

Paratransgénesis: Simbiontes al ataque

Arce-Martínez Samantha, Rodríguez, Ceballos Dalia, Garza-Cabrales Jeannete Elizabeth, Núñez-Ramírez Francisco Freinet.

RESUMEN

La aparición de resistencia por parte de insectos a toda clase de insecticidas ha ocasionado grandes pérdidas económicas tanto para el sector salud como para el sector agrícola. En las últimas décadas, ha existido una escasez de nuevos formulados químicos capaces de remplazar a los formulados viejos, y cuando estos nuevos formulados llegan a aparecer en el mercado, los insectos blanco no tardan en desarrollar una resistencia hacia ellos, volviéndolos inútiles poco después de su primera aplicación. Con el advenimiento de la ingeniería genética, nuevas tecnologías se encuentran a nuestra disposición para hacerle frente a esta dificultad. La paratransgénesis nos ofrece una alternativa a todos los problemas de resistencia a insecticidas que existen actualmente en el mundo. No obstante, la paratransgénesis enfrenta grandes retos. El objetivo de este trabajo es dar a conocer el impacto que puede tener la paratransgénesis de insectos como método alternativo de control.

INTRODUCCIÓN

El uso descontrolado e irresponsable de insecticidas para el control de insectos vectores de enfermedades, así como para el control de plagas agrícolas, ha traído consigo un problema de dimensiones inimaginables. La aparición de resistencia por parte de insectos a toda clase de insecticidas ha ocasionado grandes pérdidas económicas tanto para el sector salud como para el sector agrícola. En las últimas décadas, ha existido una escasez de nuevos formulados químicos capaces de remplazar a los formulados viejos, y cuando estos nuevos formulados llegan a aparecer en el mercado, los insectos blanco no

tardan en desarrollar una resistencia hacia ellos, volviéndolos inútiles poco después de su primera aplicación. Todo lo antes mencionado nos lleva a que es necesario el desarrollo de nuevas estrategias de control para reducir la transmisión de enfermedades por aquellos insectos vectores, así como para asegurar el bienestar de los cultivos agrícolas (20). Con el advenimiento de la ingeniería genética, nuevas tecnologías se encuentran a nuestra disposición para hacerle frente a esta dificultad. La paratransgénesis nos ofrece una alternativa a todos los problemas de resistencia a insecticidas que existen actualmente en el mundo. Lo que se busca es reducir o completamente anular la competencia del insecto modificando genéticamente organismos

simbiontes a éste. El esparcimiento de estos simbiontes modificados en la población de un insecto se da por vía materna o bien por coprofagia (12).

El objetivo de este trabajo es dar a conocer el impacto que puede tener la paratransgénesis de insectos como método alternativo de control. Además de informar las perspectivas que se tienen en el área y los desafíos que existen. Una única estrategia no basta para el control de insectos plagas y vectores, será la combinación de muchas metodologías, nuevas y tradicionales, las que nos lleven a lograr el éxito.

INSECTOS TRANSGÉNICOS VS PARATRANSGÉNESIS EN INSECTOS

Los insectos transgénicos prometen ser una gran herramienta para el área médica, farmacéutica y de salud pública. Los avances en el desarrollo de tecnologías moleculares nos han permitido transformar de manera rutinaria diferentes organismos relevantes en este caso insectos, estos desarrollos permiten la generación de ideas que ayuden a combatir plagas, enfermedades, o evitar la transmisión por vectores (31).

El inicio de los insectos transgénicos se dio a finales de los 60's donde se modificó a *Drosophila* donde se inició el desarrollo estratégico de la creación de un insecto genéticamente modificado, para el 2000 un mosquito transgénico, y para el 2010 se realizaron pruebas de campo de estos (25).

Pero aun cuando actualmente tenemos las herramientas necesarias para producir un

organismo genéticamente modificado, hay muchos detalles a considerar antes de poder liberarlos, un aspecto importante el fitness que presentan los organismos liberados es más bajo a los silvestres debido a que estos al estar en condiciones de laboratorio se seleccionan características que no coinciden con las poblaciones silvestres (13), además conocer el mecanismo de acción del gen, como la estabilidad del gen insertado en las siguientes generaciones,

y conocer de las múltiples subespecies del insecto a modificar (47).

Aun cuando el camino para desarrollar nuevas técnicas funcionales para el control de insectos que puedan causar algún problema a la sociedad ha sido largo, la sociedad aún no está preparada para aceptar un organismo transgénico y es aquí que observamos los problemas éticos, legales y los problemas sociales que detienen estos procesos.

