



ARTÍCULO DE REVISIÓN

NUEVAS ESTRATEGIAS DE CONTROL VECTORIAL: MOSQUITOS TRANSGÉNICOS

Raúl Noguez Moreno ^{1,4}

Ildefonso Fernández Salas ²

Jorge Cime Castillo ¹

Enrique Merino Pérez ³

Renaud Conde ¹

Salome Cabrera Romo ¹

Humberto Lanz Mendoza ¹ 

¹ Instituto Nacional de Salud Pública, Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas.

² Instituto Nacional de Salud Pública, Centro Regional de Investigación en Salud Pública.

³ Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

⁴ Instituto Tecnológico Superior de Ciudad Serdán.

 humberto@insp.mx

¹ Av. Universidad No. 655 Colonia Santa María Ahuacatlán, Cerrada Los Pinos y Caminera C. P. 62100, Cuernavaca, Morelos. México.

² 4a. Norte y 19 Poniente s/n Col. Centro, C. P. 30700. Tapachula, Chiapas, México.

³ Av. Universidad No. 2001, Col. Chamilpa, C. P. 62210 Cuernavaca, Morelos.

⁴ Av. Instituto Tecnológico s/n, Col. La Gloria. CP: 75520, Ciudad Serdán, Puebla, México.

Folia Entomológica Mexicana (nueva serie), 3(3): 114–138, 2017.

Recibido: 3 de octubre 2016

Aceptado: 22 de noviembre 2017

Publicado en línea: 31 de diciembre 2017

NUEVAS ESTRATEGIAS DE CONTROL VECTORIAL: MOSQUITOS TRANSGÉNICOS

New strategies of vector control: Genetically modified mosquitoes

Raúl Noguez-Moreno^{1,5}, Ildefonso Fernández-Salas², Jorge Cime-Castillo¹, Enrique Merino-Pérez³, Renaud Conde¹, Salome Cabrera-Romo⁴ y Humberto Lanz-Mendoza^{1*}.

¹ Instituto Nacional de Salud Pública, Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas.

² Instituto Nacional de Salud Pública, Centro Regional de Investigación en Salud Pública.

³ Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

⁴ El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Villahermosa.

⁵ Instituto Tecnológico Superior de Ciudad Serdán.

*Autor de correspondencia: humberto@insp.mx

RESUMEN. La idea del control genético de insectos no es nueva, ésta se desarrolló a mediados del siglo XX con el objeto de alterar el genoma de una especie, disminuyendo la viabilidad poblacional o la sustitución por un genotipo más benigno. Lo anterior impulsó un esfuerzo importante en la investigación en genética clásica con diferentes enfoques que incluye, principalmente, la generación de machos estériles y genes letales condicionales. Sin embargo, tanto el éxito aparentemente rotundo del uso de pesticidas químicos, como la investigación en el desarrollo de vacunas contra las enfermedades transmitidas por vector (ETV) y los problemas técnicos como económicos derivados de éste disminuyeron el interés en la investigación del control genético de insectos durante los últimos 20 años del siglo XX. No obstante, en el presente siglo el surgimiento de insectos resistentes a pesticidas y la falta de éxito de las vacunas para el control de ETV, han estimulado nuevamente el interés en el desarrollo de estrategias para el control genético de insectos, impulsadas también las nuevas herramientas de ingeniería genética y los avances de las ciencias genómicas de insectos, lo que permite transferir genes y expresarlos de forma regulada de una manera más rápida y eficiente. En este trabajo describiremos brevemente el control genético y abordaremos a mayor detalle los nuevos métodos de ingeniería genética de insectos para la generación de mosquitos transgénicos y el control de las ETV. También se discutirán las experiencias obtenidas, así como las ventajas y desventajas del uso de mosquitos transgénicos.

Palabras clave: Mosquitos Transgénicos, Enfermedades Transmitidas por Vector, Ingeniería Genética de Insectos, Control Genético de Insectos.

ABSTRACT. This paper will briefly describe the genetic control and address in greater detail the new methods of insect genetic engineering used to generate transgenic mosquitoes to control vector-borne (VBD) diseases. The idea of genetic control of insects is not new, it developed in the mid-twentieth century to alter the genome of a species, decreasing population viability or replacement by a more benign genotype. This led to an important effort in classical genetic research with different approaches that includes, mainly, the generation of sterile males and lethal conditional genes. However, both the seemingly resounding success of the use of chemical pesticides, and the research into the development of VBD vaccines, and the technical and economic problems derived from it, have diminished the interest in the investigation of the genetic control of insects during the last 20 years. However, in the present century the emergence of insect's resistant to pesticides and the lack of success of vaccines for the control of VBD, have stimulated again the interest in the development of genetic control strategies of insects, also driven the new engineering tools genetic and advances in the genomic sciences of insects, allowing to transfer genes and express them in a regulated way in a faster and more efficient way. In this work we will briefly describe the genetic control and we will approach in greater detail the new methods of genetic engineering of insects for the generation of transgenic mosquitoes and the control of VBD.

Key words: Transgenic Mosquitoes, Vector-borne Diseases, Insect Genetic Engineering, Insect Genetic Control.

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud estima que el 17 % de todas las enfermedades infecciosas humanas son enfermedades transmitidas por

vectores (ETV). Más de la mitad de la población a nivel mundial vive en áreas de riesgo donde las principales especies de insectos capaces de transmitir enfermedades se encuentran presentes. (www.oms.org).

La ubicuidad de los insectos es una característica que les ha permitido ser un grupo interesante para su estudio; si bien la mayoría son probablemente inoocuos o benéficos para las poblaciones humanas, existen otros que pueden ser un riesgo en la transmisión de enfermedades. La globalización y el cambio climático pueden incrementar el riesgo de dispersión de las ETV, ya que los cambios en la variación climática tienen gran impacto en la población de artrópodos, particularmente en mosquitos (Liu-Helmersson *et al.*, 2016).

Las enfermedades transmitidas por vectores, tienen un gran impacto en la salud pública en todo el mundo; dentro de éstas se encuentran aquellas que son transmitidas por garrapatas o mosquitos. Ambos artrópodos son capaces de transmitir patógenos tales como bacterias, parásitos y virus. En el caso de los parásitos, la malaria o paludismo ha sido una de las enfermedades más mortífera, tan sólo en el año 2015 causó 438,000 muertes. (www.oms.org). Por otro lado, en el caso de los virus, se encuentran los arbovirus, los cuales son virus que biológicamente necesitan replicarse dentro del vector artrópodo para llevar a cabo la transmisión al huésped vertebrado, durante la alimentación de artrópodos hematófagos (Weaver y Reisen, 2010).

Las enfermedades virales transmitidas por vectores pueden circular entre poblaciones de animales silvestres, domésticos y en poblaciones humanas. Virus como el dengue (DENV), el Chikungunya (CHIKV) y recientemente el virus de Zika, se han distribuido ampliamente en todo el mundo, no obstante, la enfermedad viral con mayor crecimiento es el dengue, cuya incidencia se ha multiplicado 30 veces en los últimos 50 años (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/>).

La reemergencia, mutación y dispersión de estos virus, ha planteado nuevos problemas desde el punto económico, sociales y de salud pública, recientemente el conjunto de efectos que causa el virus de Zika, lo que ha generado una gran preocupación, debido a las alteraciones en neonatos durante la gestación como es la microcefalia, la cual genera un daño permanente en el tamaño del cerebro al nacer y consecuentemente en las cualidades cognitivas y

en los infantes y las pérdida de autonomía en etapas posteriores de desarrollo. La infección durante el embarazo también se ha vinculado a resultados adversos que incluyen pérdida del embarazo, defectos en los ojos, pérdida de audición y trastornos de crecimiento en los neonatos (www.oms.org). Por otro lado, los efectos secundarios de esta enfermedad en adultos se asemejan al síndrome de Guillian-Barret que provoca parálisis progresiva (ECDC, 2015).

A pesar de los esfuerzos para prevenir brotes epidémicos mediante el control de poblaciones de mosquitos, se ha estimado que las ETV son responsables de más de un millón de muertes al año. Si bien, la distribución de estas enfermedades está determinada por una compleja dinámica de factores medioambientales y sociales, existen diferentes programas de prevención que han logrado atenuar la transmisión de enfermedades mediante el control de las poblaciones de los distintos vectores proporcionando una mejor calidad en la salud pública a nivel mundial (Culshaw *et al.*, 2017)

Estrategias de control genético. Es importante señalar que recientemente no ha habido una clasificación a las diferentes estrategias de control genético, a pesar de un gran número de reportes recientes al respecto. Sin embargo, en los diversos artículos reportados los autores destacan algunas de sus propiedades que nos permite diferenciarlas unas de otras. En primer lugar, la genética clásica utiliza insectos irradiados para generar esterilidad o disminuir su capacidad reproductiva (Steril Insect Technology, SIT; Gould y Schliekelman, 2004; Kraaijeveld y Chapman, 2004; Helinski *et al.*, 2009). La segunda, mosquitos transgénicos que se basan en la manipulación del material genético *in vitro*, a través de métodos de ingeniería genética o de biología sintética para el diseño y construcción de elementos genéticos los cuales llevan genes específicos de control de enfermedades o control poblacional (Stebbins *et al.*, 2001). Los mosquitos transgénicos se pueden clasificar en varias subdivisiones, como moscos refractarios, los cuales al expresar un efector, disminuyen o evitan la capacidad de infectarse; los moscos dominantes letales de uno y dos componentes que inducen esterilidad y disminuyen la población de insectos (Gong-P *et al.*, 2003); los mosquitos con fenotipo sin vuelo

que presentan vulnerabilidad a depredadores e ineficiencia en la reproducción; y los moscos para reemplazo o disminución poblacional genéticamente dirigidos (del inglés Gene Drive), basados en CRISP-CAS9 (Cuadro 1) (Adelman y Tu, 2016; Godfray *et al.*, 2016).

GENÉTICA CLÁSICA PARA EL CONTROL DE INSECTOS

Técnica del Insecto Estéril (SIT). Estas se basan en la generación de mutaciones en gametos de insectos a través de compuestos químicos o radiación. La más ampliamente utilizada fue la radiación y consiste exponer a los huevos de insecto con partículas gama de fuentes de cobalto 60 o Cesio 137 (^{60}Co o ^{137}Cs), después los huevos son incubados para que se desarrollen a un estado adulto. La radiación produce daño cromosómico en las células del insecto resultando en la esterilidad deseada, pero también causa efectos somáticos que reducen la competitividad de los machos (Fig. 1) (Kraaijeveld y Chapman, 2004). Por lo tanto, tiene que haber un balance entre la dosis de radiación, la esterilidad producida, la competitividad sexual de los machos y el nivel de la esterilidad reproductora cuando se cruzan con las hembras silvestres (Fig. 1) (Parker y Mehta, 2007; Dame *et al.*, 2009; Helinski *et al.*, 2009). La técnica SIT fue utilizada después de la segunda guerra mundial durante cuatro décadas y sirvió para controlar diversos insectos como la mosca de la fruta y el gusano barrenador del ganado entre otros (Kraaijeveld y Chapman, 2004; Gould y Schliekelman, 2004). Sin embargo, existen muy pocos programas SIT en la actualidad. Diversos factores desalentaron la utilización de la tecnología SIT, tales como el costo en el manejo y producción de insectos, además de las dificultades técnicas, así como el aparente éxito con el uso de pesticidas químicos para el control de insectos. Sin embargo, debido a la falta de éxito de vacunas seguras para el control de las ETV y al surgimiento de insectos resistentes a los diversos insecticidas, se ha renovado el interés en la técnica SIT (Kraaijeveld y Chapman, 2004). En México, en fechas recientes, el Centro Regional de Investigación en Salud Pública (CRISP) del INSP, ha iniciado un proyecto muy interesante para establecer las

condiciones óptimas de irradiación de huevecillos del mosquito *Aedes aegypti* Linnaeus, a fin de establecer un programa de control de las poblaciones de esta especie, vector de dengue, Chikungunya y Zika.

Avances de las ciencias genómicas de insectos.

Los avances en las ciencias genómicas de insectos, proporciona nuevos caminos para entender la organización estructural de los genes en el genoma y la expresión de genes involucrados en diferentes procesos de la interacción del vector-patógeno o de virus, tales como: los genes que participan en la hematofagía, reproducción, desarrollo, diferenciación y respuesta del sistema inmune a patógenos y virus (Holt *et al.*, 2002; Nene *et al.*, 2007; Chen, *et al.*, 2015; Giraldo-Calderón *et al.*, 2015). Adicionalmente, existe una gran cantidad de información derivada de los métodos de biología molecular desarrollados en el siglo pasado, como son el “Southern blot” para determinar el número de genes, el “Northern blot”, la hibridación in situ y el RT-PCR para hacer estudios de expresión espacio-temporal en células y tejidos, así como la clonación de las secuencias genómicas y la comparación con las secuencias de ADN complementario (ADNc). (Chen *et al.*, 2015). Estos estudios se complementan con el análisis de las secuencias de los promotores a través de fusiones transcripcionales con genes reporteros y su transgénesis en insectos. La secuenciación de genomas con métodos masivos no es el único camino para generar una alta calidad de la anotación del genoma, en muchos casos hay fragmentos del genoma no secuenciados o por la presencia de una alta frecuencia de polimorfismo genético y de secuencias repetidas, por lo que hay genomas incompletos o no bien anotados. Debido a lo anterior, esta información se debe de complementar con los estudios de los proteomas y transcriptomas correspondientes, lo cual nos permite entender mejor la estructura y función del genoma y la expresión genética global en el tejido u órgano específico. En su conjunto, los métodos de biología molecular y de las ciencias genómicas generan conocimiento más preciso de la fusión y expresión genética, lo cual es fundamental para el entendimiento de la fisiología molecular de insectos y en la generación de MTs para el control de insectos y las ETV (Chen *et al.*, 2015).

