



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Evaluación de riesgo ambiental para la liberación de
poblaciones *Aedes aegypti* genéticamente modificados
portadores de un sistema fsRIDL en el contexto del
sureste mexicano**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Biólogo

P R E S E N T A :

Esteban Niaves Nava



**DIRECTORA DE TESIS:
Dra. Sol Ortiz García
2015**

Índice	
1) Introducción	1
1.1) Aplicaciones de la biotecnología moderna	1
1.1.1) El uso de OGMs para control de enfermedades	2
1.1.2) El dengue	3
1.1.3) El dengue en México y Latinoamérica	4
1.2) Evaluación de riesgo ambiental	5
1.2.1) Principios e Historia de la Evaluación de Riesgo Ambiental	5
1.2.2) Marco regulatorio de la ERA en México	6
1.2.3) Enfoque de formulación del problema	7
2) Material y método	8
2.1) <i>Aedes aegypti</i> genéticamente modificado asociado a un sistema RIDL en el contexto del sureste mexicano.	8
3) Evaluación de Riesgo Ambiental de <i>Ae. aegypti</i> GM (fsRIDL)	9
3.1) Formulación del Problema	9
3.1.1) Contexto del problema	10
3.1.1.2) Enfoque general de evaluación y manejo de incertidumbre	10
3.1.1.3) Políticas de protección y metas de protección	11
3.1.1.4) Comparador: <i>Aedes aegypti</i> , importancia epidemiológica y prácticas de manejo convencionales.	12
3.1.1.4.1) Biología de <i>Ae. aegypti</i>	12
3.1.1.4.2) Relación entre <i>Ae. aegypti</i> , el DENV y el humano	15
3.1.1.4.3) Métodos actuales de control	17
3.1.1.5) <i>Ae. aegypti</i> GM con sistema RIDL asociado	19
3.1.1.5.1) Enfoques moleculares	20
3.1.1.6) Definición de Puntos Finales de Evaluación	22
3.1.2) Definición del problema	25
3.2) Caracterización de Riesgo	28
3.2.1) Caracterización de la exposición	28
3.2.2) Caracterización de las consecuencias	74
3.3) Estimación del Riesgo	93
4) Análisis de Resultados	94
4.1) Medidas de manejo	94

5) Discusión y Conclusiones

102

6) Referencias

107

1) Introducción

1.1) Aplicaciones de la biotecnología moderna

En las últimas décadas, la aplicación del conocimiento biológico en diversos campos del desarrollo humano se ha vuelto de suma importancia. La biotecnología, en sentido amplio, ha sido una herramienta esencial en el desarrollo humano desde hace más de 200 años y en la actualidad ha sido renovada debido al conocimiento de áreas como la genética, microbiología y bioquímica (Mosier & Ladisch, 2011).

Los sistemas biológicos se han logrado modificar con tecnología novedosa gracias a avances científicos como el descubrimiento de la estructura del DNA por Watson y Crick (1953) así como de la técnica del DNA recombinante por Cohen y colaboradores (1973), entre muchos otros. La unión de los campos de la biotecnología y la genética tiene como resultado el nacimiento de la biotecnología moderna (Bud, 1994).

La biotecnología moderna o nueva biotecnología es la ciencia que permite la manipulación directa de la maquinaria celular con el uso de moléculas de DNA recombinante y fusión celular (Mosier & Ladisch, 2011). En términos de bioseguridad, la biotecnología moderna, se entiende de acuerdo con el Protocolo de Cartagena sobre la Bioseguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB, 2000) como: “la aplicación de técnicas *in vitro* de ácido nucleico, incluidos el ácido desoxirribonucleico recombinante y la inyección directa de ácido nucleico en células u orgánulos; o la fusión de células más allá de la familia taxonómica, que superan las barreras fisiológicas naturales de reproducción o de la recombinación y que no son técnicas utilizadas en la reproducción y selección tradicional”.

El conocimiento, las técnicas y herramientas de la biotecnología moderna han difundido y afectado varios campos. Investigación en salud humana, desarrollo de fármacos, producción de alimentos, creación de nuevos materiales, elaboración de químicos de difícil producción y aplicaciones como la bioremediación son algunos ejemplos de ámbitos en los cuales ha sucedido la influencia de esta ciencia (Brink *et al.*, 2004).

A pesar de que la biotecnología moderna ha encontrado lugar para innovar los procesos en muchos sectores, recientemente ha impactado especialmente en aplicaciones orientadas a la agricultura así como a la salud humana. Cultivos producto de biotecnología moderna se comercializan desde 1996, año en el que se sembraron solo 1.7 millones de hectáreas, mientras que actualmente se siembran cerca de 170 millones. Según el Servicio Internacional para la Adquisición de Aplicaciones Agro-Biotecnológicas (James, 2013), en el 2013 se sembró por segundo año consecutivo una mayor área de cultivos producto de biotecnología moderna en países en desarrollo que en aquellos desarrollados y cerca de 18 millones de productores están involucrados en el uso de esta tecnología agrícola.

Por otro lado, gracias a la técnica de transformación celular para la producción de anticuerpos monoclonales desarrollada por Kohler y Milstein (1975) es que la producción de biofarmacéuticos se ha vuelto más barata y accesible a productos como la insulina (Johnson, 1983) o que se pueden realizar pruebas diagnósticas más específicas y en mayor número que antes. Los anteriores son solo un par de ejemplos de las aplicaciones de herramientas biotecnológicas en la investigación y mejoramiento de la salud en humanos.

Cabe destacar que la biotecnología moderna tiene como aplicación un número de productos, dentro de los cuales se desprenden los Organismos Genéticamente Modificados (OGM) u

Organismos Vivos Modificados (OVM) los cuales son tan variados como las modificaciones que estos puedan llegar a tener. Para el Protocolo de Cartagena “por organismo vivo modificado se entiende cualquier organismo vivo que posea una combinación nueva de material genético que se haya obtenido mediante la aplicación de biotecnología moderna” y como organismo vivo se considera a “cualquier entidad biológica capaz de transferir o replicar material genético, incluidos los organismos estériles, los virus y los viroides”.

1.1.1) El uso de OGM para control de enfermedades

Además de los usos mencionados previamente, en los últimos años se ha planteado una nueva aplicación de la tecnología: el control biológico de agentes que pudieran resultar plagas, patógenos o vectores de enfermedades de importancia sanitaria. La gestión de enfermedades a través de sus vectores no es reciente, sin embargo no fue sino hace pocos años que se planteó la posibilidad de utilizar biotecnología moderna para la modificación de organismos vivos que estarían en contacto con las poblaciones silvestres responsables de los contagios (Morel *et al.*, 2002).

Debido a que los mayores vectores de enfermedades son los invertebrados y en particular los insectos, no fue raro que la mayoría de los proyectos enfocados al uso de OGM en el control de enfermedades tuvieran a estos organismos como blanco (McGraw & O'Neill, 2013). Además de lo anterior, se cuenta con la información sobre los genomas completos de una serie de insectos vectores, los cuales facilitan la implementación de biotecnología moderna aplicada a la transformación de estos (Holt *et al.*, 2002; Sinkins, 2007).

Desde hace más de 30 años se ha experimentado con la transformación genética de insectos (Rubin & Sprading, 1982; O'Brochta *et al.*, 1995), siendo de particular interés las aplicaciones para el control de plagas y vectores de enfermedades (Berghammer *et al.* 1999). El interés por aplicar dicha tecnología para el control de vectores que afectan la salud humana se fijó sobre los mosquitos transmisores de malaria y dengue (Coates *et al.* 1998; Miller *et al.* 1987) debido a su potencial aplicación en las campañas de salud para combatir estas enfermedades.