Por las razones mencionadas anteriormente la comunidad científica está interesada en la técnica de la paratransgénesis la cual consiste en el uso de bacterias simbióticas para expresar moléculas que actúen dentro del organismo de interés. La bacteria simbiote es genéticamente modificada para expresar alguna molécula que cause algún efecto en el organismo al cual será reintroducido el simbiote (Fig. 1), Esta técnica se planteó por primera vez en 1997 por el M.D. Ravi V. Durvasula y colaboradores, donde buscaban expresar una molécula antiparasitaria (Ceropina A, péptido letal para el parasito *Trypanosoma cruzi*) mediante una bacteria simbiote de insectos transmisores de enfermedades en este caso *Rhodnius prolixus* vector de la enfermedad de Chagas (12). Esto es desencadenó el uso de esta técnica para modificar insectos de importancia en diferentes ámbitos, pues se han realizado trabajos con el objetivo de disminuir la población de mosquitos de los géneros de *Anopheles*, *Aedes* y *Culex* (47), entre otros organismos de importancia médica y agrícola.

BACTERIAS, HONGOS Y VIRUS SIMBIONTES EN INSECTOS

En los últimos años los conceptos de microbioma y viroma se han popularizado en la comunidad científica. Cada vez existe más evidencia que las bacterias, hongos y virus juegan un papel muy importante en diversos procesos metabólicos de los organismos. En los insectos no es diferente. Bacterias simbiontes se han encontrado en muchos insectos. La eliminación de estos simbiontes obligatorios resultaría en una pérdida de fitness muy grande para el insecto (47).

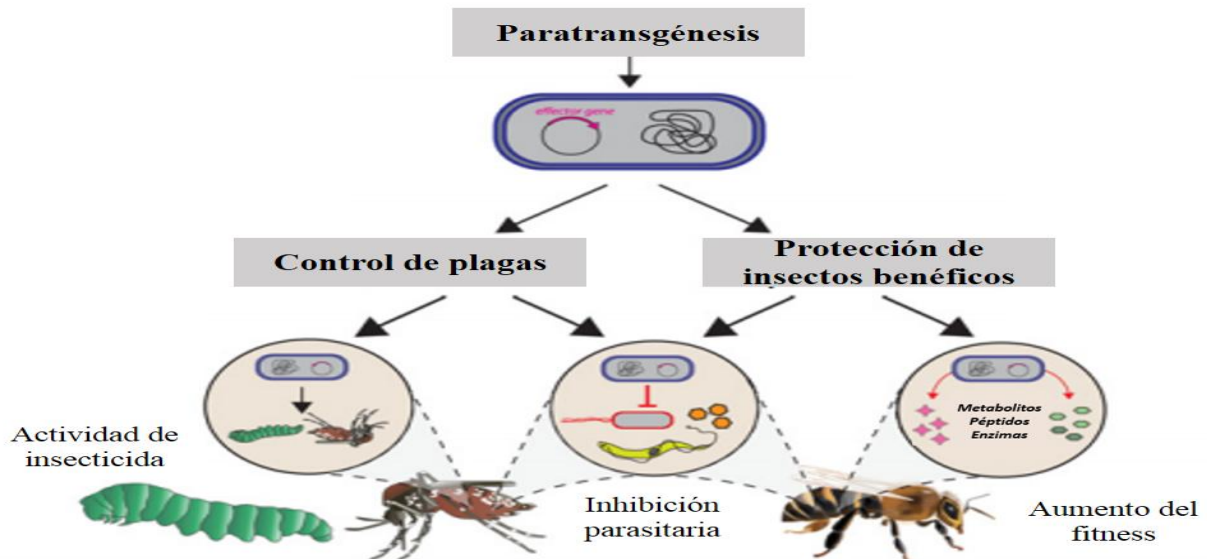


Figura 1. La paratransgénesis consta de modificar genéticamente simbiontes del insecto de interés para que exprese algún gen que codifique para alguna molécula con propiedades insecticidas o propiedades benéficas para el insecto, al ser reintegrado en el insecto. Modificada de (13).

Quizá el ejemplo más conocido de una bacteria simbiote de insectos lo pueda ofrecer *Wolbachia*. *Wolbachia* es una bacteria intracelular gram negativa que puede ser encontrada en las vacuolas citoplásmicas de insectos, isópodos, ácaros y nematodos (28,45). La literatura está repleta de numerosos reportes utilizando a *Wolbachia* como un método de control biológico. Recientemente LePage *et al.* (2017) y Beckmann *et al.* (2017) mostraron evidencia de los mecanismos moleculares que subyacen en la incompatibilidad citoplásmica (IC) característica de la cruce de un macho infectado con *Wolbachia* y una hembra no infectada. Ellos reportan por primera vez la identificación de genes de *Wolbachia* responsables de la IC aun cuando la IC tiene más de 45 años de haber sido descubierta (19).

