

Revisión

Intervenciones genéticas de *Aedes aegypti* para el control de arbovirosis

Genetic interventions of Aedes aegypti for the control of arboviruses

<https://doi.org/10.52808/bmsa.7e6.624.006>

Michelle Norma Antonio ^{1,*}

<https://orcid.org/0000-0003-0042-800X>

Marco Fabriccio Traverso Huarcaya ¹

<https://orcid.org/0000-0003-2617-7667>

Camila Alejandra Traverso Castillo ²

<https://orcid.org/0000-0002-0258-4009>

María Nelly Castillo Rodríguez ²

<https://orcid.org/0000-0003-0173-915X>

Recibido: 21/04/2022

Aceptado: 30/07/2022

RESUMEN

La ineficacia de las estrategias actuales para el control químico de los mosquitos vectores plantea la necesidad de desarrollar enfoques novedosos, entre estos están las estrategias genéticas para reducir las poblaciones de mosquitos vectores o sustituirlos por aquellos que no son capaces de transmitir patógenos, esto se logra a través de herramientas moleculares que permiten la manipulación y transgénesis de genes. Las secuencias del genoma de los mosquitos y las bases de datos de marcadores de secuencias expresadas asociadas permiten investigaciones a gran escala para proporcionar nuevos conocimientos sobre las vías evolutivas, bioquímicas, genéticas, metabólicas y fisiológicas. Además, la genómica comparativa revela las bases de los mecanismos evolutivos con especial atención a las interacciones específicas entre vectores y patógenos. Se ha desarrollado tecnología de transgénesis para el mosquito de la fiebre amarilla y dengue, *Aedes aegypti*. Se ha logrado integración exitosa de ADN exógeno en la línea germinal de este mosquito con los elementos transponibles. La disponibilidad de múltiples elementos y genes marcadores proporciona un poderoso conjunto de herramientas para investigar las propiedades biológicas básicas de este insecto vector, así como los materiales para desarrollar nuevas estrategias de control genético de poblaciones de mosquitos basadas en la técnica del insecto estéril. Una de estas estrategias consiste en liberar a la población machos esterilizados por radiación; otro, de integrar un gen letal dominante bajo el control de un promotor específico en hembras inmaduras. El uso de esta técnica de modificación genética constituirá una herramienta importante para el manejo integrado de vectores.

Palabras clave: Control de mosquitos, intervención genética, uso de técnicas genéticas, *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

*The ineffectiveness of current strategies for the chemical control of vector mosquitoes raises the need to develop novel approaches, among these are genetic strategies to reduce populations of vector mosquitoes or replace them with those that are not capable of transmitting pathogens, this is achieved through molecular tools that allow the manipulation and transgenesis of genes. Mosquito genome sequences and associated expressed sequence marker databases enable large-scale investigations to provide new insights into evolutionary, biochemical, genetic, metabolic, and physiological pathways. Furthermore, comparative genomics reveals the basis of evolutionary mechanisms with special attention to the specific interactions between vectors and pathogens. Transgenesis technology has been developed for the yellow fever and dengue mosquito, *Aedes aegypti*. Successful integration of exogenous DNA into the germ line of this mosquito with the transposable elements has been achieved. The availability of multiple elements and marker genes provides a powerful set of tools to investigate the basic biological properties of this insect vector, as well as the materials to develop new strategies for genetic control of mosquito populations based on the sterile insect technique. One of this strategy is to release radiation-sterilized males into the population; another, to integrate a dominant lethal gene under the control of a specific promoter in immature females. The use of this genetic modification technique will constitute an important tool for the integrated management of vectors.*

Keywords: Mosquito control, genetic intervention, use of genetic techniques, *Aedes aegypti*.

¹ Universidad de Valencia, Valencia, España.

² Universidad Continental, Huancayo, Perú.