Hace menos de 15 años que se lograron con éxito las transformaciones estables de mosquitos utilizando la tecnología de elementos transponibles derivados de *Musca domestica* a través de micro inyecciones en embriones de *Aedes aegypti* (Jasinkiene *et al.*, 1998) y de *Drosophila hidey* por la misma metodología en *Anopheles stephensi* (Catteruccia *et al.*, 2000). A partir de estas investigaciones es que se lograron una serie de transformaciones con diferentes elementos genéticos y metodologías en mosquitos transmisores de enfermedades exitosamente; un análisis más profundo de este tema puede ser consultado en la recopilación de Coutinho-Abreu y colaboradores (2010).

Las aproximaciones con las que se ha utilizado la biotecnología moderna en la transformación de vectores de enfermedades se puede clasificar de diversas maneras. Ya sea que se trate de una tecnología que pueda mantenerse por si misma en la naturaleza (auto-propagante) o que necesite de liberaciones prolongadas y continuas de vectores modificados para ser efectiva (auto-limitante); una estrategia que pretenda disminuir a las poblaciones de vectores en la naturaleza (supresión poblacional) o que desee introducir una característica en aquellas poblaciones que se encuentran en el medio ambiente (reemplazo poblacional) (Beech *et al.*, 2012).

Aunque los desarrollos actuales significan una variada paleta de esfuerzos que caen dentro de las categorías antes mencionadas, el mayor interés y desarrollo en pruebas de laboratorio y campo se ha enfocado en la tecnología autolimitante que busca conseguir una supresión poblacional,

recibiendo atención la supresión de poblaciones de mosquitos transmisores de dengue con el enfoque de liberación de insectos portadores de un gen dominante letal sobre el vector (RIDL).

1.1.2) El dengue

En la actualidad se tiene conocimiento de un gran número de enfermedades transmitidas por artrópodos afectando a la población mundial y a pesar de los esfuerzos por erradicar y prevenir los padecimientos, una gran parte de los grupos humanos siguen aún expuestos a la transmisión. Los mosquitos han sido reconocidos desde el siglo XIX como vectores de enfermedades, entre las que destacan la malaria y el dengue, pero la vacunación, tratamiento o métodos de prevención para estas no siempre han estado disponibles o no han sido efectivos (Rozendaal, 1997; Sperança & Capurro, 2007).

El dengue es una enfermedad que ha sido reconocida desde hace más de 500 años tanto por sus síntomas como por el vector que se encuentra asociado a sus transmisión (Gubler, 1997), sin embargo el virus que lo produce no pudo ser aislado si no hasta mediados del siglo pasado (Kuno, 2007). Existen cuatro serotipos del virus del dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) y un probable quinto serotipo (DENV-5) (Normile, 2013), los cuales pertenecen al género *Flavivirus* y la familia *Flaviviridae* (Nishiura & Halstead, 2007; Weaver & Vasilakis, 2009)

El virus del dengue es comúnmente transmitido por la mordedura de mosquitos hembras del género *Aedes*, en particular por *Aedes aegypti* (Gubler, 1997). A pesar de lo anterior, un número de especies de *Aedes* puede actuar como vector dependiendo de las condiciones geográficas, entre las cuales se encuentran *Ae. albopictus*, *Ae. polyniensis* y otros miembros del grupo de *Ae. scutellaris* (Gubler, 1998).

Las infecciones causadas por el virus del dengue producen un espectro de malestares que van desde periodos intermitentes e insignificantes de fiebre hasta una hemorragia que puede ser fatal. El desarrollo de esta enfermedad depende de muchos factores, pero se desencadena en dos tipos cuando se encuentra en su forma más aguda: el dengue febril y el hemorrágico (Gubler, 1998). El dengue febril tiene como característica principal el aumento de la temperatura corporal y afecta normalmente a niños mayores de 15 años y adultos, no resulta fatal en la mayoría de los casos. El dengue hemorrágico afecta normalmente a niños menores de 15 años, puede deteriorar la salud del afectado y terminar siendo fatal debido a un proceso de choque por extravasación en capilares sanguíneos (OPS, 2010).

La OMS (2012) considera al dengue como uno de los mayores problemas de salud pública para las regiones tropicales y subtropicales del mundo, de las enfermedades virales transmitidas por mosquitos es la que presenta el mayor número de contagios a nivel mundial, produciendo un estimado de 50 a 100 millones de infecciones al año. Además de lo anterior, se ha calculado que el crecimiento en incidencia de esta enfermedad en los últimos 50 años se ha incrementado 30 veces.

Aunado al hecho de que alrededor de la mitad de la población mundial vive en países donde el dengue es endémico (OMS, 2012), la urbanización ha sido la mayor fuerza conductora de la reemergencia de esta enfermedad a nivel global (Gubler, 2002; 2004). La rápida y no planeada urbanización ha resultado en construcción de viviendas con servicios insuficientes en donde las personas se encuentran asociadas espacialmente con grandes poblaciones de mosquitos (ONU, 2005). Lo anterior normalmente se debe a que los mosquitos necesitan para su reproducción cuerpos de agua donde el flujo sea nulo o lento y la falta de agua corriente en las comunidades significa que este recurso debe ser almacenado en depósitos cercanos a la viviendas, los cuales

muchas veces funcionan como sitios de crecimiento y reproducción de las poblaciones de vectores (Hales & Panhuis, 2005).

Otro de los factores al que se atribuye la expansión mundial del dengue es el cambio climático, dicha preocupación se ha hecho vigente en una serie de estudios (Hales *et al.*, 2002; Hales & Woodward, 2003; McMichael *et al.* 2006) en donde se concluye que el cambio climático podría aumentar las áreas geográficas en las cuales los vectores de estas enfermedades pueden establecerse exitosamente y aumentar su población, y por lo tanto incrementar el número de humanos expuestos a esta enfermedad.

El interés de las diferentes instancias internacionales en la erradicación de esta enfermedad se debe en gran parte por el impacto que representa para el desarrollo de los países. Para calcular el efecto de las enfermedades la OMS desarrolló un indicador que mide la carga que representa cada una de ellas en la población, conocido como DALYs (Disability-Adjusted Life Year), que representan la suma de años perdidos debido a muerte prematura en las poblaciones y de años perdidos por la discapacidad de un grupo poblacional que vive con alguna condición de salud o sus consecuencias (Murray, 1994). Gubler y Meltzer (1999) calcularon para algunos países de Asia y América el impacto del dengue en 1,300 DALYs, el cuál es similar a los índices de impacto de la tuberculosis.

Existen iniciativas de organizaciones internacionales para prevenir y mitigar los efectos de este padecimiento. En la Estrategia Global para la Prevención y Control del Dengue de la OMS (2012) se plantean una serie de metas como la reducción de por lo menos el 50% de la mortalidad asociada al dengue para el 2020 y se promueve el manejo integrado de vectores y medidas sostenidas de control, particularmente en zonas de alta transmisión y endemismo.

1.1.3) El dengue en México y Latinoamérica

Después de un periodo de 15 años en el que no se registraron casos de dengue en México, en 1978 se reportaron casos de la enfermedad por el serotipo 1 y 2 del virus en tres ciudades (Dantes *et al.*, 1988) y, desde ese resurgimiento, la enfermedad se ha mantenido presente en el país, teniendo un incremento importante en los últimos 20 años de manera endémica.