Además de las bacterias, los hongos son organismos también muy útiles en lo que respecta a la paratransgénesis en insectos. Éstos tienen ciertas ventajas sobre las bacterias, ya que, a diferencia de ellas, los hongos pueden sobrevivir por mucho tiempo a las condiciones ambientales como esporas, y pueden infectar al insecto sin necesidad de ser consumido por éste, sino directamente a través de la cutícula (44).

Virus simbióticos pueden servir como otra alternativa a la paratransgénesis. Densovirus, por ejemplo, ya son modificados genéticamente para expresar moléculas que reduzcan la competencia del insecto. Estos virus son vectores adecuados para la expresión de genes extraños en los mosquitos debido a que son altamente específicos, ambientalmente estables, matan a las larvas de los mosquitos de una manera dosis dependiente, disminuyen la vida de los adultos supervivientes y se transmiten verticalmente (7,8).

PARATRANSGÉNESIS EN INSECTOS CAUSANTES DE PLAGAS AGRÍCOLAS

El estudio e interés en microorganismos simbiotes para el control biológico de plagas ha crecido en los últimos años (15), esto es debido principalmente a la creciente necesidad de optar por otras tecnologías, además de las químicas, que contribuyan en disminuir el creciente número de plagas resistentes a pesticidas. En este sentido, se ha puesto mayor énfasis a las bacterias como método de control, debido a que estas tienen pueden intervenir en varios estadios del ciclo de vida de los insectos principalmente en la etapa reproductiva, es por esto que se les ha dado el

nombre de “parásitos reproductivos”, que de manera general se puede definir como aquellas bacterias simbióticas que afectan la reproducción del hospedero (32), entre estas se incluyen especies del genero *Wolbachia*, *Rickettsia*, *Arsenophonus*, *Cardinium*, *Flavobacterium* y *Spiroplasma*; de las cuales se hay mayor número de investigaciones del genero *Wolbachia*, la cual tiene la capacidad de infectar 20-70% de los insectos y entre sus excepciones se encuentra en el orden Phthiraptera. *Arsenophonus* ha sido reportado en 11% de 36 especies de insectos, *Cardinium* en 6% de 99 especies de artrópodos (11).

Uno de los principales vectores de interés para la aplicación de la técnica de paratransgénesis, corresponde a *Homalodisca vitripennis* (Fig. 2) perteneciente al orden Hemiptera (27), ya que es el principal vector de *Xylella fastidiosa* una bacteria gram negativa que causa múltiples enfermedades en los cultivos como, la enfermedad de Pierce en cultivos de uva, clorosis variada en cítricos (CVC, por sus siglas en inglés, se muestra en la figura 3), enfermedades en los cultivos de durazno, marchitamiento y enfermedad de quemadura de hojas ciruela, olmo, arce y café, principalmente (4).



Figura 2. *Homalodisca vitripenni*, principal vector de *Xylella fastidiosa*. Tomado de: (22).

Este insecto adquiere el patógeno al momento de su alimentación ya que este se encuentra inmerso en el xilema de plantas afectadas, y al momento de que el vector termina su alimentación y procede a alimentarse de otra

planta, transmite el patógeno, infectando así nuevas plantas (33). Es por esto que se han propuesto múltiples técnicas que contribuyan a la disminución de este agente patógeno, entre ellas la creación de cepas no patógenas de *Xylella fastidiosa*, transformaciones con *Agrobacterium rhizogenes* que vuelvan resistentes a los cultivos de uva, el aislamiento de anticuerpos para integrarlos a insectos vectores con el fin de volverlos resistentes a patógenos simbiontes (9,22,27), además de técnicas de paratransgénesis las cuales han demostrado tener eficacia y viabilidad (27); como la manipulación de bacterias endófitas, ya que estas son caracterizadas por habitar por ciertos periodos dentro de especies vegetales, sin causar ningún tipo de daño, además se han encontrado especies del genero *Methylobacterium* en varios cultivos de cítricos, y este género en particular ocupa el mismo nicho ecológico que *X. fastidiosa* en el xilema de las plantas vasculares.



Figura 3. Izquierda, Lesiones en hojas y frutos como consecuencia de de la clorosis

Además las bacterias endófitas tienen la capacidad natural de actuar como protectoras en contra de patógenos de plantas, ya que se cree que pueden proveer a las plantas la resistencia a enfermedades mediante la síntesis de compuestos estructurales como los sideroforos y enzimas extracelulares, así como la inducción y expresión de moléculas que generan inmunidad a la planta (26), en la Figura 4 se muestran los pasos generales seguir para implementar una estrategia de paratransgénesis contra *Xylella fastidiosa*. Es aquí donde la técnica de paratransgénesis tiene su participación, ya que se trata de provocar una alteración genética deseada en microorganismos

endófitos simbiontes que sean acarreados por insectos, de manera que, al momento de que el vector se alimente de la planta transmitirá las bacterias inocuas a plantas que no estén afectadas con el fin de brindarles inmunidad contra patógenos; además en aquellas que ya presenten la infección, se espera que las bacterias endófitas eliminen a las bacterias patógenas por competencia (4); controlando así, en este caso, la transmisión de uno de los patógenos plaga que causan un gran número de pérdidas de cultivos.