*Autor de Correspondencia: minoran@alumni.uv.es

Introducción

La historia del control de las enfermedades transmitidas por vectores es muy extensa y las evidencias muestran lo exitosos que fueron varios programas en el pasado; sin embargo la aplicación de las herramientas de control tradicionales, la participación social y la comunicación; han llevado tiempo, se han aplicado de forma parcial o insuficiente y no han sido oportunas, continuas ni sostenibles, como tampoco se han evaluado bien. Por eso, la escasa efectividad que se les ha atribuido obedece más a la manera de llevarlas a la práctica o evaluarlas que a su eficacia demostrada en ciertos contextos. Las nuevas tecnologías, además de demostrar su efectividad, deben incorporarse al manejo integrado de vectores para mejorar las estrategias y ayudar a solucionar los desafíos operativos y organizativos comunes a todas las intervenciones tradicionales (OPS, 2019).

Los patógenos humanos que son transmitidos por insectos son un problema global, particularmente aquellos transmitidos por mosquitos; por ejemplo, parásitos de la malaria transmitidos por especies de *Anopheles* y virus como el

dengue, zika y chikungunya que son transportados por mosquitos *Aedes*. Durante los últimos 20 años, la prevalencia de la malaria se ha reducido sustancialmente y los brotes de virus se han contenido mediante el control de los mosquitos vectores utilizando enfoques basados en insecticidas; sin embargo, el control de enfermedades ahora se ve amenazado por tasas alarmantes de resistencia a los insecticidas en las poblaciones de insectos, lo que genera la necesidad de desarrollar una nueva generación de estrategias específicas que puedan reducir la transmisión mediada por vectores. Aquí, se revisará cómo un mayor conocimiento en biología de insectos e interacciones insecto-patógeno está estimulando nuevos conceptos y herramientas para el control de vectores. Se enfocarán estrategias que interfieren con el desarrollo de patógenos dentro de sus vectores o impactan directamente en la supervivencia de los insectos, incluido el uso de nuevas y poderosas herramientas genéticas para editar genomas vectoriales (Shaw & Catteruccia, 2019).

Sabemos desde hace más de un siglo que los mosquitos son vectores de patógenos que causan enfermedades humanas. Aun así, las tasas de mortalidad y morbilidad asociadas con estos patógenos siguen siendo altas en países de bajos ingresos en regiones tropicales y subtropicales (Guinovart *et al.*, 2006). En total, más de la mitad de la población mundial se ve afectada por enfermedades transmitidas por mosquitos que provocan millones de muertes y cientos de millones de casos cada año. Estas estadísticas brindan el impulso para estudiar los mosquitos con la expectativa de que los nuevos conocimientos puedan contribuir al alivio de la carga de estas enfermedades (Terenius *et al.*, 2008).

De tal forma que la aplicación de análisis genéticos y técnicas de biología molecular para la investigación de mosquitos brinda oportunidades para el desarrollo de nuevas estrategias de control de enfermedades, alentando a los investigadores a la exploración y desarrollo de nuevas tecnologías, como control genético, para aliviar la carga de enfermedades transmitidas por mosquitos en los países en desarrollo en el planeta (Hill *et al.*, 2005; Adelman *et al.*, 2007). Entre estas oportunidades se encuentran nuevos métodos de control de vectores para la reducción o el reemplazo de la población (Curtis & Graves, 1988). En lo que respecta a la reducción de la población, esta busca disminuir el número absoluto de mosquitos, y por lo tanto, disminuir la probabilidad de contacto entre mosquitos y sus huéspedes humanos. Las estrategias de reemplazo de población están diseñadas para reemplazar mosquitos susceptibles (pueden transmitir el patógeno) con mosquitos refractarios (no pueden transmitir el patógeno) y tales estrategias no requieren cambios en las densidades de población de mosquitos. Para que cualquiera de estas estrategias sea efectiva, es importante reducir el número de mosquitos infectados por debajo de un nivel de umbral para que la probabilidad de transmisión caiga hasta un punto en el que la población de los patógenos disminuya abrupta e irreversiblemente (Terenius *et al.*, 2008).