Cuadro 1. Control Clasificación de Diferentes Tipos de Control Genéticos de Mosquitos.

Tipo de control genético	Subtipo	Definición	Requerimientos	Ventaja	Desventaja
I) Control Genético clásico de insectos.	Tecnología del Insecto Estéril (SIT Steril Insect Technology), (Kraaijeveld y Chapman, 2004).	La genética clásica utiliza mutaciones inducidas para generar esterilidad o disminuir su capacidad reproductiva.	Instalaciones especiales para el uso de radioactividad.	Ha sido probada su efectividad en diversos insectos.	1) Es muy costosa respecto a otras tecnologías genéticas 2) Se generan desechos radioactivos. 3) Se exponen a los seres humanos involucrados en el proceso. 4) Se deben de liberar constantemente mosquitos irradiados. 5) Se debe de optimizar la dosis de radiación para tener el óptimo de esterilidad/viabilidad y competitividad sexual. No presenta ventaja reproductiva.
II) Mosquitos transgénicos.	a) Mosquitos refractarios. (Ghosh <i>et al.</i> , 2001; Ito <i>et al.</i> , 2002; Franz <i>et al.</i> , 2006).	Mosquitos que expresan un péptido o proteína que evita la infección del mosquito por el virus o patógeno.	1) Efecto antiparasitario y viral 2) Expresión órgano o tejido específico.	1) Evita la diseminación del patógeno. 2) No extermina a una especie.	
	b) Dominante Letal de Uno y Dos Componentes. (Phuc, 2007).	Mosquito en el que se porta un gen que en el contexto heterocigoto despliega el fenotipo letal.	1) Requieren de un gen letal. 2) El gen letal debe ser fuerte y específicamente regulado para expresarse durante el desarrollo del mosquito y en el medio ambiente.	1) Disminuye la población del insecto. 2) Teniendo líneas transgénicas se pueden reproducir en el laboratorio a un costo más bajo y menos elaborado que la estrategia SIT.	1) Se debe de comprar o desarrollar la tecnología propia. 2) Se deben de liberar mosquitos constantemente para disminuir la población de insectos, porque la población transgénica tiende a desaparecer.
	c) Fenotipo Sin vuelo. (Fu <i>et al.</i> , 2010).	Insectos incapaces de volar por un defecto en la musculatura de las alas.	Expresión de una versión del gen de actina mutante órgano o tejido específico.	1) Evita la diseminación del mosquito. 2) Disminuye la población del insecto.	1) Se debe de comprar o desarrollar la tecnología propia. 2) Se deben de liberar constantemente para disminuir la población de insectos, porque la población transgénica tiende a desaparecer.
	d) Gene Drive (Genéticamente Dirigido; GD; Oye K. <i>et al.</i> , 2014).	Es la práctica de "estimular una herencia predispuesta o sesgada de genes particulares para alterar poblaciones enteras".	1) Se requiere de usar un gen egoísta o el sistema de CRISPR-CAS9 para favorecer el sesgo genético. 2) Requiere de un gen efector o blanco para el control del patógeno o favorecer incremento de su frecuencia genética.	1) Favorece su permanencia y sustitución de poblaciones. 2) Requiere de menos insectos liberados para disminuir una población. 3) Podría ser la mejor estrategia para disminuir una especie de mosquito peligrosa para la humanidad.	No han sido probados en campo y muchos modelos de GD están en alguna etapa previa de desarrollo.

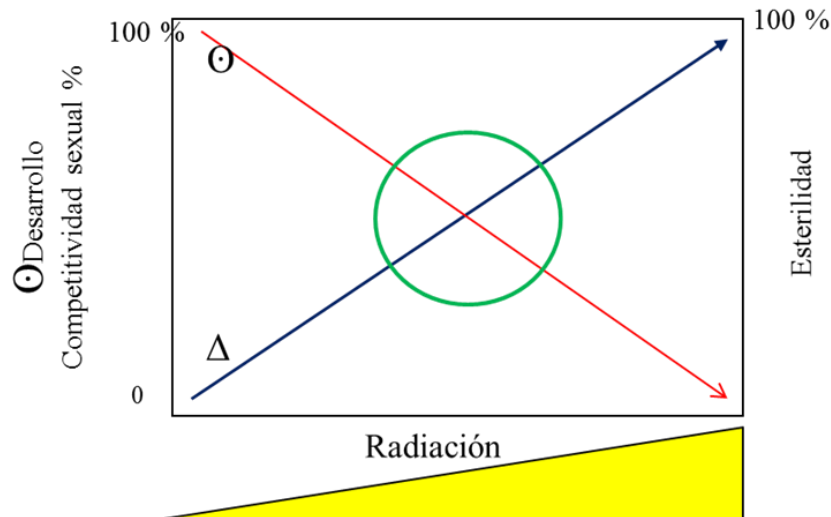


Figura 1. Optimización de la exposición a radiación para la generación de insectos estériles. Consiste exponer a los huevos de insecto con partículas gama de fuentes de cobalto 60 o Cesio 137 (^{60}Co o ^{137}Cs), después los huevos son incubados para que se desarrollen a un estado adulto. La radiación produce daño cromosómico en las células del insecto, resultando en la esterilidad deseada pero también causa los efectos somáticos que reducen la competitividad de los machos. Desventajas se requieren grandes cantidades de machos por no todos son estériles, viables o competitivos desde el punto de vista sexual (Helinski *et al.*, 2009).

ESTRATEGIAS DE INGENIERÍA GENÉTICA DE INSECTOS

Transposones para la Introducción de Genes en Insectos. Dos principales tecnologías de transgénesis han sido desarrolladas; la primera se basó en la capacidad de los transposones para recombinar de manera casi al azar en el genoma del insecto y la segunda, está soportada por las nucleasas de doble cadena, está fundamentada la tecnología de edición de genomas, como se describirá más adelante.

En el primer caso, los principales transposones usados fueron el “*piggyBack*.” y “*Hermes*” (Grossman *et al.*, 2001; Jasinskiene *et al.*, 1998). Estos tienen un tamaño de alrededor de 3,000 pares de bases y contienen una unidad de transcripción que codifica para la transposasa (Fig. 2) flanqueada por dos terminales invertidas repetidas (TIR). La transposasa cataliza la recombinación no homóloga cortando y pegando dentro de las TIR, fenómeno conocido como transposición genética (Atkinson *et al.*, 2001). Los transposones fueron utilizados manipulando su estructura, particularmente la construcción genética de interés se incluye entre las secuencias invertidas repetidas y la transposasa dentro del mismo vector de clonación o bien, complementado

en trans en otro plásmido. En este último caso la introducción del DNA para la generación de moscos transgénicos se realiza microinyectando ambos plásmidos al huevo del insecto (Grossman *et al.*, 2001; Jasinskiene *et al.*, 1998).

Edición de Genomas para Introducir Genes, Quitarlos o Editarlos. El desarrollo de las nuevas tecnologías para insertar genes, escindirlos o editarlos, tuvo su origen en el descubrimiento de que un corte en un ADN blanco de doble cadena, in vivo, estimula la edición del genoma a través de una recombinación homóloga (HR: del inglés: Homologous Recombination) (Rudin *et al.*, 1989; Rouet *et al.*, 1994; Choulika *et al.*, 1995; Bibikova *et al.*, 2002; Bibikova *et al.*, 2003). Estudios posteriores realizados por Chandrasegara y Carroll (2016) demostraron la posibilidad de diseñar nucleasas basadas en el dominio de unión de factores de transcripción del tipo “dedos de zinc” (Bibikova *et al.*, 2002, 2003). En el mismo grupo de investigación descubrieron que cuando las hebras de ADN blanco son cortadas y simultáneamente se introduce una secuencia que no presenta identidad con la secuencia blanco del genoma, éste se repara por recombinación introduciendo la secuencia no homóloga o bien, reuniendo la doble cadena de manera imprecisa, lo cual genera una inserción o pérdida de secuencia de ADN (Fig. 3).

Transposon Piggyback

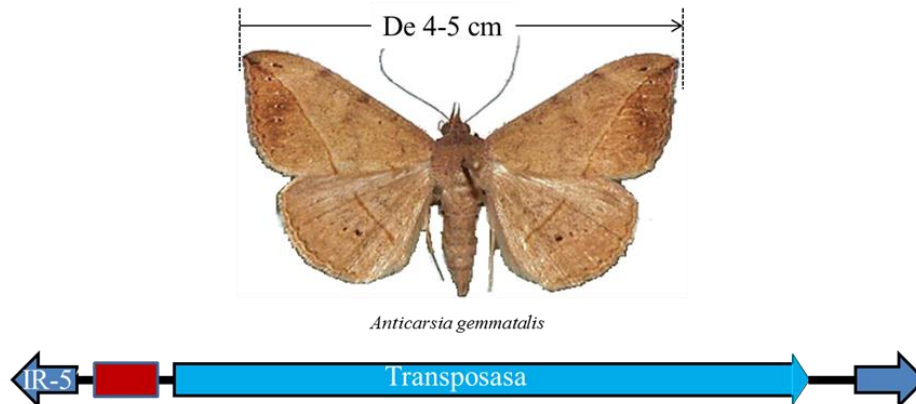


Figura 2. Los piggyBack son una familia de transposones de aproximadamente 3 kilobases con similitud en estructura y propiedades similares encontrados originalmente en una línea celular TN-368 de *Anticarsia gemmatalis*. Son útiles para la generación de moscos transgénicos, ya que los elementos invertidos pueden ser usados para flanquear una construcción genética de interés y la transposasa puede ser expresada fuera las secuencias invertidas repetidas en un mismo plásmido o proporcionadas en trans en otro plásmido. La transposasa actúa como enzima de corte y pegado para la introducción de las construcciones genéticas incluidas entre las dos secuencias invertidas IR-5' e IR-3' (Grossman *et al.*, 2001).

Ingeniería Genética por Nucleasas de Doble Cadena (ZFNs, TALENs, CRISPR/CAS)

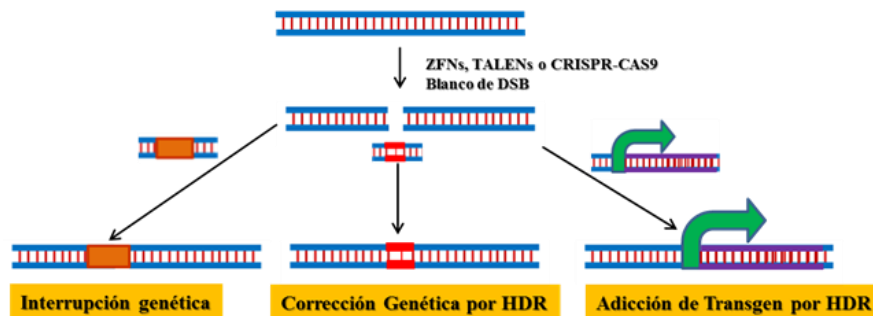


Figura 3.- Ingeniería Genética usando Nucleasas Programables (NP): ZFNs, Talens y CRISPR-Cas9. Las nucleasas se pueden programar para realizar un corte doble en un sitio específico de la doble cadena del ADN; el doble corte en el ADN induce la reparación por el sistema de reparación homologa HDR o no homologa NHEJ, (del inglés: HDR Homology-Directed Repair y Non-Homologous End Joining NHEJ, respectivamente). Durante un evento de doble corte del ADN realizado por cualquiera de las endonucleasas la célula escoge alguno de las dos vías de reparación. La reparación por la vía de HDR es favorecida cuando se introducen secuencias que comparten identidad de al menos de 20 pares de bases al sitio de corte, mientras que al no encontrar una secuencia homologa de ADN alrededor del sitio de corte, la célula repara por unión directa los extremos de las cadenas de ADN. La inducción del sistema de reparación de ADN por las NP, se ha utilizado para desarrollar la ingeniería genética in vivo o también llamada ingeniería genómica (figura adaptada de Chandrasegara S y S. Carroll, 2016).

A este proceso le llamaron NHEJ (del inglés: Non Homologous End-Joining (NHEJ) (Bibikova *et al.*, 2002). Los estudios antes mencionados fueron la base para el desarrollo de la poderosa tecnología de ingeniería genómica conocida en la actualidad como Edición de Genomas. En la actualidad tres nucleasas de doble cadena de DNA

(DSB, del inglés: Doble Strand Break): conocidas como ZFNs, TALENs y CRISP-CAS9 son utilizadas, para la edición de genomas y transgénesis (Fig. 3). Durante la inserción de genes por DSB, el requisito es que la construcción de interés lleve secuencias idénticas cortas (de 20 pares de bases) del genoma donde se desea recombinar. Esta

tecnología, que se ha ensayado en insectos y en muchos organismos, se ha demostrado que es más eficiente que los transposones para insertar genes, ya que en un solo evento de transformación se puede tener la inserción en los dos cromosomas, generando fácilmente líneas transgénicas homocigotas y además, se puede dirigir la inserción en el lugar del genoma que sea más conveniente, evitando así, la inserción al azar y los problemas de silenciamiento posicional del transgén, por estructura de cromatina (Reid y O'Brochta, 2016).

