al 0.1%. La muestra fue desnaturalizada a 100°C durante 10 min y enfriada en hielo por al menos 5 min. Al mismo tiempo se colocó la membrana activada y papel filtro en un recipiente plástico con SSPE 2x / SDS al 0.1% a temperatura ambiente durante 5 min. La membrana y los papeles filtro se colocaron en el aparato de microfiltración ensamblándolo como se describió previamente y eliminando el exceso de líquido aplicando vacío.

Las muestras desnaturalizadas se depositaron en cada uno de los pozos correspondientes, colocando SSPE 2x / SDS 0.1% en los pozos sin utilizar para prevenir la difusión entre ranuras. La hibridación se llevó a cabo a una temperatura específica cercana a la T_m de las sondas alelo específicas, esto durante un tiempo específico. Después se filtró el líquido restante a través de la membrana aplicando vacío y se transfirió la membrana a un contenedor plástico, donde se realizaron 2 lavados en un buffer (buffer de lavado) que contenía SSPE y SDS a una concentración y temperatura específica. Para visualizar el resultado se colocó la membrana dentro de una bolsa de plástico sellable y se añadieron 5 mL de estreptavidina-fosfatasa alcalina (Merck, CDMX, MX) diluida 1:2000 en el buffer de lavado y se incubó en agitación constante a 42°C durante 45-60 min. La membrana se transfirió a un recipiente plástico y se enjuagó con agitación 2 veces el buffer de lavado a 42°C durante 10 min. Se reemplazó dicha solución con 100 mL de SSC a una concentración específica y se incubó con agitación y a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente se añadió 1 mL de BCIP/NBT one-step (Merck, CDMX, MX) y se dejó incubando a 42°C hasta que se desarrolló el color azul-purpura. La reacción colorimétrica se detuvo enjuagando la membrana en H₂O bidestilada.

6.6.- Análisis de resultados

Las frecuencias genotípicas se calcularon dividiendo el número de individuos con cada uno de los genotipos (homocigoto silvestre, heterocigoto u homocigoto mutado) entre el número total de individuos. Cabe mencionar que las poblaciones recolectadas en julio de 2018 fueron genotipificadas previamente por nuestro equipo de trabajo (Mora-Jasso *et al.* 2019).

Para validar la metodología se comparó el resultado obtenido a través de mPCR/RLB con el obtenido a través de AS-PCR punto final, empleando 82 muestras, buscando incluir individuos que mostraran los 22 haplotipos detectados a través de AS-PCR punto final. A partir de esta comparación se realizaron tablas de contingencia para calcular el % total de acuerdo y el índice de concordancia kappa (κ) (con sus respectivos intervalos de confianza de 95%) para detección de genotipos en cada locus y de haplotipos en los loci 1534+410, 1534+1016, 1016+410, y 1534+410+1016 empleando el software SPSS versión 22.0. Los valores de detección individual para alelos y haplotipos se contrastaron con aquellos obtenidos utilizando el ensayo SlotBlot (ensayos realizados previamente por nuestro equipo de trabajo) y la AS-PCR punto final. El estadístico κ se obtiene comparando la concordancia observada entre dos métodos cuando son aplicados al mismo grupo de individuos, respecto a la concordancia que podría ocurrir por azar, donde 0 indica concordancia por azar y 1 concordancia perfecta. La interpretación de los valores κ obtenidos se realizó con base en la escala de interpretación de Landis y Koch (1977).

Tabla 4. Escala de interpretación del índice de concordancia kappa propuesto por Landis y Koch (1977)

Valor del índice κ	Grado de concordancia
<0.00	Sin acuerdo
>0.00 – 0.20	Leve
0.21 – 0.40	Aceptable
>0.41 – 0.60	Moderado
0.61 – 0.80	Considerable
0.81 – 0.99	Casi Perfecta
1.00	Perfecta

7.-RESULTADOS

7.1.- Estandarización del ensayo de mPCR

La amplificación individual inicial de las regiones que flanquean las 3 mutaciones kdr de interés se realizó empleando las siguientes condiciones: 95 °C durante 2 min; 30 ciclos a 95 °C durante 30 s, 60 °C durante 30 s, 72 °C durante 45 s y, por último, una extensión final a 72 °C durante 5 min. Utilizando una concentración final de iniciadores de 0.2 µM (figura 4).

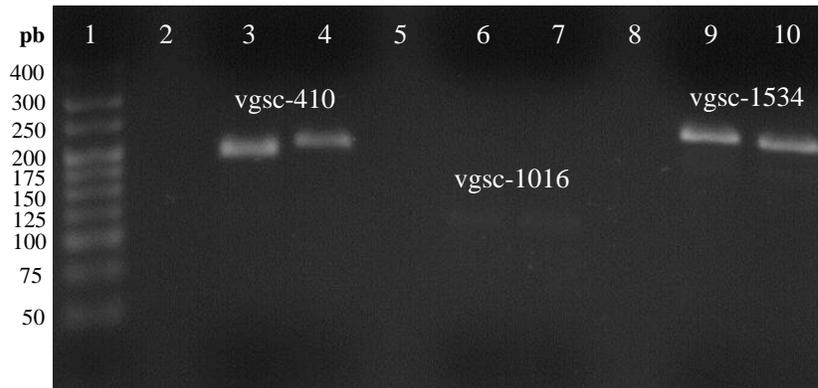


Figura 4.- Amplificación individual de las regiones del vgsc que flanquean las mutaciones de interés. Gel de agarosa al 2.5%. Concentración final de iniciadores de 0.2 µM utilizando ADN de individuos *Ae. aegypti* de la cepa de referencia New Orleans (carril 3, 6 y 9) y de un individuo de campo (carril 4, 7 y 10). Carril 1: marcador de peso molecular de 25 pb; Carril 2: control negativo con agua libre de nucleasas como templado en la reacción de PCR; Carriles 5 y 8: no contienen muestra.

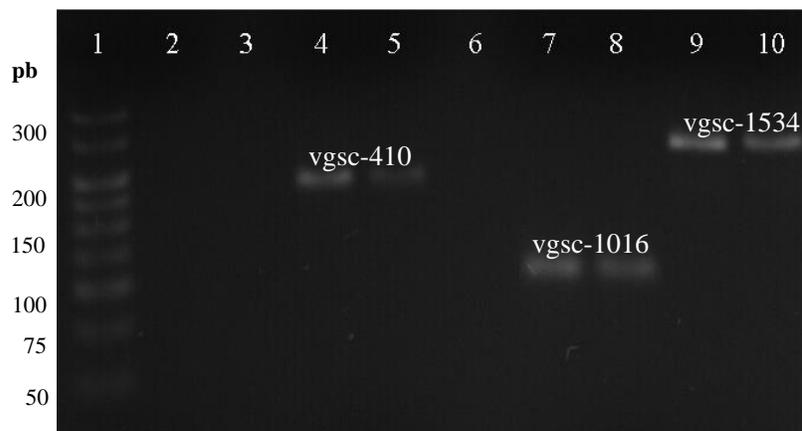


Figura 5.- Amplificación individual de las regiones de interés del vgsc aumentando la concentración de iniciadores para vgsc-1016. Gel de agarosa al 2.5%. Concentración final de iniciadores de 0.2 µM para vsgc-410 y vgsc-1534, y de 0.4 µM para vgsc-1016 utilizando ADN de individuos *Ae. aegypti* de la cepa de referencia New Orleans (carril 4, 7 y 9) y de un individuo de campo (carril 5, 8 y 10). Carril 1: marcador de peso molecular de 25 pb; Carril 2: control negativo con agua libre de nucleasas como templado en la reacción de PCR. Carriles 3 y 6 no contienen muestra.

Se obtuvo señal de amplificación adecuada independientemente de si la muestra de ADN utilizada correspondía a un individuo de campo o a la cepa de referencia New Orleans, sin embargo, la señal de *vgsc-1016* fue más tenue en comparación con el resto, por lo que se aumentó la concentración final de iniciadores para *vgsc-1016* de 0.2 μM a 0.4 μM , manteniendo las mismas condiciones de reacción (figura 5). Posteriormente se redujo la temperatura de alineamiento base de 60°C a 58.6°C, situándola en un punto intermedio entre las T_m de los iniciadores utilizados. Además, se añadió la amplificación individual de β -actina como control interno, utilizando una concentración final de iniciadores de 0.2 μM (figura 6).

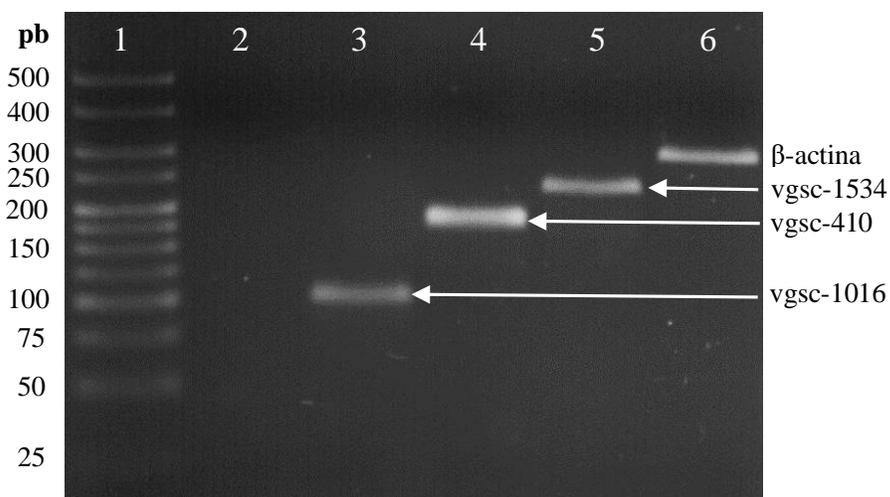


Figura 6.- Amplificación individual de las regiones de interés del *vgsc* y β -actina. Gel de agarosa al 2.5%. Concentración final de iniciadores de 0.2 μM para *vgsc-410*, *vgsc-1534* y β -actina y 0.4 μM para *vgsc-1016*, utilizando ADN de individuos *Ae. aegypti* de la cepa de referencia New Orleans. Carril 1: marcador de peso molecular de 25 pb; Carril 2: control negativo con agua libre de nucleasas como templado en la reacción de PCR; Carril 3: *vgsc-1016*; Carril 4: *vgsc-410*; carril 5: *vgsc-1534*; Carril 6: β -actina

Una vez que la señal de amplificación individual fue adecuada, se ajustó el volumen de reacción para la amplificación simultánea de las regiones de interés, probando 2 concentraciones distintas de iniciadores para β -actina, 0.2 μM y 0.4 μM . Con una concentración mayor de iniciadores para β -actina (0.4 μM), la amplificación de *vgsc-1534* y *vgsc-1016* se vio comprometida por lo que se decidió mantenerla a 0.2 μM (figura 7).

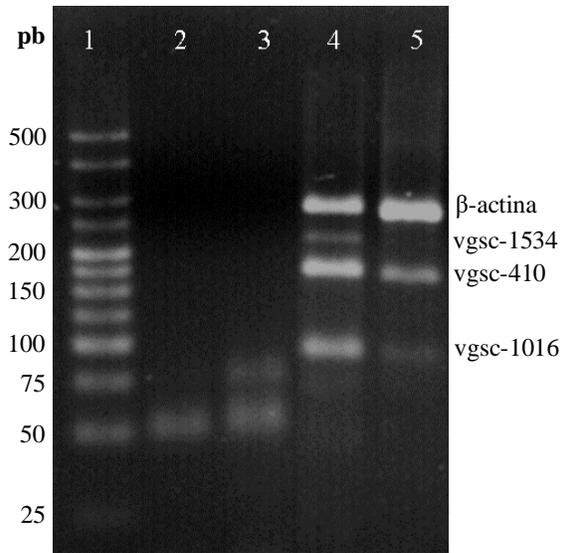


Figura 7.- Amplificación simultánea de las regiones de interés del vgsc y β -actina. Gel de agarosa al 2.5%. Concentración final de iniciadores para β -actina de 0.2 μ M y 0.4 μ M (carril 4 y 5, respectivamente) utilizando ADN de individuos *Ae. aegypti* de campo. Carril 1: marcador de peso molecular de 25 pb; Carril 2 y 3: control negativo de dichas reacciones (con 0.2 μ M y 0.4 μ M de iniciadores de β -actina, respectivamente).

Debido a que la señal de amplificación de vgsc-1534 se mostró más tenue que las otras 3 bandas se realizó una prueba utilizando 1 μ l, 2 μ l y 3 μ l de ADN (figura 8). Aunque no se observó diferencia en la intensidad de las bandas, se decidió utilizar 1 μ l de ADN para un volumen final de reacción de 25 μ l y 2 μ l de ADN para un volumen final de reacción de 50 μ l.

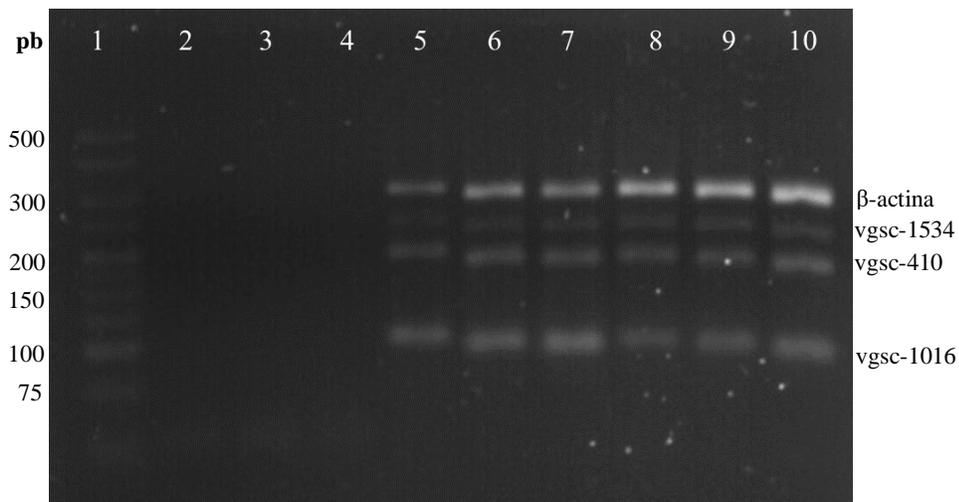


Figura 8.- Efecto de la cantidad de templado en la amplificación simultánea de las regiones de interés del vgsc y β -actina. Gel de agarosa al 2.5%. Concentración final de iniciadores para vgsc-1534 y vgsc-410 de 0.2 μ M y para vgsc-1016 de 0.4 μ M, utilizando 1 μ l, 2 μ l y 3 μ l de ADN de individuos *Ae. aegypti* de la cepa de referencia New Orleans (carril 5, 6 y 7) y de campo (carril 8, 9 y 10). Carril 1: marcador de peso molecular de 25 pb; Carril 2, 3 y 4: control negativo con 1 μ l, 2 μ l y 3 μ l de agua libre de nucleasas como templado en las reacciones de PCR.