En México se encuentran desde 1995 los cuatro serotipos del dengue (DENV1-4), cada uno de ellos se presenta cíclicamente y de manera predominante por periodos de cuatro a cinco años. Los aislamientos realizados en nuestro país revelan una predominancia promedio del 85% de un serotipo, aunque pueden estar presentes los cuatro serotipos en diferentes proporciones. (CONAVE, 2011). El periodo 1995 a 1999 fue dominado por el DENV-3, seguido por el DENV-2 del 2000 al 2005 y desde el 2006 es predominante el DNV-1.

Debido a la periodicidad detectada en la incidencia de los serotipos es que se ha podido pronosticar no solo el incremento del serotipo DENV-2 con respecto al DENV-1, sino también un incremento en los estados afectados del sur del país, esto debido a una mayor incidencia en temporada de lluvias y los patrones de dispersión observados en años previos (CONAVE, 2012). El aumento en la presencia del serotipo DENV-2 (19 casos en 2011 y 343 casos en 2012) es de particular interés debido a que presenta un estado clínico con sangrados menores y un descenso en el número de plaquetas circulantes en la sangre, además de ser el más propenso a desarrollar dengue hemorrágico (CONAVE 2011).

Según reportes del Comité Nacional de Vigilancia Epidemiológica (CONAVE, 2012), a la semana 25 del año 2012 se observó un incremento del 238% en el número de casos de dengue en

comparación con el año anterior. Solo diez estados concentran el 90% de estos casos, localizándose, en orden de incidencia, en el sureste en Yucatán con 1,945 casos; Veracruz con 1,103 casos; Campeche con 843 y Chiapas con 663 casos.

Con respecto al continente americano (excepto Estados Unidos y Canadá), entre el año 2001 y 2007 se presentaron 4,332,731 casos de dengue, de los cuales, 106,037 resultaron en dengue hemorrágico y 1,299 terminaron en la muerte del afectado (OMS. 2009).

Son varios los ejemplos a lo largo de Latinoamérica en donde han sucedido epidemias de dengue de manera repentina. Brasil enfrentó en el año 2008 una de las más fuertes en su historia, se trata de un suceso de particular interés por ocurrir en gran medida en la ciudad de Río de Janeiro y por presentar más de 734,000 infectados con 212 víctimas mortales (Lourenço-de-Oliveira, 2008). Bolivia tuvo en el 2009 una situación similar cuando se reportaron más de 22,000 casos de dengue (Seijo, 2009) y México enfrentó una emergencia de este tipo en Colima en el 2006 con más de 2,000 casos confirmados en laboratorio (Chowell & Sánchez, 2006).

Los anteriores son solo algunos ejemplos de cómo la enfermedad puede llegar de manera cíclica pero impredecible a diferentes países en Latinoamérica y hacen vigentes los esfuerzos de los diferentes países para implementar medidas sanitarias de control en contra del contagio de este padecimiento, como se mencionará más adelante.

Al igual que en otros países (Lacroix *et al*, 2012), en México se ha planteado como una opción para el control de esta enfermedad la liberación de mosquitos genéticamente modificados (GM) al ambiente. Como cualquier liberación de OGM en nuestro país, está sujeta a regulación y procedimientos específicos, entre los cuales se encuentra una evaluación de riesgos ambientales.

1.2) Evaluación de riesgo ambiental (ERA)

Las modificaciones genéticas y los productos derivados de estas están altamente reguladas alrededor del mundo. Para la liberación al ambiente de OGM así como para su consumo es necesario realizar una serie de aprobaciones reglamentarias (EFSA, 2006). La ERA no es un proceso nuevo, se ha utilizado desde hace mucho tiempo aplicado a la contaminación y daños causados por químicos en el ambiente, sin embargo su adaptación para actividades en las que se utilizan OGM tiene apenas cerca de treinta años de existir (Hill & Sandashoga, 2003).

1.2.1) Principios e Historia de la Evaluación de Riesgo Ambiental

La Evaluación de Riesgo Ambiental (ERA) es un proceso sistemático cuyo propósito es describir y cuantificar los riesgos asociados con sustancias peligrosas, procesos, acciones o eventos que puedan causar efectos adversos en el ambiente (Covello & Merkhoher, 1993). En otras palabras, se trata del proceso por el cual se identifican posibles daños en el ambiente, se estima el nivel de riesgo y se determinan cuáles son aquellos potenciales efectos negativos que necesitan de medidas para reducir dicho nivel (EPA, 1998).

La ERA existe como tal desde hace más de treinta años, pero fue hasta 1975 que se acuñó ese nombre (Kuzmack & McGaughy, 1975) y el primer marco de trabajo en donde se proporcionan instrucciones de cómo realizarlo se logró un año después (EPA, 1976). El establecimiento formal de la ERA está dado por “El Libro Rojo” (NRC, 1983), “El Libro Azul” (OECD, 1986) y “El Libro Naranja” (FDA,1996), en los cuales se establecen dos principios básicos: (1) la información utilizada para realizar este proceso debe ser de orden científico y los factores emotivos no deben de permear este proceso, y (2) no solo se determina la caracterización analítica del riesgo sino

también de la incertidumbre producto del análisis, logrado con la participación de expertos en un proceso transparente.

Los países en donde se plantean liberaciones al ambiente u otros usos de OGMs pueden tener marcos regulatorios así como políticas diferentes, sin embargo una de las características que se tiene en común alrededor del mundo es la implicación de una ERA en la toma de decisiones sobre estos temas (Gray, 2012). Uno de los documentos internacionales que especifica sobre la realización de ERAs en el ámbito de los OGM es el Protocolo de Cartagena (CDB, 2000), del cual México es país Parte.

A continuación se encuentran muestran los objetivos y características que una ERA asociada a OGM tiene, de acuerdo al Protocolo de Cartagena:

Es necesario que las ERAs se realicen teniendo en cuenta técnicas reconocidas para este propósito y se deberán realizar de acuerdo a procedimientos científicos sólidos. Este tratado considera como objetivo de la ERA “determinar y evaluar los posibles efectos adversos de los organismos vivos modificados en la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica en el probable medio receptor, teniendo en cuenta también los riesgos para la salud humana”.

Es importante resaltar que nunca se habla de la ERA como la única fuente de información para que las autoridades responsables adopten decisiones fundamentales en relación a los OGM sino que se trata de una herramienta que se incluye dentro del proceso global de decisión.

Similar a “El Libro Naranja”, el Protocolo de Cartagena propone una realización “transparente y científicamente competente de la ERA con el asesoramiento de los expertos y teniendo en cuenta las directrices elaboradas por las organizaciones internacionales pertinentes”. En este proceso se reconoce que no se asignará un nivel riesgo determinado a una situación particular debido a la falta de conocimiento científico o de consenso científico.

Para determinar los riesgos asociados a los OGM se debe tener en cuenta el contexto de los riesgos planteados por sus contrapartes no modificados o por los organismos parentales. Deberá tenerse en cuenta que se trata de un análisis “caso por caso”, es decir, el tipo de información necesaria para realizar la evaluación dependerá del organismo modificado, el uso previsto que se tenga para este y el probable medio receptor.

La metodología para realizar la ERA asociada a OGM ha variado a lo largo del tiempo y son diferentes la maneras en la que esta se aborda en diferentes países (Hill, 2005), sin embargo comparte muchos de sus aspectos y paradigmas con las metodologías enfocadas a la evaluación de estresores químicos desde que ésta surgió (Hill y Sandashoga, 2003).

Aunque los enfoques con los cuales se realiza la ERA sean diferentes, existen etapas comunes en varios de estos, los cuales pueden ser numerados como 1) Formulación del problema (FP); 2) Evaluación de la exposición a un agente “estresor” 3) Evaluación de la magnitud de un efecto adverso asociado 4) Caracterización general de riesgo en función de la exposición y la magnitud de un efecto adverso (Hill & Sandashoga, 2003).

