

# USO DE LA BIOTECNOLOGÍA EN EL CONTROL DE MOSQUITOS

Kevin Aarón Ontiveros Zapata & Perla Cecilia Martínez Sánchez

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Entomología Medica, San Nicolás de los Garza, N.L., 66455. México.

## Introducción

Las enfermedades transmitidas por vectores representan más del 17% de todas las enfermedades infecciosas, causando más de 1 millón de muertes al año con un alto impacto económico. Los insectos, particularmente mosquitos pueden transmitir enfermedades como malaria, fiebre del oeste del nilo, dengue, fiebre amarilla, zika, chikungunya y mayaro. De estas enfermedades infecciosas, la malaria representa un gran reto para la salud pública en el mundo <sup>(1)</sup>.

Los métodos de control tradicionales, se basan en la reducción de las poblaciones de mosquitos mediante la aplicación de insecticidas o la prevención de su reproducción mediante la remoción de criaderos, métodos que resultan en gran medida ineficaces <sup>(2)</sup>.

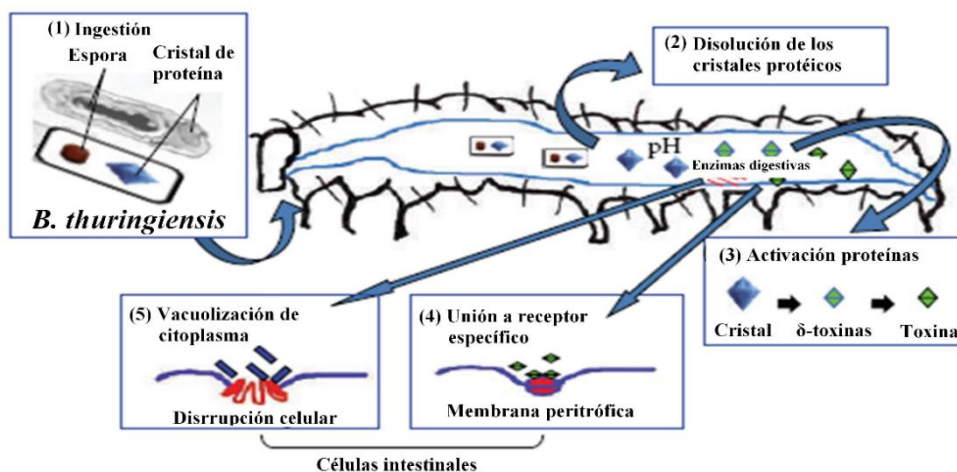
Actualmente, el control de enfermedades transmitidas por vectores está amenazado principalmente por elevadas tasas de resistencia a insecticidas en las poblaciones de insectos, de ahí la necesidad de desarrollar una nueva generación de estrategias específicas que puedan reducir la transmisión mediada por vectores <sup>(3)</sup>. En esta revisión se mencionan nuevos enfoques potencialmente eficientes de modificación y reducción de poblaciones de mosquitos.



### *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*

*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) ha sido utilizado para controlar poblaciones de dípteros del género *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* y *Simulium*, en programas de manejo integrado en diferentes partes del mundo, se ha comprobado que a pesar de ser aplicado constantemente durante un año no causa el desarrollo de resistencia en los organismos ni resistencia cruzada con otro tipo de insecticidas. Estas protoxinas actúan conjuntamente ya que su acción larvicida se ve disminuida estas han sido evaluadas individualmente (4,5).