Una estrategia de reemplazo de la población tiene el objetivo de modular genéticamente la competencia del vector y se basa en la hipótesis de que una mayor frecuencia en una población de vectores de un gen que interfiere con un patógeno resultará en la reducción o eliminación de la transmisión de ese patógeno (Benedict *et al.*, 2011). Probar esta hipótesis estimuló el desarrollo de tecnologías genéticas moleculares para el análisis y la manipulación de genes en mosquitos. Un objetivo clave era establecer métodos de rutina para generar mosquitos transgénicos y esto se logró con un número de especies usando elementos transponibles (Allen *et al.*, 2001; Grossman *et al.*, 2001). Estos éxitos estimularon el debate y la investigación para medir el impacto de los genes introducidos en la capacidad vectorial de los mosquitos. Por ejemplo, la integración de un transgén puede interrumpir o alterar las características de expresión de los genes endógenos, los productos transgénicos pueden ser tóxicos o la transcripción y traducción del transgén pueden usurpar los recursos necesarios para la supervivencia normal o las funciones reproductivas (Terenius *et al.*, 2008).

En consecuencia, los efectos de la integración y expresión de transgenes en la capacidad vectorial de los mosquitos varían (Irvin *et al.*, 2004; Marrelli *et al.*, 2006). La mayoría de los enfoques genéticos requieren que los insectos transformados muestren un costo de aptitud tan bajo como sea posible (Lambrechts *et al.*, 2008). Por lo tanto, la expresión de un transgén debe limitarse a un tejido y tiempo específicos en el mosquito para lograr el máximo efecto sobre el patógeno, mientras se minimiza la carga potencial sobre el vector. Se espera que los avances recientes en las áreas de genómica e ingeniería genética permitan el diseño y la producción de mosquitos que expresen moléculas efectoras antipatógenas bajo el control de ADN promotor-regulador sintético o híbrido (quimérico o mosaico) para lograr un rendimiento óptimo. Promotores de plantas sintéticas funcionales que combinan una colección de elementos de secuencia de ADN de genes activados por patógenos (Rushton *et al.*, 2002) sirven como modelo conceptual para desarrollos similares en mosquitos.

Elementos reguladores para la dirección de la expresión transgénica a través de herramientas genómicas

Los genomas de varios mosquitos, entre ellos el *Aedes aegypti*, están disponibles en bases de datos de acceso público. Estos recursos brindan una gran cantidad de información y desafíos para el diseño y la implementación de mosquitos transgénicos. Ahora es factible utilizar estos recursos para comprender mejor la regulación génica en los mosquitos y aplicar este conocimiento para identificar o diseñar ADN promotor capaz de dirigir la expresión de moléculas efectoras en puntos de tiempo relevantes después de la infección y dentro de los tejidos en los que hay interacciones significativas con el patógeno, como el intestino medio, las glándulas salivales y la grasa corporal (Terenius *et al.*, 2008).

La identificación de promotores de mosquitos funcionales no estuvo restringida por la ausencia de secuencias genómicas completas. La clonación y caracterización de genes individuales combinada con la transgénesis permitió el

descubrimiento de fragmentos de ADN que contienen elementos reguladores capaces de dirigir la expresión génica temporal y espacial restringida. La funcionalidad de varios promotores se demostró mediante la determinación de la expresión de genes indicadores o antipatógenos en mosquitos transformados genéticamente (Ito *et al.*, 2002). Hay promotores disponibles para expresar productos que se acumulan en el intestino medio, la hemolinfa y las glándulas salivales de los mosquitos hembras (Chen *et al.*, 2007; Yoshida y Watanabe, 2006), y además, se identificaron promotores que permiten la expresión de genes específicos de etapa y sexo (Adelman *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2007). Sin embargo, la disponibilidad de pocas genomas de mosquitos amplía nuestra capacidad para explorar los mecanismos implicados en la regulación de la transcripción y permite búsquedas exhaustivas de genes que muestren patrones de expresión espacial y temporal bien definidos.