Sistemas de nucleasas ZFNs y TALENs. Las dos primeras herramientas antes mencionadas son el resultado del estudio de la estructura función de las nucleasas de restricción tipo II llamada FokI y de los dominios de unión a ADN tipo dedos de zinc (Zinc Finger o ZF), el cual forma parte de un factor de transcripción IIIA de la rana *Xenopus laevis*, que se une a unas secuencias consenso ricas en GC (5' GCGTGGGCG3') (Miller *et al.*, 1985; Berg, 1990). La enzima Fok I, está formada por dos dominios estructurales: un dominio de unión a una secuencia/s específica ADN de doble cadena (5'GGATG-3':5'CATCC3') y un dominio de nucleasa de corte inespecífico entre 9-13 bases del sitio de reconocimiento. Esta propiedad permitió a través de ingeniería genética, fusionar la secuencia de ADN que codifica para el dominio de nucleasa (ZFN) y unirla con la secuencia de ADN que codifica para el dominio de unión a ADN ZF, del factor de transcripción (Fig. 4a) (Kim Y-G, 1996). La reprogramación a diferentes sitios de pegado es posible gracias a los estudios de la estructura de la proteína ZF, permitió entender, que residuos de aminoácidos de la alfa hélice del dominio ZF, interaccionan específicamente con cada uno de los cuatro nucleótidos del ADN. Además, el dominio ZF que esta repetido tres veces en tándem, se le puede agregar uno dominio ZF y se pueden generar cambios específicos de esos dominios para un nuevo reconocimiento de una secuencia de ADN contigua y específica (Chandrasegara y Carroll 2016). La desventaja más importante es que, para cada sitio seleccionado con fines de edición de genoma, se deben diseñar y ejecutar nuevos cambios del dominio ZN múltiple. La nucleasa quimérica ZFN funciona haciendo un corte sencillo en una hebra de la

cadena de ADN, así que, para generar un doble corte, se deben diseñarse dos ZFNs: una ZFN-Izquierda y otra ZFN-Derecha, para que reconozcan secuencias vecinas en una región con corte coincidente (Chandrasegara y Carroll, 2016) (Fig. 4a). 2016) (Fig. 4a).

Por otro lado, el sistema de nucleasa TALENs fue desarrollado gracias al descubrimiento de un módulo de unión a ADN derivado de un factor de virulencia de *Xantomonas* (un patógeno de plantas). Este factor de virulencia se llama TALE, mismo que presenta un dominio central repetido que consiste en 33 a 35 aminoácidos (Christian *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2011). Cada módulo repetido es idéntico excepto en dos aminoácidos en posiciones 12 y 13, conocidos como RVDS (del inglés: Repeat Variable Di-Residues). Mientras cada ZF reconoce de tres a cuatro bases; cada motivo TALE reconoce un solo nucleótido. La especificidad del RVD opera de la siguiente manera: los residuos NI reconocen A, HD reconoce C, NG o HG reconocen T and NN reconoce G o A (Fig. 4b) (Moscou y Bogdanove, 2009; Christian *et al.*, 2010; Mussolino *et al.*, 2011; Deng *et al.*, 2012). Una diferencia importante entre los dominios ZF y el módulo TALE, es la independencia de los módulos vecinos, lo que lo hace conceptualmente sencillo para el diseño de módulos de reconocimiento a secuencias de ADN específicas, pero no desde el punto de vista técnico, por lo que su costo es elevado (hasta US \$5000 / blanco). Estos módulos de diseño se deben fusionar (a nivel de las secuencias codificantes correspondientes) con el dominio de nucleasa de la enzima de restricción Fok I. Al igual que las ZFNs, las nucleasas TALENs deben ser diseñadas en pares (izquierda y derecha) para lograr un doble corte en la cadena de ADN (Fig. 4b) (Chandrasegara y Carroll, 2011).

Sistema de Nucleasa CRISPR-CAS9. La tercera nucleasa usada para editar genomas proviene del descubrimiento del sistema inmune adaptativo CRISPR-CAS9 de la bacteria *Streptococcus pyogenes*, cuyo nombre deriva la organización del locus donde se encuentra la nucleasa CAS9 (del inglés CRISPR: Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats CRISPR-Associated Sequence 9).

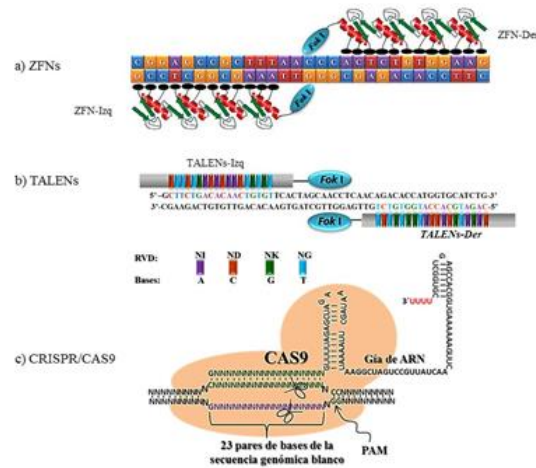


Figura 4. Esquema que representa las nucleasas programables. Se muestran las nucleasas unidas a su sitio blanco. En a) schematic nucleasas unidas a 4 dedos de zinc, en b) TALENs y en c) CRISPR-Cas9-RNAguía (adaptado de Chandrasegara S y S. Carroll. 2016).

En realidad, CRISPR-CAS9 es uno de los tres sistemas CRISPR-CAS encontrados en el 50 % de las diversas especies estudiadas y es del tipo II el cual el más sencillo desde el punto de vista estructural, lo que facilita su manipulación para el uso de la ingeniería genómica (Chandrasegara y Carroll, 2011; Jiang y Doudna, 2017) (Fig. 4).

No obstante que las nucleasas programables ZFNs y TALENs se desarrollaron primero y han sido usadas con éxito por muchos autores para generar ingeniería genómica, incluyendo la generación de moscos transgénicos, el sistema CRISPR-CAS9 ha tenido un mayor éxito en el uso y versatilidad en la ingeniería genómica debido a su sencillez, ya que la proteína CAS9 siempre es el núcleo de reacción y la especificidad sobre las secuencias de ADN blanco es mediado por la secuencias de ARN guía intercambiables que varían sólo en los 20 nucleótidos de la secuencia de reconocimiento, manteniendo los otros elementos de la estructura que forma plegamientos secundarios que son importantes para ser reconocidas por la proteína CAS9 (Chandrasegara y Carroll, 2016) (Fig. 5). El sistema CRISPR-CAS9, no solo se presenta como una herramienta prometedora para la generación de moscos transgénicos, ofrece una variedad de oportunidades, para desarrollar “nocaút genético”, silenciamiento transcripcional, modificación de elementos reguladores de la transcripción, y sobre-expresión de genes, lo cual potenciará el conocimiento de la fisiología molecular de los seres vivos y, en particular, la oportunidad de

conocer a mayor detalle los eventos de interacción insecto-vector patógeno o virus, pero de hecho ya se plantean una infinidad de estrategias para la supresión y sustitución poblacional de insectos a través de genética dirigida, usando el sistema CRISPR-CAS9 (Esvelt *et al.*, 2014).

Sistema Sintético tTAV-OP7 para la Expresión Regulada de Efectores en Insecto por Tetraciclina. Los elementos de control del operón de resistencia a tetraciclina (Tc) del transposon Tn10 de *Escherichia coli*, fueron utilizados por primera vez para desarrollar un sistema altamente eficiente de control transcripcional negativo en células de mamífero. Lo anterior se consiguió fusionando la secuencia de ADN que codifica para el represor de tetraciclina (tet) con la secuencia codificante ADN de los últimos 109 aminoácidos del dominio de transactivación de la proteína V16 del virus herpes humano (V) y colando el elemento de ADN operador OP en siete repeticiones (OP7), justo antes de un promotor mínimo de citomegalovirus humano (PMC) y el gen de luciferasa, que se expresa de manera constitutiva (Figs. 6 y 7). Con esta construcción se logró modular la transcripción de luciferasa en respuesta a la concentración de Tc, alcanzando un apagado a concentraciones de 1 µg/ml con un máximo de transcripción de cinco veces en ausencia de Tc (Gossen y Bujard, 1992).

Usando el sistema de regulación tTAV-OP7, pero en este caso bajo un promotor mínimo de heat shock 70 fue evaluado en insectos (en líneas

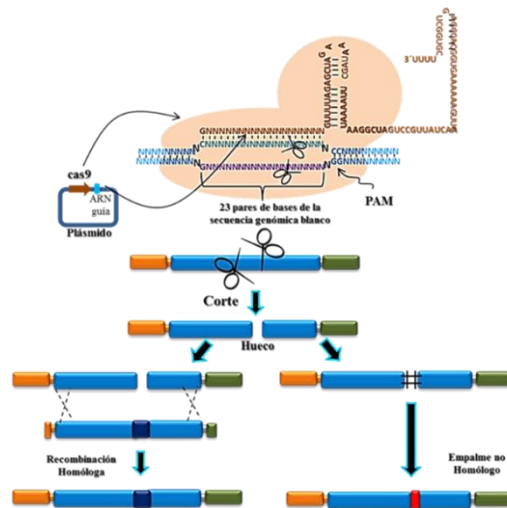


Figura 5.- La edición genómica a través de ARNgüia-CAS9. La nucleasa Cas9 y la guía de ARN, debe ser primero introducida en la célula diana. Esto se logra mediante la transfección de los plásmidos de expresión que contiene ambas secuencias codificantes, pero la introducción del ARNm de CAS9 y el ARN guía también es eficaz. El ARN guía dirige a Cas9 para unir secuencias de ADN diana. En el blanco se forma una burbuja que debe estar flanqueada por un adecuado motivo adyacente (PAM), (con secuencia NGG). Si el ARN guía es idéntica con solo unos desajustes en el extremo 5' del espacio de hibridación, Cas9 cortará las dos cadenas del ADN generando extremos romos. Si se suministra con una plantilla de reparación que contiene los cambios deseados y homología a las secuencias a ambos lados de la ruptura, la célula puede utilizar la recombinación homóloga para reparar la ruptura mediante la incorporación de la plantilla de la reparación en el cromosoma. De lo contrario, la ruptura será reparada uniendo los extremos, lo que resulta en la pérdida de algunos nucleótidos y la interrupción del gen (Jinek *et al.*, 2012 (modificada de Esvelt *et al.*, 2016).

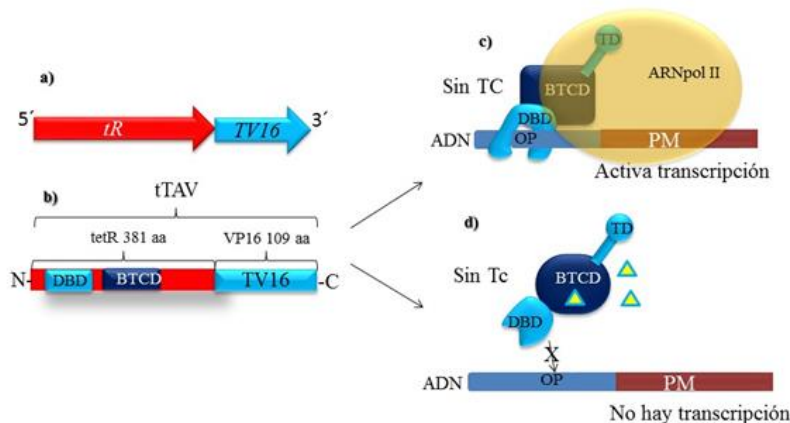


Figura 6. En a) se presenta la construcción genética para producir el transactivador quimérico tTAV, esto se logró fusionando la secuencia del gen regulador de tetraciclina TR con los últimos 327 nucleótidos del gen V16 del virus herpes generando una proteína de fusión. b) La secuencia primaria del transactivador quimérico tTAV tiene tres dominios estructurales que se pliegan para darle una integridad funcional. En b) y c) se presentan los tres dominios de tTA: el dominio de unión a ADN (DBD), el dominio de unión a tetraciclina (BTCD) y el dominio de transactivación que recluta a la ARNpol II para iniciar la transcripción en un promotor mínimo (PM). d) En ausencia de Tc el regulador tTAV se une al ADN reconociendo la secuencia OP, lo cual posiciona el dominio TD, para reclutar componentes del RNA polimerasa II en el PM (Gossen y Bujard, 1992).

transgénicas de), donde se demostró por el funcionamiento adecuado de este sistema para la expresión del gen *Ala5* que dispara la muerte celular en un sistema de dos componentes con patrón de expresión durante el desarrollo embrionario y larval y encendido-apagado en ausencia o presencia de Tc en *Drosophila melanogaster* (Stebbins *et al.*, 2001). Lo anterior

fue un paso importante para el desarrollo del control poblacional de insectos en *A. aegypti*, ya que los elementos de control fueron utilizados para generar la cepa OX513A de moscos transgénicos, la cual lleva un gen dominante letal que actúa a nivel larvario como un sistema de un solo componente (Figs. 8 y 9) (Phuc *et al.*, 2007).