#### Modo de acción



**Figura 1.** Modo de acción de *Bacillus thuringiensis* en Lepidoptera: ingestión de bacterias (1); solubilización de los cristales (2); proteína de activación (3); unión de proteínas a los receptores (4); formación de poros de la membrana y lisis celular (5) (Fuente: Adaptado de Schünemann, 2012)

Sus principales agentes activos son las protoxinas pertenecientes a la familia de toxinas Cry de 3 dominios (Cry11Aa, Cry4Ba, Cry4Aa) y la protoxina citolítica (Cyt1Aa), con propiedades tóxicas para las

larvas de estos mosquitos. Los pasos necesarios para la activación de las protoxinas de *Bti* son la ingestión de cristales por larvas, solubilización en intestino medio, liberación de protoxinas y su posterior activación proteolítica (Figura1). Las toxinas activadas interactúan con los receptores caderina en la membrana del intestino medio, provocando la formación de poros que derivan a permeabilidad celular causando lisis osmótica de la membrana celular (6,7).

La especificidad de este método estriba en las características fisiológicas de cada orden de insecto como el pH, proteínas presentes en microvellosidades en el intestino, dieta del insecto, etc. Tomando en cuenta estos factores es

evidente que el modo de acción será diferente para cada orden de insectos (8).

Estudios demuestran (9) que el uso de *Bti* en larvas de *Aedes aegypti* (L) por 30



generaciones no altera la actividad de enzimas detoxificantes que pudieran ejercer algún mecanismo de resistencia, así mismo no se registró resistencia cruzada con los larvicidas temefos y diflubenzuron, lo que respalda que el *Bti* es un método sostenible para prácticas de control integrado a pesar de ser un insecticida que requiera aplicaciones constantes durante todo el año.

### Wolbachia

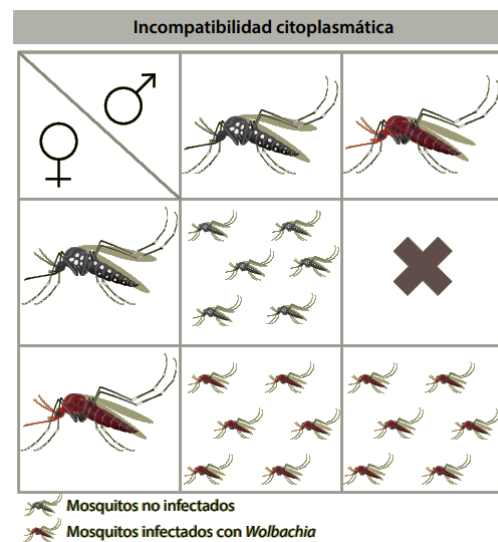
*Wolbachia* es un género de bacterias intracelulares gramnegativas que pertenecen al orden *Rickettsiales* y la familia *Anaplasmataceae*. Estas bacterias solo infectan a los organismos invertebrados y se encuentran naturalmente en más del 50% de todas las especies de artrópodos y en varios nematodos <sup>(10)</sup>. *Wolbachia pipientis* (wPip) fue la primera cepa descubierta en el mosquito *Culex pipiens* <sup>(11)</sup>.

*Wolbachia sp.* puede inducir alteraciones significativas de la biología reproductiva de su huésped, incluida la matanza selectiva de machos, la partenogénesis (una forma de reproducción asexual en la que se desarrollan embriones viables a partir de óvulos no fertilizados), la feminización de embriones genéticamente masculinos y la incompatibilidad citoplasmática <sup>(12)</sup>.

La incompatibilidad citoplasmática se refiere al fracaso de los machos infectados con *Wolbachia* para producir descendencia viable (Figura 2) cuando se aparean con hembras no infectadas o con hembras infectadas con una cepa diferente de *Wolbachia* <sup>(13,14)</sup>. En el primer escenario,

se dice que la incompatibilidad citoplasmática es unidireccional porque promoverá la expansión de una sola subpoblación compuesta de mosquitos infectados con *Wolbachia*. En el segundo escenario, la incompatibilidad citoplasmática puede ser bidireccional porque puede resultar en el desarrollo de subpoblaciones divergentes, cada una infectada con una o dos cepas de *Wolbachia* opuestas <sup>(15,16)</sup>.

Sin embargo, las hembras infectadas pueden aparearse con éxito con los machos infectados y esto les proporciona una ventaja evolutiva sobre las hembras no infectadas <sup>(13,14)</sup>.