Por otra parte, en el siguiente ensayo se redujo la concentración de iniciadores para β -actina de 0.2 μ M a 0.15 μ M y se amplificaron las muestras utilizando 30 y 40 ciclos. Se observó mayor intensidad de amplificación utilizando 40 ciclos, además, disminuyó la intensidad de la banda correspondiente al control interno y aumentó la de vgsc-410 y vgsc-1016 (figura 9).

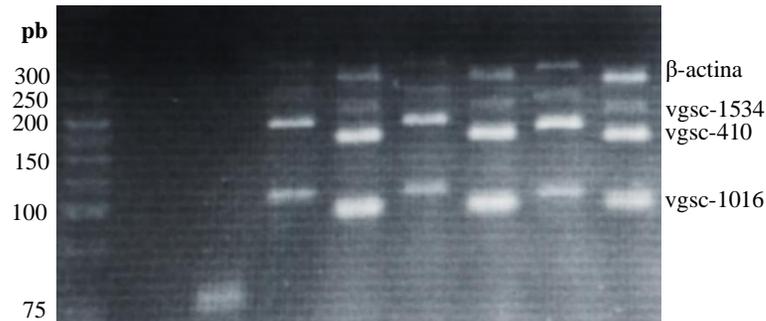


Figura 9.- Efecto de la cantidad de ciclos de reacción en la amplificación simultánea de las regiones de interés del vgsc y β -actina. Gel de agarosa al 2.5%. Concentración final de iniciadores para β -actina de 0.15 μ M, para vgsc-1534, y vgsc-410 de 0.2 μ M y para vgsc-1016 de 0.4 μ M utilizando 2 μ l de ADN de individuos *Ae. aegypti* de la cepa de referencia New Orleans (carril 4 y 5) y de campo (carril 6, 7, 8 y 9). 30 y 40 ciclos en la reacción. Carril 1: marcador de peso molecular de 25 pb; Carril 2 y 3: control negativo; Carriles 4, 6 y 8: amplificación con 30 ciclos de reacción; Carriles 5, 7 y 9: amplificación con 40 ciclos de reacción.

Por último, se modificó la concentración de iniciadores para vgsc-1534 de 0.2 μ M a 0.22 μ M, equiparando además la empleada para β -actina y vgsc-410 a 0.16 μ M. Con lo anterior se logró unificar la intensidad de las bandas (figura 10).

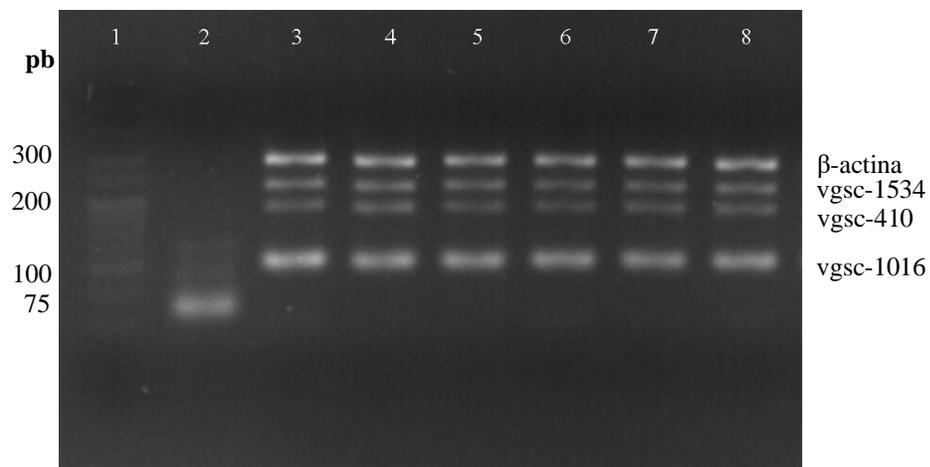


Figura 10.- Productos de mPCR de las regiones de interés del vgsc y β -actina. Gel de agarosa al 2.5% con productos de mPCR utilizando iniciadores de β -actina a una concentración final de 0.15 μ M, vgsc-1534 a 0.22 μ M y vgsc-410 a 0.16 μ M y de vgsc-1016 a 0.4 μ M utilizando ADN individuos *Ae. aegypti* de la cepa de referencia New Orleans (4 y 5) y de campo (carriles 5, 6, 7 y 8); Carril 1: marcador de peso molecular de 25 pb; Carril 2: control negativo.

7.2.- Estandarización del ensayo RLB

Se realizaron una serie de ensayos preliminares hasta definir especificaciones técnicas del protocolo para obtener señal de hibridación y bandas definidas (figura 11). Además, se probaron distintas temperaturas utilizando los buffers recomendados por Kong y Gilbert (2006): SSPE 2X / SDS 0.1% para diluir el producto de mPCR y llevar a cabo la hibridación, y SSPE 2X / SDS 0.5% para realizar los lavados posteriores a la hibridación, obteniendo señal inespecífica con la mayoría de las combinaciones de temperatura (tabla 5).

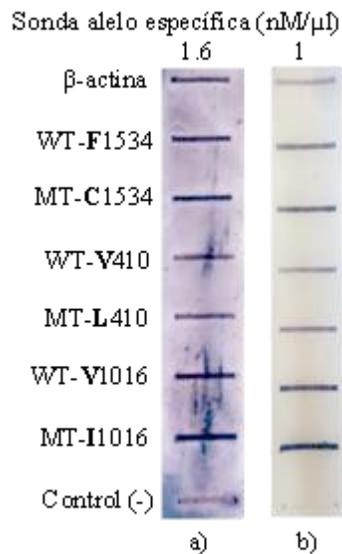


Figura 11.- Ensayo RLB preliminar. En ambos casos se utilizó ADN de un individuo CC₁₅₃₄/LL₄₁₀/II₁₀₁₆ y una temperatura de hibridación de 58.6°C y los lavados post-hibridación se realizaron con SSPE 2X / SDS 0.5% a 65°C. En el primer caso (a) la fijación de sondas, hibridación y revelado se realizó de manera continua sin desarmar el aparato de microfiltración, en el segundo caso (b) se realizaron marcas guía luego de fijar las sondas, lo que permitió retirar la membrana para realizar los lavados fuera del aparato. WT: alelo silvestre; MT: alelo mutado.

Tabla 5.- Efecto de distintas condiciones de hibridación y lavados post-hibridación en la especificidad del ensayo RLB.

Buffer (lavados post-hibridación)	Hibridación (°C)	Lavados post-hibridación (°C)	Resultado (señal de hibridación)
SSPE 2X / SDS 0.5%	58.6	65	WT/MT de los 3 loci y β -actina
	60	65	WT/MT-1534 y β -actina
	52	60	WT/MT-1534 y β -actina
	63	65	WT/MT de los 3 loci y β -actina
	67	72	WT/MT de los 3 loci y β -actina
	70	75	WT/MT de los 3 loci y β -actina
	78	79	Sólo en β -actina
SSPE 2X / SDS 0.8%	74	78	WT/MT de los 3 loci y β -actina
	76	78	WT/MT de los 3 loci y β -actina
	50	65	Sólo en β -actina
	77	82	Señal específica (WT/MT-1534 y β -actina)

La especificidad de la reacción para WT/MT-1534 se presentó al aumentar la temperatura a 77 °C y 82 °C en la hibridación y lavados post-hibridación, respectivamente, además de aumentar la concentración de SDS de 0.5% a 0.8% en el buffer empleado en los lavados post- hibridación (figura 12).

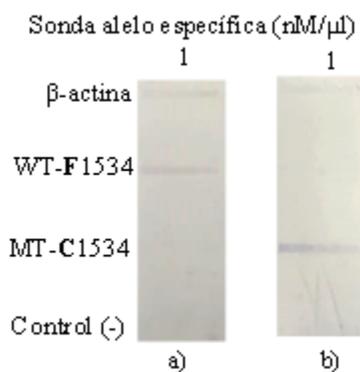


Figura 12.- Ensayo RLB para detección de WT-F1534 y MT-C1534. Se utilizó ADN de un individuo (a) CC₁₅₃₄/LL₄₁₀/II₁₀₁₆ y (b) FF₁₅₃₄/VV₄₁₀/VV₁₀₁₆. En ambos casos se utilizó una temperatura de hibridación de 77°C y los lavados post-hibridación se realizaron con SSPE 2X / SDS 0.8% a 82°C. En ambos casos se observa señal específica.

Todos los ensayos RLB se realizaron diluyendo 1.5 μl de producto de mPCR en 148.5 μl de buffer SSPE 2X / SDS 0.1% precalentado a 45°C. En todos los ensayos, en el control negativo se fijó cada una de las 7 sondas a la concentración indicada en su respectivo carril. Las condiciones que variaron en cada ensayo RLB durante la estandarización fueron la temperatura de hibridación, la temperatura de los lavados post-hibridación y la concentración de sales o SDS y el volumen del buffer empleado en estos últimos lavados. La incubación con el conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina se realizó utilizando una misma dilución de la enzima (1:2,000) y temperatura (42°C) según las especificaciones del producto. Por otra parte, la figura 13 muestra un ensayo RLB donde se fijaron 6 concentraciones distintas de cada sonda a la membrana Biodyne C®. La mPCR se realizó utilizando 2 μl de ADN de un individuo triple homocigoto mutado (CC₁₅₃₄/LL₄₁₀/II₁₀₁₆) en un volumen final de reacción de 50 μl. La hibridación y los lavados post-hibridación se realizaron bajo las temperaturas y concentraciones de buffers sugeridas por la literatura, 60°C y 65°C respectivamente y SSPE 2X / SDS 0.1% para el paso de hibridación y SSPE 2X / SDS 0.5% para los lavados post-hibridación. Lo anterior para determinar si la concentración de sonda podía suplir el uso de temperaturas elevadas en dichos pasos para obtener señal específica. Si bien a una concentración de sonda de 4 nM/μl se observó señal uniforme e inespecífica en todos los pozos, se observó también una reducción gradual de la señal conforme disminuyó la concentración de sonda, en el

caso de β -actina, dejando de ser visible a 1 nM/ μ l; en MT-C1534 y WT-V1016 dejando de ser visible a 0.5 nM/ μ l; y en WT-F1534 y MT-L410 dejando de ser visible a 100 pmol/ μ l. Bajo estas condiciones y a partir de una concentración de sonda de 2 nM/ μ l hasta 0.5 nM/ μ l el ensayo RLB fue específico para la detección de MT-L410. Cabe mencionar que por error técnico no se aplicó dilución de mPCR en la fila correspondiente a MT-I1016

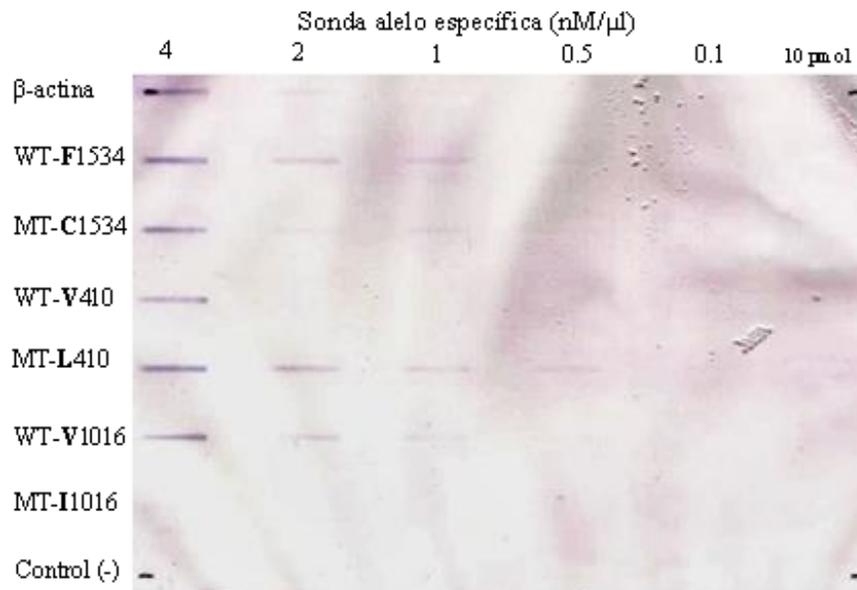


Figura 13.- Efecto de la concentración de sonda en la intensidad de la señal de hibridación. Se fijaron 6 concentraciones de sondas y se utilizó ADN de un individuo CC₁₅₃₄/LL₄₁₀/II₁₀₁₆, aplicando las condiciones de temperatura y concentración de buffer estándar reportadas por Kong y Gilbert (2006).

En la figura 14 se presenta un ensayo RLB donde se fijaron a la membrana las 3 concentraciones de sonda que anteriormente mostraron señal específica para MT-L410 (figura 13). Las condiciones utilizadas fueron las mismas del ensayo anterior (hibridación a 60°C durante 1 hora y 2 lavados post-hibridación a 65°C durante 10 min en 50 ml de buffer SSPE 2X / SDS 0.5% con la diferencia de que al realizar la mPCR se utilizaron 4 μ l de ADN (en lugar de 2 μ l) de un individuo CC₁₅₃₄/LL₄₁₀/II₁₀₁₆ en un volumen final de reacción de 50 μ l, esto para determinar si se presentaba un aumento de intensidad de la señal en aquellos carriles donde previamente se obtuvo señal específica. De nuevo se observó relación entre la reducción de la señal y la concentración de sondas. Sin embargo, se presentó señal en todos los pozos con excepción de β -actina cuya señal sólo se observó utilizando 2 nM / μ l.