1.2.2) Marco regulatorio de la ERA en México

Como ya se mencionó antes, México es Parte del Protocolo de Cartagena y está sujeto a una serie de obligaciones en materia de OGM. La realización de ERA para fundamentar la toma de decisiones es una de estas, sin embargo también posee marcos regulatorios propios en materia de

protección ambiental y bioseguridad. Entre las leyes y reglamentos aplicables para OGM y su liberación intencional al medio ambiente se encuentra la Ley General de Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (LGEEPA, 2014), de donde se desprenden una serie de principios útiles para la realización de ERAs como el siguiente:

Se deben realizar acciones de protección y preservación de la biodiversidad en el país, así como del aprovechamiento de material genético (Art 2º), en donde se entiende como material genético “todo material de origen vegetal, animal, microbiano o de otro tipo, que contenga unidades funcionales de herencia” y recursos genéticos como “el material genético de valor real o potencial” (Art 3º).

De manera más específica, la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM, 2005) contempla lo siguiente con respecto a la elaboración de ERA dentro del esquema de bioseguridad:

“Se debe de realizar una evaluación previa de los riesgos derivados de las actividades con OGM con el fin de proteger el medio ambiente, la diversidad biológica y la salud humana (Art 9º V), los posibles riesgos se evaluarán caso por caso y basada en la mejor evidencia científica y técnica disponible” (Art 9º VIII)”.

“Para llevar a cabo el estudio y la evaluación de riesgo, se deberán observar los siguientes lineamientos (Art 61º):

- I. Deben de realizarse casos por caso de una forma transparente y basada en principios científicos y en el enfoque de precaución ...
- II. Se realizarán en los campos de especialidad relevantes ;
- III. La falta de conocimiento o consenso científico no se interpretará necesariamente como indicador de un determinado nivel de riesgo, de ausencia de riesgo, o de la existencia de riesgos aceptables;
- IV. Debe tener como base mínima los posibles riesgos que se impondrían por la liberación de los organismos hospederos no modificados genéticamente o de los organismos parentales, cuando fueran liberados al medio ambiente;
- V. Se deberá considerar el organismo receptor, la modificación genética, incluyendo la construcción genética y el método de inserción, y el ambiente en el que se pretende liberar el OGM, y
- VI. La naturaleza y el nivel de detalle de la información que contengan pueden variar de un caso a otro, dependiendo del OGM de que se trate, su uso previsto y el probable medio receptor”.

1.2.3) Enfoque de Formulación del Problema (FP)

Los enfoques con los que se realiza la ERA son diversos pero siempre tienen como objetivo el determinar cuáles son los potenciales efectos adversos en entidades ambientales que deseamos proteger, entre las aproximaciones que se tienen se encuentra la Formulación del Problema (FP).

También conocido como la identificación de peligro (EPA, 1998; Hill, 2005), es la etapa inicial de la ERA. Se trata un proceso en el que se construyen hipótesis de riesgo asociadas a los efectos que pudiera ocasionar un OGM así como un plan para probarlas, y es un método que busca maximizar la posibilidad de detectar indicadores de un potencial efecto adverso o bien indicar un bajo riesgo cuando estos no son detectados (Raybould, 2006).

La FP se compone conceptualmente de dos etapas: la identificación de los efectos adversos potenciales causados por la actividad a evaluar (definición del problema) así como por los aspectos y parámetros que componen a la ERA (contexto del problema) (Wolt *et al.*, 2010). Estas dos etapas están relacionadas íntimamente y cada una aporta los enfoques y métodos bajo los cuales se caracterizan los posibles efectos adversos.

“Efecto adverso” se entiende el cambio negativo en la morfología, fisiología, crecimiento, desarrollo, reproducción o periodo de vida de un organismo, sistema o población que resulta en impedimento sobre la capacidad funcional, impedimento sobre la capacidad de compensar cuando sucede estrés adicional o aumento en la susceptibilidad a otras influencias (OECD, 2003).

De manera complementaria El Protocolo de Nagoya- Kuala Lumpur sobre la responsabilidad y compensación suplementario al Protocolo de Cartagena sobre seguridad de la biotecnología define como daño “un efecto adverso en la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica, tomado también en cuenta los riesgos para la salud humana, que: pueda medirse o de cualquier otro modo observarse teniéndose en cuenta, donde estén disponibles, referencias científicamente establecidas reconocidas por una autoridad competente en las que se tengan en cuenta cualquier otra variación de origen antropogénico y cualquier variación natural.”

El objetivo de la FP se puede entender en tres actividades: (1) Selección de entidades que son susceptibles de ser dañadas por la actividad relacionada con el OGM y que son de interés de acuerdo a las políticas nacionales e internacionales vigentes y pertinentes, (2) proponer escenarios que resulten en un efecto adverso ambiental producto del uso o actividad de un OGM en el ambiente y (3) encontrar y definir los escenarios que merecen caracterización detallada (Wolt *et al.*, 2010).

2) Material y método

Para esta tesis se realizará una Evaluación de Riesgo Ambiental que contemple a la especie de mosquito genéticamente modificado (GMM) *Aedes aegypti* con sistema de Liberación al Ambiente de Individuos portadores de un Alelo Letal Ligado a Hembras (fsRIDL por sus siglas en inglés) en el contexto del Sureste Mexicano. Esta ERA corresponde a un caso hipotético de posible liberación al ambiente de esta especie de mosquito GM, en la región identificada. Se trata de un escenario factible, sin embargo en nuestro país aún no se ha recibido una solicitud de permiso para liberación al ambiente de mosquitos GM.

Para generar una ERA bajo el principio de “caso por caso” es necesario conocer el sitio de liberación exacto así como el OGM específico a ser liberado, con lo cual no se cuenta en esta ocasión debido a que se trata de un escenario hipotético. Este trabajo tiene la intención de abordar temas relevantes de la tecnología y el método de control de poblaciones que se plantean por varios desarrollos biotecnológicos en una zona donde existen lugares de endemismo y alta transmisión. Entendiéndose como lugar endémico aquellos sitios donde la enfermedad persiste durante un tiempo determinado y afecta o puede afectar poblaciones humanas.

2.1) *Aedes aegypti* con sistema de Liberación al Ambiente de Individuos portadores de un Alelo Letal ligado a Hembras (fsRIDL) en el contexto del Sureste Mexicano.

El organismo con el cuál se trabajará es el mosquito *Ae. aegypti* GM que contiene un constructo genético portador de un alelo letal, dominante, específico de sexo y que codifica para una característica que se expresa en condiciones específicas. La liberación de estos organismos tiene como objetivo la disminución de poblaciones silvestres de la misma especie. La biología y bionomía

del mosquito será abordada en siguientes secciones, al igual que el sistema tecnológico que esta asociado a este.

Este sistema de control biológico consiste en la liberación de machos portadores de copias de un constructo específico que se espera sea transmitido a una siguiente generación en el ambiente. Una vez que sucede inseminación de estos machos GM a hembras silvestres, aquellas crías que sean portadoras de por lo menos una copia del constructo genético de interés no se desarrollaran de manera regular y morirán antes de llegar a la adultez. Los mosquitos GM se describen con más detalle en las siguientes secciones.