**Figura 2.** Resultados de la cruce de mosquitos infectados con *Wolbachia* (rojo) <sup>(34)</sup>.

La expansión selectiva de las subpoblaciones de vectores infectadas por *Wolbachia* es responsable de su capacidad de invadir y reemplazar progresivamente las poblaciones silvestres después de las liberaciones de campo a gran escala <sup>(17,18)</sup>.

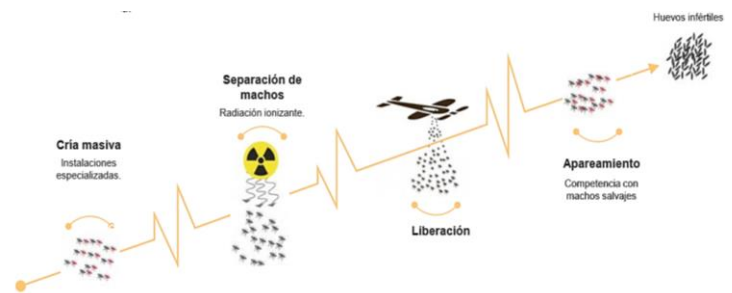


Alternativamente, si solo los mosquitos machos infectados son liberados en una población no infectada o incompatible (la "Técnica de Insectos Incompatibles"), la población de vectores puede colapsar, lo que deja un nicho ecológico para la repoblación de vectores no infectados<sup>(19)</sup>. Países como China, Australia, Colombia, Estados Unidos y en algunos países de Asia se han liberado mosquitos infectados con *Wolbachia* (wMelPop) en diferentes zonas endémicas de dengue. A la fecha los resultados han sido positivos y se ha observado la disminución de casos reportados de la enfermedad.

### Técnica del insecto estéril e IIT

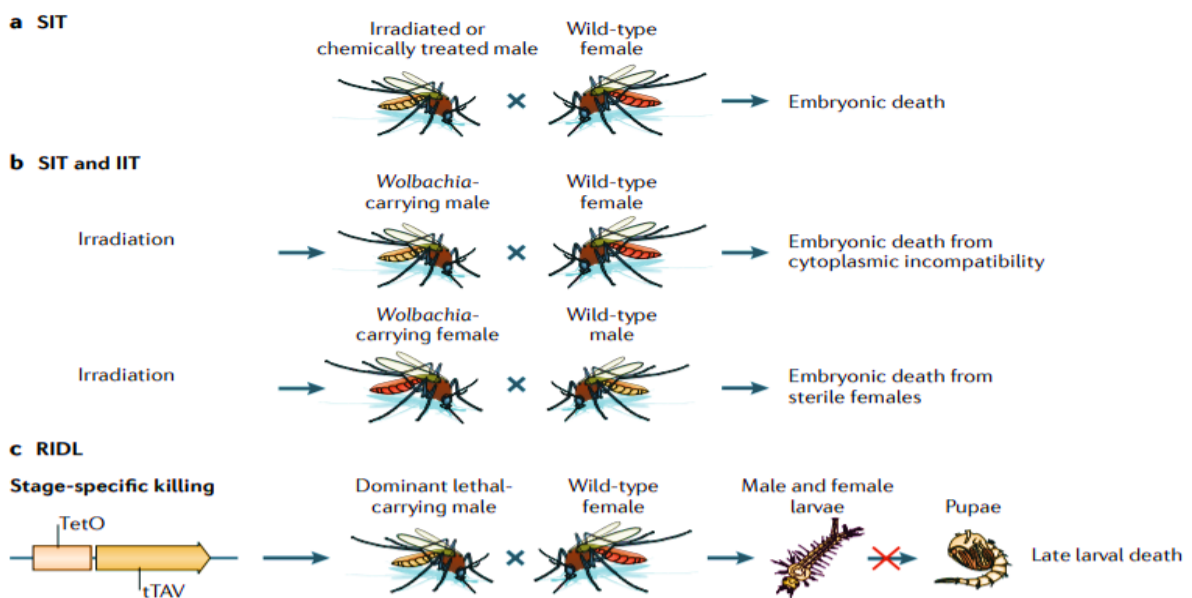
Los nuevos enfoques de reducción de la población implican la cría y liberación de grandes cantidades de mosquitos machos que no pueden producir crías viables cuando se aparean con hembras salvajes o de campo. En el transcurso de muchas generaciones de liberación continua de estos machos, el tamaño de la población de vectores debería reducirse sustancialmente, lo que a su vez debería reducir la transmisión de la enfermedad.