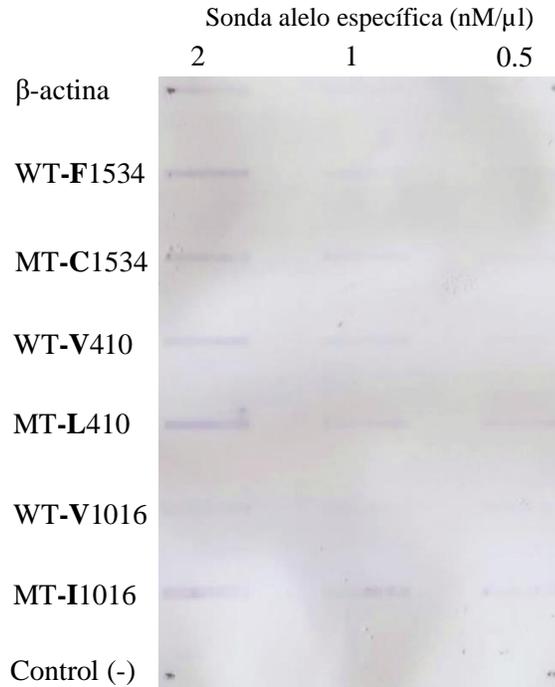


Figura 14.- Efecto de la cantidad de templado utilizado en la mPCR sobre la intensidad y especificidad del resultado. Se fijaron 3 concentraciones en la membrana y se utilizó ADN de un individuo $CC_{1534}/LL_{410}/II_{1016}$.

Aunque la señal fue inespecífica para detectar los alelos mutados, al fijar 0.5 nM/ μ l de sonda la señal de MT-L410 y MT-I1016 fue más intensa que la de WT-V410 y WT-V1016. Considerando la diferencia en la especificidad de MT-L410 al utilizar 2 μ l y 4 μ l de ADN al realizar la mPCR, se decidió mantener la cantidad de ADN a 1 μ l y 2 μ l para un volumen final de reacción de 25 μ l y 50 μ l respectivamente y proceder a probar utilizando la temperatura de hibridación y post-hibridación con la que previamente se obtuvo señal específica en WT/MT-1534 (figura 12). En dicho ensayo se fijaron 2 nM/ μ l y 1 nM/ μ l de sondas en la membrana, con una temperatura de hibridación a 77 °C durante 1 hr y lavados post-hibridación a 82°C durante 10 min en 50 ml de buffer SSPE 2X / SDS 0.8% (figura 15). Bajo estas condiciones y con 2 nM/ μ l de sonda la señal de los 3 alelos mutados fue más intensa que la de los alelos silvestres, mientras que con 1 nM/ μ l de sonda esto fue más notable para MT-I1016 respecto a WT-V1016.

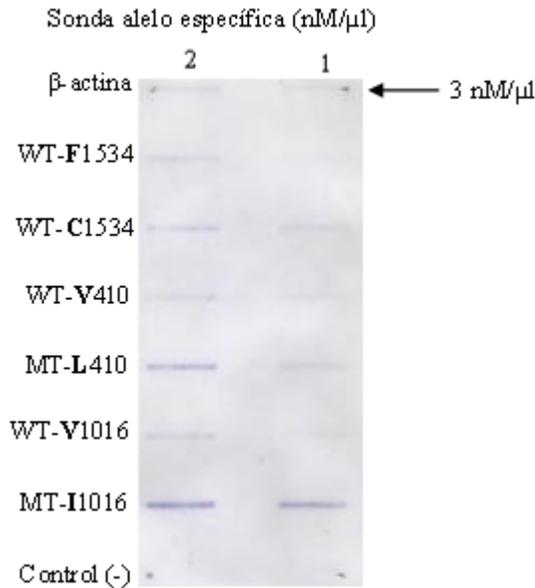


Figura 15.- Ensayo RLB realizado a mayor temperatura de hibridación y lavados post hibridación. Se utilizaron temperaturas que mostraron ser específicas para WT-F1534 y MT-C1534. Se fijaron 2 concentraciones de sondas en la membrana y una concentración de 3 nM/μl para β-actina. La mPCR se realizó utilizando ADN de un individuo CC₁₅₃₄/LL₄₁₀/II₁₀₁₆.

Las condiciones de los lavados post-hibridación del siguiente ensayo se eligieron con base en el resultado específico obtenido para WT-F1534 / MT-C1534 (figura 13) en una membrana de 4 pozos y debido a que la especificidad no se observó en este último caso empleando una membrana de mayor tamaño (figura 15) se repitió este ensayo aumentando el volumen del buffer utilizado en los lavados post-hibridación de 50 ml a 150 ml. El resultado obtenido se muestra en la figura 16, en este se observa señal específica para MT-C1534, MT-L410 y MT-I1016, pero casi imperceptible, y en el caso del de β-actina la señal se perdió por completo a pesar de haber aumentado la concentración de sonda a 3 nM/μl.

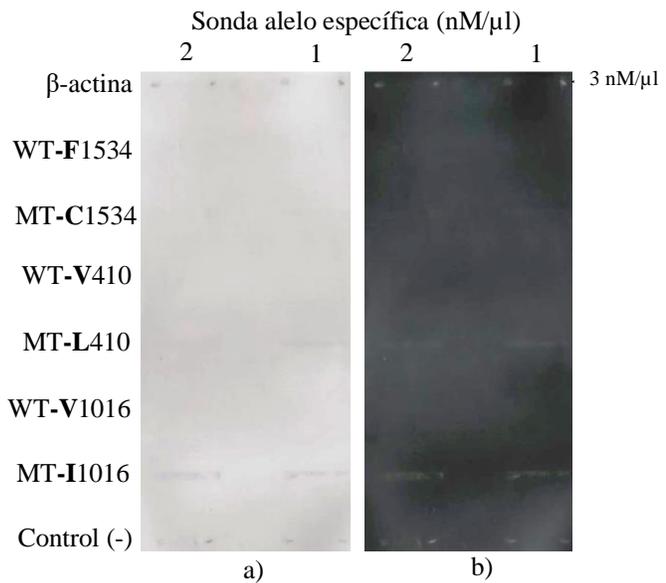


Figura 16.- Efecto del volumen de buffer de lavado en la especificidad del ensayo RLB. Se fijaron 2 concentraciones de sondas en la membrana. La mPCR se realizó utilizando ADN de un individuo CC₁₅₃₄/LL₄₁₀/II₁₀₁₆. Se presenta la imagen normal (a) y con inversión de colores (b) para mejorar la percepción de la señal.

En el siguiente ensayo (figura 17) se utilizaron las mismas condiciones de hibridación, utilizando ADN de un individuo CC₁₅₃₄/LL₄₁₀/II₁₀₁₆, pero empleando 3 buffers de lavado distintos: SSPE 2X / SDS 1%, SSPE 1X / SDS 0.8% y SSPE 1X / SDS 1%. Además, se fijaron 6 nM/μl de sonda para β-actina. Independientemente del aumento en la concentración de SDS, el reducir la concentración de SSPE de 2X a 1X ayudo a eliminar la señal inespecífica en WT-V1016 (figura 17a). Por lo tanto, las sondas MT-C1534, MT-L410 y MT-I1016 hibridaron de manera específica a 77°C en SSPE 2X / SDS 0.1% aplicando lavados post-hibridación en un mayor volumen tanto de SSPE 1X / SDS 0.8% como de SSPE 1X / SDS 1% A 82°C, esto luego de 1 hora de revelado en NBT/BCIP.

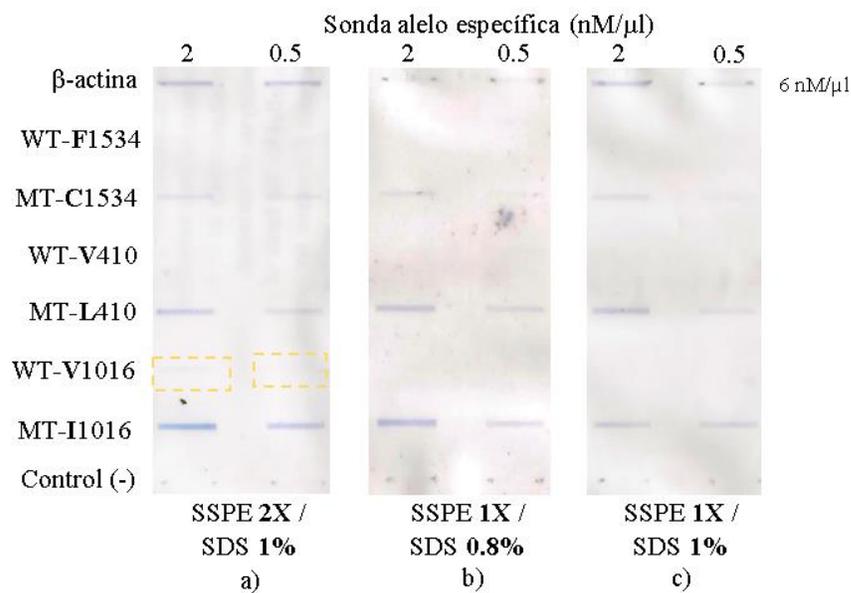


Figura 17.- Ensayo RLB probando distintas concentraciones de buffer de lavado. Se empleó ADN de un individuo CC₁₅₃₄/LL₄₁₀/II₁₀₁₆. Se utilizaron las mismas temperaturas y tiempos de hibridación y de lavados post-hibridación, pero distintos buffers de lavado. (a) Se conservó la concentración de sales utilizada anteriormente (SSPE 2X) y se aumentó la concentración de SDS a 1%; (b) se redujo a 1X la concentración de SSPE y se conservó la concentración de SDS a 0.8%; (c) por último, se redujo la concentración de SSPE a 1X y se aumentó la de SDS a 1%.

Al replicar las condiciones del ensayo de hibridación reversa utilizando ADN de un individuo FF₁₅₃₄/VV₄₁₀/VV₁₀₁₆, a excepción de β-actina y WT-F1534 se obtuvo una menor intensidad de la señal luego de 1 hora de revelado. Debido a esto se decidió extender el revelado a 12 horas, luego de esto se apreciaron bandas inespecíficas al emplear SSPE 2X / SDS 1%, en cambio al reducir el SSPE de 2X a 1X y aumentar el SDS

de 0.5% a 0.8% se obtuvo señal específica para WT-F1534 y WT-V410. Por otra parte, al utilizar SSPE 1X / SDS al 1% se observó inespecificidad en MT-C1534 (figura 18).

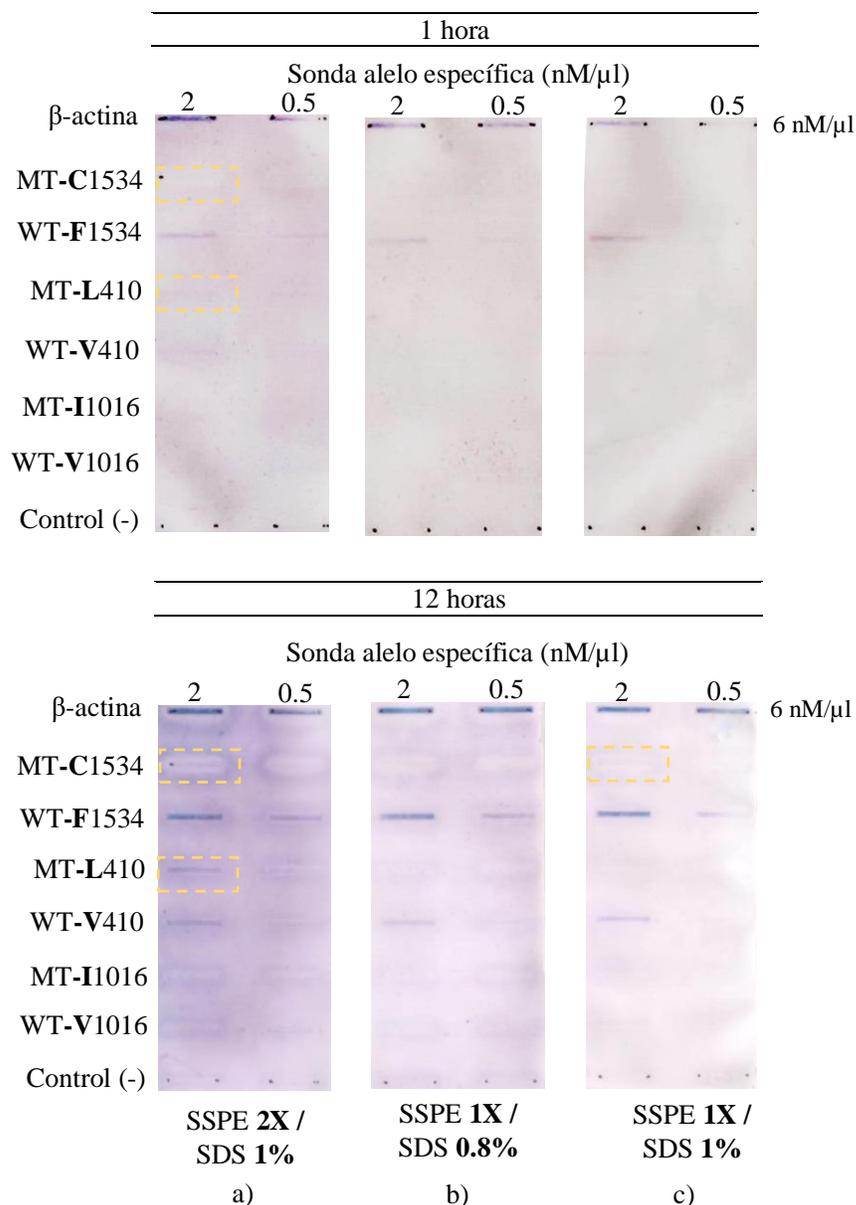


Figura 18.- Ensayo RLB probando distintas concentraciones de buffer de lavado y tiempos de revelado, empleando ADN de un individuo FF₁₅₃₄/VV₁₀₁₆/VV₄₁₀. Se utilizaron las mismas temperaturas y tiempos de hibridación y de lavados post-hibridación y los 3 buffers de lavados empleados en el ensayo anterior. Se presenta el resultado a la 1 hora y a las 12 horas después del revelado con NBT/BCIP.

Considerando los resultados previos obtenidos para individuos FF₁₅₃₄/VV₄₁₀/VV₁₀₁₆ y CC₁₅₃₄/LL₄₁₀/II₁₀₁₆ se establecieron las siguientes concentraciones

de sondas a fijar en la membrana para procesar individuos: WT-F1534 y WT-I1016 a 2 nM/ μ l, MT-C1534 y MT-L410 a 4 nM/ μ l, β -actina a 6 nM/ μ l y WT-V1016 a 8 nM/ μ l.