3) Evaluación de Riesgo Ambiental de *Ae. aegypti* GM (fsRIDL)

3.1) Formulación del Problema

El contexto y la definición del problema son dos módulos dentro de la FP íntimamente relacionados y que suceden de manera paralela, aunque en muchos esquemas se les sitúa uno tras otro (Wolt *et al.*, 2010). La etapa del contexto del problema es la etapa procedimental en la que se establecen cuáles son los parámetros para realizar la ERA, mientras que en la etapa de definición del problema se identifican potenciales riesgos que pudieran asociarse al OGM y que serán sujetos a una futura evaluación (Gray, 2012). En la figura 1 se muestran las etapas de la ERA que se tomarán como parte de la metodología para poder caracterizar riesgo y generar recomendaciones siguiendo el enfoque de la FP para este caso de estudio.

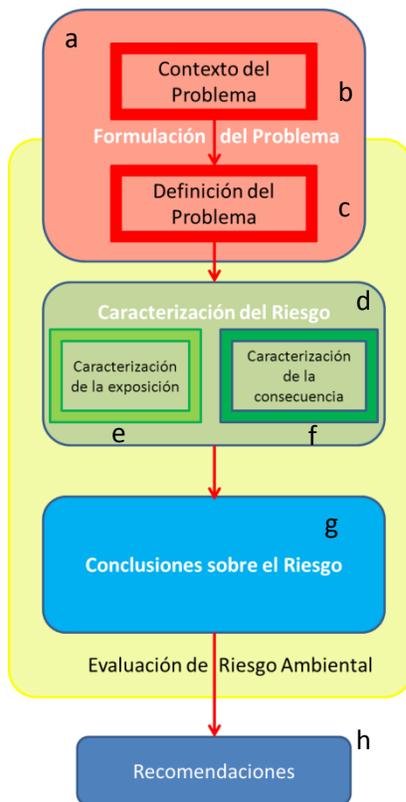


Figura 1. El proceso general de ERA con el enfoque de FP se divide en etapas secuenciales que pueden retroalimentarse a lo largo del proceso. Durante la Formulación del Problema (a) se destilan hipótesis de potenciales efectos adversos producto del Contexto del Problema (b) y de la Definición del Problema (c) que serán después evaluadas. Para lograr la Caracterización del Riesgo (d), las hipótesis planteadas se evaluarán en función de las Caracterización de la exposición (e) y la Caracterización de la consecuencia (f) y con base en estos componentes se generarán Conclusiones sobre el Riesgo (g) de cada hipótesis generada. Tras concluir las etapas anteriores se generan Recomendaciones de control, manejo y mitigación de los riesgos estimados (h). Modificado de Wolt *et al.*, 2010.

3.1.1) Contexto del problema

Esta sección dentro de la ERA (Fig 1b) consiste en determinar el “andamiaje” metodológico con el cual se trabajarán, es decir, cuáles son las reglas de análisis que se utilizarán para poder detectar los posibles efectos adversos así como cuáles son las entidades sobre las que estos pudieran suceder.

Debido a que a lo largo de la ERA se realizan juicios subjetivos por parte del evaluador, se deben justificar cuáles son los motivos que llevan a fijar el enfoque con el que se evalúa, cuáles son los supuestos de trabajo, la elección de modelos, la acción precautoria y el grado de precaución que se decide utilizar, cuando se encuentra con incertidumbre (Hayes, 2004). Las elecciones antes mencionadas forman parte del contexto del problema; junto a estas el evaluador debe tener en cuenta una serie de aspectos como la política del país en el cual se realiza la evaluación, regulaciones compartidas de manera internacional y las guías que están adoptadas para la realización de ERA dentro del país (i.e. EFSA, 2010), entre otros.

3.1.1.2) Enfoque general de uso, manejo de incertidumbre

Del mismo modo, se deberá de considerar el tipo y nivel de la información necesaria para realizar la evaluación así como los requerimientos metodológicos y analíticos de los estudios a realizar, las metas de protección, puntos finales de evaluación, los umbrales de aceptación de riesgo, estrategias de manejo existentes (AHTEG, 2012) y su efectividad.

A lo largo del proceso de la evaluación de riesgo es común toparse con incertidumbre de varias fuentes, la cual podría resultar en detrimento del proceso global si es ignorada. Debido a eso es necesario establecer un marco en el cual este aspecto sea analizado con cuidado.

La incertidumbre es la incapacidad total para determinar un estado específico para algo, este estado describe las condiciones en las que algo sucede y puede tomar parámetros como el tiempo, la dimensión o magnitud, el número o la causalidad. Aunque en todas las evaluaciones de riesgo siempre existirá incertidumbre, existen métodos para disminuirla, estimarla o incorporarla al proceso, el primer paso para esto consiste en la identificación de la fuente que la genera. La incertidumbre se puede clasificar de manera general de la siguiente forma (OGTR, 2014):

- a) Incertidumbre sobre los hechos.- Esta sucede cuando no se cuenta con un elemento de veracidad en aquello que se afirma o se presenta como evidencia.
- b) Incertidumbre en el conocimiento.- Reside en huecos de información, errores propios de un instrumento de medición, herramientas estadísticas, uso de tamaños de muestras muy pequeños. A diferencia del anterior, se trata de errores que suceden durante el proceso para generar el conocimiento y no en el conocimiento mismo.
- c) Incertidumbre asociada a la variabilidad.- Corresponde a la complejidad del sistema o eventos estocásticos, puede suceder por fluctuaciones que suceden inherentes al sistema a través del tiempo, espacio y está asociada a la diversidad y heterogeneidad natural del sujeto de estudio.
- d) Incertidumbre asociada a la descripción.- Sucede cuando alguno de los elementos por los cuales se quiere comunicar una idea es ambiguo, no se comparten los códigos de comunicación, no se interpreta correctamente el contexto en el que generan datos o se trata de un lenguaje muy específico.
- e) Incertidumbre asociada a la percepción.- Este se presenta cuando las variaciones de percepción de cada individuo y a través del tiempo son diferentes. Algunos individuos

adscritos a una circunstancia socio-cultural en un determinado momento, pueden no tener la misma percepción de lo que asocian con riesgo, que otros individuos en escenarios diferentes.

Como ya se mencionó antes, la incertidumbre es un elemento intrínseco de la ERA que no debe tomarse como un obstáculo a lo largo de la evaluación. Adoptando las medidas para incorporarla o disminuirla sucede un aumento en la claridad, consistencia, credibilidad, reproductibilidad y transparencia del proceso que informa la toma de decisiones. Algunas de las maneras que existen para lograrlo son las siguientes:

- 1) Establecer cuáles son los parámetros de calidad que se tomarán en cuenta para realizar la evaluación.
- 2) Obtener datos adicionales a los presentados en un principio.
- 3) Identificar cuáles son las fuentes que causan los errores y corregirlos.
- 4) Aplicar estimados que sean de alguna manera conservadores.
- 5) Delimitar los límites superiores e inferiores de los estimados.
- 6) Buscar la opinión de uno o más expertos en el tema u obtener una revisión que sea independiente.

A lo largo de la caracterización de la exposición y de la consecuencia se hará explícita la incertidumbre encontrada en cada uno de los procesos para después ser analizada, este proceso concluye cuando se generan las recomendaciones necesarias para atender esta falta de certeza.

3.1.1.3) Políticas y metas de protección

De acuerdo al artículo 4º de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos y el artículo 1º de la Ley General de Salud, todas las personas tienen derecho a la protección de la salud. Son de particular interés para estrategias de control vectorial las consideraciones normativas incluidas en algunos de los artículos subsecuentes en esta Ley.

El artículo 2º de Ley General de Salud destaca la búsqueda de la prolongación y el mejoramiento de la calidad humana, la extensión de actitudes solidarias y responsables de la población en la preservación, conservación, mejoramiento y restauración de la salud y el desarrollo de la enseñanza y la investigación científica y tecnológica para la salud.