Los análisis de transcriptoma que utilizan la secuenciación de alto rendimiento de ADNc (secuencias de ADN complementarias) y las determinaciones de la regulación de la transcripción mediante tecnología basada en micromatrices son enfoques técnicos poderosos para identificar patrones de genes con expresión adecuada. Más de 200.000 marcadores de secuencias expresadas de *An. gambiae*, 300.000 *Aedes aegypti*, y 200.000 *Cx. quinquefasciatus* están disponibles actualmente en la “base de vectores” y en el Centro Nacional de Información Biotecnológica, y estos proporcionan evidencia de la actividad transcripcional y revelan estructuras genéticas, particularmente en los extremos 5' y 3', donde las secuencias de nucleótidos son a menudo menos conservado. Además, estos grandes conjuntos de datos de secuencias permiten la identificación de genes implicados en la inmunidad, el olfato, la reproducción, la resistencia a los insecticidas, la desintoxicación de xenobióticos, la regulación endocrina y la adquisición y digestión de la sangre de los mosquitos (Waterhouse *et al.*, 2007; Strode *et al.*, 2008). Estos esfuerzos se complementan con enfoques proteómicos modernos para identificar productos génicos (Li *et al.*, 2006; He *et al.*, 2007). Si bien las predicciones automatizadas de la estructura de los genes son esenciales para administrar grandes conjuntos de datos, la anotación manual basada en secuencias de ADNc y proteínas de alta calidad es importante para revelar productos transcripcionales novedosos y variantes de corte y empalme alternativos, y proporcionar límites de exones precisos (Ding *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006).

Técnica del insecto estéril-supresión de poblaciones

En 1955 Knippling propuso el concepto de liberación insectos estériles para controlar poblaciones de plagas de importancia agrícola. Según Robinson *et al.*, (2004). La técnica del insecto estéril (TIE) se basa en la reproducción masiva, la esterilización por radiación y la liberación de grandes cantidades de insectos machos en un área objetivo. Los machos liberados se aparearán con hembras silvestres, lo que reducirá el potencial reproductivo de la población silvestre, lo que provocará una reducción de la población en generaciones posteriores. Si se liberan suficientes machos estériles durante el tiempo suficiente, la población objetivo colapsará, lo que conducirá a su supresión o incluso a la eliminación completa del área objetivo. Esta técnica es, por lo tanto, específica para cada especie y no daña el medio ambiente.

El control genético busca la cobertura universal aprovechando el comportamiento altamente eficiente del macho para localizar hembras de la misma especie para aparearse (Wyss, 2000). La presencia de resistencia a los insecticidas en la población objetivo es irrelevante para el éxito de este tipo de método. Las hembras salvajes evitan aparearse con machos criados artificialmente o estériles, hecho que debe ser tomado en consideración. Sin embargo, existe una posibilidad real que la liberación de mosquitos estériles puede erradicar poblaciones diana aisladas, ya que si la densidad de la población silvestre disminuye, la tasa de mosquitos estériles en la población aumenta, facilitando el cruce entre machos estériles y hembras silvestres.

El paradigma de este método fue el éxito en la eliminación de *Cochliomyia hominivorax* (una miasis) del sur de Estados Unidos, México y América Central. Esta área está actualmente protegida de una nueva invasión a través de América del Sur a través de una barrera en Panamá con relativamente pocas moscas estériles. Estas moscas estériles también se utilizaron para eliminar la entrada potencialmente devastadora de esta especie en África del Norte (Bushland *et al.*, 2000). Existen otros ejemplos de erradicación y control de plagas agrícolas e incluso vectores patógenos utilizando la TIE, como la erradicación de moscas mosca tsé-tsé, vector de los agentes de la tripanosomiasis bovina (enfermedad del sueño) en Zanzíbar (Vreysen, *et al.*, 2000).

La separación de machos y el efecto de la radiación

Una de las dificultades de implementar el programa de liberación de insectos estériles es la necesidad de liberar solo individuos machos. La separación manual, además de ser extremadamente laboriosa, presenta niveles inadecuados de contaminación de hembras entre machos estériles en algunas especies (Delprat *et al.*, 2002). De esta forma, se han desarrollado sistemas que provocan la muerte de hembras en alguna etapa de su vida, separando automáticamente las hembras de los machos, eliminando el trabajo de separación y disminuyendo la presencia de hembras entre los machos liberados a niveles muy bajos. Un ejemplo de esto lo constituye la mosca de la fruta, que está muy determinada por el sexo influenciado por el sistema de cromosomas sexuales XX/XY. Se puede diseñar un linaje genético de división por sexos para especies ubicando una mutación autosómica recesiva letal en situaciones específicas. Por ejemplo, la sensibilidad a altas temperaturas está vinculada al alelo de tipo salvaje del cromosoma Y usando la translocación. La cepa mutante de separación sexual debe tener hembras homocigóticas para la sensibilidad a la temperatura y machos fenotípicamente normales para este rasgo (Mayer *et al.*, 1998). Los sistemas que provocan la muerte de hembras tienen la ventaja de que pueden aplicarse a la población en su conjunto, ya que la manipulación individual de las pupas puede