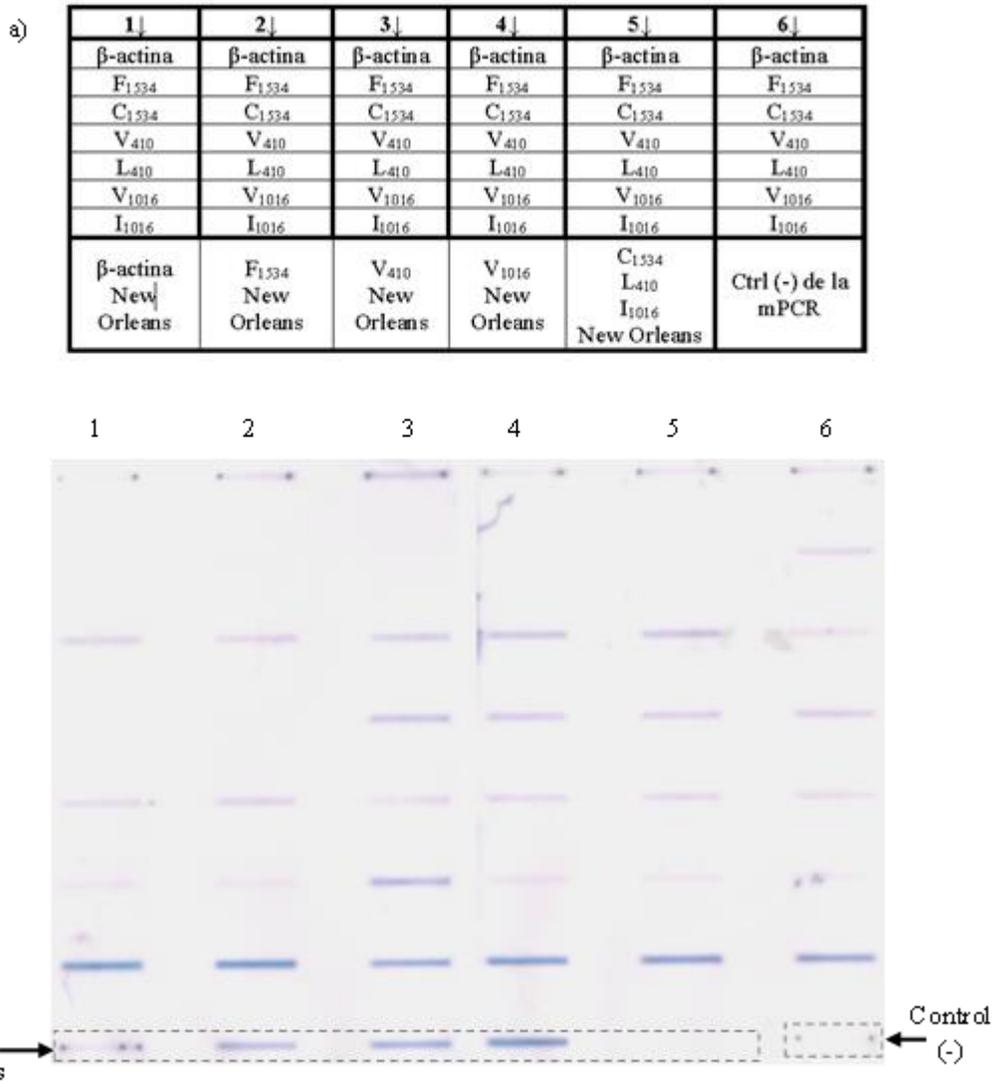


Figura 19.- Distribución de las sondas en la membrana y resultado representativo del ensayo RLB. (a) Distribución de las sondas en la membrana que permite procesar 6 individuos en total, además de un control FF₁₅₃₄/VV₄₁₀/VV₁₀₁₆ (individuo de la cepa New Orleans) y un control negativo. (b) Resultado que muestra la detección de haplotipos de 6 individuos: columna 1 y 2: CC₁₅₃₄/LL₄₁₀/VI₁₀₁₆; columna 3, 4 y 5: CC₁₅₃₄/VL₄₁₀/VI₁₀₁₆; columna 6: FC₁₅₃₄/LL₄₁₀/VI₁₀₁₆.

7.3.- Validación del chip biosensor de ADN

Se seleccionaron 82 individuos de 13 poblaciones que en conjunto presentaron 22 haplotipos (de los 27 posibles) al ser procesados por AS-PCR punto final. De 5 de las 13 poblaciones se seleccionó 1 sólo individuo que mostraba algún haplotipo único, por lo que no se muestran sus frecuencias genotípicas ni haplotipos presentes (tabla 6). En cambio, al ser procesados con el chip biosensor se detectaron solamente 16 haplotipos. En los 6 haplotipos no detectados, 4 discordancias consistieron en la detección de FF₁₅₃₄ con AS-PCR como CC₁₅₃₄ o FC₁₅₃₄ con el chip biosensor. Las otras 2 discordancias consistieron en la detección de LL₄₁₀ como VL₄₁₀ y VV₁₀₁₆ como II₁₀₁₆, con AS-PCR y el chip biosensor respectivamente. Cabe mencionar que 1 de los 6 haplotipos se presentó solamente en 2 individuos y el resto sólo en 1.

Tabla 6.- Frecuencias genotípicas de F1534C, V1016I y V410L de las poblaciones de *Ae. aegypti* de México consideradas para el ensayo mPCR/RLB. Se muestra la cantidad de haplotipos detectados en cada población. *Tomado de Mora-Jasso *et al.* 2019.

Población	n	V1016I			F1534C			V410L			# Haplotipos
		f(SS)	f(RS)	f(RR)	f(SS)	f(RS)	f(RR)	f(SS)	f(RS)	f(RR)	
Poza Rica*	29	0.69	0.24	0.07	0	0	1	0.1	0.24	0.66	6
Cosoleacaque*	27	0.04	0.74	0.22	0	0.37	0.63	0.37	0.48	0.15	6
Minatitlán*	30	0.03	0.07	0.9	0.03	0.37	0.6	0	0.03	0.97	5
La Paz	30	0.2	0.66	0.13	0	0.3	0.7	0.3	0.43	0.26	11
Loreto	30	0.16	0.66	0.16	0	0.43	0.57	0.3	0.53	0.16	10
Muzquiz	30	0.3	0.43	0.26	0.3	0.23	0.73	0.03	0.3	0.66	9
Acuña	30	0.23	0.46	0.3	0.3	0.53	0.43	0.2	0.73	0.06	9

La tabla 7 muestra el porcentaje total de acuerdo entre técnicas para detección de haplotipos. Se presentó concordancia moderada para la detección de haplotipos asociados a los 3 loci de interés, con una concordancia total de 55.6% (k=0.520 IC 95%, 0.394-0.631). La detección de haplotipos asociados a los loci 1534+1016 y 1016+410 presentaron concordancia similar, clasificandose entre moderada y buena (figura 20), mientras que la detección haplotípica en 1534+410 fue buena, con un porcentaje de concordancia total de 75.7% (k=0.703; IC 95% 0.588-0.809).

Tabla 7. Porcentaje total de acuerdo e índice de concordancia kappa entre AS-PCR punto final y el chip biosensor para detección de haplotipos asociados a los loci 1534, 410 y 1016 del vgsc en *Ae. aegypti*.

Haplotipo	%Total de acuerdo	Kappa	IC 95%	
			Inferior	Superior
1534+410	75.7	0.703	0.588	0.809
1534+1016	67.2	0.603	0.481	0.718
1016+410	65.9	0.587	0.460	0.708
1534+410+1016	55.6	0.520	0.394	0.631

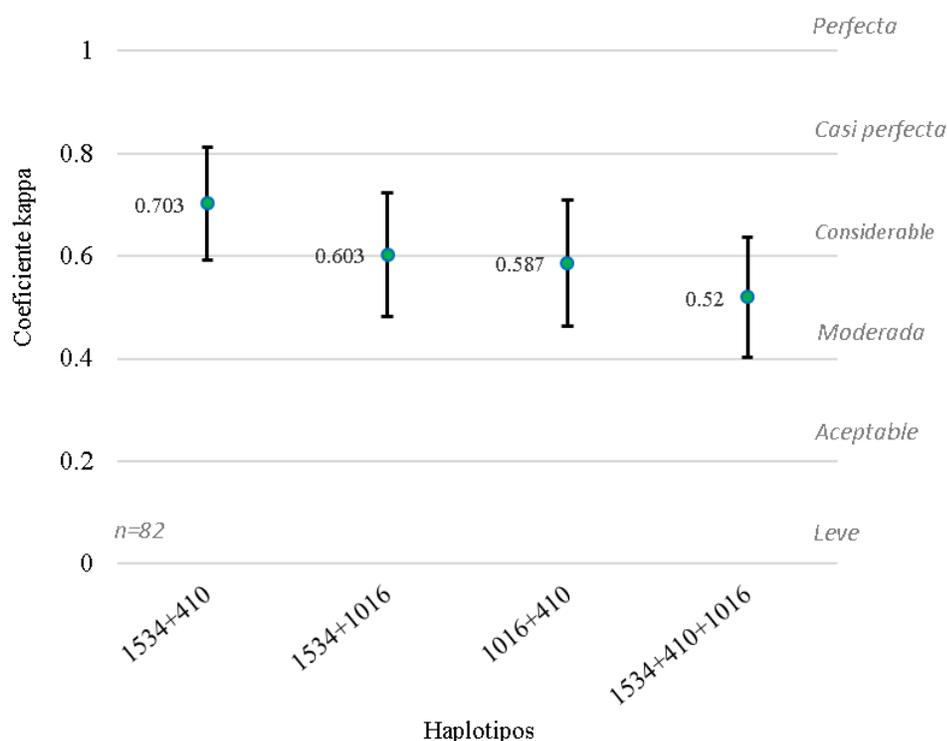


Figura 20.- Interpretación del índice de concordancia kappa entre AS-PCR punto final y el chip biosensor para detección de haplotipos en los loci 1534, 410 y 1016 del vgsc de *Ae. aegypti* de acuerdo con la escala de Landis y Koch (1977).

La tabla 8 muestra el porcentaje total de acuerdo entre técnicas para discriminación de los genotipos individuales homocigotos silvestres (SS), homocigotos mutados (RR) y heterocigotos (RS) en los loci 1534, 410 y 1016. Se observa buena concordancia, siendo mayor para genotipos en el locus 1534 con un porcentaje total de acuerdo de 87.9% ($k=0.789$, IC 95% 0.628-0.888) seguido de 410 con 81.7% ($k=0.718$, IC 95%, 0.580-0.840) y en menor medida para 1016 con 78% ($k=0.663$, IC 95% 0.517-0.791) (tabla 8, figura 21). Cabe destacar que en 5 casos no fue posible detectar alelo alguno utilizando el chip biosensor, correspondiendo a 4 individuos VV_{1016} y 1 individuo VV_{410} .

Tabla 8. Porcentaje total de acuerdo e índice de concordancia kappa entre AS-PCR punto final y el chip biosensor para detección de genotipos individuales SS, SR y RR en los loci 1534, 410 y 1016 del vgsc en *Ae. aegypti*.

Genotipo	% Total de acuerdo	Kappa	IC 95%	
			Inferior	Superior
1534	87.9	0.768	0.628	0.888
410	81.7	0.718	0.580	0.840
1016	78	0.663	0.517	0.791

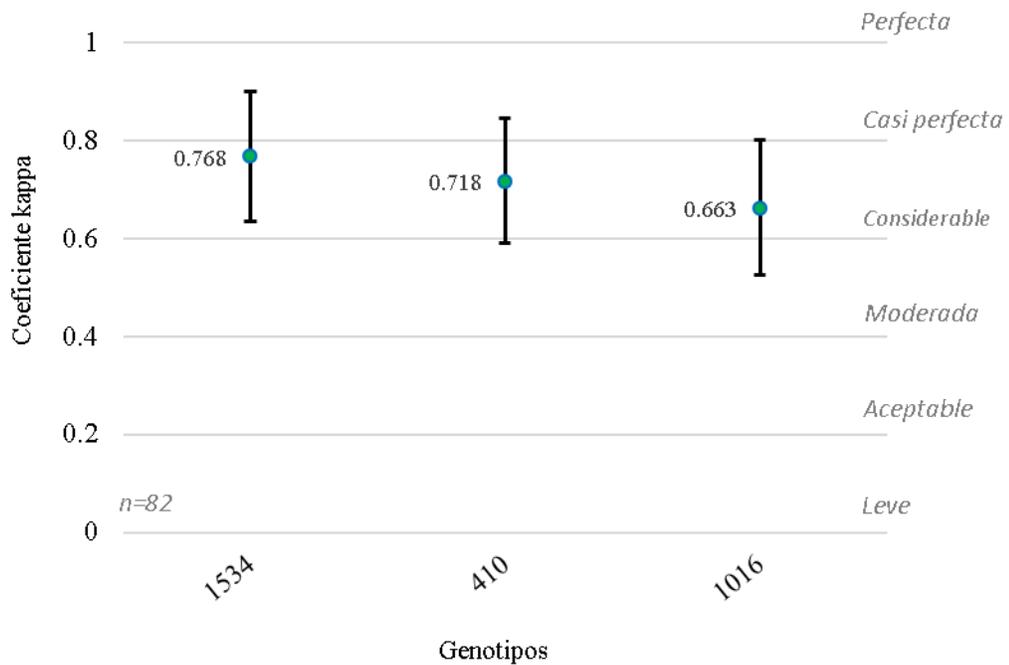


Figura 21.- Interpretación del índice de concordancia kappa entre AS-PCR punto final y el chip biosensor para detección individual de genotipos SS, SR y RR en los loci 1534, 410 y 1016 del vgsc de *Ae. aegypti* de acuerdo con la escala de Landis y Koch (1977).

8.-DISCUSIÓN

La mPCR/RLB es un método que ha demostrado gran versatilidad y ha sido ampliamente recomendado para la detección rápida y simple de mutaciones puntuales (Kong y Gilbert, 2006) que se fundamenta en la hibridación diferencial del ADN blanco con sondas alelo-específicas, debido a la presencia de mismatches dentro de la secuencia, proceso que ocurre sobre una fase sólida (Saiki *et al.* 1989; Schollen *et al.* 1997). En el presente trabajo se estandarizó un ensayo de mPCR/RLB como prototipo de chip biosensor de ADN que detecta de manera simultánea las mutaciones kdr F1534C, V410L y V1016I en *Ae. aegypti*.