En el enfoque de la técnica del insecto estéril (SIT), los insectos machos están expuestos a radiación o a productos químicos esterilizantes, causando daño aleatorio a gran escala a los cromosomas del insecto o mutaciones letales dominantes en los espermatozoides. Estos machos luego son liberados en la población salvaje, y cuando se aparean con hembras silvestres, rara vez producen crías viables, lo que finalmente conduce a una disminución sustancial en el tamaño de la población de vectores (Figura 3).



**Figura 3.** Técnica del insecto estéril. Elaboración propia





**Figura 4.** Modificación de vectores para la reducción poblacional (2).

En el enfoque de la técnica de insectos incompatibles (IIT), una cepa *Wolbachia* es introducida en una colonia de una especie de mosquito. Solo se liberan machos infectados con *Wolbachia*, que, cuando se aparean con hembras que no albergan la misma cepa de *Wolbachia* o que no portan, provocan la muerte de su descendencia debido a la incompatibilidad citoplasmática. Se podría utilizar una combinación de IIT y SIT para suprimir las poblaciones de mosquitos. Durante este enfoque, los mosquitos infectados con *Wolbachia* se tratan con radiación de bajo nivel. En la técnica IIT, el apareamiento entre machos *Wolbachia* y hembras salvajes no producirá descendencia. La liberación de insectos portadores de un letal dominante (RIDL) es una estrategia de supresión mediante la cual los machos que portan un transgén que causa letalidad de acción tardía se liberan en campo abierto. Estos machos se aparean con

hembras de tipo salvaje, y la descendencia resultante muere antes de llegar a la etapa de pupa (Figura 4). TetO, operador de tetraciclina; tTAV, activador transcripcional reprimible de tetraciclina (3,31).

### Manipulación genética

#### RNAi

En los mosquitos, el mecanismo de RNAi se ha utilizado ampliamente para estudiar la función de los genes, y se ha explorado su potencial como una nueva alternativa para el control de la población 25. “Para que el RNAi en los insectos sea efectivo, el dsRNA tiene que funcionar dentro de las células. Hasta ahora se han propuesto al menos dos tipos de mecanismos de captación de dsRNA: captación mediada por canales transmembrana y captación mediada por endocitosis ”(20,21,22). En la célula objetivo, la maquinaria de RNAi procesa los dsRNA, que son cortados por



la enzima RNase III-Dicer en pequeños ARN interferentes de 20-25 nucleótidos (siRNA).

Posteriormente, las proteínas argonautas ensamblan este ARNsi para formar un complejo silenciador inducido por ARN (RISC) que se dirige a la destrucción del ARNm endógeno complementario a su cadena guía <sup>(23,24)</sup>. Como la absorción de dsRNA es el principal cuello de botella para el control de vectores o plagas por RNAi, los métodos más simples de administración de dsRNA, tales como remojo <sup>(25)</sup>, alimentación oral <sup>(26,27)</sup> y uso de micro pulverizadores <sup>(28)</sup>, han abierto la posibilidad de explorar el uso de dsRNA como un biopesticida o bioinsecticida. Además, la especificidad de RNAi hace que estos enfoques sean ambientalmente más seguros que otros métodos actualmente en uso, minimizando la toxicidad para especies no objetivo y reduciendo la posibilidad de resistencia en las poblaciones de insectos <sup>(28,29,30)</sup>.