El artículo 3º promueve la prevención y el control de los efectos nocivos de los factores ambientales, por la manera en la que se relacionan con el control de enfermedades transmisibles y la influencia en la transmisión de enfermedades vectoriales, como el dengue.

En el contexto del problema se ven plasmadas las políticas y metas de protección ambiental bajo las cuales la ERA se plantea. Las metas de protección son aquellas entidades que se desean proteger, están definidas por la regulación de cada país y forman parte de la política ambiental de cada gobierno (EFSA, 2010). Las metas de protección son normalmente conceptos generales y relativamente ambiguos dentro de documentos legislativos (Sanvido, 2012) por lo que necesita la interpretación de evaluadores con experiencia, sin embargo, al ser conceptos vagos pueden llegar a ser ampliamente interpretadas, difíciles de falsear o comprobar (Evans *et al*; 2006).

3.1.1.4) Comparador: Vector no modificado *Aedes aegypti*, importancia médica y prácticas de manejo convencionales.

En esta etapa se definen cuáles son las características novedosas del OGM en función de su comparador, la interacción con el ambiente, a las prácticas asociadas al uso de este (Wolt *et al.*, 2010) y que son resultado de la modificación genética (Gray, 2012). Para poder definir esto necesitamos de identificar un comparador para los aspectos antes mencionados.

Para escoger al comparador correcto es necesario establecer una serie de criterios de manera previa y aunque la mayoría de las guías que se han generado están diseñadas para plantas GM, existen parámetros comunes y aplicables a animales GM. El Grupo Técnico *Ad Hoc* de Expertos sugiere como comparador a la línea parental con la cual se desarrolló la tecnología (AHTEG, 2012). Por lo tanto, para los fines que persigue el presente trabajo, se considerará al vector no modificado como referente principal.

Se cree que *Ae. aegypti* se originó en la zona central y tropical de África, donde se encuentra su mayor distribución, es una especie tropical y subtropical que se encuentra entre los paralelos 35° al Norte y 35° al sur y con una altitud menor a los 1,000 m.s.n.m, aunque se le ha encontrado en elevaciones superiores (Fernández, 2009). Es un insecto dentro del orden Díptera, localizado en el suborden *Nematócero* y la familia *Culicidae* (junto a los otros mosquitos), pertenecen al género *Aedes* y subgénero *stegomya*. La especie *Ae. aegypti* presenta tres variedades: *aegypti* de color oscuro en el interior de África subsahariana, *formosus* de color negro y limitada a África subsahariana y *queenslandensis* de color pálido en el norte de Australia.

3.1.1.4.1) Biología de *Ae. aegypti*

El mosquito *Aedes aegypti* es uno de los insectos mejor conocidos por científicos de diversos campos y especialidades no solo por el uso que se le puede dar en actividades de laboratorio sino porque, como ya se mencionó, representa un problema de salud mundial al estar distribuido alrededor del mundo y causar una de las enfermedades que más dañan a las poblaciones humanas (Foote, 1961).

La aplicación de medidas para su control han llevado a un amplio, aunque aún insuficiente, conocimiento sobre aspectos de su ciclo de vida que intervienen en la transmisión de las enfermedades de las cuales es vector. *Ae. aegypti* establece relaciones con su ambiente en diferentes etapas de su vida, este término es conocido como bionomía y es de suma importancia debido a que no todas las formas que suceden en su desarrollo son portadoras del agente infeccioso o susceptibles a cierto método de control (Christophers, 1960).

Se pueden diferenciar las fases del ciclo de vida en huevo, larva (con cuatro estadios diferentes), pupa y adulto. Las cuales se componen de una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y de comportamiento (Fernández, 2009). Estas etapas se encuentran ilustradas en la Figura 2.

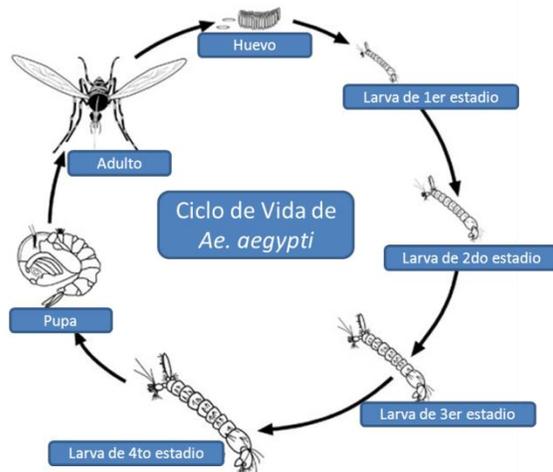


Figura 2. Ciclo de vida de *Ae. aegypti* Modificado de Williams *et al.*, 2010

Los huevos de *Ae. aegypti* son pequeños, de un color negro, de no más de un milímetro de longitud y tienen una forma similar a la de una lancha, con una de las caras de la superficie cóncava mientras que la otra es convexa. Un aspecto distintivo de estos huevos es la presencia de pequeñas marcas poligonales que pueden lucir blancas, aunque mucho depende de la desecación que estos presenten (Christophers, 1960).

Cuando son ovopositados tienen un color que va del blanco hasta ser transparentes, pero a medida que el tiempo pasa se oscurecen hasta ser negros, incrementan de volumen y adquieren una forma más redondeada.

Los lugares potenciales de ovoposición son uno de los aspectos a considerar en el desarrollo de las campañas de control vectorial, pues es donde se generan y mantienen las poblaciones de mosquitos que serán adultos. Las hembras llegan a ovopositar en lugares con agua estancada como cacharros, floreros, tumbas de cementerios, llantas viejas, canaletas de desagüe, etc. El amplio espectro de sitios de ovoposición tiene un papel en la migración de este vector a largas distancias, se cree que el mayor medio de dispersión en el mundo de este mosquito se debió al transporte de llantas y bambús desde Asia.

Las hembras depositan sus huevos en las paredes de recipientes con agua, se posan a unos centímetros del borde del líquido y a unos cuantos milímetros sucede la ovoposición. Los huevos se sostienen en su lugar con una estructura llamada parche corónico y después una sustancia cementante los mantiene en su lugar, probablemente se trate de una glicoproteína (Fernández, 2009). El agua contenida en los recipientes puede tener materia orgánica en descomposición en mayor o menor medida, incluso existen experiencias de sitios de ovoposición de fosas sépticas (Barrera *et al.*, 2008).

El número de huevos que una hembra produce en una ovoposición y a lo largo de su vida depende de factores como el tamaño corporal (Briegel, 1990), cantidad y calidad protéica de la sangre que ha ingerido (Reyes-Villanueva, 2004) y la edad. El número de huevos que se puede encontrar en un recipiente es variable debido a que depende del número de hembras involucradas en las ovoposiciones, sin embargo se estima que cada ovoposición produce de 20 a 120 huevos (Fernández, 2009).

Al igual que el resto de los mosquitos, *Ae. aegypti* presenta cuatro estadios larvales que terminan en un proceso de ecdisis. De manera general, las larvas, presentan una forma cilíndrica y elongada compuesta por cabeza, torax y abdomen, con la mayoría de sus partes blandas con excepción de la cabeza y el sifón. Los estadios son periodos en los cuales aumenta el tamaño de todas las estructuras que forman al mosquito, salvo estructuras duras cuticulares. Debido a lo anterior se puede reconocer el inicio y final de cada estadio por la proporción que las diferentes partes tienen entre ellas.