La optimización de una mPCR es un proceso complejo, ya que es necesario considerar factores como la T_m , %GC y la concentración de los iniciadores, el buffer de PCR, el balance entre el $MgCl_2$ y los dNTPs, la temperatura de alineamiento y cantidad de ciclos de reacción, así como la cantidad de templado de ADN y la Taq polimerasa a utilizar (Markoulatos *et al.* 2002) Villanueva-Segura *et al.* (2020) resaltan esta complejidad en la estandarización para obtener una amplificación simultánea óptima de F1534C, V410L y V1016I en *Ae. aegypti*. Una opción para facilitar el proceso es el uso de una ADN polimerasa con propiedad hot start, que a pesar de elevar el costo contribuye a reducir la formación de dímeros (Kong y Gilbert, 2006), dicha estrategia ha sido aplicada para facilitar el desarrollo de la mPCR para la detección simultánea de F1534C y V1016G en *Ae. aegypti* (Saingamsook *et al.* 2017). El fundamento de la AS-PCR/ AS-mPCR radica en la capacidad de la ADN polimerasa para elongar iniciadores que son complementarios al templado, permitiendo la discriminación de SNPs debido a la inclusión de uno o más mismatches en posiciones específicas de los iniciadores, dependiendo de las variaciones de la técnica (Kwok, 2001; Ye *et al.* 2001; Medrano y Oliveira, 2014). Cabe mencionar que, a diferencia de estas metodologías, la mPCR que forma parte del prototipo de chip biosensor, utiliza iniciadores totalmente complementarios al templado, dirigidos a amplificar regiones de entre 90 y 232 pb y no a detectar variaciones alélicas.

Para la estandarización de la mPCR, los puntos clave fueron el balance de reactivos en el buffer de reacción, el diseño adecuado de iniciadores y la temperatura de alineamiento (T_A) (Elnifro *et al.* 2000). Respecto al primer punto, se empleó una Taq

polimerasa comercial que contiene glicerol, dNTPs y MgCl₂ en un buffer de reacción a una concentración óptima preestablecida. La concentración de MgCl₂ sólo necesita ser proporcional a los dNTPs, por lo que dichos valores pueden ser constantes para cualquier reacción y en nuestro caso no representan un punto crítico en la estandarización. Además, el uso de glicerol como adyuvante contribuye a relajar las cadenas de ADN, facilitando la desnaturalización del templado y por ende mejorando reacciones de PCR multiplex (Henegariu *et al.* 1997; Markoulatos *et al.* 2002).

Idealmente todos los pares de iniciadores de una mPCR deben tener eficiencia de amplificación similar. Esto se consigue diseñándolos para tener una T_A cercana, considerando rangos de contenido GC de 35% a 60% y longitud de 18 pb a 30 pb, además de evitar secuencias repetitivas o complementarias que favorezcan la interacción entre ellos, y por ende la formación de dímeros y estructuras secundarias (Henegariu *et al.* 1997; Elnifro *et al.* 2000; Kong y Gilbert, 2006; O'Sullivan *et al.* 2011). El uso de iniciadores con un % de GC de entre 41 y 60% y T_m de 52.2 a 61.3°C permitió establecer una T_A de 60°C para amplificar las 4 regiones de manera individual, utilizando una concentración equimolar de iniciadores de 0.2 µM, siendo duplicada para el locus 1016, con el fin de corregir su amplificación deficiente. Si bien, loci individuales pueden ser amplificados utilizando rangos de T_A, se ha observado que es útil reducirla entre 4-6°C para coamplificar esos mismos loci en reacciones multiplex (Henegariu *et al.* 1997; Markoulatos *et al.* 2002). Considerando esto, se redujo la T_A de 60°C a 58.6°C en la amplificación simultánea, con el fin de establecerla en un punto intermedio de las T_m de los iniciadores, obteniendo amplificación adecuada de las 4 regiones de interés. Sin embargo, fue notable la diferencia en la intensidad de señal para el locus 1534 comparado con las otras bandas, la amplificación preferencial de una secuencia blanco sobre otra es un fenómeno común en las PCR multiplex, los loci amplificados con mayor eficiencia influirán negativamente en el rendimiento de producto de los loci menos eficientes (Walsh *et al.* 1992; Polz y Cavanaugh, 1998; Elnifro *et al.* 2000), por lo que, a partir de la obtención de amplificación, las concentraciones de iniciadores se modificaron de manera empírica hasta obtener eficiencias similares (Henegariu *et al.* 1997).

La hibridación reversa constituye el segundo componente del prototipo de chip biosensor. Aunque no hay reglas definidas para el desarrollo de un ensayo de hibridación reversa, existen guías generales que pueden tomarse como punto de partida. El diseño de sondas alelo-específicas representa el primer paso para asegurar la discriminación alélica, en nuestro caso, estas se diseñaron buscando que su T_m fuera cercana a la temperatura de hibridación (T_h) utilizando los mismos criterios que para el diseño de los iniciadores de la mPCR, pero añadiendo un mismatch en el centro, lo que en la mayoría de los casos es suficiente para desestabilizar la formación del dúplex sonda-templado (Kong y Gilbert, 2006; Matson y Rampan, 2007; Gold, 2003). Además de esto, la modificación de la astringencia en la reacción contribuye a aumentar la especificidad de las sondas. El término astringencia se refiere a aquellas condiciones que afectan la asociación de dos cadenas de ADN monocatenario y se ve influenciada por la temperatura y concentración de sales de los buffers utilizados durante la hibridación y los lavados. Los protocolos típicos utilizan un incremento en la temperatura y una reducción de la concentración de sales entre estos pasos para aumentar la astringencia de la reacción (Negritto y Manthey, 2008). En nuestro caso el uso de temperaturas de 77° C y 82° C en la hibridación y lavados, respectivamente y la reducción en la concentración de SSPE 2X a 1X en el buffer de lavado permitió detectar de manera específica todos los alelos de interés al utilizar individuos CC₁₅₃₄/LL₄₁₀/II₁₀₁₆ y FF₁₅₃₄/VV₄₁₀/VV₁₀₁₆. Algunos mismatch desestabilizan el dúplex de ADN más que otros, es el caso para aquellos con G o T. Todas las sondas con excepción de aquella para I1016 presentan un mismatch G o T, lo que podría explicar la necesidad del uso de temperaturas elevadas fuera del rango normalmente utilizado en este tipo de ensayos, que suele ir de 42 a 68°C (Gold, 2003; Matson y Rampan, 2007). Por otra parte, debido a la capacidad del SDS de evitar unión inespecífica causada por interacciones iónicas o hidrofóbicas con sitios en la membrana, el aumentar su concentración en el buffer de lavado de 0.5% a 0.8% y finalmente a 1% mejoró la relación sensibilidad/ruido (Rose *et al.* 2002; Scott *et al.* 2012). Respecto al volumen de buffer utilizado en los lavados post-hibridación Herzer y Englert (2001) recomiendan al menos 2 ml por cada cm² de membrana. En nuestro caso, se obtuvo señal específica al utilizar 50 ml de buffer de lavado en una membrana de 7.5 cm² (~6.6 ml/cm²), pero señal inespecífica en los mismos alelos al aplicar la misma cantidad en una membrana de 24 cm² (~2.08

ml/cm²). Inespecificidad resuelta a la hora de elevar el volumen de buffer a 150 ml (~6.25ml/cm²).

El método de revelado puede influir en la sensibilidad del experimento. En un inicio los resultados de ensayos de Southern blot, Slot/Dot blot y de hibridación reversa eran visualizados a través de sondas marcadas con isotopos radioactivos. En la actualidad, los métodos más utilizados son la detección colorimétrica y por quimioluminiscencia, pues ofrecen mayor seguridad, estabilidad y vida de anaquel. Ambos métodos requieren que la muestra tenga un marcaje, aunque existe una gran variedad de moléculas que pueden ser utilizadas, las dos más comunes son la biotina o digoxigenina (DIG). La visualización colorimétrica puede realizarse por inmunofluorescencia indirecta o por conjugación con un fluorocromo o enzima para producir un precipitado con color. En cambio, la detección por quimioluminiscencia se basa en la escisión de un sustrato quimioluminiscente de dioxetano por el conjugado con fosfatasa alcalina (Boyle y Perry-O'Keefe, 1992; Podzorski *et al.* 2006). En nuestro caso, para el revelado de resultados se emplea un marcaje con biotina, que actúa como cofactor enzimático de la estreptavidina, formando una unión irreversible bajo la mayoría de las condiciones experimentales (Haushalter, 2008). El conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina reacciona con el sustrato NBT/BCIP (cloruro de nitroblue tetrazolium/ 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) produciendo un precipitado morado (Smejkal y Kaul 2001). Aunque el uso de NBT/BCIP en membranas de nylon y concentraciones altas de sondas puede producir señal inespecífica alrededor de la membrana, el uso de agentes bloqueadores como una mayor concentración de SDS puede mitigar este problema (Chard y Work, 1987; Rose *et al.* 2002). La detección colorimétrica tiene la ventaja de no requerir equipo adicional para su revelado, haciéndola atractiva y accesible para aplicaciones diagnosticas. Sin embargo, la detección por quimioluminiscencia es más sensible y facilita la reutilización de las membranas, por lo que representa una alternativa al método de revelado utilizado en este trabajo (Perry-O'Keefe y Kissinger; 1994).

La versatilidad del ensayo de hibridación reversa permite adaptar algunos pasos de la metodología para continuar optimizando la metodología, ejemplo de esto es la modificación del método de fijación de sondas utilizando membranas de nylon con carga

positiva (Hybond N+®) en lugar de membranas de nylon con carga negativa (Biodyne C®), empleando sondas de iniciadores con colas de poli-dT e inmovilizándolas aplicando luz UV en lugar de sondas marcadas con grupos amino inmovilizadas a través de métodos químicos (Yasmin *et al.* 2018). Además de la modificación en los pasos de fijación de sondas, otra alternativa que podría mejorar el rendimiento en tiempo y costo es el uso de otras plataformas para distribuir las muestras y realizar el proceso de hibridación. En nuestro caso, el aparato de microfiltración Bio-Dot BioRad SF permitió procesar 6 individuos y los respectivos controles para detectar 6 variantes alélicas, siendo útil para la escala de este trabajo, donde parte del objetivo fue la estandarización del proceso. En cambio, las plataformas con mayor rendimiento a la hora de procesar muestras incluyen equipos como HybriMax®, Auto-LiPA™ y Auto-LiPA™ 48 que automatizan los pasos de lavados y el cambio en temperaturas, reduciendo la cantidad de tiempo y reactivos necesarios para la hibridación reversa (Lebrun *et al.* 2003; Alina *et al.* 2020; Uribe-Noguez *et al.* 2020). Sin embargo, estos se presentan como parte de kits comerciales que incluyen membranas prediseñadas con las sondas ya fijadas y con características específicas para la conformación de dichos equipos. Considerando la necesidad de pasos de optimización adicionales, en nuestro caso una mejor alternativa sería el uso del aparato Miniblotter Immunetics, el cual, en los últimos años ha sido ampliamente utilizado para realizar ensayos de hibridación reversa (Kong y Gilbert *et al.* 2006; O'Sullivan *et al.* 2011; Yasmin *et al.* 2018), ya que permite procesar hasta 45 muestras a la vez, no requiere de la aplicación de vacío y está conformado por canales que permiten una hibridación en formato checkboard en lugar de pozos que requieren inoculaciones individuales de las muestras (Giorgio *et al.* 2018).

Para resaltar la potencial contribución del prototipo de chip biosensor a los programas de manejo de resistencia en mosquitos es necesario considerar las limitaciones de las técnicas estándar aplicadas de manera rutinaria para el monitoreo de resistencia, la co-ocurrencia de múltiples mutaciones *kdr* y la influencia de mecanismos de resistencia adicionales. En primer lugar, el monitoreo de cambios en la susceptibilidad a plaguicidas, en particular a piretroides, se ha realizado de manera rutinaria a través de bioensayos en botella del CDC o bioensayos en cilindro de la OMS (Elamathi *et al.* 2014). No obstante, aunque estos son efectivos para detectar la prevalencia o el nivel de fenotipos resistentes,

no identifican los mecanismos de resistencia asociados. Estos usualmente detectan la resistencia a piretroides cuando la frecuencia de los alelos mutados involucrados es alta, en especial si la resistencia conferida se presenta como característica recesiva, como en el caso de las mutaciones *kdr* (Flores et al. 2014; Dusfour et al. 2019). Respecto al segundo punto, las 3 mutaciones *kdr* analizadas en este trabajo se han encontrado co-ocurriendo como V410L+F1534C o V410L+V1016I+F1534C (Haddi *et al.* 2017; Granada *et al.* 2018, Saavedra-Rodríguez *et al.* 2018; Villanueva-Segura *et al.* 2020), sin embargo, la presencia de V410 y V1016I se ha limitado a América, mientras que F1534C se ha encontrado distribuida a nivel mundial, co-ocurriendo como F1534C+V1016G, S989P+V1016G+F1534C (Kawada *et al.* 2014), T520I+F1534C (Kushwah *et al.* 2015) y F367I+T1520I+F1534C (Fan *et al.* 2020). Por último, la resistencia metabólica es otro de los principales mecanismos involucrados en la resistencia a piretroides en *Ae. aegypti*, sin embargo, el monitoreo de este mecanismo suele realizarse a través de estudios de expresión génica ya que el monitoreo de la dinámica de alelos resistentes involucrados se ha visto limitado por la ausencia de marcadores moleculares robustos. Recientemente y gracias a las técnicas de secuenciación de última generación se han detectado patrones de mutaciones no sinónimas en genes que codifican para enzimas desintoxicantes en colonias de laboratorio de *Ae. aegypti* seleccionadas con deltametrina, planteando que estas podrían estar o no asociadas funcionalmente a la resistencia metabólica, considerándolas como potenciales marcadores moleculares (Faucon *et al.* 2017; Dusfour *et al.* 2019). Considerando lo anterior, el prototipo de chip biosensor puede ser adaptado para detectar de manera general y rutinaria la presencia de mutaciones *kdr* presentes a bajas frecuencias en las poblaciones, complementando la aplicación de bioensayos. Además, su adaptabilidad y versatilidad permite optimizarlo para la detección simultánea de otras mutaciones *kdr* que coocuran en otras regiones geográficas, así como para la detección de variantes alélicas adicionales una vez que sean elucidados nuevos marcadores moleculares asociados a la resistencia.