Idealmente, los cambios genéticos deseados, ya sean genes inductores de esterilidad o factores reductores de la competencia, deberían propagarse a través de las poblaciones de insectos sin tener que depender de la liberación masiva insostenible de insectos. Este es el concepto detrás del desarrollo de impulsos genéticos <sup>(3)</sup>, elementos genéticos que sesgan su propia herencia de una manera no mendeliana al copiarse de un cromosoma a su homólogo dentro de las células de la línea germinal para que puedan ser transportados a través de poblaciones naturales (Figura 5).

Un transgen impulsor de genes (derecha) sesga la transmisión a más del 50% de su descendencia. A través de un mecanismo

de copia autodirigido dentro de la línea germinal de heterocigotos, se copiará un transgen impulsor de genes (púrpura) en un cromosoma (resaltado en amarillo) al otro cortando el otro cromosoma en la ubicación de la inserción, y la célula usa el cromosoma original que contiene el transgen impulsor del gen como plantilla para reparación por reparación dirigida por homología. Todos los descendientes heredan una copia del gen transgénico. Cruzar a las poblaciones naturales de tipo salvaje provocará la propagación del transgen impulsor del gen en toda la población.

#### CRISPR/Cas9

La modificación dirigida de genes en mosquitos vectores de patógenos humanos es considerada un poderoso método para descubrir la biología subyacente de la transmisión de patógenos de mosquitos, lo cual puede brindar información acerca del desarrollo y la aplicación de nuevos enfoques para el control de mosquitos y enfermedades. Las tecnologías de manipulación genómica pueden por sí mismas formar la base para el control de mosquitos y patógenos <sup>(2)</sup>.

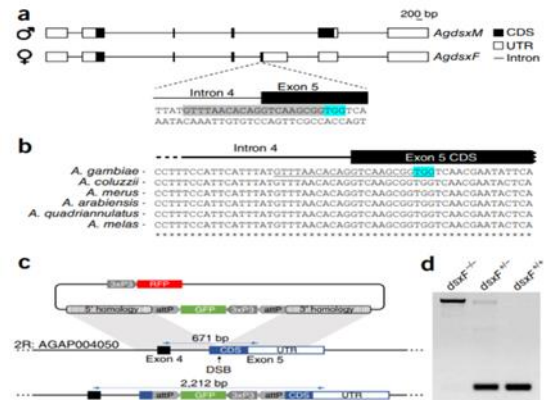
Se han propuesto múltiples diseños de impulso genético, pero ninguno hasta ahora es potencialmente tan poderoso como el que ofrece la edición CRISPR. En este sistema, el transgen codifica una endonucleasa, generalmente Cas9, que es dirigida por un ARN guía CRISPR para cortar el cromosoma homólogo en el sitio de inserción. Cuando la ruptura se repara mediante una reparación dirigida por homología utilizando el cromosoma 'transgénico' original como plantilla, todos los descendientes heredarán el



impulso genético. Si bien, muchas técnicas basadas en CRISPR / Cas9 han mejorado los estudios en genética de mosquitos, estas se basan en la inyección embrionaria del complejo ribonucleoproteico (RNP) Cas9, lo cual requiere equipo y capacitación especializados y costosos (<sup>231</sup>).