La técnica de paratransgénesis también se ha aplicado como control de plaga en *Dermolepida albohirtum* (Fig. 5), el cual pertenece al orden *Coleóptera* y afecta en su estado larvario al cultivo de caña de azúcar australiana (37), posterior a la eclosión, los especímenes en sus primeros instas larvales se alimentan de materia orgánica, incluyendo las raíces delgadas, esto durante 4 semanas; en instas posteriores se alimentan de las raíces de la caña de azúcar cerca de 5 semanas. En el tercer insta se alimentan durante 3 a 4 meses y es cuando se produce mayores daños al cultivo (42). Se ha observado en estudios microbiológicos, que el intestino larval de estos escarabajos, está expuesto a una gran diversidad de microorganismos. Es por esto, que varios estudios se han centrado en la identificación y caracterización de estas; utilizando el análisis DGGE y análisis filogenéticos acompañados de técnicas moleculares, se han identificado especies de bacterias asociadas a las larvas aun en especies geográficamente aisladas (38), se propone que estas especies de bacterias sean aisladas en cultivos puros y transformadas genéticamente para que puedan expresar compuestos que eviten la alimentación los cultivos de caña de azúcar australiana, ya que, posterior a la inserción a las larvas de los escarabajos, posteriormente podrían ser liberados y se espera que en base al fitness más alto que estos presentaran, pueda disminuir paulatinamente la población de escarabajos que afectan a la caña de azúcar (37, 38, 42).

PARATRANSGÉNESIS EN INSECTOS VECTORES

Las enfermedades transmitidas por vectores representan el 17% de las enfermedades

infecciosas y provocan cada año más de 1 millón de defunciones. Los vectores son organismos vivos que pueden transmitir enfermedades infecciosas entre personas o de animales a personas. La mayoría de los vectores son insectos hematófagos. Los mosquitos son los vectores de enfermedades más conocidos después le siguen las garrapatas, moscas, flebótomos, pulgas, triatominos y algunos caracoles de agua dulce (34).

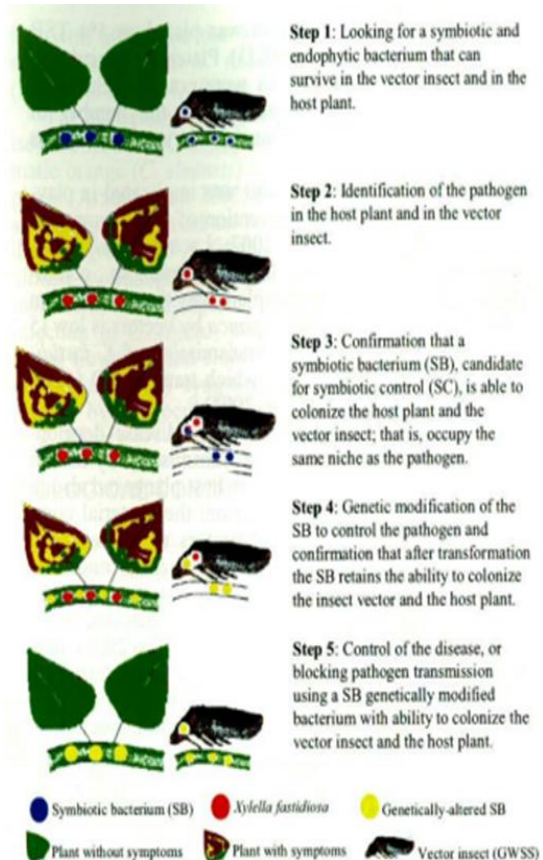


Figura 4. Pasos a seguir para desarrollar la estrategia de paratransgénesis como control simbiote usando bacterias endofitas, en contra de *Xylella fastidiosa*. Tomado de: (26).

Por ser una parte importante, la búsqueda de técnicas que ayuden a la disminución del vector o logren eliminar del vector el agente infeccioso, no ha parado incluso se han retomado técnicas, a las que ahora se les ve más futuro, como es el caso de la paratransgénesis.