El ensayo de hibridación reversa deriva de la técnica de PCR-Dot/Slot Blot y dadas las similitudes de requerimientos en equipo y reactivos, este último representa también una opción potencial como método para monitoreo *kdr* que cumpla con algunas de las necesidades previamente mencionadas. La PCR- Dot/Slot Blot ha destacado por su

capacidad de procesamiento de muestras, bajo costo y resultados de detección aceptables. En este método, de manera general, se inmoviliza el ADN de interés en un soporte sólido, usualmente membranas de nylon cargadas positivamente, que a su vez son incubadas en una solución que contiene sondas alelo-específicas marcadas con biotina u otra molécula (Matson y Rampan, 2007). Al ser utilizado para detectar 1014S, 1014L y 1014F en especies de *Anopheles*, mostró sensibilidad y especificidad similar a la obtenida por AS-PCR punto final, contando con la capacidad de procesar hasta 150 muestras en 16-18 horas (Bass *et al.* 2007). Rodríguez-Servín *et al.* (2020) estandarizó las condiciones de este ensayo para la detección de F1534C, V410L y V1016I, reduciendo el tiempo de procesamiento a ~7-10 horas, obteniendo además valores de concordancia moderada respecto al ensayo de AS-PCR punto final (índice de concordancia Kappa de 0.450-0.570) para la detección de alelos silvestres y mutados. En nuestro caso, al comparar los resultados obtenidos con el chip biosensor con los obtenidos por AS-PCR punto final se observó concordancia entre moderada y casi perfecta para la detección de alelos (índice de concordancia Kappa de 0.552-0.772), concordancia entre moderada y considerable para la detección de haplotipos en 2 o 3 loci (índice de concordancia Kappa de 0.520-0.703), y concordancia entre considerable y casi perfecta para la detección de genotipos homocigotos silvestres, homocigotos mutados y heterocigotos (índice de concordancia Kappa de 0.663-0.768).

En este trabajo la AS-PCR punto final es considerada el estándar debido a que es una de las técnicas más utilizadas para la detección y estudio de frecuencias de mutaciones *kdr* en *Ae. aegypti* (Bass *et al.* 2007; Unwin *et al.* 2018), no obstante, es necesario establecer la validez (incluyendo sensibilidad y especificidad) del ensayo a través de la comparación con una técnica estándar, usualmente la prueba diagnóstica más compleja y rigurosa (González y Castán, 2007), que en nuestro caso sería el ensayo de secuenciación. Oh *et al.* (2018) reportan concordancia perfecta ($k=1.00$) entre el ensayo mPCR/hibridación reversa y secuenciación para la detección de 18 variantes alélicas en el cromosoma Y. Por otra parte, Wan *et al.* (2020) reportan concordancia de 93.4% a 99.1% entre ambas técnicas con valores kappa de 0.85 a 0.96 para la detección de variantes alélicas involucradas en la resistencia a 4 fármacos en *M. tuberculosis*. En ambos casos

resaltando la concordancia elevada entre ensayos de mPCR/hibridación reversa y secuenciación para la detección de mutaciones puntuales.

9.-CONCLUSIONES

El chip biosensor que utiliza sondas alelo-específicas fijadas sobre membranas comerciales de nylon (Biodyne C) y productos de amplificación por PCR multiplex de regiones del canal de sodio dependiente de voltaje donde se presentan las mutaciones kdr F1534C, V410L y V1016I, permite la detección eficiente de haplotipos en 1534/410 y moderadamente eficiente de haplotipos en 1534/1016, 1016/410 y en 1534/410/1016 (valores de concordancia kappa de 0.703, 0.603, 0.587 y 0.52 respectivamente). Además, el chip muestra eficiencia considerable para la discriminación de genotipos homocigotos mutados, homocigotos silvestres y heterocigotos en los loci 1534, 410 y 1016 (valores kappa entre 0.663-0.768) en mosquitos *Aedes aegypti* de México.

10.- PERSPECTIVAS

El prototipo de chip biosensor requiere de optimización adicional para acoplarlo a plataformas de microfiltración que permitan aumentar la cantidad de muestras que pueden ser procesadas por ensayo. Una vez conseguido esto y considerando que al cambiar el tipo de equipo se modifica también la cantidad de reactivos empleados, es fundamental realizar un análisis de costos que permita una mejor comparación con métodos moleculares estandarizados previamente con el mismo propósito, por ejemplo, la AS-mPCR o ensayos de qPCR. Además, aunque la validación del chip biosensor comparando los resultados con aquellos obtenidos por AS-PCR ofrece una referencia adecuada sobre su capacidad para detectar mutaciones kdr en *Ae. aegypti* se requiere secuenciar individuos procesados para determinar medidas de validez como sensibilidad y especificidad. Por último, las condiciones utilizadas en el ensayo mPCR/RLB serán patentadas con la finalidad de proteger el potencial comercial del ensayo.

11.- BIBLIOGRAFÍA

- Agresti, A, Coull, B. A. 1998. Approximate is better than “exact” for interval estimation of binomial proportions. *The American Statistician*, 52(2), 119-126.
- Aguirre-Obando, O. A., Bona, A. C. D., Duque, L., Jonny, E., y Navarro-Silva, M. A. 2015. Insecticide resistance and genetic variability in natural populations of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) from Colombia. *Zoologia (Curitiba)*, 32(1), 14-22.
- Alina, M. F., Azma, R. Z., Norunaluwar, J., Azlin, I., Darnina, A. J., Cheah, F. C., y Ainoon, O. 2020. Genotyping of Malaysian G6PD-deficient neonates by reverse dot blot flow-through hybridisation. *Journal of human genetics*, 65(3), 263-270.
- Al Nazawi, A. M., Aqili, J., Alzahrani, M., McCall, P. J., y Weetman, D. 2017. Combined target site (kdr) mutations play a primary role in highly pyrethroid resistant phenotypes of *Aedes aegypti* from Saudi Arabia.
- Álvarez, G., Ponce, G., Oviedo, M., Briceno, A., & Flores, S. 2014. Mechanisms associated with knockdown resistance to deltamethrin in *Aedes aegypti* from western Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 54(1), 58-67.
- Álvarez, L. C., Ponce, G., Saavedra-Rodriguez, K., Lopez, B., y Flores, A. E. 2015. Frequency of V1016I and F1534C mutations in the voltage-gated sodium channel gene in *Aedes aegypti* in Venezuela. *Pest management science*, 71(6), 863-869.
- Aponte, H. A., Penilla, R. P., Dzul-Manzanilla, F., Che-Mendoza, A., López, A. D., Solis, F., y Rodríguez, A. D. 2013. The pyrethroid resistance status and mechanisms in *Aedes aegypti* from the Guerrero state, Mexico. *Pesticide biochemistry and physiology*, 107(2), 226-234.
- Atencia, M. C., Pérez, M. D. J., Jaramillo, M. C., Caldera, S. M., Cochero, S., y Bejarano, E. E. 2016. First report of the F1534C mutation associated with cross-resistance to DDT and pyrethroids in *Aedes aegypti* from Colombia. *Biomedica*, 36(3), 432-437.

- Bai, L., Zhu, G. D., Zhou, H. Y., Tang, J. X., Li, J. L., Xu, S., y Zhang, H. W. 2014. Development and application of an AllGlo probe-based qPCR assay for detecting knockdown resistance (kdr) mutations in *Anopheles sinensis*. *Malaria journal*, 13(1), 379.
- Bass, C., Nikou, D., Donnelly, M. J., Williamson, M. S., Ranson, H., Ball, A., y Field, L. M. 2007. Detection of knockdown resistance (kdr) mutations in *Anopheles gambiae*: a comparison of two new high-throughput assays with existing methods. *Malaria Journal*, 6(1), 111.
- Bariami, V., Jones, C. M., Poupardin, R., Vontas, J., y Ranson, H. 2012. Gene amplification, ABC transporters and cytochrome P450s: unraveling the molecular basis of pyrethroid resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(6), e1692.
- Barnes, J. M., y Verschoyle, R. D. 1974. Toxicity of new pyrethroid insecticide. *Nature*, 248.
- Bisset, J. A. 2002. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 54(3), 202-219.
- Boyle, A., y Perry-O'Keefe, H. 1992. Labeling and colorimetric detection of nonisotopic probes. *Current protocols in molecular biology*, 20(1), 3-18.
- Bloomquist, J. R., y Miller, T. A. 1986. Sodium channel neurotoxins as probes of the knockdown resistance mechanism. *Neurotoxicology*, 7(1), 217-223.
- Brattsten, L. 1989. Insecticide resistance: Research and management. *Pesticide Science*, 26(4), pp.329-332.
- Bregues, C., Hawkes, N. J., Chandre, F., McCarroll, L., Duchon, S., Guillet, P., y Hemingway, J. 2003. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Medical and veterinary entomology*, 17(1), 87-94.
- Brown, A. W. A., y Pal, P. 1971. The nature and characterization of resistance. AWA Brown, K Pal, *Insecticide resistance in arthropods, Monograph Series*, 38, 9-44.

- Bunschoten, A., Tiemersma, E., Schouls, L., y Kampman, E. 2000. Simultaneous determination of polymorphism in N-acetyltransferase 1 and 2 genes by reverse line blot hybridization. *Analytical biochemistry*, 285(1), 156-162.
- Busvine, J. R. (1951). Mechanism of resistance to insecticide in houseflies. *Nature*, 168(4266), 193-195.
- Cao, K., Chopek, M., y Fernandez-Vina, M. A. 1999. High and intermediate resolution DNA typing systems for class I HLA-A, B, C genes by hybridization with sequence-specific oligonucleotide probes (SSOP). *Reviews in immunogenetics*, 1(2), 177-208.
- Carvalho, F. D., y Moreira, L. A. 2017. Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so Successful as a Species?. *Neotropical entomology*, 46(3), 243-255.
- Chang, C., Shen, W. K., Wang, T. T., Lin, Y. H., Hsu, E. L., y Dai, S. M. 2009. A novel amino acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with knockdown resistance to permethrin in *Aedes aegypti*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 39(4), 272-278.
- Chapadense, F. G. G., Fernandes, E. K. K., Lima, J. B. P., Martins, A. J., Silva, L. C., Rocha, W. T. D., y Cravo, P. 2015. Phenotypic and genotypic profile of pyrethroid resistance in populations of the mosquito *Aedes aegypti* from Goiania, Central West Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48(5), 607-609.
- Chard, T., Work, T. S., y Work, E. 1987. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Elsevier, Amsterdam.
- Choi, K. S., Spillings, B. L., Coetzee, M., Hunt, R. H., y Koekemoer, L. L. 2010. A comparison of DNA sequencing and the hydrolysis probe analysis (TaqMan assay) for knockdown resistance (kdr) mutations in *Anopheles gambiae* from the Republic of the Congo. *Malaria journal*, 9(1), 278.
- Clements, A. 1992. *The biology of mosquitoes, Vol. 1: Development, Structure and Reproduction*. Wallingford: CABI Publishing.

- Cleton, N., Koopmans, M., Reimerink, J., Godeke, G. J., y Reusken, C. 2012). Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. *Journal of Clinical Virology*, 55(3), 191-203.
- Coen, E., Strachan, T., & Dover, G. 1982. Dynamics of concerted evolution of ribosomal DNA and histone gene families in the melanogaster species subgroup of *Drosophila*. *Journal of molecular biology*, 158(1), 17-35.
- Collet, M. L., Frizzo, C., Orlandin, E., Rona, L. D., Nascimento, J. C., Montano, M. A., y Wagner, G. 2016. Frequency of the Val1016Ile mutation on the kdr gene in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in south Brazil. *Genet Mol Res*, 15(10.4238).
- Deming, R., Manrique-Saide, P., Barreiro, A. M., Cardeña, E. U. K., Che-Mendoza, A., Jones, B., y Lenhart, A. 2016. Spatial variation of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* presents unique vector control challenges. *Parasites y vectors*, 9(1), 67.
- Dong, K., Du, Y., Rinkevich, F., Nomura, Y., Xu, P., Wang, L., y Zhorov, B. S. 2014. Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect biochemistry and molecular biology*, 50, 1-17.
- Dolabella, S. S., Santos, R. L. C., Silva, M. C. N., Steffler, L. M., Ribolla, P. E. M., Cavalcanti, S. C. H., y Martins, A. J. 2016. Detection and Distribution of V1016I kdr Mutation in the Voltage-Gated Sodium Channel Gene in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Populations from Sergipe State, Northeast Brazil. *Journal of medical entomology*, 53(4), 967-971.
- Dusfour, I., Vontas, J., David, J. P., Weetman, D., Fonseca, D. M., Corbel, V., y Chandre, F. 2019. Management of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses: Advances and challenges. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(10).
- Du, Y., Nomura, Y., Satar, G., Hu, Z., Nauen, R., He, S. Y., y Dong, K. 2013. Molecular evidence for dual pyrethroid-receptor sites on a mosquito sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(29), 11785-11790.