Kyrou y colaboradores (<sup>32</sup>) establecen que en el vector de malaria humana *Anopheles gambiae* (F), el gen doublesex (*Agdsx*) codifica dos transcripciones empalmadas alternativamente, *dsx*-female (*AgdsxF*) y *dsx*-male (*AgdsxM*), que controlan la diferenciación de los dos sexos. La transcripción de hembras, a diferencia del macho, contiene un exón (exón 5) cuya secuencia se encuentra conservada en todos los mosquitos *Anopheles* analizados hasta ahora. Los investigadores observaron que la disrupción dirigida por CRISPR-Cas9 del límite intrón 4-exón 5 dirigida a bloquear la formación de *AgdsxF* funcional no afectó el desarrollo o la fertilidad masculina, mientras que las hembras homocigotas para el alelo alterado mostraron un fenotipo intersexual esterilidad completa. Una construcción de impulso genético CRISPR-Cas9 dirigida a esta misma secuencia se extendió rápidamente en mosquitos enjaulados, alcanzando una prevalencia del 100% en 7-11 generaciones, mientras que se redujo progresivamente la producción de huevos hasta el punto del colapso total de la población. Las variantes resistentes a Cas9 surgieron en cada generación en el sitio objetivo, pero no bloquearon la propagación de la unidad (Figura 5) (<sup>32</sup>).

En la Tabla 1 se comparan las técnicas que han sido implementadas o están siendo desarrolladas para el control de vectores de enfermedades, cada una tiene diferentes ventajas y limitaciones que deben considerarse para su posterior implementación.



**Figura 5.** (a) Representación esquemática de transcritos *dsx* específicos para hembras y machos y la secuencia de ARNg utilizada para dirigir el gen (gris). El motivo adyacente protospacer (PAM) del gRNA se resalta en azul. Las regiones codificantes de los exones (CDS) están sombreadas en negro, las regiones no codificantes en blanco. UTR, región no traducida. (b) Alineación de secuencia del límite *dsx* intrón 4 – exón 5 en seis de las especies del complejo *A. gambiae*. El ARNg utilizado para apuntar al gen está subrayado y el motivo adyacente al protospacer se resalta en azul. (c) Representación esquemática de la construcción de eliminación de HDR que reconoce específicamente el exón 5 y el locus objetivo correspondiente. (d) PCR de diagnóstico utilizando un conjunto de cebadores (flechas azules en c) para discriminar entre el alelo de tipo salvaje y *dsxF* en individuos homocigotos (*dsxF* - / -), heterocigotos (*dsxF* +/-) y de tipo salvaje (*dsxF* + / +) (<sup>2</sup>).



**Tabla 1.** Comparación de diferentes tecnologías de control de vectores.

Tecnología	Pruebas de laboratorio	Liberación a campo	Escalable a más de 20 km <sup>2</sup>	Requerimiento de re-aplicación	Tasa de liberación (mosquitos por semana)
<i>Alteraciones en la población</i>					
Bti	+	-	+	Si	N/A
Wolbachia	+	+	+	No	10-100
CRISP-Cas9	+	-	-	No	<1
<i>Supresión de la población</i>					
SIT	+	+	-	Si	1000
IIT (Wolbachia)	+	+	-	Si	1000-10000
RIDL	+	+	-	Si	25000-50000

*Bti*, *Bacillus thuringiensis*; IIT, técnica de insectos incompatible; RIDL, liberación de insectos portadores de un letal dominante; SIT, técnica de insecto estéril <sup>(2)</sup>

### Conclusión

Los métodos existentes de control de vectores son claramente incapaces de hacer frente a la aparición y reemergencia sin precedentes de enfermedades arbovirales. Varios métodos novedosos en desarrollo son prometedores para frenar la capacidad de los mosquitos de *Ae. aegypti* de transmitir patógenos.

En los próximos años, esperamos que se acumule evidencia de la efectividad de estas nuevas intervenciones. La adopción de pruebas epidemiológicas rigurosas que demuestren el impacto en la enfermedad, no solo los indicadores entomológicos, será fundamental para la adopción a gran escala de cualquiera de estos enfoques. Muchas de estas tecnologías están siendo desarrolladas por científicos que no se encuentran en países con enfermedades

endémicas. En última instancia, se necesitan colaboraciones entre científicos y gobiernos de los países afectados para probar y aplicar la tecnología. Igualmente, importante será la sostenibilidad y la rentabilidad de los diferentes enfoques para países con enfermedades endémicas con recursos limitados para los programas de control. Afortunadamente, al menos algunas de estas tecnologías demostrarán ahorrar costos para los ministerios de salud, en cuyo caso las vías de adopción serán más sencillas. Con evidencia epidemiológica sólida y apoyo de la comunidad, su implementación generalizada podría revertir la alarmante tendencia mundial actual de la enfermedad.