Las larvas se desarrollan en un medio acuático en el cual suceden interacciones de competencia por recursos y condiciones de manera intra e interespecífica que pueden repercutir en su desarrollo en este estadio o en los posteriores. Dichos efectos pueden recaer en la esperanza de vida que presentan (Maciel-de-Freitas, 2007), desarrollo fisiológico de las barreras que los agentes virales deben sortear para diseminarse (Alto *et al.*, 2005) o en el tamaño que tendrán las hembras adultas (Gama *et al.*, 2005, Walsh *et al.*, 2012). Estos factores están relacionados con la capacidad que estas tendrán para contagiarse y transmitir una enfermedad y serán discutidos más adelante.

Las larvas se alimentan de algas y protozoarios de vida libre que encuentren en el agua, tanto en la superficie como en el fondo, aunque existe también una relación entre el tamaño que estas presentan y el espectro de la columna de agua que pueden explotar. Probablemente la relación presa-depredador que más se ha documentado con las larvas de *Ae. aegypti* es la que sucede con copépodos, sin embargo son varios los programas de control biológico que especulan sobre la que sucede con peces como las gambusias (Walton, 2007) y otros organismos (Kumar & Hwang, 2006).

Una vez que ha terminado el último estadio de la larva comienza la etapa de pupa, la cual deriva de la excreción de una sustancia dura que recubre su cuerpo. A diferencia de otros insectos que muestran las cuatro etapas de desarrollo antes mencionadas (holometábolos), la pupa de *Ae. aegypti* presenta movilidad como respuesta a estímulos como la luz y las vibraciones. Dicho movimiento se logra gracias a las aletas caudales, además posee un par de trompetas respiratorias que participan en el intercambio gaseoso y en elementos de flotabilidad (Christophers, 1960).

La etapa de pupa se distingue por una gran cantidad de cambios fisiológicos que permiten la invasión del ambiente aéreo, entre las que se encuentran el desarrollo de alas, tres pares de patas, ovarios y todos los aparatos necesarios para tener una dieta con base en líquidos nutritivos (Fernández, 2009).

El fin del desarrollo asociado a cuerpos de agua se da cuando el mosquito adulto emerge de la pupa en donde sucedieron los cambios fisiológicos antes mencionados. Después de su salida reposa sobre la película de agua en la cual se crió y al transcurrir 24 horas está listo para volar tras el endurecimiento de su cuerpo (Fernández, 2009).

Aunque se caracteriza a la hembra como activa en la mordedura y la ingesta de sangre, tanto machos como hembras pueden sostener su dieta con base en fluidos que contengan algún tipo de azúcar, como el néctar de flores. A pesar de lo anterior, las hembras necesitan de consumir sangre para poder completar su ciclo gonotrófico y lograr ovopositar una vez que han sido fecundadas por los machos (Christopher, 1960).

Una vez que los machos son capaces de copular, se guían por las vibraciones producidas por los aleteos de las hembras. De manera general se supone que las hembras tienen una sola cópula a lo largo de su vida y termina con el sellado por una sustancia llamada matrona que mantiene el semen del macho en una espermateca, con el cual inseminará a todos los huevos que formen en

cada ciclo gonotrófico (Fernández, 2009). Sin embargo, existen experiencias que hablan de presencia de poliandria en la especie cuando se trabaja en laboratorio (Helinski *et al.*, 2012).

El comportamiento hematofágico de las hembras de *Ae. aegypti* se debe a que necesitan de una serie de aminoácidos que se encuentran en los eritrocitos y el plasma sanguíneo para sintetizar proteínas del vitelo durante la producción de huevos (Hurd, 2003). Una vez que los mosquitos se posan sobre el organismo del cual se alimentarán, buscan un lugar adecuado para realizar la mordedura con su probóscide y la insertan causando laceraciones en los tejidos adyacentes, esto genera vasoconstricción, coagulación de sangre y agregado de plaquetas (Ribeiro, 2000).

Para contrarrestar los efectos del sistema inmune del hospedero, los mosquitos segregan saliva que es inyectada también y contiene vasodilatadores, antihistamínicos y anticoagulantes (Ribeiro & Francischetti, 2003), proceso que continúa mientras sucede la alimentación de sangre. El contacto entre la sangre y la probóscide de los mosquitos activa una serie de señales moleculares con las que la ingesta comienza (Ribeiro *et al.*, 1984).

Durante la alimentación, *Ae. aegypti* puede ingerir cantidades de sangre variables dependiendo de muchos factores como el desarrollo en etapas larvales (Nasci, 1986), tamaño de la hembra (Farjana & Tuno, 2012), la respuesta que el hospedero tenga (Edman & Scott, 1987) o el fondo genético del mosquito (Chaves *et al.*, 2010). La cantidad de sangre ingerida y el número de picaduras necesarias tienen un impacto no solo en el desarrollo de los huevos sino en la dinámica de contagios que sucedería, si el mosquito se encontrara infectado con algún parásito.

3.1.1.4.2) Relación entre *Ae. aegypti*, el DENV y el humano

Cuando *Ae. aegypti* ingiere sangre con contenido viral, suceden una serie de eventos necesarios para la diseminación del virus del dengue hacia ciertos tejidos. En la Fig. 3 se muestra la ruta de infección que sucede en un mosquito infectado hasta la retransmisión del patógeno.

Durante el recorrido, el DENV se encuentra con barreras a la infección en donde el virus debe de establecer la infección en el intestino medio, y para lograrlo sortea la barrera de infección del intestino medio (MIB). Después de que se ha replicado en las células del tejido epitelial, los virus deben de pasar por un segundo obstáculo conocido como la barrera de escape del intestino medio (MEB) para terminar de replicarse en otros tejidos (Fig 3 d, f, g) y finalmente llegar e infectar a las glándulas salivales.

En la figura 3 se muestra un diagrama del ciclo que sigue el virus en el *Ae. aegypti*.

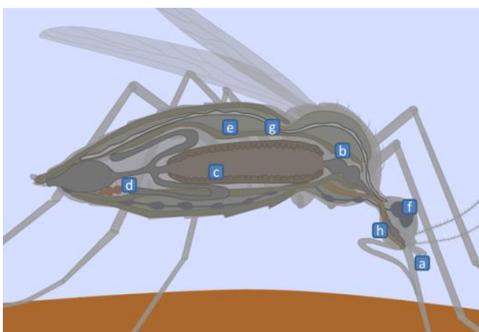


Figura 3 Después de ser ingerido (a), el DENV cruza la barrera faríngea (b) y entra al intestino medio (c) del mosquito, en donde accede a las células epiteliales intestinales, ovarios (d), sistema nervioso (f) y cuerpos grasos (g). En estos tejidos se replica para después salir y viajar a través del hemocele (g) repleto de hemolinfa hacia las glándulas salivales (h). En las glándulas salivales se replicará de nuevo hasta ser inyectado a un hospedero al alimentarse de sangre (Beemsten *et al.*, 2000). Modificado de <http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-life-cycle.swf>

El DENV es un virus de RNA que posee una superficie externa compuesta de proteínas que rodean una bicapa de lípidos, dentro de esta capa se encuentra la cápside que contiene el genoma

viral. Las células blanco del dengue son células del sistema inmune que poseen dos receptores celulares susceptibles a la envoltura del virus, receptores específicos de superficie y “receptores Fc”, los segundos serán de suma importancia en un fenómeno denominado potenciamiento dependiente de anticuerpos (ADE) (Gubler & Kuno, 1997).

Las proteínas de superficie se unen a los receptores cognados y disparan un proceso denominado endocitosis mediada por receptores. El virus es internalizado por una nueva estructura celular denominada endosoma en donde el pH del interior es disminuido gracias a bombas de protones, sin embargo esto causa un cambio en la conformación de las proteínas de superficie del virus por lo que las porciones hidrofóbicas quedan expuestas hacia el exterior, pudiendo penetrar y fusionarse con la membrana del endosoma para así liberar solamente la cápside en el citoplasma celular.