tener un efecto negativo sobre calidad final del lote a liberar. El éxito de la técnica de separación genética en moscas se atribuye directamente al hecho de que los embriones pueden tratarse fácilmente con altas temperaturas. Una mutación sensible a la temperatura que solo se expresa tarde en el desarrollo presentará problemas operativos, ya que no es fácil regular la temperatura de volúmenes de alimentación en salas grandes (Meats *et al.*, 2002).

Adaptación de la técnica del insecto estéril a mosquitos vectores patógenos

A fines de la década de 1960 y principios de la de 1970, había un gran optimismo con respecto al uso de la TIE como una estrategia alternativa para controlar los mosquitos transmisores de enfermedades. Sin embargo, esta técnica solo se ha utilizado contra unas pocas especies de mosquitos, debido a parte de los problemas fundamentales del sistema. Los insectos machos genéticamente modificados deben competir para aparearse con los tipos salvajes. El proceso de producción, especialmente la esterilización de machos por radiación, puede causar un efecto de pérdida drástico en la capacidad de apareamiento de estos insectos en comparación con los machos salvajes. Los machos irradiados pueden ser menos competitivos y también tener una esperanza de vida reducida. Por ejemplo, el método de esterilización de la mosca de la fruta (*Ceratitis capitata*) condujo a una reducción de cuatro a diez veces en los parámetros de competitividad, perjudicando el programa de erradicación de esta especie (Rendón *et al.*, 2004).

En un estudio realizado en 1981 en California (EEUU), aproximadamente 85.000 machos de *Culex tarsalis* irradiados se tiñeron con polvo fluorescente y se liberaron en un cañón semiaislado para monitorear la abundancia y la esterilidad. Los machos esterilizados se dispersaron satisfactoriamente y representaron el 30% de los machos capturados. Sin embargo, la población presentó sólo un 11% de esterilidad, resultado insuficiente para suprimir o incluso provocar alguna disminución en la población de hembras. La mayoría de los machos irradiados no competían con los salvajes en términos de cópula con hembras salvajes locales. Las instalaciones de irradiación son costosas y potencialmente peligrosas. Existe la posibilidad de que se liberen individuos irradiados, pero todavía fértiles, lo que puede ser potencialmente peligroso. La logística se ve obstaculizada por la necesidad de liberación en etapas de vida preestablecidas y la distancia de las instalaciones a las áreas objetivo (Alphey, 2002).

Otro problema del uso de la TIE en mosquitos vectores de patógenos es que, desde un punto de vista ético y de seguridad, la liberación de mosquitos machos estériles es solo aceptable si no hay liberación de hembras con muchos machos estériles. Sólo machos no realice una comida de sangre y, por lo tanto, no transmiten patógenos y no son un factor de molestia. En mosquitos de los géneros *Culex* y *Aedes*, la separación se puede hacer en función del tamaño de las pupas (Robinson, 2002). Este sistema fue utilizado en la India y sólo el 0,2% de las hembras fueron liberadas entre los machos. Sin embargo, cientos de miles de mosquitos se producían diariamente y liberó un gran número de hembras entre machos, haciendo inviable su eficacia. La liberación de hembras entre machos irradiados resulta en un aumento de hembras en el ambiente. Esto causa no sólo la transmisión de molestias y enfermedades, sino interfiere con la cópula con machos irradiados, cuando compiten con hembras salvajes (Sharma *et al.*, 1972).