## BIBLIOGRAFÍA

1. Patrão Neves, M., & Druml, C. (2017). Ethical implications of fighting malaria with CRISPR/Cas9. *BMJ Global Health*, 2(3), e000396. doi: 10.1136/bmjgh-2017-000396
2. Flores, H., & O'Neill, S. (2018). Controlling vector-borne diseases by releasing modified mosquitoes. *Nature Reviews Microbiology*, 16(8), 508-518. doi: 10.1038/s41579-018-0025-0
3. Shaw, W., & Catteruccia, F. (2018). Vector biology meets disease control: using basic research to fight vector-borne diseases. *Nature Microbiology*, 4(1), 20-34. doi: 10.1038/s41564-018-0214-7
4. Bonin A, Paris M, Frerot H, Bianco E, Tetreau G, Despres L. (2015). The genetic architecture of a complex trait: Resistance to multiple toxins produced by *Bacillus thuringiensis israelensis* in the dengue and yellow fever vector, the mosquito *Aedes aegypti*. *Infect Genet Evol.* 35:204–13.
5. Wirth MC, Ferrari JA, Georghiou GP. (2001). Baseline susceptibility to bacterial insecticides in populations of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) from California and from the Mediterranean Island of Cyprus. *J Econ Entomol.* 94:920–8.
6. Fernández, L. E. Aimanova, K. G., Gill, S. S., Bravo, A., & Soberón, M. (2006). “A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae”, en *Biochemical Journal*, 394.
7. Pérez, C. L. E., Sun, J., Folch, J. L., Gill, S. S., Soberón, M., & Bravo, A. (2005). “*Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor”, en *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102.
8. Bravo A, Gill SS, Soberón M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon.* 49:423–35
9. Carvalho, K.d.S., Crespo, M.M., Araújo, A.P. da Silva, R. S., de Melo-Santos, M. A. V., de Oliveira, C. M. F., & Silva-Filha, M. H. N. L. (2018) Long-term exposure of *Aedes aegypti* to *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* did not involve altered susceptibility to this microbial larvicide or to other control agents. *Parasites Vectors* 11, 673 . <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3246-1>
10. Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, et al. How many species are infected with *Wolbachia*?: A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol Lett* 2008; 281:215–220.
11. Hertig M, Wolbach SB. Studies on *Rickettsia*-like micro-organisms in insects. *J Med Res* 1924; 44:329–374. 327.
12. Werren JH, Baldo L, Clark ME. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol* (2008); 6:741–751.
13. Turelli M, Hoffmann AA. Rapid spread of an inherited incompatibility factor in California *Drosophila*. *Nature* 1991; 353:440–442.
14. LePage D, Bordenstein SR. *Wolbachia*: can we save lives with a great pandemic? *Trends Parasitol* 2013; 29:385–393.
15. Landmann F, Orsi GA, Loppin B, Sullivan W. *Wolbachia*-mediated cytoplasmic incompatibility is associated with impaired histone deposition in the