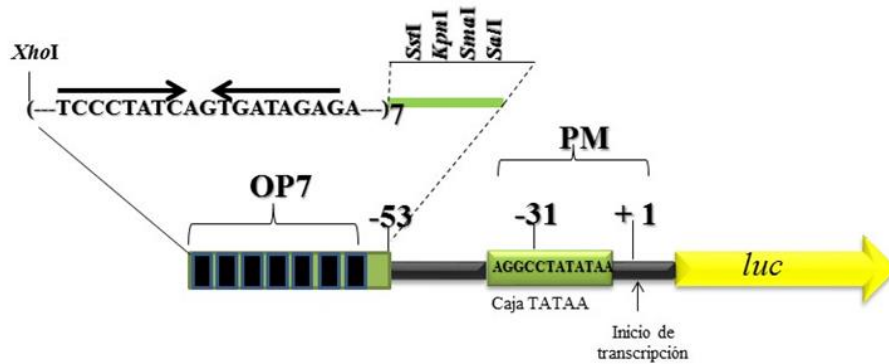


Figura 7. La primera construcción genética para controlar la transcripción de manera negativa en presencia de tetraciclina fue desarrollada por Gossen y Bujard en 1992. Se muestra, en cuadros negros los siete sitios para el pegado (OP7) del transactivador quimérico (tTAV), que al unirse a estos sitios favorece la transcripción de un promotor mínimo, el cual incluye la caja TATAAA y el sitio de inicio de la transcripción de un promotor de citomegalovirus humano que controlan el gen reportero de luc (del gen de luciferasa) (Gossen y Bujard H, 1992).

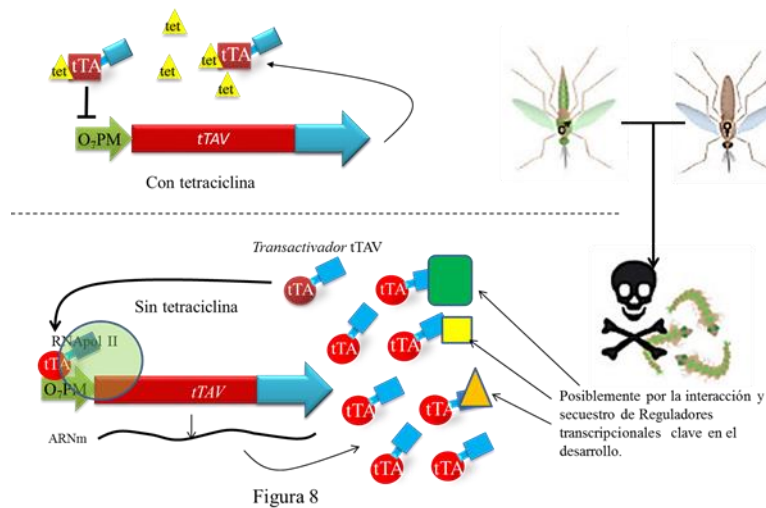


Figura 8

Figura 8. Sistema letal de retroalimentación positiva o también conocido como de sistema de un componente. Se muestra la construcción realizada por Luke Alpey y colaboradores para la generación de moscos transgénicos dominante letal de acción retardada (del inglés Late-Acting Dominant Lethal: LADL). En donde el transactivador quimérico tTAV está bajo el control de su propio sitio de unión, tetO, el promotor mínimo de *Drosophila* Hsp70, y una secuencia 3' UTR de *Drosophila* fs 1-K10 que favorece la terminación y el pegado del poli A durante la transcripción (ver figura 6 y es similar a lo descrito en la figura 4). El elemento funciona de la siguiente manera: en ausencia de tetraciclina, tTAV se une a tetO y dirige la expresión de más tTAV, en un bucle de retroalimentación positiva. En presencia de tetraciclina, el factor de transcripción tTAV se une a tetraciclina; lo que genera un cambio conformacional que afecta el dominio de unión a ADN y por lo tanto no se une a tetO, lo que no conduce a la expresión de más tTAV. En consecuencia, esta construcción da niveles muy altos de expresión de tTAV en ausencia de tetraciclina, pero la expresión sólo llega a nivel basal en presencia de tetraciclina. La expresión de alto nivel de tTAV es tóxica, posiblemente debido a la interacción del dominio VP16 con factores de transcripción clave durante el desarrollo (Phuc *et al.*, 2007; figura modificada de Gabrieli *et al.*, 2014).

Genes Marcadores para Mosquitos Transgénicos. La proteína nativa verde fluorescente (Green Fluorescent Protein: GFP), fue aislada originalmente de la medusa *Aequoria victoria* del pacífico norte (Shimomura *et al.*, 1962). Se demostró que esta tenía propiedades especiales: no necesita de sustrato para fluorescer, es muy estable en tejidos fijados o vivos (Ward, 1979).

Desde que el ADNc que codifica para la GFP fue clonado por Prasher y colaboradores (1992), se ha utilizado como un marcador de expresión genética, en estudios de tráfico y localización de proteínas en células y tejidos de diversos organismos. Lo anterior se consigue fusionando la secuencia codificante de la GFP con el promotor, o fase de lectura con la secuencia de ADNc codificante de la proteína de

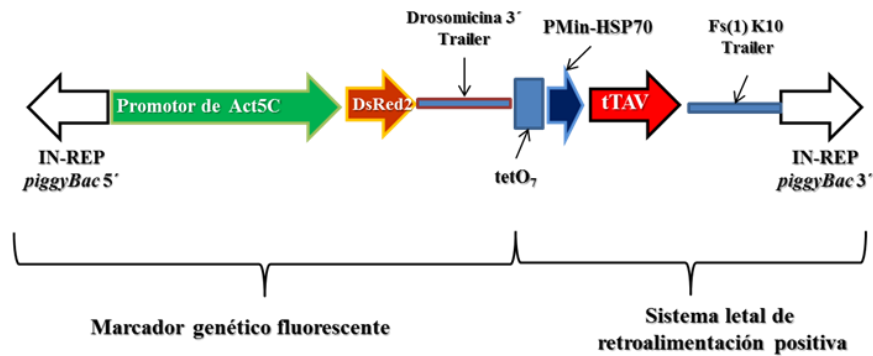


Figura 9. Estructura del sistema letal de un componente (ver texto). La construcción genética está integrada dentro de las secuencias invertidas repetidas (IN-REP) del transposón piggyBac. En el extremo 5', justo debajo del IN-REP 3' del piggyBac, se encuentra el promotor de Act5, que se expresa en la mayor parte del cuerpo del insecto. El promotor Ac5 activa la transcripción de la proteína roja fluorescente (Dsred2) al encontrarse río arriba de éste; por lo que se usa como marcador genético para seguir a los moscos transgénicos. El sistema letal de retroalimentación positiva o de un componente, es construido con una región sintética de siete sitios de pegado (tetO7) para la proteína reguladora. La región tetO7, se encuentra justo antes del promotor mínimo de HSP70 y en conjunto activan la transcripción del regulador transicional quimérico tTAV, el cual tiene varios dominios funcionales, como son el dominio de unión a ADN, el dominio de regulación que se une a tetraciclina y el dominio de trans-activación de la proteína V16 del virus herpes de humano. Este regulador se une a su propio promotor como un sistema de retro-alimentación positiva, que se ha sugerido es letal por que posiblemente secuestra reguladores transcripcionales durante el desarrollo del insecto (Kim *et al.*, 2007.)

interés (Cubitt *et al.*, 1995; Prasher, 1995; Ward, 1979). Se ha logrado la generación de mutantes de GFP, que presentan diferentes rangos de excitación-emisión, resultando en la fluorescencia en diversos colores como en rojo y azul, (red-shifted GFP: rsGFP y la Blue Fluorescent Protein: BFP), por lo que se pueden utilizar en diversos blancos de localización y expresión simultánea en la misma célula o tejido (Ormö *et al.*, 1996). Otra proteína que se ha usado frecuentemente como marcador genético para insectos es DsRed la cual fue aislada del coral *Discosoma spp.* (Matz *et al.*, 1999). Algunas de sus variantes mutagénicas como mCherry, han sido usadas como marcadores genéticos para la selección de moscos transgénicos bajo el control de expresión de promotores órgano o tejido específico, como es el caso del promotor *Act5* de actina muscular, que se expresa en el cuerpo del insecto y el promotor *3xP3* que se expresa específicamente en ojos. Esto permite la simple selección visual del portador, sin destruir ningún órgano o tejido del mosquito transgénico (Dong *et al.*, 2015).

INGENIERÍA GENÉTICA PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTOR

Insectos que Trasmiten un Gen Dominante Letal de Uno y Dos componentes. El sistema de dominante letal de un componente fue

desarrollado por el grupo Alphey *et al.* (2010), basándose el sistema de regulación tTAV-OP₇ (Figs. 4 a 7). En este caso el módulo sintético es sencillo: el gen efector (que codifica para la proteína que se desea expresar), es el mismo regulador transcripcional que activa su propia transcripción, al llevar un promotor quimérico OP₇-PM, cuya expresión autóloga es tóxica en insectos (Fig. 7). El mecanismo por el cual la sobre expresión del transactivador tTAV es tóxico para insectos se desconoce, ya que trabajos previos se ha encontrado no ser letal en ratones, sin embargo, se ha propuesto que en insectos la sobreexpresión de tTA secuestra a reguladores clave del desarrollo embrionario en insectos o interfiriendo con el sistema de proteólisis dependiente de ubiquitina (Thomas *et al.*, 2000).

En el caso del sistema de dos componentes el transactivador quimérico tTAV regula la transcripción de un gen efector (HidAla5), el cual es un gen que dispara la muerte celular programada, logrando la expresión específica de tejido a través de poner el gen que codifica para el transactivador tTAV bajo un promotor órgano o tejido específico, mientras que el efector se pone bajo el promotor OP₇-PM (Heinrich y Scott, 2000; Horn y Wimmer, 2003). La ventaja es que se puede modular la expresión del gen de interés porque es posible apagarlo en presencia de Tc, (Figs. 9 y 10) (Stebbins *et al.*, 2001).

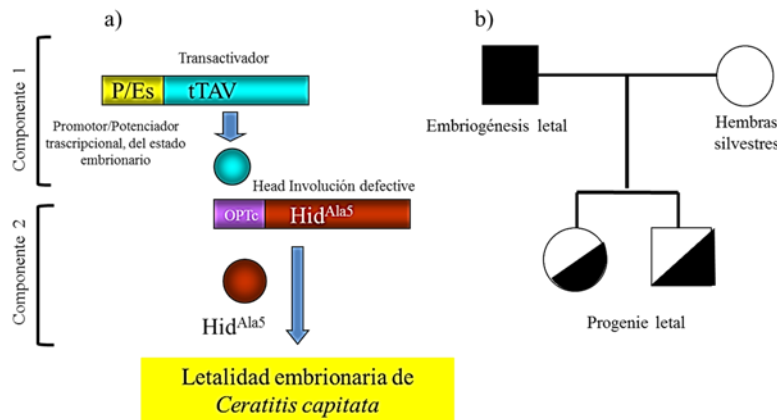


Figura 10. El sistema de letalidad embrionaria de dos componentes fue desarrollado en *Ceratitidis capitata* por Schetelig *et al.*, en 2009. En a) se muestra el sistema de dos componentes que consiste en un promotor embrionario Sry- α que regula el transactivador quimérico tTAV, que a su vez controla la expresión del gen que codifica para la proteína *Hind^{Ala5}*, la cual es un elemento en la cascada de transducción de señales que dispara la muerte celular programada. El sistema letal es regulado negativamente por Tc, lo que permite reproducir los insectos en el laboratorio y en ausencia de Tc el gen *Hind^{Ala5}* se expresa durante el desarrollo embrionario y es letal en la progenie (Schetelig *et al.*, 2009).

Los primeros indicios de la funcionalidad de esta tecnología fueron demostrados en un trabajo reportado en *Drosophila melanogaster* Meigen, en donde se construyó un módulo que lleva el transactivador tTA bajo un promotor (*yolk 1*) que se expresa en la yema de huevo e insertando el gen pro-apoptótico *Hind^{Ala5}* bajo el promotor *OP₇*, es posible regular la transcripción en presencia de Tc (Heinrich y Scott, 2000). Tanto los machos como en las hembras de una cepa que llevan ambos componentes son viables en medio suplementado con Tc, pero sólo los machos sobreviven en medio en ausencia de Tc. Heinrich y Scott (2000) proponen que una cepa con tales propiedades sería ideal para un programa de liberación para garantizar un adecuado control de Insectos, ya que es más eficaz que el método SIT. Un sistema de letalidad embrionaria de dos componentes fue desarrollado en *Ceratitidis capitata*. El sistema consiste en un promotor embrionario Sry- α que regula el transactivador quimérico tTAV, mismo que a su vez controla la expresión de gen que codifica para la proteína *Hind^{Ala5}*, la cual es un elemento en la cascada de transducción de señales que dispara la muerte celular programada. El sistema letal es regulado negativamente por Tc, lo que permite reproducir los insectos en el laboratorio y, en ausencia de Tc, el gen *Hind^{Ala5}* se expresa durante el desarrollo embrionario y resulta letal en la progenie (Fig. 10) (Schetelig *et al.*, 2009). No obstante, el sistema letal de dos componentes no

ha sido utilizado en la supresión de insectos para el control de las ETV.