En cuanto a los mosquitos se ha realizado paratransgénesis en los géneros de *Anopheles*, *Aedes* y *Culex*, responsables de malaria, dengue y

filiarías respectivamente, las cuales son de gran importancia para la salud pública por tal motivo el desarrollo de técnicas genéticas para el control de estos ha sido el centro de atención, al buscar genes letales que disminuyan las poblaciones de estos organismos haciendo que se detenga su ciclo de vida. Un ejemplo es en *Ae. aegypti* que tiene como simbionte a el hongo *M. anisoplia* la cual fue modificada para expresar scopina una molécula que puede interferir con el dengue, así como para *An. Stephensi* y *An. Gambie* que transmiten malaria, se modificó a sus simbionte bacteriano *Pa. Agglomerans* para secretar Cercopina A, SM1, Scorpine EPIP, scFVS y mPLA2 (antiplasmodium) que inhiben el desarrollo del parásito *P. falciparum* causante de esta infección (47).

Otro vector de importancia es la mosca de la enfermedad del sueño o Tripanosomiasis africana, es la mayor causa de muertes en África, el cuál mediante su simbionte bacteriano *Sodalis* el cual fue modificado para producir un tripanocida encontrando resultados de prevalencia a la resistencia de tripanosomas del 100% por 25 años en poblaciones de la mosca tsetse (17).

La enfermedad de Chagas es causada por el protozooario *Tripanosoma cruzi* y es transmitida a humanos por la chinche besucona *Triatoma infestans* que transmite el parásito al humano vía fecal, este insecto es endémico de la región centro y sur de América. Un simbionte de este insecto es *R. rhodnii* la cual fue transformada para expresar AMP ceropina A, como resultados obtenidos el 65% de los insectos examinados quedaron libres de *T.cruzi* el restante quedó con un número reducido de parásitos (24).

DESAFÍOS Y PERSPECTIVAS DE LA PARATRANGÉNESIS EN INSECTO

A pesar del éxito en la transformación de vectores en simbiontes de insectos, no se sabe si los simbiontes transformados pueden substituir a los no transformados en poblaciones naturales de insectos y con ello afectar potencialmente el desarrollo y la transmisión del patógeno en su hábitat natural (2).



Figura 5. *Dermolepida albohirtum*, plaga de caña de azúcar australiana. Tomado de: (42).

Aunque se han realizado estudios de la microbiota de insectos silvestres, la identificación completa de las poblaciones que allí residen todavía está en desarrollo (3,10, 14, 18, 30, 36, 39, 40, 43). El conocimiento de la microbiota de los insectos es esencial para que un sistema paratransgénico funcione, por lo que uno de los desafíos más importantes que enfrenta dicha tecnología es buscar e identificar virus y simbiontes bacterianos y fúngicos que no son patógenos para los seres humanos o los animales y que estén bien establecidos en los insectos problema y que se puedan transmitir a la próxima generación (6, 21, 36), ya que juegan un papel crítico en los procesos metabólicos y pueden ser vitales para erradicar a estos organismos pues colonizan sus órganos internos y otros tejidos, por lo que la eliminación de los simbiontes obligados daría lugar a una pérdida en el fitness de los insectos (disminución de la fertilidad y tasa de crecimiento lenta) (16,36). Aunque se ha identificado una gran variedad de microorganismos simbióticos en la microflora de insectos, en su mayoría bacterias, el aislamiento de estos simbiontes no es tan sencillo debido a que las técnicas existentes de cultivo no permiten aislar e identificar todos los componentes del microbioma ya que no es posible simular las condiciones requeridas para su crecimiento en un laboratorio (23). Pero gracias a las técnicas de metagenómica, los científicos comienzan a identificar cada vez de una forma más sencilla los microorganismos presentes en este microambiente.

Otro de los desafíos es explorar e idear diferentes estrategias de paratransgénesis para limitar la supervivencia o la reproducción de los

insectos blanco, o para disminuir la capacidad de vectorización de patógenos de ciertas especies de insectos e incluso para aumentar la eficacia de los agentes de control biológico ya establecidos.

Para que una bacteria sea utilizada en la paratransgénesis se requieren tres componentes claves: una molécula efectora que logre el efecto deseado; un mecanismo que excrete la molécula efectora en la superficie de la bacteria; y que las bacterias puedan sobrevivir en el insecto el tiempo suficiente para producir la cantidad esperada de moléculas efectoras (41). Si las bacterias genéticamente modificadas expresan la molécula efectora pero no la excretan o la exhiben en su superficie, debe usarse un mecanismo apoptótico, lo que conduce a costos adicionales en el fitness, siendo uno de los tantos desafíos a los que se ha enfrentado la paratransgénesis. Sin embargo, si las moléculas efectoras excretadas por las bacterias pueden ser producidas continuamente, aumentarían significativamente la efectividad del sistema para transgénico (41,46).