- Du, Y., Nomura, Y., Zhorov, B., y Dong, K. 2016. Sodium channel mutations and pyrethroid resistance in *Aedes aegypti*. *Insects*, 7(4), 60.
- Elamathi, N., Barik, T. K., Verma, V., Velamuri, P. S., Bhatt, R. M., Sharma, S. K., y Raghavendra, K. 2014. Standardization of a bottle assay—an indigenous method for laboratory and field monitoring of insecticide resistance and comparison with WHO adult susceptibility test. *Parasitology research*, 113(10), 3859-3866.
- Elliot, M. 1995. Chemicals in insect control. In “Pyrethrum flowers: Production, Chemistry, Toxicology, and Uses” (J.E. Casida and G.B. Quistad, eds.). Oxford University Press, New York: 3-31.
- Elliot, M., Farnham, A.W., Janes, N.F., Soderlund, D.M. 1978. Insecticidal activity of the pyrethrins and related compounds. Part XI. Relative potencies of isomeric cyano-substituted 3-pehnoxybenzyl esters. *Pesticide. Science*, 9: 112–116.
- Elnifro, E. M., Ashshi, A. M., Cooper, R. J., & Klapper, P. E. 2000. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clinical microbiology reviews*, 13(4), 559-570.
- Fan, Y., O'Grady, P., Yoshimizu, M., Ponlawat, A., Kaufman, P. E., y Scott, J. G. 2020. Evidence for both sequential mutations and recombination in the evolution of kdr alleles in *Aedes aegypti*. *PLoS neglected tropical diseases*, 14(4), e0008154.
- Farnham, A. W., Murray, A. W., Sawicki, R. M., Denholm, I., y White, J. C. 1987. Characterization of the structure-activity relationship of kdr and two variants of super-kdr to pyrethroids in the housefly (*Musca domestica* L.). *Pesticide science*, 19(3), 209-220.
- Faucon, F., Gaude, T., Dusfour, I., Navratil, V., Corbel, V., Juntarajumnong, W., y David, J. P. 2017. In the hunt for genomic markers of metabolic resistance to pyrethroids in the mosquito *Aedes aegypti*: An integrated next-generation sequencing approach. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(4), e0005526.
- Flores, A. E., Grajales, J. S., Salas, I. F., Garcia, G. P., Becerra, M. H. L., Lozano, S., y Beaty, B. 2006. Mechanisms of insecticide resistance in field populations of

- Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern Mexico. Journal of the American Mosquito Control Association, 22(4), 672-678.
- Flores, A. E. 2014. Detección de resistencia a insecticidas en mosquitos con énfasis en *Aedes aegypti*. Artrópodos y Salud, 1(2), 21-36.
- Francis, S., Saavedra-Rodriguez, K., Perera, R., Paine, M., Black IV, W. C., y Delgoda, R. 2017. Insecticide resistance to permethrin and malathion and associated mechanisms in *Aedes aegypti* mosquitoes from St. Andrew Jamaica. PloS one, 12(6), e0179673.
- Gammon, D. W., Brown, M. A., y Casida, J. E. 1981. Two classes of pyrethroid action in the cockroach. Pesticide Biochemistry and Physiology, 15(2), 181-191.
- Gil, D. C. Q., Benítez, J. E. O., y Gutiérrez, M. M. 2012. Competencia vectorial: consideraciones entomológicas y su influencia sobre la epidemiología del Dengue. Iatreia, 23(2), 146-156.
- Giorgio, R. 2018. The use of reverse line-blot hybridization for the detection of Trichostrongylid nematodes in small ruminants. Cornell University.
- Goindin, D., Delannay, C., Gelasse, A., Ramdini, C., Gaude, T., Faucon, F., y Fouque, F. 2017. Levels of insecticide resistance to deltamethrin, malathion, and temephos, and associated mechanisms in *Aedes aegypti* mosquitoes from the Guadeloupe and Saint Martin islands (French West Indies). Infectious diseases of poverty, 6(1), 38.
- Gold, B. 2003. Origin and utility of the reverse dot-blot. Expert review of molecular diagnostics, 3(2), 143-152.
- González, C. G., y Castán, J. P. 2007. Capítulo 8: Pruebas diagnósticas. Concordancia. SEMERGEN-Medicina de Familia, 33(10), 509-519.
- Gordon, J. A. 1988. Mixed strategies in health education and community participation: an evaluation of dengue control in the Dominican Republic. Health Education Research, 3(4), 399-420.

- Granada, Y., Mejía-Jaramillo, A., Strode, C., y Triana-Chavez, O. 2018. A Point Mutation V419L in the Sodium Channel Gene from Natural Populations of *Aedes aegypti* Is Involved in Resistance to λ -Cyhalothrin in Colombia. *Insects*, 9(1), 23.
- Haddi, K., Tomé, H. V., Du, Y., Valbon, W. R., Nomura, Y., Martins, G. F., y Oliveira, E. E. 2017. Detection of a new pyrethroid resistance mutation (V410L) in the sodium channel of *Aedes aegypti*: a potential challenge for mosquito control. *Scientific reports*, 7, 46549.
- Haushalter, K. A. 2008. Labeling DNA and preparing probes. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, (1), 8-4.
- Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H., y Vogt, P. H. 1997. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*, 23(3), 504-511.
- Henry-Halldin, C. N., Nadesakumaran, K., Keven, J. B., Zimmerman, A. M., Siba, P., Mueller, I., y Zimmerman, P. A. 2012. Multiplex assay for species identification and monitoring of insecticide resistance in *Anopheles punctulatus* group populations of Papua New Guinea. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 86(1), 140-151.
- Herzer, S., y Englert, D. F. 2001. Nucleic acid hybridization. *Molecular Biology Problem Solver: A Laboratory Guide*, 399.
- Icaza, J. T. 2003. El mosquito *Aedes aegypti* y el dengue en México. México: Bayer [Bayer Environmental Science] pp17-26.
- Ingles, P.J., Adams, P.M., Knipple, D.C., Soderlund, D.M., 1996. Characterization of voltage-sensitive sodium channel gene coding sequences from insecticide-susceptible and knockdown-resistant house fly strains. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 319–326
- Ishak, I. H., Jaal, Z., Ranson, H., y Wondji, C. 2015. Contrasting patterns of insecticide resistance and knockdown resistance (kdr) in the dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Malaysia. *Parasites y Vectors*, 8, e181.

- Kaufhold, A., Podbielski, A., Baumgarten, G., Blokpoel, M., Top, J., y Schouls, L. 1994). Rapid typing of group A streptococci by the use of DNA amplification and non-radioactive allele-specific oligonucleotide probes. *FEMS microbiology letters*, 119(1-2), 19-25.
- Kawada, H., Higa, Y., Komagata, O., Kasai, S., Tomita, T., Yen, N. T., y Takagi, M. 2009. Widespread distribution of a newly found point mutation in voltage-gated sodium channel in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* populations in Vietnam. *PLoS neglected tropical diseases*, 3(10), e527.
- Kawada, H., O, S. Z. M., Thaug, S., Kawashima, E., Maung, Y. N. M., Thu, H. M., y Minakawa, N. 2014. Co-occurrence of point mutations in the voltage-gated sodium channel of pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* populations in Myanmar. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(7), e3032.
- Kawada, H., Higa, Y., Futami, K., Muranami, Y., Kawashima, E., Osei, J. H., ... y Ohta, N. 2016. Discovery of point mutations in the voltage-gated sodium channel from African *Aedes aegypti* populations: potential phylogenetic reasons for gene introgression. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(6), e0004780.
- Kliot, A. and Ghanim, M. 2012. Fitness costs associated with insecticide resistance. *Pest Management Science*, 68(11), pp.1431-1437.
- Kolaczinski, J. H., Fanello, C., Hervé, J. P., Conway, D. J., Carnevale, P., y Curtis, C. F. 2000. Experimental and molecular genetic analysis of the impact of pyrethroid and non-pyrethroid insecticide impregnated bednets for mosquito control in an area of pyrethroid resistance. *Bulletin of entomological research*, 90(2), 125-132.
- Kong, F., y Gilbert, G. L. 2006. Multiplex PCR-based reverse line blot hybridization assay (mPCR/RLB)—a practical epidemiological and diagnostic tool. *Nature protocols*, 1(6), 2668.
- Kulkarni, M. A., Rowland, M., Alifrangis, M., Mosha, F. W., Matowo, J., Malima, R., y Salanti, A. 2006. Occurrence of the leucine-to-phenylalanine knockdown resistance (kdr) mutation in *Anopheles arabiensis* populations in Tanzania,

- detected by a simplified high-throughput SSOP-ELISA method. *Malaria Journal*, 5(1), 56.
- Kushwah, R. B. S., Dykes, C. L., Kapoor, N., Adak, T., y Singh, O. P. 2015. Pyrethroid-resistance and presence of two knockdown resistance (kdr) mutations, F1534C and a novel mutation T1520I, in Indian *Aedes aegypti*. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(1), e3332.
- Kushwah, R. B. S., Kaur, T., Dykes, C. L., Kumar, R. H., Kapoor, N., y Singh, O. P. 2019. A new knockdown resistance (kdr) mutation F1534L in *Aedes aegypti* associated with insecticide resistance. *bioRxiv*, 740829.
- Kwok, P. Y. 2001. Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Annual review of genomics and human genetics*, 2(1), 235-258.
- Lagunes TA, Villanueva JAiménez. 1994. *Toxicología y manejo de insecticidas*. Colegio de Postgraduados. México. 264 pp.
- Lawrence LJ, Casida JE 1982 Pyrethroid toxicology: mouse intracerebral structure-toxicity relationships. *Pestic Biochem Physiol* 18:9–14.
- Lebrun, L., Gönüllü, N., Boutros, N., Davoust, A., Guibert, M., Ingrand, D., y Doucet-Populaire, F. 2003. Use of INNO-LIPA assay for rapid identification of mycobacteria. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 46(2), 151-153.
- Li, C. X., Kaufman, P. E., Xue, R. D., Zhao, M. H., Wang, G., Yan, T., y Zhang, H. D. 2015. Relationship between insecticide resistance and kdr mutations in the dengue vector *Aedes aegypti* in Southern China. *Parasites & vectors*, 8(1), 325.
- Lien, N. T. K., Ngoc, N. T. H., Hien, N. T., Hoang, N. H., y Binh, N. T. H. 2018. Two novel mutations in the voltage-gated sodium channel associated with knockdown resistance (kdr) in the dengue vector *Aedes aegypti* in Vietnam. *Journal of Vector Ecology*, 43(1), 184-189.
- Liew, M., Pryor, R., Palais, R., Meadows, C., Erali, M., Lyon, E., y Wittwer, C. 2004. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clinical chemistry*, 50(7), 1156-1164.

- Lin, Y. H., Tsen, W. L., Tien, N. Y., y Luo, Y. P. 2013. Biochemical and molecular analyses to determine pyrethroid resistance in *Aedes aegypti*. *Pesticide biochemistry and physiology*, 107(2), 266-276.
- Linns, J. G. B., Brito, L. P., Garcia, G. A., Araki, A. S., Bruno, R. V., Lima, J. B. P., y Martins, A. J. 2014. Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. *Parasites y vectors*, 7(1), 25.
- Lima, E. P., Paiva, M. H. S., de Araújo, A. P., da Silva, É. V. G., da Silva, U. M., de Oliveira, L. N., y Wilding, C. S. 2011. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasites & vectors*, 4(1), 5.
- Lopez-Monroy, B., Gutierrez-Rodriguez, S. M., Villanueva-Segura, O. K., Ponce-Garcia, G., Morales-Forcada, F., Alvarez, L. C., y Flores, A. E. 2018. Frequency and intensity of pyrethroid resistance through the CDC bottle bioassay and their association with the frequency of kdr mutations in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Mexico. *Pest management science*, 74(9), 2176-2184.
- Loughney, K., Kreber, R., y Ganetzky, B. 1989. Molecular analysis of the para locus, a sodium channel gene in *Drosophila*. *Cell*, 58(6), 1143-1154.
- Lund, A. E., and Narahashi, T. 1983. Kinetics of sodium channel modification as the basis for the variation in the nerve membrane effects of
- Lynd, A., Ranson, H., McCall, P. J., Randle, N. P., Black, W. C., Walker, E. D., y Donnelly, M. J. 2005. A simplified high-throughput method for pyrethroid knock-down resistance (kdr) detection in *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*, 4(1), 16.
- Narahashi, T., Ginsburg, K. S., Nagata, K., Song, J. H., y Tatebayashi, H. 1998. Ion channels as targets for insecticides. *Neurotoxicology*, 19(4-5), 581-590.
- Nkya, T., Akhouayri, I., Kisinza, W. and David, J. 2013. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: Facts, evidences and prospects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(4), pp.407-416.

- Nelson, M. J. 1986. *Aedes aegypti*: Biology and ecology. Pan-American Health Organization. Washington, D.C.
- Negritto, M. C., y Manthey, G. M. 2008. Overview of Blotting. Current Protocols Essential Laboratory Techniques, (1), 8-1.
- Norma Oficial Mexicana 2014. NOM-032-SSA-2-2014 para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector (DOF 21 julio del 2003). Norma Oficial Mexicana, Ciudad de México.
- Maestre-Serrano, R., Gomez-Camargo, D., Ponce-Garcia, G., y Flores, A. E. 2014. Susceptibility to insecticides and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from the Colombian Caribbean Region. Pesticide biochemistry and physiology, 116, 63-73.
- Marcombe, S., Mathieu, R. B., Pocquet, N., Riaz, M. A., Poupardin, R., Sélior, S., y David, J. P. 2012. Insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors. PloS one, 7(2), e30989.
- Markoulatos, P., Siafakas, N., y Moncany, M. 2002. Múltiple polymerase chain reaction: a practical approach. Journal of clinical laboratory analysis, 16(1), 47-51.
- Martínez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M. S., Darriet, F., Berge, J. B., Devonshire, A. L., y Pauron, D. 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* ss. Insect molecular biology, 7(2), 179-184.
- Martins, W. F. S., Pereira, B. N. S., Alves, A. T. V., Murphy, A., Martins, P. G. S., Weetman, D., y Donnelly, M. J. 2019. Development and application of a tri-allelic PCR assay for screening Vgsc-L1014F kdr mutations associated with pyrethroid and organochlorine resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. Parasites & vectors, 12(1), 232.
- Martins, A. J., y Valle, D. 2012. The pyrethroid knockdown resistance. In Insecticides-Basic and Other Applications. IntechOpen.

- Matson, R. S., y Rampal, J. B. 2007. Hybridization Analysis Using Oligonucleotide Probe Arrays. In *Microarrays* (pp. 279-298). Humana Press.
- Medrano, R. F. V., y de Oliveira, C. A. 2014. Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development. *Molecular biotechnology*, 56(7), 599-608.
- Yasmin, M., Refregier, G., Siddiqui, R. T., Iqbal, R., Abbasi, S. A., y Tahseen, S. 2018. Reverse line probe assay for cheap detection of single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 110, 52-55.
- Milani, R. 1954. Mendelian behavior of resistance to the breakdown action of DDT: correlation between killing and mortality in *Musca domestica* L. *Riv Parasitol*, 15, 513-542.
- Miyazaki, M., Ohyama, K., Dunlap, D.Y., Matsumura, F., 1996. Cloning and sequencing of the para-type sodium channel gene from susceptible and kdr-resistant German cockroaches (*Blattella germanica*) and house fly (*Musca domestica*). *Mol. Gen. Genet.* 252, 61-68.
- Mokrousov, I., Narvskaya, O., Limeschenko, E., Vyazovaya, A., Otten, T., y Vyshnevskiy, B. 2004. Analysis of the allelic diversity of the mycobacterial interspersed repetitive units in *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing family: practical implications and evolutionary considerations. *Journal of clinical microbiology*, 42(6), 2438-2444
- Mora-Jasso, E. J. et al. 2019. Detección múltiple de las mutaciones kdr V410L, V1016I y F1534C en poblaciones de *Aedes aegypti* (L.) resistentes a insecticidas piretroides. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León. México.
- Muthusamy, R., y Shivakumar, M. S. 2015. Involvement of metabolic resistance and F1534C kdr mutation in the pyrethroid resistance mechanisms of *Aedes aegypti* in India. *Acta tropica*, 148, 137-141.
- Oh, S., Kim, J., Park, S., Kim, S., Lee, K., Lee, Y. H., y Lee, H. 2018. Prediction of Y haplogroup by polymerase chain reaction-reverse blot hybridization assay. *Genes y genomics*, 1-8.