Reemplazo de poblaciones de mosquitos-elementos genéticos transponibles

Las estrategias de control genético incluyen aquellas que proponen la inserción de ADN exógeno en el mosquito vector con el objetivo de reducir la población del mismo o limitar o eliminar su capacidad de transmitir patógenos a los humanos (reemplazo de la población) (Adelman *et al.*, 2007). Estas estrategias se benefician de la disponibilidad de tecnologías de transgénesis, y la integración estable de genes modificados en mosquitos *A. aegypti* mediante el uso de elementos transponibles (ET) es ahora una rutina (O'Brochta y Atkinson, 2004). Las estrategias de reemplazo de poblaciones también dependen del desarrollo de genes efectores para interferir y prevenir la transmisión de patógenos; estos genes reducen significativamente los títulos virales del dengue en mosquitos transgénicos (Frans *et al.*, 2006). Finalmente, las estrategias de reemplazo de poblaciones requieren un sistema de impulso genético para propagar genes de resistencia a las poblaciones silvestres, y se han propuesto los elementos transponibles como una base mecánica para el desarrollo de dicho sistema. La liberación de mosquitos transgénicos tiene consideraciones técnicas, sociales y éticas, y se han identificado criterios para cumplirlas (James, 2005). Uno de los desafíos técnicos consiste en restringir la actividad del sistema de impulsores genéticos a donde será necesaria, es decir, en la línea germinal de la especie diana. Este desafío puede resolverse parcialmente poniendo al ADN bajo el control de agentes impulsores genéticos, regulando el desarrollo de genes para dirigir la transposición específica de sexo, tejido y etapa evolutiva del vector.

Por otra parte, los ET se proponen como base para desarrollar sistemas impulsores en la propagación de genes de resistencia a patógenos a través de poblaciones de mosquitos vectores. El uso de elementos de ADN de control transcripcional y traduccional de genes expresados específicamente en la línea germinal de insectos para mediar la transposición ofrece posibilidades para mitigar algunas de las preocupaciones sobre el comportamiento del transgén en las especies de vectores diana y eliminar los efectos en organismos no deseados. De esta forma, se ha descrito el uso exitoso del promotor y las regiones no traducidas del gen ortólogo del *A. aegypti*, para controlar exógenamente la expresión específica del sexo. Los mosquitos transgénicos expresaron ARNm de transposasa en abundancia cercana o igual a la transcripción endógena y exclusivamente en las células germinales femeninas. Además, el ARNm de interés se depositó en ovocitos en desarrollo y se localizó y mantuvo en el polo posterior durante el desarrollo embrionario temprano. Es importante destacar que cuatro de las cinco líneas transgénicas examinadas fueron capaces de movilizar un segundo transgén en el genoma del mosquito, lo que indica que se estaba produciendo una transposasa funcional. Por lo tanto, las

secuencias de control se muestran prometedoras como parte de un sistema de impulso genético basado en ET (Adelman *et al.*, 2007).

Conflicto de intereses

No se reporta conflicto de intereses.

Agradecimientos

No se reportan agradecimientos.