Mosquitos con Fenotipo sin vuelo. Los métodos modernos en el control de insectos requieren del conocimiento detallado del ciclo de vida, fisiología y comportamiento del mosquito. En este sentido el vuelo es una función fundamental durante el apareamiento sexual, así como en la dispersión y escape de los depredadores en el estado adulto. Con estas consideraciones se desarrollaron líneas transgénicas de *A. aegypti* para tener un fenotipo reprimible no volador específico expresado solo en hembras. Lo anterior se logró utilizando dos transgenes separados o un único transgén, y el uso del promotor de actina 4 (*Act4*) para la expresión específica de una versión mutante de actina no funcional en las hembras de *A. aegypti* (Fu *et al.*, 2010). También se han desarrollado líneas transgénicas de *Aedes albopictus* Skuse, con un fenotipo similar (Labbé *et al.*, 2012); sin embargo, no existen estudios que se hayan realizado en ambientes confinados ni tampoco en campo, para poder estimar o medir su efectividad.

MOSQUITOS TRANSGÉNICOS REFRACTARIOS A PATÓGENOS O VIRUS

Mosquitos Refractarios a Malaria. La malaria permanece como una de las enfermedades más devastadoras, causando alrededor de un millón de

mueres de seres humanos por año en el mundo, debido a esto ha sido objeto de intenso estudio durante varias décadas. El conocimiento del ciclo de vida de este parasito indica que el estadio más vulnerable del *Plasmodium* es el ooquiste encontrado en el intestino medio (de sólo cinco ooquistes por insecto), razón que lo convierte el primer blanco de ataque empleando mosquitos transgénicos que expresen moléculas efectoras antiplasmódicas o, en su caso, mediante para-transgénesis que involucra el uso de simbiosis transgénicos del mosquito, mismos que expresan los efectores en presencia del ooquiste (Wang y Jacobs-Lorena, 2013). En *Anopheles stephensi* Liston, el péptido MS1, que se une a un posible receptor del oocineto, se ha expresado en el intestino medio en MTs; dicho péptido inhibe fuertemente la invasión del oocineto y subsecuentemente éste es incapaz de transmitir el parasito (Ghosh *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2002). Reportes posteriores de diferentes laboratorios han expresado diferentes péptidos con resultados similares. Estos estudios demuestran que es posible reducir la transmisión del *Plasmodium* vía modificación genética del mosquito vector. No obstante, estos logros, se debe de trabajar en la ventaja genética (genética dirigida o Gene-Drive GD) para que los moscos transgénicos refractarios, portadores de los efectores antes mencionados, pudiesen ser efectivos para su aplicación en algún programa de sustitución poblacional.

Mosquitos Refractarios a Virus. Debido a que el genoma del virus del dengue es de ARN, una de estas estrategias para la generación de moscos refractarios se basó en la tecnología del ARN interferente (ARNi), la cual dirige la maquinaria de degradación de ARN hacía el genoma viral, generando moscos resistentes a la infección. Los resultados obtenidos fueron que la línea Carb77 que expresa el ARNi, redujo la infección del mosquito significativamente en comparación con el control, mostrando un alto nivel de resistencia contra dengue 2 (DEN-2). Esto sugiere que esta tecnología puede ser una poderosa herramienta para el desarrollo de moscos refractarios a virus y un posible uso en estrategias de reemplazo poblacional para controlar la transmisión del DEN-2 (Franz *et al.*, 2006).

Se ha demostrado en muchos trabajos que el diseño y uso de ribozimas llamadas cabeza de martillo (del inglés Hammerhead ribozymes: HRZ's) son una tecnología útil para apagar genes o evitar la infección de virus de ARN (Scott *et al.*, 2013). En un trabajo reciente se diseñaron ribozimas dirigidas contra genes proteínas estructurales del virus CHIKV y se demostró que son efectivas para suprimir la infección del virus tanto en células Vero como en líneas transgénicas de mosquitos. Este informe proporciona una prueba de que las HRZs, adecuadamente manipuladas son poderosos efectores antivirales para la generación de mosquitos transgénicos resistentes a virus (Mishra *et al.*, 2016).

ESTRATEGIAS DE REEMPLAZAMIENTO O DISMINUCIÓN POBLACIONAL DE INSECTOS POR GENÉTICA DIRIGIDA (GENE-DRIVE)

La Genética Dirigida (GD), se define como la práctica de estimular la herencia sesgada de genes particulares o módulos sintéticos, con el fin de disminuir o sustituir una población silvestre por un organismo menos perjudicial. Aunque el concepto se desarrolló a inicios de la década pasada, éste se ha reforzado gracias a la tecnología de edición de genomas que proporciona un número vasto de estrategias en donde sólo la imaginación es el límite (Oye *et al.*, 2014; Fig. 11). El desarrollo de estrategias GD puede ser el camino para hacer que una población de insectos refractaria sea capaz de sustituir a una población previa, o bien que a través de GD sexual podría permitir la supresión poblacional, (favoreciendo que una población dada de insectos tienda a desaparecer de manera sustentable). Aquí describiremos algunos elementos genéticos naturales que tienen propiedades GD (elementos Medea, genes de endonucleasa HEGs: Homing Endonuclease Genes, y la bacteria intracelular Wolbachia), los cuales son interesantes para manipulación y su posible aplicación en programas de sustitución poblacional de insectos para controlar las ETV. Posteriormente describiremos algunas de las nuevas estrategias de GD basadas en el sistema de edición de genomas CRISPR-CAS9 (Esvelt *et al.*, 2014).

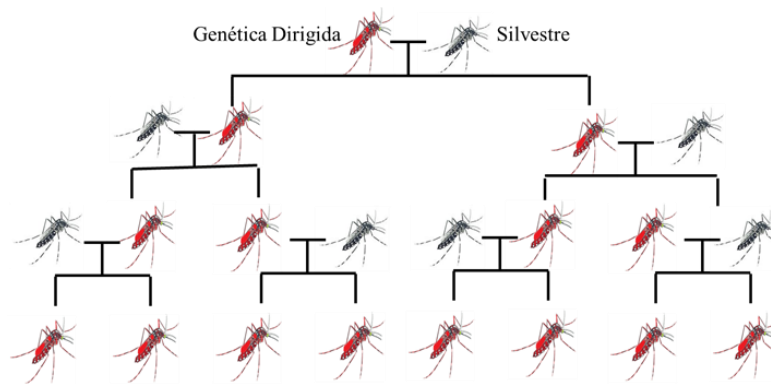


Figura 11. El concepto de genética dirigida (del inglés Gene Drive: GD) lo podemos ejemplificar en un caso hipotético de un transgen que bloquea la transmisión de la malaria (pero que no tiene valor selectivo en la población de insectos). Se podría impulsar el incremento en su frecuencia genética en la población, sustituyendo a los silvestres (sin color) a través de una construcción genética que incluya un gen que proporciona una ventaja selectiva (Gene Drive o GD) (en rojo) (figura modificada de Esvelt *et al.*, 2014).

Elementos Medea. Los Medea son miembros de una clase de “elementos genéticos egoístas” que mejoran su transmisión genética al inducir la muerte de aquellas crías que no logran heredar el elemento (Burt y Trivers, 2006). Éste se identificó por primera vez en el escarabajo de la harina (*Tribolium castaneum* Herbst), a través del análisis de los cruces entre cepas aisladas geográficamente. El elemento Medea se fija en una posición del genoma, y tiene la característica de que la descendencia de las hembras heterocigotas que se aparean con machos silvestres, únicamente sobreviven aquellos que tienen el elemento Medea. En contraste, los machos Medea heterocigotos que se cruzan con hembras silvestres dan lugar al tipo silvestre de manera mendeliana (Beeman *et al.*, 1992). No hace mucho tiempo, fue desarrollado un módulo sintético Medea que tiene los elementos para poder comportarse como el natural; no obstante, presentó una baja frecuencia de invasión y un alto costo reproductivo en estudios poblacionales en *D. melanogaster*. Así que es necesario ajustar algunos parámetros para que, en el futuro, dicho módulo resulte efectivo para su acoplamiento a un gen de resistencia patógenos o virus para su aplicación en la generación de moscos transgénicos refractarios (Marshall *et al.*, 2011b).

Genes de endonucleasa. Los HEGs que tiene un comportamiento de expansión en las frecuencias genéticas sobre todo cuando la nucleasa reside dentro de un intrón tipo I y puede esparcirse dentro de la población hasta llegar a un 95 % los

individuos a nivel experimental (Gimble y Thorner, 1992). Debido a que este es un elemento genético móvil que puede terminar invadiendo un genoma, teniendo algún valor negativo en algunos individuos de la población, por lo que desde el punto de vista GD para la sustitución poblacional lo hace interesante. Esto ha atraído la atención de diversos investigadores hacia el estudio de los mecanismos de recombinación destinados a controlar de manera precisa y dirigida la expansión dentro de un locus en el genoma, para poder utilizarlo como un sistema de GD en algún programa de sustitución poblacional, asociando algún gen de interés para el control de las ETV (Deredec *et al.*, 2008; Roy *et al.*, 2016).

Bacterias del Genero *Wolbachia*. Existe una gran variedad de cepas de *Wolbachia* que se comportan como si fuesen elementos de ADN egoísta principalmente, y algunas veces, mostrando ciertos aspectos simbióticos de las poblaciones de artrópodos y nemátodos, por lo que se ha pensado utilizar esta información como un recurso de GD para suprimir la transmisión del virus del dengue (Hoffman *et al.*, 2011). A pesar de que *Wolbachia* no tiene una gran capacidad infecciosa entre los insectos en la escala de tiempo; su mayor éxito de expansión en la naturaleza se debe a que estos elementos se transmiten por vía materna, al igual que las mitocondrias, pero generando una distorsión en la biología reproductiva de su anfitrión (Jansen *et al.*, 2008). En este caso, los machos no propagan al endosimbionte sólo es heredado de la madre; en

lugar de eso los machos producen espermatozoides modificados que forman cigotos viables solamente con los huevos de las hembras infectadas, un fenómeno conocido como incompatibilidad citoplásmica (CI), fusionando como un elemento esterilidad parcial de machos perjudicando así la reproducción de hembras no infectadas.

Debido a que *Wolbachia* es un simbiote obligado, no es posible cultivarla y no se han podido generar herramientas de ingeniería genética para modificarla. Así que, para utilizar a esta bacteria en el control genético, se deben de liberar mosquitos infectados, los cuales son generados a través del aislamiento de *Wolbachias* simbiotes de otras especies de insectos como *D. melanogaster* que, a través de técnicas de fragmentación celular, y mediante microinyección de embriones de *A. aegypti* se pudieron obtener líneas hiperinfectadas (Joubert 2016). La posibilidad de infectar *A. aegypti* con *Wolbachia* permitió encontrar que el fenómeno de incompatibilidad citoplásmica favorece la refractabilidad contra dengue y zika (Moreira *et al.*, 2009). No obstante, existen reportes que en *A. albopictus* infectados con *Wolbachia* no se tiene ningún efecto sobre la refractabilidad del virus dengue (Rainey *et al.*, 2014); o incluso se incrementa la susceptibilidad a la infección de *Culex tarsalis* Linnaeus, contra el Virus del Nilo Occidental (Dodson *et al.*, 2014; Hughes *et al.*, 2012).

Las bases moleculares de la refractabilidad no se conocen, pero se sabe que induce diversos componentes del sistema inmune del mosquito, las especies reactivas de oxígeno y la competencia de recursos limitantes como el colesterol (Kambris *et al.*, 2009). La transferencia vertical de *Wolbachia* es el principal mecanismo de propagación; no obstante, se ha encontrado también evidencias de la transferencia horizontal utilizando, marcadores moleculares de cepas de *Wolbachia* (Ahmed *et al.*, 2016). Por lo anterior se debe considerar conocer a mayor detalle el comportamiento de las diversas cepas de *Wolbachia* para hacer estudios en el laboratorio, antes de proponer un programa de control ETV a fin de evitar errores de estrategias que pudieran poner en riesgo la salud humana o un impacto

ecológico negativo por el uso de esta bacteria (Cuadro 2).

Genética Dirigida (GD) con CRSIPR-CAS9.

Aunque existen varios tipos de elementos genéticos egoístas en la naturaleza, pocos han sido diseñados con éxito en el laboratorio hasta el momento. No obstante, con el descubrimiento del sistema CRISPR-Cas9 se abren un sinnúmero de oportunidades para ser utilizado el diseño, optimización y mejoramiento de unidades de genes sintéticos egoístas GD para su uso en el control ETV. Aquí describen dos diferentes tipos de unidades de genes de ingeniería y sus aplicaciones potenciales en la manipulación de las poblaciones de mosquitos silvestres (Macias *et al.*, 2017) (Fig. 12).

Genética dirigida (GD) utilizando el sistema CAS9-ARN guía.

En este sentido se ha estado trabajando en diferentes grupos de investigación en el mundo; sin embargo, están sólo en etapa de desarrollo. Por ejemplo, se elige un gen esencial cuya pérdida genere la inviabilidad del organismo (Fig. 13). Las ventajas se incrementan introduciendo varias unidades de ARN guía, con lo cual se aumenta la frecuencia de corte y se reduce la evolución de alelos resistentes a GD hasta niveles indetectables. Al elegir sitios diana dentro de un gen esencial, éste debe ser modificado para hacer un alelo resistente, e incluirlo en la construcción, con el sistema CAS9-ARN guía, al que contenga el gen marcador y gen de resistencia para el patógeno o virus que se trate. Cualquier acontecimiento que elimine los sitios blanco del sistema CAS9-ARN, producirán letalidad en lugar de crear una unidad de alelo resistente, lo que aumenta aún más la robustez de la construcción genética GD y favoreciendo la sustitución poblacional de insectos (Esvelt *et al.*, 2014) (Fig. 13).