- O'Sullivan, M. V., Zhou, F., Sintchenko, V., Kong, F., y Gilbert, G. L. 2011. Multiplex PCR and reverse line blot hybridization assay (mPCR/RLB). *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (54), e2781.
- Perry-O'Keefe, H., y Kissinger, C. M. 1994. Chemiluminescent detection of nonisotopic probes. *Current Protocols in Molecular Biology*, 26(1), 3-19.
- Plernsub, S., Saingamsook, J., Yanola, J., Lumjuan, N., Tippawangkosol, P., Walton, C., y Somboon, P. 2016. Temporal frequency of knockdown resistance mutations, F1534C and V1016G, in *Aedes aegypti* in Chiang Mai city, Thailand and the impact of the mutations on the efficiency of thermal fogging spray with pyrethroids. *Acta tropica*, 162, 125-132.
- Podzorski, R. P., Loeffelholz, M., y Hayden, R. T. 2006. Detection and characterization of molecular amplification products: agarose gel electrophoresis, southern blot hybridization, restriction enzyme digest analysis, and enzyme-linked immunoassay. In *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology* (pp. 243-263). Springer, Boston, MA.
- Polz, M. F., y Cavanaugh, C. M. 1998. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(10), 3724-3730.
- Ponce-García, G., Flores, A. E., Fernández-Salas, I., Saavedra-Rodríguez, K., Reyes-Solis, G., Lozano-Fuentes, S., y Domínguez-Galera, M. (2009). Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in Mexico. *PLoS neglected tropical diseases*, 3(10).
- Ponce-García, G., Del Río-Galvan, S., Barrera, R., Saavedra-Rodriguez, K., Villanueva-Segura, K., Felix, G., y Flores, A. E. 2016. Knockdown Resistance Mutations in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) From Puerto Rico. *Journal of medical entomology*, 53(6), 1410-1414.
- Rajatileka, S., Black IV, W. C., Saavedra-Rodriguez, K., Trongtokit, Y., Apiwathnasorn, C., McCall, P. J., y Ranson, H. 2008. Development and application of a simple colorimetric assay reveals widespread distribution of sodium channel mutations in Thai populations of *Aedes aegypti*. *Acta tropica*, 108(1), 54-57.

- Ranson, H., Jensen, B., Vulule, J. M., Wang, X., Hemingway, J., y Collins, F. H. 2000. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect molecular biology*, 9(5), 491-497.
- Rinkevich, F. D., Du, Y., y Dong, K. 2013. Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. *Pesticide biochemistry and physiology*, 106(3), 93-100.
- Rivero, A., Magaud, A., Nicot, A. and Vézilier, J. 2011. Energetic Cost of Insecticide Resistance in *Culex pipiens* Mosquitoes. *Journal of Medical Entomology*, 48(3), pp.694-700.
- Rodríguez-Servín, R. 2020. Método diagnóstico para la detección de mutaciones V410L, V1016I y F1534C que confieren knock-down resistance (kdr) a insecticidas piretroides en poblaciones *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Díptera:Culicidae) de México. Tesis de pregrado. Universidad Autónoma de Nuevo León. México.
- Rose, K., Mason, J. O., y Lathe, R. 2002. Hybridization parameters revisited: solutions containing SDS. *BioTechniques*, 33(1), 54-58.
- Ruiz-López, F., González-Mazo, A., Vélez-Mira, A., Gómez, G., Zuleta, L., Uribe, S. and Vélez-Bernal, I. 2016. Presencia de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) y su infección natural con el virus del dengue en alturas no registradas para Colombia. *Biomédica*, 36(2), p.303.
- Saavedra-Rodriguez, K., Beaty, M., Lozano-Fuentes, S., Denham, S., Garcia-Rejon, J., Reyes-Solis, G., y Beaty, B. 2015. Local evolution of pyrethroid resistance offsets gene flow among *Aedes aegypti* collections in Yucatan State, Mexico. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 92(1), 201-209.
- Saavedra-Rodriguez, K., Maloof, F. V., Campbell, C. L., Garcia-Rejon, J., Lenhart, A., Penilla, P., y Lozano, S. 2018. Parallel evolution of *vgsc* mutations at domains IS6, IIS6 and IIIS6 in pyrethroid resistant *Aedes aegypti* from Mexico. *Scientific reports*, 8.

- Saavedra-Rodriguez, K., Urdaneta-Marquez, L., Rajatileka, S., Moulton, M., Flores, A. E., Fernandez-Salas, I., y Ranson, H. 2007. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect molecular biology*, 16(6), 785-798.
- Saiki, R. K., Walsh, P. S., Levenson, C. H., y Erlich, H. A. 1989. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(16), 6230-6234.
- Saingamsook, J., Saeung, A., Yanola, J., Lumjuan, N., Walton, C., y Somboon, P. 2017. A múltiple PCR for detection of knockdown resistance mutations, V1016G and F1534C, in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti*. *Parasites y vectors*, 10(1), 465.
- Sawicki, R. M. 1978. Unusual response of DDT-resistant houseflies to carbinol analogues of DDT. *Nature*, 275(5679), 443-444.
- Schollen, E., Vandenberg, P., Cassiman, J. J., y Matthijs, G. 1997. Development of reverse dot-blot system for screening of mitochondrial DNA mutations associated with Leber hereditary optic atrophy. *Clinical chemistry*, 43(1), 18-23.
- Scott, J. G. 2019. Life and Death at the Voltage-Sensitive Sodium Channel: Evolution in Response to Insecticide Use. *Annual review of entomology*, 64, 243-257.
- Scott, M. C., Harmon, J. R., Tsao, J. I., Jones, C. J., y Hickling, G. J. 2012. Reverse line blot probe design and polymerase chain reaction optimization for bloodmeal analysis of ticks from the eastern United States. *Journal of medical entomology*, 49(3), 697-709.
- Secretaria de Salud. 2012. Prevención y control de Dengue 2013-2018. Programa Sectorial de Salud.
- Secretaria de Salud. 2020. Lista de productos recomendados por el CENAPRECE para el combate de insectos vectores de enfermedades a partir de 2020 [Online]. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/546678/Productos_Recomen

datos_por_el_CENAPRECE_para_el_Combate_de_los_Insectos_Vectores_2020.pdf

- Siller, Q., Ponce, G., Lozano, S., y Flores, A. E. 2011. Update on the frequency of Ile1016 mutation in voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* in Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 27(4), 357-363.
- Silver, K. S., Du, Y., Nomura, Y., Oliveira, E. E., Salgado, V. L., Zhorov, B. S., y Dong, K. 2014. Voltage-gated sodium channels as insecticide targets. In *Advances in insect physiology* (Vol. 46, pp. 389-433). Academic Press.
- Srisawat, R., Komalamisra, N., Eshita, Y., Zheng, M., Ono, K., Itoh, T. Q., y Rongsriyam, Y. 2010. Point mutations in domain II of the voltage-gated sodium channel gene in deltamethrin-resistant *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Applied Entomology and Zoology*, 45(2), 275-282.
- Soderlund, D. M. 2005. Sodium channels. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds.), *Comprehensive Insect Science. Pharmacology*, vol. 5. Elsevier B.V., Amsterdam, pp. 1e24.
- Soderlund, D. M. 2010. Toxicology and mode of action of pyrethroid insecticides. In *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (pp. 1665-1686). Academic Press.
- Soderlund, D. M. 2012. Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. *Archives of toxicology*, 86(2), 165-181.
- Sombié, A., Saiki, E., Yaméogo, F., Sakurai, T., Shirozu, T., Fukumoto, S., ... y Badolo, A. 2019. High frequencies of F1534C and V1016I kdr mutations and association with pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Somgandé (Ouagadougou), Burkina Faso. *Tropical medicine and health*, 47(1), 2.
- Souza-Neto, J. A., Powell, J. R., y Bonizzoni, M. 2018. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. *Infection, Genetics and Evolution*.
- Smejkal, G. B., y Kaul, C. A. 2001. Stability of nitroblue tetrazolium-based alkaline phosphatase substrates. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 49(9), 1189-1190.

- Smith, L., Kasai, S. and Scott, J. 2016. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 133, pp.1-12.
- Stenhouse, S. A., Plernsub, S., Yanola, J., Lumjuan, N., Dantrakool, A., Choochote, W., y Somboon, P. 2013. Detection of the V1016G mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) by allele-specific PCR assay, and its distribution and effect on deltamethrin resistance in Thailand. *Parasites y vectors*, 6(1), 253.
- Tripet, F., Wright, J., y Lanzaro, G. 2006. A new high-performance PCR diagnostic for the detection of pyrethroid knockdown resistance kdr in *Anopheles gambiae*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 74(4), 658-662.
- Unwin, V. T., Ainsworth, S., Rippon, E. J., Paine, M. J., Weetman, D., y Adams, E. R. 2018. Development of a rapid field-applicable molecular diagnostic for knockdown resistance (kdr) markers in *An. gambiae*. *Parasites y vectors*, 11(1), 307.
- Uribe-Noguez, L. A., Mata-Marín, J. A., Ocaña-Mondragón, A., Pompa-Mera, E. N., Ribas-Aparicio, R. M., Arroyo-Anduiza, C. I., y Mauss, S. 2020. Comparison of direct sequencing of the NS5B region with the Versant HCV genotype 2.0 assay for genotyping of viral isolates in Mexico. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 26(2), 205-210.
- Vera-Maloof, F. Z., Saavedra-Rodriguez, K., Elizondo-Quiroga, A. E., Lozano-Fuentes, S., y Black IV, W. C. 2015. Coevolution of the Ile1, 016 and Cys1, 534 mutations in the voltage gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* in Mexico. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(12).
- Verhaeghen, K., Van Bortel, W., Roelants, P., Backeljau, T., y Coosemans, M. 2006. Detection of the East and West African kdr mutation in *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* from Uganda using a new assay based on FRET/Melt Curve analysis. *Malaria Journal*, 5(1), 16.

- Villanueva-Segura, O. K. 2015. Caracterización molecular del receptor de la Vitelogenina en *Bactericera cockerelli* [Sulc, 1909](hemiptera: trioziidae). Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León. México.
- Villanueva-Segura, O. K., Ontiveros-Zapata, K. A., Lopez-Monroy, B., Ponce-Garcia, G., Gutierrez-Rodriguez, S. M., Davila-Barboza, J. A., y Flores, A. E. 2020. Distribution and Frequency of the *kdr* Mutation V410L in Natural Populations of *Aedes aegypti* (L.)(Diptera: Culicidae) From Eastern and Southern Mexico. *Journal of medical entomology*, 57(1), 218-223.
- Villanueva-Segura, O. K., Ponce-García, G., Lopez-Monroy, B., Mora-Jasso, E. D. J., Perales, L., Gonzalez-Santillan, F. J., y Flores, A. E. 2020. Multiplex PCR for simultaneous genotyping of *kdr* mutations V410L, V1, 016I and F1, 534C in *Aedes aegypti* (L.). bioRxiv.
- Vinjé, J., y Koopmans, M. P. 2000. Simultaneous detection and genotyping of “Norwalk-like viruses” by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. *Journal of clinical microbiology*, 38(7), 2595-2601.
- Wan, L., Guo, Q., Wei, J. H., Liu, H. C., Li, M. C., Jiang, Y., y Li, G. L. 2020. Accuracy of a reverse dot blot hybridization assay for simultaneous detection of the resistance of four anti-tuberculosis drugs in *Mycobacterium tuberculosis* isolated from China. *Infectious Diseases of Poverty*, 9, 1-10.
- Walsh, P. S., Erlich, H. A., y Higuchi, R. 1992. Preferential PCR amplification of alleles: mechanisms and solutions. *Genome Research*, 1(4), 241-250.
- Williamson, M. S., Martinez-Torres, D., Hick, C. A., y Devonshire, A. L. 1996. Identification of mutations in the houseflypara-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides. *Molecular and General Genetics MGG*, 252(1-2), 51-60.
- Wondji, C. S., Priyanka De Silva, W. A. P., Hemingway, J., Ranson, H., y Parakrama Karunaratne, S. H. P. 2008. Characterization of knockdown resistance in DDT- and pyrethroid-resistant *Culex quinquefasciatus* populations from Sri Lanka. *Tropical Medicine y International Health*, 13(4), 548-555.

- Wuliandari, J., Lee, S., White, V., Tantowijoyo, W., Hoffmann, A., y Endersby-Harshman, N. 2015. Association between three mutations, F1565C, V1023G and S996P, in the voltage-sensitive sodium channel gene and knockdown resistance in *Aedes aegypti* from Yogyakarta, Indonesia. *Insects*, 6(3), 658-685.
- Yanola, J., Somboon, P., Walton, C., Nachaiwieng, W., y Prapanthadara, L. A. 2010. A novel F1552/C1552 point mutation in the *Aedes aegypti* voltage-gated sodium channel gene associated with permethrin resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96(3), 127-131.
- Yanola, J., Somboon, P., Walton, C., Nachaiwieng, W., Somwang, P., y Prapanthadara, L. A. 2011. High-throughput assays for detection of the F1534C mutation in the voltage-gated sodium channel gene in permethrin-resistant *Aedes aegypti* and the distribution of this mutation throughout Thailand. *Tropical Medicine y International Health*, 16(4), 501-509.
- Ye, S., Dhillon, S., Ke, X., Collins, A. R., y Day, I. N. 2001. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic acids research*, 29(17), e88-e88.
- Zettel, C., y Kaufman, P. 2012. Yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus)(Insecta: Diptera: Culicidae). Retrieved on August, 22, 2017.

RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Francisco Javier González Santillán

Candidato para el Grado de

Maestro en Entomología Médica y Veterinaria

Tesis: DISEÑO Y VALIDACIÓN DE UN CHIP BIOSENSOR DE ADN PARA LA DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE MUTACIONES *KDR* EN POBLACIONES DE *Aedes aegypti* (L.) DE MÉXICO.

Campo de estudio: Efectividad biológica y resistencia a los plaguicidas en artrópodos de importancia médica y veterinaria.

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 10 de noviembre de 1994, hijo de Francisco González Torres y Juana Santillán Bautista.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Licenciado en Biotecnología Genómica en 2018.