Referencias

- Adelman, Z. N., Jasinskiene, N., Onal, S., Juhn, J., Ashikyan, A., Salampessy, M., MacCauley, T., & James, A. A. (2007). nanos gene control DNA mediates developmentally regulated transposition in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(24), 9970–9975. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701515104>
- Allen, M. L., O'Brochta, D. A., Atkinson, P. W., & Levesque, C. S. (2001). Stable, germ-line transformation of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 38(5), 701–710. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-38.5.701>
- Alphey L. (2002). Re-engineering the sterile insect technique. *Insect biochemistry and molecular biology*, 32(10), 1243–1247. [https://doi.org/10.1016/s0965-1748\(02\)00087-5](https://doi.org/10.1016/s0965-1748(02)00087-5)
- Benedict, M. Q., James, A. A., & Collins, F. H. (2011). Safety of genetically modified mosquitoes. *JAMA*, 305(20), 2069–2070. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.676>
- Bushland, R. C., Lindquist, A. W., & Knipping, E. F. (1955). Eradication of Screw-Worms through Release of Sterilized Males. *Science (New York)*, 122(3163), 287–288. <https://doi.org/10.1126/science.122.3163.287>
- Calisher C. H. (2005). Persistent emergence of dengue. *Emerging infectious diseases*, 11(5), 738–739. <https://doi.org/10.3201/eid1105.050195>
- Chen, X. G., Marinotti, O., Whitman, L., Jasinskiene, N., James, A. A., & Romans, P. (2007). The *Anopheles gambiae* vitellogenin gene (VGT2) promoter directs persistent accumulation of a reporter gene product in transgenic *Anopheles stephensi* following multiple bloodmeals. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 76(6), 1118–1124. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.76.1118>
- Delprat, M. A., Stolar, C. E., Manso, F. C., & Cladera, J. L. (2002). Genetic stability of sexing strains based on the locus *sw* of *Ceratitis capitata*. *Genetica*, 116(1), 85–95. <https://doi.org/10.1023/a:1020963709795>
- Ding, Y., Ortelli, F., Rossiter, L. C., Hemingway, J., & Ranson, H. (2003). The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. *BMC genomics*, 4(1), 35. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-4-35>
- Franz, A. W., Sanchez-Vargas, I., Adelman, Z. N., Blair, C. D., Beaty, B. J., James, A. A., & Olson, K. E. (2006). Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(11), 4198–4203. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600479103>
- Grossman, G. L., Rafferty, C. S., Clayton, J. R., Stevens, T. K., Mukabayire, O., & Benedict, M. Q. (2001). Germline transformation of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, with the piggyBac transposable element. *Insect molecular biology*, 10(6), 597–604. <https://doi.org/10.1046/j.0962-1075.2001.00299.x>
- Gubler D. J. (2004). The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle?. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 27(5), 319–330. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.013>
- Guinovart, C., Navia, M. M., Tanner, M., & Alonso, P. L. (2006). Malaria: burden of disease. *Current molecular medicine*, 6(2), 137–140. <https://doi.org/10.2174/156652406776055131>
- He, N., Botelho, J. M., McNall, R. J., Belozerov, V., Dunn, W. A., Mize, T., Orlando, R., & Willis, J. H. (2007). Proteomic analysis of cast cuticles from *Anopheles gambiae* by tandem mass spectrometry. *Insect biochemistry and molecular biology*, 37(2), 135–146. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.10.011>
- Irvin, N., Hoddle, M. S., O'Brochta, D. A., Carey, B., & Atkinson, P. W. (2004). Assessing fitness costs for transgenic *Aedes aegypti* expressing the GFP marker and transposase genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(3), 891–896. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305511101>