Sistema de CRISPR-Cas9 de Distorsión de las Frecuencias Sexuales para el Control Genético de Insectos (Gene Drive Sex).

Una estrategia recientemente descrita por Galizi *et al.* (2016), se basa en las nucleasas CAS9 y una guía de ARN que se dirige contra un gen que reside en el cromosoma sexual. Para evaluar el sistema se desarrollaron líneas genéticas de *Anopheles gambiae* sensu stricto CRISPRSD. Todas las líneas

Cuadro 2. Tipo de Control de Mosquitos (ventajas y desventajas).

Métodos de control de insectos	Ventajas	Desventajas
Químico	<ol style="list-style-type: none"> 1) Efectividad alta 2) Baratos 3) Fácil aplicación 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Generación de resistencia 2) No hay especificidad (dañan insectos benéficos). 3) Contaminante en el ambiente, 4) Potencialmente teratógenos y carcinógenos.
Wolbachia	<ol style="list-style-type: none"> 3) Su uso podría ser relativamente más barata que los mosquitos transgénicos. 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Son obligadamente intracelulares, por lo que no se pueden cultivar fuera de las células del huésped. 2) No hay herramientas genéticas para manipular este organismo. 3) Baja infectividad de insecto a insecto; pero se transmiten a través de los procesos sexuales a la descendencia. Se requiere la liberación de mosquitos infectados. 4) No son específicos (pudiendo perjudicar especies importantes y generar un desequilibrio ecológico). 5) Poco estudiados. 6) La protección contra un tipo de virus o patógeno no protege contra otro, o puede dar mayor susceptibilidad.
Genética clásica	<p>Programas de este tipo han funcionado para el control de poblaciones de insectos.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) Requiere de infraestructura para la generación de mosquitos estériles. 2) Se requieren estudios de optimización del proceso de esterilización de mosquitos. 3) Genera residuos radioactivos contaminantes. 4) Se requiere de personal altamente especializado en la producción de mosquitos estériles. 5) Impacto negativo en la salud del personal expuesto a la radiación. 6) Altamente costoso.
Mosquitos transgénicos	<ol style="list-style-type: none"> 1) Puede evitar la diseminación del patógeno o disminuirlo del mosquito. 2) Podría ser la estrategia para exterminar una especie de mosquito peligrosa para la humanidad. 3) Altamente especie específico. 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Se debe de comprar o desarrollar tecnología propia. 2) Se deben de liberar mosquitos constantemente para generar la refractabilidad a patógenos o para disminuir la población de insectos, porque la población transgénica tiende a desaparecer. 3) Muchos de los modelos transgénicos no han sido probados en campo y muchos de ellos están en alguna etapa previa de desarrollo. 4) Se podrían generar mutaciones con fenotipo silvestre.

CRISPRSD mostraron una fuerte distorsión de las frecuencias sexual, con un sesgo masculino entre la progenie que van desde 86.1 % a 94.8% de los machos (Fig. 13). Estos resultados son muy prometedores para que esta tecnología pueda ser usada en un futuro en algún programa de control de ETV.

LIBERACIÓN DE INSECTOS TRANSGÉNICOS

Para la liberación de moscos transgénicos se han considerado aspectos del comportamiento de hembras y machos. Dentro de los cuales se sabe que solo la hembra tiene hábitos hematófagos, es la que pica y trasmite las enfermedades. Por otro lado, durante la reproducción sexual, la hembra copula con un macho una sola vez y almacena los espermatozoides en su espermoteca (Lang, 1956); por lo tanto, solo los machos deben ser liberados durante los programas de control, utilizando la tecnología del mosco estéril o dominante letal, con el propósito de que compitan sexualmente con los machos silvestres (Phuc, 2007).

En el presente siglo el desarrollo científico y tecnológico adquirido por el grupo Luke Alpey de la Universidad de Oxford en Inglaterra permitió fundar la compañía OXITEC el año 2002 (Alpey, 2002). Entre varias tecnologías desarrolladas por ellos cuentan con una línea transgénica llamada OX513A de moscos transgénicos dominante letal RICDL (del inglés: Release of Insects Carrying a Dominant Lethal) de *A. aegypti*, como se mencionó anteriormente. Esta línea porta un gen dominante letal que actúa a nivel larvario (Figs. 6 y 7). Los moscos pueden ser reproducidos en el laboratorio ya que la expresión del gen letal se “apaga” en presencia de un antibiótico (tetraciclina); sin embargo, una vez liberados los moscos adultos transgénicos y homocigotos se cruzarán con las hembras silvestres y, en consecuencia, todos los descendientes morirán en el estado larvario en tanto que la tetraciclina ya no está presente (Phuc *et al.*, 2007).

En el 2009, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el gobierno de Malasia, así como la Sociedad de Ciencias de Malasia consideraron utilizar esta tecnología para el control del dengue. Esto impulsó un primer estudio de impacto ecológico de la tecnología RILDC en un área de

selva Pahang en Malasia, donde se liberaron machos adultos de misma línea de mosquitos transgénicos anteriormente usadas en las Islas Caimán (OX513A), para compararla con una línea silvestre ambientada al laboratorio de *A. aegypti*. En ese estudio evaluaron parámetros de sobrevivencia y dispersión, comparando el comportamiento de ambas líneas de insecto a través de experimentos de captura y recaptura. En este caso se encontró que había diferencia significativa en la distancia de dispersión la cual fue de 52 metros de la línea transgénica contra 100 metros de la silvestre en promedio. Mientras que la sobrevivencia promedio fue de dos días en la línea transgénica, mientras en la silvestre fue de 2.2. Estos datos son importantes para futuras pruebas de liberación de insectos o la implementación de estrategias de control genético en el campo, para esta u otras líneas de insectos transgénicos (Lacroix *et al.*, 2012).

Así que la primera liberación de un millón de moscos macho de la línea transgénica OX513A de *A. aegypti* realizada en el 2010 en las Islas Caimán en un espacio de 14 hectáreas y durante un periodo de cuatro semanas. Provocaron la supresión de la población silvestre en un 80 %. Por lo que estos resultados sugieren que esta tecnología puede ser utilizada para el control poblacional de insectos durante un brote epidémico (Harris *et al.*, 2011).

Después de un brote de dengue en Key West, Florida, durante los años 2009 y 2010, autoridades, consideraron realizar la primera liberación en EU de los mosquitos machos de *A. aegypti* de la línea transgénica OX513A, para la supresión poblacional. A pesar de la divulgación y atención de los medios, sólo la mitad de la comunidad estaba al tanto de la propuesta y la mitad de ellos apoyaron la idea, sin embargo, nunca se llegó a realizar la liberación de mosquitos transgénicos. De este estudio se concluye que para la implementación de las nuevas estrategias de salud pública requiere una participación muy importante de la comunidad (Ernst *et al.*, 2015).

Mientras tanto en Brasil, debido a la epidemia de zika que inicio durante el 2015, se abrió a un debate público en aquel país, que involucró a responsables políticos y legisladores, así como el

público en general para el uso de la tecnología de RILDC y, particularmente el uso de la línea transgénica OX513A, las cosas fueron distintas. Aquí (en dónde también) se discutieron los riesgos potenciales de esta tecnología y fueron sopesados con respecto al contexto de la epidemia de Zika. Esto elevó la importancia percibida de *A. aegypti* como insecto vector. La Comisión elaboró una lista completa de riesgos percibidos y fueron analizados sistemáticamente. Tales riesgos incluyen el potencial de supervivencia hasta la edad adulta de los estadios inmaduros del insecto que portan el transgen, es decir, como el riesgo de ser comido por depredadores, o si el transgen deja de ser expresado al apagarse por la exposición a suficiente tetraciclina del medio ambiente, etc. Otros peligros percibidos en este foro, incluyen el potencial alergénico o la toxicidad de las proteínas expresadas por el gen, la posibilidad de que el flujo de genes o aumento de la transmisión de patógenos humanos y la ocupación de los lugares liberados de *A. aegypti* por otras especies de insectos vectores; sin embargo en abril de 2014, la Comisión Técnica Nacional de Bioseguridad de Brasil completó una evaluación del riesgo de la liberación de la línea transgénica OX513A de *A. aegypti* y concluyó que la cepa no presentó nuevos riesgos biológicos para los seres humanos o el medio ambiente y podría ser liberado en Brasil. En ese momento, Brasil se convirtió en el primer país en aprobar la liberación sin restricciones de un mosquito modificado genéticamente para el control de enfermedades (de Andrade *et al.*, 2016).

Lo anterior dio la pauta para la liberación en campo de la línea transgénica dominante letal *Aedes aegypti* (OX513A) durante el 2015 para una etapa de evaluación en campo en los suburbios de Juazeiro, Bahía, Brasil. Donde se liberaron machos de manera regular durante más de un año, lo cual redujo la población local de *A. aegypti* en aproximadamente 95 %, de la original, estos resultados fueron sustentados por los datos de poblacional de adultos mediante trampas y en el 81 % en base a los índices de ovoposición en ovitrampas, en comparación con el área control adyacente donde no se liberaron insectos transgénicos. La competitividad de apareamiento de los machos liberados fue similar a la estimada

en los ensayos que se realizaron en las islas Caimán durante el 2010 (Harris, 2011). Lo cual indica que las diferencias ambientales y de las características genéticas de la cepa OX513A de *A. aegypti* liberada no tuvieron impacto negativo en el éxito de apareamiento de los machos. Por lo que concluyen que la liberación sostenida de los machos OX513A puede ser un método eficaz y ampliamente útil para la supresión del vector del dengue *A. aegypti*. Los autores sugieren que con el nivel supresión observada, probablemente sería suficiente para prevenir epidemias de dengue en las localidades con característica similares a la comunidad estudiada (de Andrade *et al.*, 2016).

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL USO DE MOSCOS TRANSGÉNICOS

Derivado de la epidemia mundial de las ETV, la generación de mosquitos transgénicos es una alternativa muy importante para el control de estas enfermedades y por lo que actualmente está pasando a una etapa de pruebas de campo y el costo beneficio nos dará respuestas en un plazo no muy largo sobre la verdadera efectividad de esta tecnología. Las principales desventajas actuales del mosquito dominante letal (como la línea OX513A de *A. aegypti*), requiere una producción masiva y continúa (Puch *et al.*, 2011; de Andrade *et al.*, 2016). Lo cual involucra inversiones importantes en infraestructura para los laboratorios de biología molecular para la producción y monitoreo del uso de la tecnología, así como el pago de los derechos de uso de organismos patentado, lo cual podría ser muy costoso para países como el nuestro. Por lo cual se requiere generar tecnología propia que nos permita abaratar alternativamente el uso de los moscos transgénicos a través de la búsqueda de nuevos métodos para inhibir la replicación de viral o multiplicación del patógeno. Entre las ventajas más importantes de la tecnología de los moscos transgénicos, nos permite que la supresión y/o sustitución poblacional son altamente específicos (especie-específica), a diferencia del uso de insecticidas como control químico o biológico usando microorganismos. (Catterucia *et al.*, 2009; Puch *et al.*, 2011; Massonnet-Bruneel *et al.*, 2013; de Andrade *et al.*, 2016; Phuc *et al.*, 2016).

La nueva tecnología de moscos transgénicos también nos genera una ventaja sobre los moscos estériles generados por radiación (SIT; Steril Insect Technology), ya que son altamente eficientes en la esterilidad reproductiva, los mosquitos transgénicos es una tecnología segura (genéticamente específica y no se exponen a radiación a seres humanos) y de manejo ecológicamente más amigable con el ambiente, (no se producen desechos radioactivos), (LaChanse *et al.*, 1967; Lecis *et al.*, 1975; Catterucia *et al.*, 2009). Adicionalmente las estrategias contemporáneas de manipulación genética son ya rutinarias, lo que permitirá, a través de la genética dirigida (GD), el control de las ETV de manera eficiente y sustentable (Cuadro 2).

PERSPECTIVAS EN NUESTRO GRUPO DE INVESTIGACIÓN

En nuestro grupo de investigación estamos trabajando para desarrollar mosquitos transgénicos de *A. aegypti* dominante letal y la generación de moscos refractarios a virus dengue. El sistema de mosco transgénico dominante letal, está basado en la caracterización de un gen bacteriano, aislado previamente en nuestro laboratorio, el cual, al ser expresado tanto en células bacterianas como en células de insecto, resulta en la muerte de éstas (datos no publicados). Por otro lado, pretendemos tener moscos transgénicos resistentes a virus dengue expresando un péptido antimicrobiano llamado escorpina, tanto en glándulas salivales como en intestino (hemos demostrado previamente que este péptido tiene propiedades contra virus Dengue y *Plasmodium*) (Carballar-Lejarazu *et al.*, 2008). La efectividad de estas dos líneas de moscos transgénicos se evaluará tanto en condiciones de laboratorio como en sistema confinado de jaulas en las instalaciones del Instituto Nacional de Salud Pública en Tapachula Chiapas. Pretendemos en el futuro desarrollar líneas de moscos transgénicos con distorsión de sexo (Gene Drive sexual) y GD para favorecer la introducción de genes refractarios a patógenos y enfermedades, con el fin de incrementar las frecuencias de los genes refractarios en poblaciones de *A. eaegypti*, durante un posible programa de sustitución poblacional.