Las llegadas de tecnologías de edición de genomas abrirán un sinnúmero de puertas en la modificación genética de simbiontes de insectos. Nuevas e ingeniosas aproximaciones se esperan en los próximos años para el control de insectos vectores y plaga. Como se mencionaba anteriormente, LePage et al. (2017) y Beckmann et al. (2017) reportaron recientemente la identificación de genes de *Wolbachia* responsables de la IC. El siguiente paso lógico sería la construcción de un modelo in vivo de mosquito mediante la utilización de estas nuevas herramientas de edición de genomas como el sistema CRISPR-Cas9, donde se le introduzca al mosquito estos genes de *Wolbachia* y se pruebe su efectividad y se compare con el efecto que produce la propia *Wolbachia*.

Aunque el riesgo que se prevé con el uso de insectos paratransgénicos implica la probabilidad de que las bacterias, hongos o virus genéticamente modificados puedan infectar especies de insectos no problema, dicha posibilidad se reduce drásticamente debido a que los machos buscarán hembras de su misma especie. Otro aspecto a considerar es que no hay presión selectiva que interactúe con las bacterias, ya que el insecto es un huésped sin salida,

impidiendo la extinción del insecto (1,41). No obstante, los OGM utilizados en la paratransgénesis podrían persistir y propagarse en el medio ambiente ocasionando efectos adversos sobre la diversidad biológica, consecuencias adversas en el flujo de genes, alteración del ecosistema y cambios ambientales (1). Por lo que cualquier proyecto de liberación de organismos genéticamente modificados deberá someterse a un análisis del riesgo (AR) ambiental para evaluar posibles efectos adversos en la salud humana y animal, así como al medio ambiente.

Sin embargo, el AR en la paratransgénesis es particularmente complejo debido a que: 1) existe una amplia y diversa gama de virus, bacterias y hongos que se utilizan para dicha estrategia por lo que las características biológicas y las interacciones de dichos OGM con los insectos diana y el medio ambiente son muy diferente. 2) El grado de asociación de ciertos OGM con sus hospederos puede ser muy variado. Por ejemplo, los simbiontes bacterianos intracelulares, como *Wolbachia*, están estrechamente asociados con insectos diana y su patrón de transmisión vertical podría parecerse al de la reproducción de insectos genéticamente modificados de la misma especie. Mientras que otros microorganismos están menos asociados con su hospedero. Por lo tanto, puede producirse una transmisión horizontal dentro de las poblaciones de hospederos o incluso entre diferentes especies. 3) La capacidad específica de las poblaciones de OGM de propagarse en sus hospederos es diferente: Los virus y patógenos son infecciosos en diferentes grados. Por otra parte, las aplicaciones de paratransgénesis están diseñadas para aprovechar los mecanismos de accionamiento genético, que están presentes naturalmente en los diferentes microorganismos. 4) Aún hay un conocimiento limitado de algunos de los rasgos transgénicos explorados en la paratransgénesis. 5) El conocimiento también es limitado en lo que respecta a las interacciones de los OGM con los insectos hospederos y estos con el medio ambiente. Por otro lado, la liberación de insectos portadores de OGM para la paratransgénesis estaría sujeta a la regulación de acuerdo con los marcos de bioseguridad existentes. Por lo que otro de los desafíos es desarrollar con urgencia una orientación

específica que aborde de manera adecuada y exhaustiva el AR para la paratransgénesis.

Por lo que se sugiere la investigación previa a la liberación del organismo modificado en cuestión para planificar y evaluar estos impactos ambientales, teniendo en cuenta que el resultado aceptable y esperado de la evaluación de la liberación de los organismos modificados genéticamente debería implicar niveles de riesgo mucho más bajos que sus beneficios (1). Aunque las medidas de seguridad para el uso de mosquitos paratransgénicos son estrictas, la mayoría de los problemas asociados con la liberación de OGM no están presentes en el abordaje paratransgénico, mismo que es compatible con las estrategias de control tradicionales y los programas de manejo integrado de plagas (IPM; Integrated Pest Management) (6).