- Ito, J., Ghosh, A., Moreira, L. A., Wimmer, E. A., & Jacobs-Lorena, M. (2002). Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature*, 417(6887), 452–455. <https://doi.org/10.1038/417452a>
- James A. A. (2005). Gene drive systems in mosquitoes: rules of the road. *Trends in parasitology*, 21(2), 64–67. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.11.004>
- Knipling, E. F. (1955). Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *Journal of Economic Entomology*, 48(4), 459-462. Disponible en: <https://academic.oup.com/jee/article-abstract/48/4/459/2205947?login=false> (Acceso diciembre 2021).
- Lambrechts, L., Koella, J. C., & Boëte, C. (2008). Can transgenic mosquitoes afford the fitness cost?. *Trends in parasitology*, 24(1), 4–7. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.09.009>
- Li, J., Riehle, M. M., Zhang, Y., Xu, J., Oduol, F., Gomez, S. M., Eiglmeier, K., Ueberheide, B. M., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Ribeiro, J. M., & Vernick, K. D. (2006). Anopheles gambiae genome reannotation through synthesis of ab initio and comparative gene prediction algorithms. *Genome biology*, 7(3), R24. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-3-r24>
- Marrelli, M. T., Moreira, C. K., Kelly, D., Alphey, L., & Jacobs-Lorena, M. (2006). Mosquito transgenesis: what is the fitness cost?. *Trends in parasitology*, 22(5), 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.03.004>
- Mayer, D. G., Atzeni, M. G., Stuart, M. A., Anaman, K. A., & Butler, D. G. (1998). Mating competitiveness of irradiated flies for screwworm fly eradication campaigns. *Preventive veterinary medicine*, 36(1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/s0167-5877\(98\)00078-6](https://doi.org/10.1016/s0167-5877(98)00078-6)
- Meats, A., Maheswaran, P., Frommer, M., & Sved, J. (2002). Towards a male-only release system for SIT with the Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni*, using a genetic sexing strain with a temperature-sensitive lethal mutation. *Genetica*, 116(1), 97–106. <https://doi.org/10.1023/a:1020915826633>
- O'Brochta, D. A., & Atkinson, P. W. (2004). Transformation systems in insects. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 260, 227–254. <https://doi.org/10.1385/1-59259-755-6:227>
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2019). Evaluación de las estrategias innovadoras para el control de *Aedes aegypti*: desafíos para su introducción y evaluación del impacto. Disponible en: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51376/9789275320969_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y (Acceso diciembre 2021).
- Rendón, P., McInnis, D., Lance, D., & Stewart, J. (2004). Medfly (Diptera: Tephritidae) genetic sexing: large-scale field comparison of males-only and bisexual sterile fly releases in Guatemala. *Journal of economic entomology*, 97(5), 1547-1553. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-97.5.1547>
- Robinson A. S. (2002). Genetic sexing strains in medfly, *Ceratitis capitata*, sterile insect technique programmes. *Genetica*, 116(1), 5–13. <https://doi.org/10.1023/a:1020951407069>
- Robinson, A. S., Franz, G., & Atkinson, P. W. (2004). Insect transgenesis and its potential role in agriculture and human health. *Insect biochemistry and molecular biology*, 34(2), 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2003.10.004>
- Rushton, P. J., Reinstädler, A., Lipka, V., Lippok, B., & Somssich, I. E. (2002). Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling. *The Plant cell*, 14(4), 749–762. <https://doi.org/10.1105/tpc.010412>
- Sharma, V. P., Patterson, R. S., & Ford, H. R. (1972). A device for the rapid separation of male and female mosquito pupae. *Bulletin of the World Health Organization*, 47(3), 429–432. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2480716/> (Acceso noviembre 2021).
- Shaw, W. R., & Catteruccia, F. (2019). Vector biology meets disease control: using basic research to fight vector-borne diseases. *Nature microbiology*, 4(1), 20–34. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0214-7>
- Smith, R. C., Walter, M. F., Hice, R. H., O'Brochta, D. A., & Atkinson, P. W. (2007). Testis-specific expression of the beta2 tubulin promoter of *Aedes aegypti* and its application as a genetic sex-separation marker. *Insect molecular biology*, 16(1), 61–71. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00701.x>
- Strode, C., Wondji, C. S., David, J. P., Hawkes, N. J., Lumjuan, N., Nelson, D. R., Drane, D. R., Karunaratne, S. H., Hemingway, J., Black, W. C., 4th, & Ranson, H. (2008). Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 38(1), 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.09.007>
- Terenius, O., Marinotti, O., Sieglaff, D., & James, A. A. (2008). Molecular genetic manipulation of vector mosquitoes. *Cell host & microbe*, 4(5), 417–423. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.09.002>

- Vreysen, M. J., Saleh, K. M., Ali, M. Y., Abdulla, A. M., Zhu, Z. R., Juma, K. G., Dyck, V. A., Msangi, A. R., Mkonyi, P. A., & Feldmann, H. U. (2000). *Glossina austeni* (Diptera: Glossinidae) eradicated on the island of Unguja, Zanzibar, using the sterile insect technique. *Journal of economic entomology*, 93(1), 123–135. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.1.123>
- Waterhouse, R. M., Kriventseva, E. V., Meister, S., Xi, Z., Alvarez, K. S., Bartholomay, L. C., Barillas-Mury, C., Bian, G., Blandin, S., Christensen, B. M., Dong, Y., Jiang, H., Kanost, M. R., Koutsos, A. C., Levashina, E. A., Li, J., Ligoxygakis, P., Maccallum, R. M., Mayhew, G. F., Mendes, A., & Christophides, G. K. (2007). Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5832), 1738–1743. <https://doi.org/10.1126/science.1139862>
- Wyss J. H. (2000). Screwworm eradication in the Americas. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 916, 186–193. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05289.x>
- Yoshida, S., & Watanabe, H. (2006). Robust salivary gland-specific transgene expression in *Anopheles stephensi* mosquito. *Insect molecular biology*, 15(4), 403–410. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00645.x>