LITERATURA CITADA

- AHMED, M. Z., BREINHOLT, J. W. AND Y. A. KAWAHARA. 2016. Evidence for common horizontal transmission of *Wolbachia* among butterflies and moths. *Ahmed et al. BMC Evolutionary Biology*, 16: 118.
- ALPHEY, L. 2002. Re-engineering the sterile insect technique. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(10): 1243–1247.
- ADELMAN, Z. N. AND Z. TU. 2016. Control of mosquito-borne infectious diseases: sex and gene Drive. *Trends in Parasitology*. M32(3): 219–229. doi: 10.1016/j.pt.2015.12.003.
- ATKINSON, P. W., PINKERTON, A. C. AND D. A. O'BROCHTA. 2001. Genetic transformation systems in insects. *Annual Review of Entomology*, 46: 317–346. doi: 10.1146/annurev.ento.46.1.317.
- BERG, J. M. 1990. Zinc fingers and other metal-binding domains. Elements for interactions between macromolecules. *The Journal of Biological Chemistry*, 265: 6513–6516.
- BEEAMAN, R. W., FRIESEN, K. S. AND R. E. DENELL. 1992. Maternal-effect selfish genes in flour beetles. *Science*, 256: 89–92.
- BIBIKOVA, M., GOLIC, M., GOLIC, K. G. AND M. CARROLL. 2002. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 161(3):1169–1175. [PubMed: 12136019].
- BIBIKOVA, M., BEUMER, K., TRAUTMAN, J. K. AND D. CARROLL. 2003. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science*, 300: 764. doi: 10.1126/science.1079512.
- BURT, A. AND R. TRIVERS. 2006. Genes in conflict. Cambridge, MA: Belknap Press. 632 pp.
- CARBALLAR-LEJARAZÚ, R., RODRIGUEZ, M. H., DE LA CRUZ HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, F., RAMOS-CASTAÑEDA, J., POSSANI, L. D., ZURITA-ORTEGA, M., REYNAUD-GARZA, E., HERNÁNDEZ-RIVAS, R., LOUKERIS, T., LYCETT, G. AND H. LANZ-MENDOZA. 2008. Recombinant scorpine: a multifunctional antimicrobial peptide with activity against different pathogens. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65: 3081–3092. doi: 10.1007/s00018-008-8250-8.
- CATTERUCCIA, F., CRISANTI, A., WIMMER E. A. AND J. MALAR. 2009. Transgenic technologies to induce sterility. *Malaria Journal*, 16:8 Suppl. 2–Suppl. 7. doi: 10.1186/1475-2875-8-S2-S7.
- CUBITT, A. B., HEIM, T., ADAMS, S. R., BOYD, A. E., GROSS, L. A. AND T. Y. TSIEN. 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins.

- proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(11): 448–455.
- CHANDRASEGARA, S. AND S. CARROLL. 2016. Origins of programmable nucleases for genome engineering. *Journal of Molecular Biology*, 428: 963–989. doi:10.1016/j.jmb.2015.10.014.
- CHEN, X. G., JIANG, X., GU, J., XU, M., WU, Y., DENG, Y., ZHANG, C., BONIZZONI, M., DERMAUW, W., VONTAS, J., ARMBRUSTER, P., HUANG, X., YANG, Y., ZHANG, H., HE, W., PENG, H., LIU, Y., WU, K., CHEN, J., LIRAKIS, M., TOPALIS, P., VAN LEEUWEN, T. I., HALL, A. B., JIANG, X., THORPE, C., MUELLER, R. L., SUN, C., WATERHOUSE, R. M., YAN, G., TU, Z. J., FANG, X. AND A. A. JAMES. 2015. Genome sequence of the Asian Tiger mosquito, *Aedes albopictus*, reveals insights into its biology, genetics, and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(44): E5907–E5915. doi:10.1073/pnas.1516410112.
- CHRISTIAN, M., CERMAK, T., DOYLE, E. L. SCHMIDT, C., ZHANG, F., HUMMEL, A., BOGDANOVA, A. J. AND D. F. VOYTAS. 2010. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 186: 757–761. doi: 10.1534/genetics.110.120717.
- CHOULIKA, A., PERRIN, A., DUJON, B. AND J. F. NICOLAS. 1995. Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell Biology*, 15(4): 1968–1973.
- DAME, D. A., CURTIS, C. F., BENEDICT, M. Q., ROBINSON, A. S. AND B. G. J. KNOLS. 2009. Historical applications of induced sterilization in field populations of mosquitoes. *Malaria Journal*, 8: S2. doi: 10.1186/1475-2875-8-S2-S2.
- DENG, D., YAN, C., PAN, X., MAHFOUZ, M., WANG, J., ZHU, J. K., SHI, Y. AND N. YAN. 2012. Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science*, 335: 720–723. doi: 10.1126/science.1215670.
- DE ANDRADE, P. P., LIMA-ARAGÃO, F. J., COLLI, W., DELLAGOSTIN, O. A., FINARDI-FILHO, F., HIROYUKI-HIRATA, M., DE CASTRO LIRA-NETO, A., ALMEIDA DE MELO M., LIMA-NEPOMUCENO, A., GORGÔNIO DA NÓBREGA, F., DELFINO-DEOUSA, G., HERCOSVALICENTE, F. AND M. H. BODANESE-ZANETTINI. 2016. Use of transgenic *Aedes aegypti* in Brazil: risk perception and assessment. *Bulletin of the World Health Organization; Type: Policy & practice*, Article ID: BLT.16.17337.
- DEREDEC, A., BURT, A. AND H. GODFRAY. 2008. Population genetics of using homing endonuclease genes in vector and pest management. *Genetics*, 179: 2013–2026.
- DONG, S., LIN, J., HELD, N. L., CLEM, R. J., PASSARELLI, A. L. AND A. W. FRANZ. 2015. Heritable CRISPR/Cas9-mediated genome editing in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *PLoS One*, 10(3): e0122353. doi: 10.1371/journal.pone.0122353.
- ERNST, K. C., HAENCHEN, S., DICKINSON, K., DOYLE, M. S., WALKER, K., MONAGHAN, A. J. AND M. H. HAYDEN. 2015. Awareness and support of release of genetically modified “Sterile” mosquitoes, Key West, Florida, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 21: 320–324. doi: 10.3101/eid2102.141035.
- ESVELT, K. E., SMIDLER, A. L., CATTERUCCIA, F. AND G. M. CHURCH. 2014. Concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations. *eLife*, 3:e03401. doi: 10.7554/eLife.03401.
- ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control. 2015. Rapid risk assessment: microcephaly in Brazil potentially linked to the Zika virus epidemic. Stockholm. Disponible en: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/publications/zika-microcephaly-brazil-rapid-risk-assessment-nov-2015.pdf>. (Fecha de consulta: 23-IX-2016).
- FRANZ, A. W., SANCHEZ-VARGAS, I., ADELMAN, Z. N., BLAIR, C. D., BEATY, B. J., JAMES, A. A. AND K. E. OLSON. 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. doi: 10.1073/pnas.0600479103.
- FU, G., LEES, R. S., NIMMO, D., AW, D., JIN, L., GRAY, P., BERENDONK, T. U., WHITE-COOPER, H., SCAIFE, S., PHUC, H. K., MARINOTTI, O., JASINSKIENE, N., JAMES, A. A. AND L. ALPHEY. 2010. Female-specific flightless phenotype for mosquito control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(10): 4550–4554. doi: 10.1073/pnas.1000251107.
- GABRIELI, P., SMIDLER, A. AND F. CATTERUCCIA. 2014. Engineering the control of mosquito-borne infectious diseases. *Genome Biology*, 15: 535. doi: 10.1186/s13059-014-0535-7.
- GALIZI, R., HAMMOND, A. AND K. KYROU. 2016. A CRISPR-Cas9 sex-ratio distortion system for genetic control. *Scientific Reports*, 6: 311–339. doi:10.1038/srep31139.

- GHOSH, A. K., RIBOLLA, P. E. AND M. JACOBS-LORENA. 2001. Targeting *Plasmodium* ligands on mosquito salivary glands and midgut with a phage display peptide library. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 13278–13281. doi: [10.1073/pnas.241491198](https://doi.org/10.1073/pnas.241491198).
- GODFRAY, H. C. J., NORTH, A. AND A. BURT. 2017. How driving endonuclease genes can be used to combat pests and disease vectors. *BMC Biology*, 15(1): 81. doi: [10.1186/s12915-017-04204](https://doi.org/10.1186/s12915-017-04204).
- GIMBLE, F. S. AND J. THORNER. 1992. Homing of a DNA endonuclease gene by meiotic gene conversion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 357: 301–306. doi: [10.1038/357301a0](https://doi.org/10.1038/357301a0).
- GIRALDO-CALDERON, G. I., EMRICH, S. J., SCOTT J., MACCALLUM, R. M., MASLEN, G., DIALYNAS, E., TOPALIS, P., HO, N., GESING, S., VECTORBASE CONSORTIUM., MADEY, G., COLLINS, F. H. AND D. LAWSON. 2015. VectorBase: an updated bioinformatics resource for invertebrate vectors and other organisms related with human diseases. *Nucleic Acids Research*, 43: D707–D713. doi: [10.1093/nar/gku1117](https://doi.org/10.1093/nar/gku1117).
- GONG, P., EPTON, M. J., FU, G., SCAIFE, S., HISCOX, A., CONDON, K. C., CONDON, G. C., MORRISON, N. I., KELLY, D. W., DAFA'ALLA, T., COLEMAN, P. G. AND L. ALPHEY. 2005. A dominant lethal genetic system for autocidal control of the Mediterranean fruit fly. *Nature Biotechnology*, 23(4): 453–456.
- GOSSEN, M. AND H. BUJARD. 1992. Tight Control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 5547–5551.
- GOULD, F. AND P. SCHLIEKELMAN. 2004. Population genetics of autocidal control and strain replacement. *Annual Review of Entomology*, 49: 193–217. doi: [10.1146/annurev.ento.49.061802.123344](https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123344).
- GROSSMAN, G. L., RAFFERTY, C. S., CLAYTON, J. R., STEVENS, T. K., MUKABAYIRE, O. AND M. Q. BENEDICT. 2001. Germline transformation of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, with the piggyBac transposable element. *Insect Molecular Biology*, 10: 597–604. doi: [10.1046/j.0962-11075.2001.0299.x](https://doi.org/10.1046/j.0962-11075.2001.0299.x).
- GYAWALI N., BRADBURY R. S., TAYLOR-ROBINSON A. W. The epidemiology of dengue infection: Harnessing past experience and current knowledge to support implementation of future control strategies. *Journal of Vector Borne Diseases*, 2016 Oct-Dec; 53(4):293-304.
- HANDLER, A. M. 2002. Prospects for using genetic transformation for improved SIT and new biocontrol methods. *Genetica*, 116(1): 137–149.
- HARRIS, A. F., NIMMO, D., MCKEMEY, A. R., KELLY, N., SCAIFE, S., DONNELLY, C. A., BEECH, C., PETRIE, W. D. AND L. ALPHEY. 2011. Field performance of engineered male mosquitoes. *Nature Biotechnology*, 29(11): 1034–1037. doi: [10.1038/nbt.2019](https://doi.org/10.1038/nbt.2019).
- HELINSKI, M. E. H., PARKER, A. G. AND B. G. J. KNOLS. 2009. Radiation biology of mosquitoes. *Malaria Journal*, 8: S2–S6. doi: [10.1186/1475-2875-8-S2-S6](https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-S2-S6).
- HEINRICH, J. AND M. SCOTT. 2000. A repressible female-specific lethal genetic system for making transgenic insect strains suitable for a sterile-release program. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 8229–8232. doi: [10.1073/pnas.1401442697](https://doi.org/10.1073/pnas.1401442697).
- HOFFMANN, A. A., MONTGOMERY, B. L., POPOVICI, J., ITURBE-ORMAETXE, I., JOHNSON, P. H., MUZZI, F., GREENFIELD, M., DURKAN, M., LEONG, Y. S., DONG, Y., COOK, H., AXFORD, J., CALLAHAN, A. G., KENNY, N., OMODEI, C., MCGRAW, E. A., RYAN, P. A., RITCHIE, S. A., TURELLI, M. AND S. L. O'NEILL. 2011. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature*, 476: 454–56. doi: [10.1038/nature10356](https://doi.org/10.1038/nature10356).
- HOLT, R. A., SUBRAMANIAN, G. M., HALPERN, A., SUTTON G. G., CHARLAB, R., NUSSKERN, D. R., WINCKER, P., CLARK, A. G., RIBEIRO, J. M., WIDES, R., SALZBERG, S. L., LOFTUS, B., YANDELL, M., MAJOROS, W. H. *et al.* 2002. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*, 298(5591): 129–49. doi: [10.1126/science.1076181](https://doi.org/10.1126/science.1076181).
- HORN, C. AND E. WIMMER. 2003. A transgene-based, embryo-specific lethality system for insect pest management. *Nature Biotechnology*, 21: 64–70. doi: [10.1038/nbt769](https://doi.org/10.1038/nbt769).
- HUGHES, G. L., VEGA-RODRIGUEZ, J., XUE, P. AND J. L. RASGON. 2012. *Wolbachia* strain wAlbB enhances infection by the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei* in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 1491–95. doi: [10.1128/AEM.06751-11](https://doi.org/10.1128/AEM.06751-11).
- HSU, P. D., LANDER, E. S. AND F. ZHANG. 2014. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157: 1262–1278. doi: [10.1016/j.cell.2014.05.010](https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010).