REFERENCIAS

1. Aguilera, J., Gomes, A. R. & Nielsen, K. M. (2011): Genetically modified microbial symbionts as arthropod pest controllers: risk assessment through the European legislations. *Journal of Applied Entomology* 135: 494-502.
2. Aksoy S, Weiss B, Attardo G. Paratransgenesis applied for control of tsetse transmitted sleeping sickness. *Adv Exp Med Biol* 2008;627:35-48.
3. Alphey L. Re-engineering the sterile insect technique. *Insect Biochem Mol Biol.* 2002;32:1243 – 7.
4. Arora, A. K., Yolo, T. S., Miller, T. A., Lauzon, C., Lampe, D., & Richards, F. (2005). Symbiotic Control of Pierce's Disease: Testing Reagents Against *Xylella fastidiosa*. In *Symposium Proceedings, Pierce's Disease Research Symposium*. San Diego, CA: Pierce's Disease. org (pp. 219-20).
5. Beckmann, J. F. Ronau, J. A and Hochstrasser, M. *Nature Microbiol.* 2017. 2, 17007.
6. Bruno-Wilke, André Barretto; Toledo-Marrelli, Mauro. Paratransgenesis: a

CONCLUSIONES

La paratransgénesis enfrenta grandes retos por lo que todavía es una tecnología que se debe desarrollar y perfeccionar puesto que la falta de investigaciones que arrojen resultados concluyentes le impide ser considerada como una estrategia efectiva frente a enfermedades transmitidas por vectores. Se debe considerar que el propósito de la paratransgénesis es modular la capacidad del insecto de transmitir un parásito y/o enfermedad, reduciendo así su capacidad de dañar la salud humana y de generar daños o pérdidas económicas. En nuestra opinión las ventajas que ofrece dicha estrategia superan las desventajas de esta tecnología, aunque es necesaria una investigación sólida sobre la seguridad pública y donde se descarte que compromete el equilibrio ecológico y la salud humana.

- promising new strategy for mosquito vector control. *Parasites & Vectors* 2015;8:342-350.
7. Carlson J, et al. Molecular genetic manipulation of mosquito vectors. *Annu Rev Entomol.* 1995;40:359-88.
8. Carlson J, Suchman E, Buchatsky L. Densoviruses for control and genetic manipulation of mosquitoes. *Adv Virus Res.* 2006;68:361-92.
9. Cooksey, D. A. (2003, December). Biological control of Pierce's disease with non-pathogenic strains of *Xylella fastidiosa*. In *Symposium Proceedings*.
10. Damiani C, Ricci I, Crotti E, Rossi P, Rizzi A, Scuppa P, et al. Paternal transmission of symbiotic bacteria in malaria vectors. *Curr Biol.* 2008;18:1087-8.
11. Duron, O., et al. (2008). The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. *BMC Biology* 6, 27.
12. Durvasula, R. V., Gumbs, A., Panackal, A., Kruglov, O., Aksoy, S., Merrifield, R. B., ... & Beard, C. B. (1997). Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(7), 3274-3278.

13. Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects—diversity in structure and function. *FEMS microbiology reviews*, 37(5), 699-735.
14. Favia G, Ricci I, Damiani C, Raddadi N, Crotti E, Marzorati M, et al. Bacteria of the genus *Asaiastably* associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:9047-51.
15. Feldhaar, H. (2011) Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect host. *Ecological Entomology* 36, 533-543
16. Gaio AO, Gusmão DS, Santos AV, Berbert-Molina MA, Pimenta PF, Lemos FJ. Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae). *Parasit Vectors*. 2011;14:4 – 105.
17. Gilbert, J. A., Medlock, J., Townsend, J. P., Aksoy, S., Mbah, M. N., & Galvani, A. P. (2016). Determinants of Human African Trypanosomiasis Elimination via Paratransgenesis. *PLoS Negl Trop Dis*, 10(3), e0004465.
18. Gonzalez-Ceron L, Santillan F, Rodriguez MH, Mendez D, Hernandez-Avila JE. Bacteria in midguts of field-collected *Anopheles albimanus* block *Plasmodium vivax* sporogonic development. *J Med Entomol*. 2003;40:371-4.
19. Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A, Werren JH. How many species are infected with *Wolbachia*?. *FEMS Microbiol Lett* 2008; 281: 215-220
20. Hill CA, et al. Arthropod-borne diseases: vector control in the genomics era. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(3):262–8.
21. Hillesland H, Read A, Subhadra B, Hurwitz I, McKelvey R, Ghosh K, et al. Identification of aerobic gut bacteria from the kala azar vector, *Phlebotomus argentipes*: a platform for potential paratransgenic manipulation of sand flies. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;79:881 – 6.
22. Hopkins, D. L., & Purcell, A. H. (2002). *Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. *Plant disease*, 86(10), 1056-1066.
23. Huhn GD, Sejvar JJ, Montgomery SP, Dworkin MS. West Nile Virus in the United States: an update on an emerging infectious disease. *Am Fam Physician*. 2003;68:653 – 60.
24. Hurwitz, I., Fieck, A., Read, A., Hillesland, H., Klein, N., Kang, A., & Durvasula, R. (2011). Paratransgenic control of vector borne diseases. *Int J Biol Sci*, 7(9), 1334-44.
25. Knols, B. G., Bossin, H. C., Mukabana, W. R., & Robinson, A. S. (2007). Transgenic mosquitoes and the fight against malaria: managing technology push in a turbulent GMO world. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(6 Suppl), 232-242.
26. Lacava, P. T., Azevedo, J. L., Miller, T. A., & Hartung, J. S. (2009). Interactions of *Xylella fastidiosa* and endophytic bacteria in citrus: a review. *For. Sci. Biotechnol*, 3, 40-48.
27. Lampe, D., Miller, T., Lauzon, C., Hayward, C. A., Cooksey, D., & Bextine, B. (2002, December). Paratransgenesis for control of pierce's disease: manipulation of endophytic bacteria for paratransgenic control of pierce's disease. In *Pierce's Disease Research Symposium*.
28. Laven H. Eradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmic incompatibility. *Nature*. 1967; 216:383–4.
29. LePage, D. P. et al. *Nature* 543, 2017; 243–247.
30. Lindh JM, Terenius O, Faye I. 16S rRNA gene-based identification of midgut bacteria from field-caught *Anopheles gambiae sensu lato* and *A. funestus* mosquitoes reveals new species related to known insect symbionts. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71:7217-23.
31. Mark Q Benedict (2014) *Transgenic Insects: Techniques and applications*. CAB International
32. Mason, P. G., & Gillespie, D. R. (Eds.). (2013). *Biological control programmes in Canada 2001-2012*. CABI. Pp. 44-46.