- male pronucleus. PLoS Pathog (2009); 5:e1000343.
16. Tram U, Sullivan W. Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. Science (2002); 296:1124–1126.
17. Brownstein JS, Hett E, O'Neill SL. The potential of virulent *Wolbachia* to modulate disease transmission by insects. J Invertebr Pathol (2003); 84:24–29.
18. Yeap HL, Mee P, Walker T, et al. Dynamics of the 'popcorn' *Wolbachia* infection in outbred *Aedes aegypti* informs prospects for mosquito vector control. Genetics (2011); 187:583–595.
19. Atyame CM, Cattel J, Lebon C, et al. *Wolbachia*-based population control strategy targeting *Culex quinquefasciatus* mosquitoes proves efficient under semi-field conditions. PLoS One (2015); 10:e0119288.
20. Singh, A. D., Wong, S., Ryan, C. P., Whyard, S. & Gordon, K. Oral delivery of double-stranded RNA in larvae of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*: implications for pest mosquito control. J Insect Sci 13(1), 69, <https://doi.org/10.1673/031.013.6901> (2013).
21. Joga, M. R., Zotti, M. J., Smagghe, G. & Christiaens, O. RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: what we know so far. Front Physiol 7, 553, <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00553> (2016).
22. Huvenne, H. & Smagghe, G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. J Insect Physiol 56(3), 227–235, <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.10.004> (2010).
23. McEwan, D. L., Weisman, A. S. & Hunter, C. P. Uptake of extracellular double-stranded RNA by SID-2. Mol Cell 47(5), 746–754, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.014> (2012).
24. Semizarov, D. et al. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. Proc Natl Acad Sci 100(11), 6347–6352, <https://doi.org/10.1073/pnas.1131959100> (2003).
25. Yu, N. et al. Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. Insect Sci. 20(1), 4–14, <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2012.01534.x> (2013).
26. Lin, Y. H., Huang, J. H., Liu, Y., Belles, X. & Lee, H. J. Oral delivery of dsRNA lipoplexes to German cockroach protects dsRNA from degradation and induces RNAi response. Pest Manag Sci 73(5), 960–966, <https://doi.org/10.1002/ps.4407> (2017).
27. Zhang, X., Zhang, J. & Zhu, K. Y. Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). Insect Mol Biol 19(5), 683–693, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2010.01029.x> (2010).
28. Zhang, H., Li, H., Guan, R. & Miao, X. Lepidopteran insect species-specific, broad-spectrum, and systemic RNA interference by spraying dsRNA on larvae. Entomol Exp Appl 155(3), 218–228, <https://doi.org/10.1111/eea.12300> (2015).



29. Zhang, X. et al. Chitosan/interfering RNA nanoparticle mediated gene silencing in disease vector mosquito larvae. *J Vis Exp* 97 (2015).
30. Balakrishna Pillai, A. et al. RNA interference in mosquito: understanding immune responses, doublestranded RNA delivery systems and potential applications in vector control. *Insect Mol Biol* 26(2), 127–139, <https://doi.org/10.1111/imb.12282> (2017).
31. Macias, V. M., McKeand, S., Chaverra-Rodriguez, D., Hughes, G. L., Fazekas, A., Pujhari, S., Jasinskiene, N., James, A. A., & Rasgon, J. L. (2020). Cas9-Mediated Gene-Editing in the Malaria Mosquito *Anopheles stephensi* by ReMOT Control. *G3 (Bethesda, Md.)*, 10(4), 1353–1360. <https://doi.org/10.1534/g3.120.401133>.
32. Kyrou, K., Hammond, A., Galizi, R., Kranjc, N., Burt, A., & Beaghton, A. et al. (2018). A CRISPR–Cas9 gene drive targeting doublesex causes complete population suppression in caged *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Nature Biotechnology*, 36(11), 1062-1066. doi: 10.1038/nbt.4245
33. Schünemann, R. Knaak, N. Fiuza, L. (2014). Mode of Action and Specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the Control of Caterpillars and Stink Bugs in Soybean Culture. *ISRN Microbiology*. 1
34. Uribe-Álvarez, Cristina, & Chiquete Félix, Natalia. (2017). Las enfermedades transmitidas por vectores y el potencial uso de Wolbachia, una bacteria endocelular obligada, para erradicarlas. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 60(6), 51-55. Recuperado en 20 de junio de 2020, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0026-17422017000600051&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422017000600051&lng=es&tlng=es)