- ITO, J., GHOSH, A., MOREIRA, L. A., WIMMER, E. A. AND M. JACOBS-LORENA. 2002. Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature*, 417: 452–455. doi: [10.1038/417252a](https://doi.org/10.1038/417252a).
- JANSEN, V. A., TURELLI, M. AND H. C. GODFRAY. 2008. Stochastic spread of *Wolbachia*. *Proceedings of Biological Sciences/ The Royal Society*, 275: 2769–76. doi: [10.1098/rspb.2008.0914](https://doi.org/10.1098/rspb.2008.0914).
- JASINSKIENE, N., COATES, C. J., BENEDICT, M. Q., CORNEL, A. J., RAFFERTY, C. S., JAMES, A. A. AND F. H. COLLINS. 1998. Stable transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, with the helement from the housefly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 3743–3747.
- JINEK, M., CHYLINSKI, K., FONFARA, I., HAUER, M., DOUDNA, J. A. AND E. CHARPENTIER. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337: 816–821. doi: [10.1126/science.12255829](https://doi.org/10.1126/science.12255829).
- JIANG, F. AND J. A. DOUDNA. 2017. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics*, 22;46: 505–529. doi: [10.1146/annurev-biophys-062215-010822](https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822).
- JOUBERT, D. A., WALKER, T., CARRINGTON, L. B., DE BRUYNE, J. T., KIEN, D. H., HOANG, N., LE, T., CHAU, N. V. ITURBE-ORMAETXE, I., SIMMONS, C. P. AND S. L. O'NEILL. 2016. Establishment of a *Wolbachia* superinfection in *Aedes aegypti* mosquitoes as a potential approach for future resistance management. *PLoS Pathogens*, 18;12(2): e1005434. doi: [10.1371/journal.ppat.1005434](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005434).
- KAMBRIS, Z., COOK, P. E., PHUC, H. K. AND S. P. SINKINS. 2009. Immune activation by life-shortening *Wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes. *Science*, 326: 134–36. doi: [10.1126/science.1177531](https://doi.org/10.1126/science.1177531).
- KIM, Y-G., CHA, J. AND S. CHANDRASEGARAN. 1996. Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 1156–1160.
- KRAAIJEVELD, K. AND T. CHAPMAN. 2004. Effects of male sterility on female remating in the Mediterranean fruitfly, *Ceratitidis capitata*. *Proceedings of Biological Sciences/ The Royal Society*, 271 (S4): 209–211. doi: [10.1098/rsbl.2003.0116](https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0116).
- LACROIX, R., MCKEMEY, A. R., RADUAN, N., KWEE WEE, L., HONG, M. W., NEY, G. T., SITI-RAHIDAH, A. A., SALMAN, S., SUBRAMANIAM, S. *et al.* 2012. Open field release of genetically engineered sterile male *Aedes aegypti* in Malaysia. *PLoS ONE*, 7(8): e42771. doi: [10.1371/journal.pone.0042771](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042771).
- LABBÉ, G. M., SCAIFE, S., MORGAN, S. A., CURTIS, Z. H. AND L. ALPHEY. 2012. Female-specific flightless (fsRIDL) phenotype for control of *Aedes albopictus*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(7): e1724. doi: [10.1371/journal.pntd.0001724](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001724).
- LACHANCE, L. E., SCHMIDT, C. H. AND R. C. BUSHLAND. Radiation-induced sterilization. 1967. Pp. 147–196. In: Kilgore, W. W. and Douth, R. L., (Eds.). *Pest Control-Biological, Physical and Selected Chemical Methods*. New York: Academic Press Inc;
- LANG, C. A. 1956. The influence of mating on egg production by *Aedes aegypti*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, (5): 909–914.
- LECIS, A. R., FIGUS, V. AND C. SANTARINI. 1975. Radiosensitivity curve of different stages of spermatogenesis of *Anopheles atroparvus* (Diptera: Nematocera) *Parasitology*, 17: 145–150.
- LIU-HELMERSSON, J., QUAM, M., WILDER-SMITH, A., STENLUND, H., EBI, K., MASSAD, E. AND J. ROCKLÖV. 2016. Climate change and *Aedes* vectors: 21st Century Projections for Dengue Transmission in Europe. *EBioMedicine*, 7: 267–77. doi: [10.1016/j.ebiom.2016.03.046](https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.03.046).
- Massonnet-Bruneel, B., Corre-Catelin, N., Lacroix, R., Lees, R. S., Phuc, H. K., Nimmo, D., Alphey, L. and P. Reiter. 2013. Fitness of Transgenic Mosquito *Aedes aegypti* males carrying a dominant lethal genetic system. *PLoS ONE*. 8:5. 1–7. doi: [10.1371/journal.pone.0062711](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062711).
- MACIAS, V. M., OHM, J. R. AND J. L. RASGON. 2017. Gene drive for mosquito control: Where did it come from and where are we headed? *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(9): 1006. doi: [10.3390/ijerph14091006](https://doi.org/10.3390/ijerph14091006).
- MARSHALL, J. M. AND B. A. HAY. 2011. General Principles of single-construct chromosomal gene drive. *Evolution*, 66-7: 2150–2166. doi: [10.1111/j.1558-5646.2012.01582.x](https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2012.01582.x).
- MARSHALL, J. M., PITTMAN, G. W., BUCHMAN, A. B. AND B. A. HAY. 2011. Semele: a killer-male, rescue-female system for suppression and replacement of insect disease vector populations. *Genetics*, 187: 535–551.
- MATZ, M. V., FRADKOV, A. F., LABAS, Y. A., SAVITSKY, A. P., ZARAIISKY, A. G., MARKELOV, M. L. AND S. A. LUKYANOV. 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotechnology*, 17: 969–973.

- MILLER, J., MCLACHLAN, A. D. AND A. KLUG. 1985. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*. *The EMBO Journal*, 4(6): 1609–1614. [PMC 554390](#). [PMID 4040853](#).
- MILLER, J. C., TAN, S., QIAO, G., BARLOW, K. A., WANG, J., XIA, D. F., MENG, X., PASCHON, D. E., LEUNG, E., HINKLEY, S. J., DULAY, G. P., HUA, K. L., ANKOUDINOVA, I., COST, G. J., URNOV, F. D., ZHANG, H. S., HOLMES, M. C., ZHANG, L., GREGORY, P. D. AND E. J. REBAR. 2011. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotechnology*, 29(2): 143–148. [doi: 10.1038/nbt.1755](#).
- MISHRA, P., FUREY, C., BALARAMAN, V. AND M. J. FRASER. 2016. Antiviral hammerhead ribozymes are effective for developing transgenic suppression of Chikungunya Virus in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Viruses*, 8: 163. [doi: 10.3390/v8060163](#).
- MOREIRA, L. A., ITURBE-ORMAETXE, I., JEFFERY, J. A., LU, G., PYKE, A. T., HEDGES, L. M., ROCHA, B. C., HALL-MENDELIN, S., DAY, A., RIEGLER, M., HUGO, L. E., JOHNSON, K. N., KAY, B. H., MCGRAW, E. A., VAN DEN HURK, A. F., RYAN, P. A. AND S. L. O'NEILL. 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with Dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell*, 139: 1268–1278. [doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.042](#).
- MOSCOU M. J. AND A. J. BOGDANOVE. 2009. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 326: 1501. [doi: 10.1126/science.1178817](#).
- MUSSOLINO, C., MORBITZER, R., LÜTGE, F., DANNEMANN, N., LAHAYE, T. AND T. CATHOMEN. 2011. A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Research*, 39(21): 9283–9293. [doi: 10.1093/nar/gkr597](#).
- NENE, V., WORTMAN, J. R., LAWSON, D., HAAS B, KODIRA C, TU, Z. J., LOFTUS, B., XI, Z., MEGY, K., GRABHERR, M., REN, Q., ZDOBNOV, E. M., LOBO, N. F., CAMPBELL, K. S., BROWN, S. E., *et al.* 2007. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science*, 316: 1718–1723. [doi: 10.1126/science.1138878](#).
- OMS. Disponible en: <http://www.who.int/campaigns/world-health-day/2014/vector-borne-diseases/es/>; (Fecha de consulta: 20-IX-2016).
- ORMÖ, M., CUBITT, A. B., KALLIO, K., GROSS, L. A., TSIEN, R. Y. AND S. J. REMINGTON. 1996. Crystal structure of *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*, 273: 1392–1395.
- OYE, K. A., ESVELT, K., APPLETON, E., CATTERUCCIA, F., CHURCH, G., KUIKEN, T., LIGHFOOT, S., MCNAMARA, J., SMIDLER, A. AND J. P. COLLINS. 2014. Regulating gene drives. *Science*, 10.126. [doi: 10.1126/science.1254287](#).
- PARKER, A. AND K. MEHTA. 2007. Sterile insect technique: A model for dose optimization for improved sterile insect quality. *Florida Entomologist*, 90(1): 88–95.
- PRASHER, D. C., ECKENRODE, V. K., WARD, W. W., PENDERGAST, F. G. AND M. J. CORMIER. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Gene*, 111(2): 229–233.
- PRASHER, D. C. 1995. Using GFP to see the light. *Trends in Genetics*, 11(8): 320–323.
- PHUC, H. K., ANDREASEN, M. H., BURTON, R. S., VASS, C., EPTON, M. J., PAPE, G., FU, G., CONDON, K. C., SCAIFE, S., DONNELLY, C. A., COLEMAN, P. G., WHITE-COOPER, H. AND L. ALPHEY. 2007. Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. *BMC Biology*, 20;5: 11. [doi: 10.1186/1741-7007-5-11](#).
- PHUC, K. H., MIN, T. T., HO, T. X. AND V. S. LE. 2016. Mechanisms of sex determination and transmission ratio distortion in *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*. 9:49. [doi: 10.1186/s13071-016-1331-x](#).
- RAINEY, M. S., SHAH, P., KOHL, A. AND I. DIETRICH. 2014. Understanding the *Wolbachia*-mediated inhibition of arboviruses in mosquitoes: progress and challenges. *Journal of General Virology*, 95: 517–530. [doi: 10.1099/vir.0.057422-0](#).
- REID, W. AND D. A. O'BROCHTA. 2016. Applications of genome editing in insects. *Current Opinion in Insect Science*, 13: 43–54. [doi: 10.1016/j.cois.2015.11.001](#).
- RINKER, D. C., PITTS, R. J. AND L. J. ZWIEBEL. 2016. Disease vectors in the era of next generation sequencing. *Genome Biology*, 17:95. [doi: 10.1186/s13059-016-0966-4](#).
- ROUET, P., SMIH, F. AND M. JASIN. 1994. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Molecular Cell Biology*, 14: 8096–8106. [[PubMed: 7969147](#)].
- ROY, A. C., WILSON, G. G. AND D. R. EDGELL. 2016. Perpetuating the homing endonuclease life cycle: identification of mutations that modulate and change I-TevI cleavage preference. *Nucleic Acids Research*, 44(15): 7350–7359. [doi: 10.1093/nar/gkw614](#).
- RUDIN, N., SUGARMAN, E. AND J. E. HABER. 1989. Genetic and physical analysis of double-strand

- break repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 122: 519–534. [[PubMed: 2668114](#)].
- SCHETELIG, M. F., CACERES, C., ZACHAROPOULOU, A., FRANZ, G. AND E. A. WIMMER. 2009. Conditional embryonic lethality to improve the sterile insect technique in *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae). *BMC Biology*, 7:4. doi: [10.1186/1741-7007-7-4](#).
- SCOTT, W. G., HORAN, L. H. AND M. MARTICK. 2013. Progress in molecular biology and translational science, *The hammerhead ribozyme: structure, catalysis, and gene regulation*, 120: 1–23. doi: [10.1016/B978-0-12-381286-5.00001-9](#).
- SHIMOMURA, O., JOHNSON, F. H. AND Y. SAIGA. 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*. 59: 223–227.
- STEBBINS, M. J., URLINGER, S., BYRNE, G., BELLO, B., HILLEN, W. AND J. C. P. YIN. 2001. Tetracycline-inducible systems for *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011. 98(19): 10775–10780. doi: [10.1073/pnas.121186498](#).
- THOMAS, D. T., DONNELLY, C. A., WOOD, R. J. AND L. S. ALPHEY. 2000. Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science*, 287: 2474–2476. doi: [10.1126/science.287.5462.2474](#).
- WANG, S. AND M. JACOBS-LORENA. 2013. Genetic approaches to interfere with malaria transmission by vector mosquitoes. *Trends in Biotechnology*, 31(3): 185–193. doi: [10.1016/j.tibtech.2013.01.001](#)
- WARD, W. W. 1979. Energy transfer processes in bioluminescence. Pp. 1–57. In: Smith, K. C. (Ed.) *Photochemistry and Photobiology*, Rev. 4. (Plenum, N. Y.).
- WEAVER, S. C. AND W. REISEN. 2010. Present and future arboviral threats. *Antiviral Research*, 85(2): 328–345. doi: [10.1016/j.antiviral.2009.10.008](#).