33. Miller, T. A., Cooksey, D., Lampe, D., Lauzon, C., Peloquin, J., & Hayward, C. A. (2001, December). Insect-symbiotic bacteria inhibitory to *Xylella fastidiosa* in sharpshooters. In *Pierce's Disease Research Symposium December 5-7, 2001* (p. 78).
34. Organización mundial de la salud OMS Enfermedades transmitidas por vectores Febrero de 2016
35. Paula AR, Carolino AT, Silva CP, Samuels RI. Susceptibility of adult females *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is modified following blood feeding. *Parasit Vectors*. 2011;2011(4):2 – 7.
36. Pidiyar VJ, Jangid K, Patole MS, Shouche YS. Studies on cultured and uncultured microbiota of wild *Culex quinquefasciatus* mosquito midgut based on RNA gene analysis. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;70:597-603.
37. Pittman, G. W., Brumbley, S. M., Allsopp, P. G., & O'Neill, S. L. (2008). Assessment of gut bacteria for a paratransgenic approach to control *Dermolepida albohirtum* larvae. *Applied and environmental microbiology*, 74(13), 4036-4043.
38. Pittman, G. W., Brumbley, S. M., Allsopp, P. G., & O'Neill, S. L. (2008). "Endomicrobia" and other bacteria associated with the hindgut of *Dermolepida albohirtum* larvae. *Applied and environmental microbiology*, 74(3), 762-767.
39. Pumpuni CB, Demaio J, Kent M, Davis JR, Beier JC. Bacterial population dynamics in three anopheline species: the impact on *Plasmodium* sporogonic development. *Am J Trop Med Hyg*. 1996;54:214-8.
40. Rani A, Sharma A, Rajagopal R, Adak T, Bhatnagar RK. Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*-an Asian malarial vector. *BMC Microbiol*. 2009;19:9-96.
41. Riehle MA, Jacobs-Lorena M. Using bacteria to express and display anti-parasite molecules in mosquitoes: current and future strategies. *Insect Biochem Mol Biol* 2005;35:699 – 707.
42. Robertson, L. N., & Walker, P. W. (2001). Distribution of greyback canegrub, *Dermolepida albohirtum* (Coleoptera: Scarabaeidae), larvae in sugarcane soil. In *Proceedings of the International Society of Sugarcane Technologists* (Vol. 24, pp. 361-365).
43. Terenius O, de Oliveira CD, Pinheiro WD, Tadei WP, James AA, Marinotti O. 16S rRNA gene sequences from bacteria associated with adult *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. *J Med Entomol*. 2008;45:172-5.
44. Thomas MB, Read AF. Can fungal biopesticides control malaria? *Nat Rev Microbiol*. 2007;5:377–83.
45. Townson H. *Wolbachia* as a potential tool for suppressing filarial transmission. *Ann Trop Med Parasitol*. 2002; 96:117–27.
46. WHO - TDR. Planning meetings on Progress and Prospects for the Use of GMM to Prevent Disease Transmission: Meeting 1. Technical Consultations on the Current Status and Planning for Future Development. 2009.
47. Wilke AB, Marrelli MT. Paratransgenesis: a promising new strategy for mosquito vector control. *Parasit Vectors*. 2015; 8:3