La cápside se desintegra y deja expuesto el RNA viral, cuando este RNA se encuentra con el retículo endoplásmico es un RNA que puede ser transcrito directamente a proteínas y utilizando la maquinaria celular del hospedero se sintetiza una cadena proteica que se activa para formar el complejo de replicación viral. El RNA previamente descrito se concatena formando un círculo y se une al complejo de replicación para iniciar con el primer periodo de síntesis, sirviendo como molde para generar RNA de doble hélice. Esta será ahora utilizada para sintetizar copias de RNA de cadena sencilla iguales a la que entró en la célula en primer lugar (Kalitzky & Borowski, 2006).

Algunas de las nuevas hebras son utilizadas para sintetizar más proteínas virales hasta ser suficientes para formar nuevas envolturas de virus que se ensamblarán con el contenido genético en su interior y darán lugar a nuevos virus (Roby *et al.*, 2012). Debido a que el exterior proteico aun no está listo para atravesar la membrana celular, sufre una serie de modificaciones a través del Aparato de Golgi que le permitirán ser exocitado por la célula, donde podrá infectar otras células en el hospedero.

El control del ciclo de este virus ha sido uno de los grandes retos en la búsqueda de la erradicación del dengue y, aunque existen algunos prospectos, aun no se tiene desarrollada una vacuna efectiva (Angel & Valle, 2013). Por lo anterior es que se ha apostado al control vectorial como estrategia para abatir la incidencia de esta enfermedad.

Para determinar el potencial que los mosquitos tienen para ser infectados y transmitir un parásito a las poblaciones humanas se crearon conceptos como “capacidad vectorial”, este factor permite estimar las tendencias esperadas en la incidencia de la transferencia de un patógeno entre los organismos involucrados en su ciclo de vida. Es un parámetro que surge de estudios de malaria y está representada por una ecuación central desprendida de la Teoría Ross-MacDonald (Klempner *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2012).

Aunque se ha expandido el uso de esta ecuación hacia otras enfermedades, parece tener una serie de defectos que imposibilitan su uso para generar predicciones sobre la dinámica del dengue cuando se plantean estrategias de control. Fernández-Salas & Flores-Leal (1995) hacen un análisis más profundo sobre las variables del fenómeno y su implicación en la dinámica del dengue en México.

Debido a lo anterior, se tomará “capacidad vectorial” sin asociarlo a las ecuaciones derivadas de los modelos generados a partir de la Teoría Ross-MacDonald. Se debe tener en cuenta que este supuesto implica que se cuenta con una enorme carga de incertidumbre sobre los valores que son importantes para determinar el aumento en el potencial de transmisión así como la ponderación que cada uno tiene.

3.1.1.4.3) Métodos actuales de control

En las últimas décadas se ha realizado una enorme cantidad de esfuerzos en los cuales se utiliza el control de vectores como método para reducir los contagios del dengue en el mundo y en nuestro país.

El método más utilizado en los últimos 60 años para el control de los vectores es el uso de insecticidas (Raghavendra *et al.* 2011). Un buen ejemplo de los esfuerzos realizados para reducir la incidencia de enfermedades vectoriales con métodos más efectivos y seguros para los humanos y el medio ambiente es la creación del Esquema de Evaluación de Pesticidas de la Organización Mundial de la Salud, en donde recolectan experiencias a nivel mundial sobre los beneficios de algunos pesticidas así como las acciones a realizar (OMS, 2006).

Las estrategias de control químico se pueden dividir en función de la etapa del desarrollo sobre la cual el químico actúa. Los adulticidas químicos han sido utilizados de manera histórica desde hace más de dos siglos (Raghavendra & Subbarao, 2002), aunque no fue hasta el siglo XX que el descubrimiento del Dicloro Difenil Tricloroetano (DDT) comenzó una oleada de uso de distintos insecticidas para el control de enfermedades vectoriales (Matalerz, 2005). A pesar de una serie de prohibiciones en el uso del DDT debido a sus efectos tóxicos (Turusov *et al.*, 2002), en septiembre del 2006 la OMS autorizó el uso de insecticidas que contienen esta sustancia en países de África y otras zonas donde el vector se encuentra (OMS, 2006). Independientemente de las prohibiciones y permisos especiales para el uso de este químico, el debate sobre el uso seguro de insecticidas que presentan DDT para el control de mosquitos vectores se encuentra aún encendido (Dash *et al.* 2007; Rogan & Chen, 2005; Scharipa, 2006).

Uno de los métodos de control químico (sin DDT) implementados y que ha mostrado una gran efectividad es la fumigación de interiores con insecticidas de acción residual, esta técnica consiste en rociar en paredes, suelo y techos del interior de viviendas con alguna formulación estable de insecticida (OMS, 2002). Este método disminuye la transmisión de dengue al reducir el tiempo de vida de las hembras adultas de mosquito y la densidad de sus poblaciones. Aunque el método es efectivo, su eficacia depende de varios factores como la naturaleza química del insecticida utilizado, la susceptibilidad de las especies del vector, la calidad del rociado y la eficacia residual (Raghavendra *et al.*, 2011).

El tratamiento de redes mosquiteras con insecticidas es un método para evitar la mordedura de vectores infectados en humanos susceptibles al formar una barrera física, tener un efecto repelente y además matar a los mosquitos por sus efectos residuales (Hill *et al.* 2006). Esta técnica ha demostrado ser efectiva junto a otras tecnologías de control (Maxwell *et al.*, 2002; Lengeler, 2009) pero se necesita implementar tecnologías que sean gratuitas, con una mayor duración, de amplia cobertura poblacional y su uso debe estar acompañado de programas de monitoreo y evaluación (OMS, 2007), por lo cual su aplicación a nivel global no presenta muchas historias de éxito.

Además de las anteriores, se encuentran opciones de control como el uso de larvicidas químicos, que ha sido también un método implementado en diferentes regiones del mundo (Fillinger *et al.*, 2009), el enfoque de manejo ambiental para modificar condiciones que disminuyan el contacto humano-vector (OMS, 1998), medidas de protección personal (Barnard, 2000) y la nebulización o fumigación de exteriores (Gratz, 1999).

A pesar de la eficacia observada en estos métodos, son varias las dificultades que se han encontrado para implementar en programas de manejo a gran escala: muchos de los insecticidas que se utilizan están en contacto con fuentes de agua potable de las comunidades, haciendo de la

aplicación de estos una práctica peligrosa (Rose, 2001). Además de lo anterior, la habilidad del vector para explotar lugares no convencionales para depositar huevos se ha comprobado en varias experiencias (Koh *et al.*, 2008; Roberts, 1999).

La nebulización es un buen método cuando sucede un brote epidémico pero no ha demostrado ser efectiva a largo plazo para prevenir reemergencias del vector, además de utilizarse normalmente químicos dañinos (Esu *et al.*, 2010). Del mismo modo la fumigación de interiores con insecticidas de acción residual resulta poco práctica para algunas regiones y demanda de una enorme cantidad de trabajo y se ha comprobado la evolución de resistencia a los insecticidas y repelentes por parte de los mosquitos (Brogdon & McAllister, 1998; Hemingway & Ranson, 2000).

Entre las lecciones que han quedado del combate a las poblaciones vectoriales podemos encontrar las siguientes:

- Se ha observado que el control vectorial es la manera más efectiva para reducir la transmisión de enfermedades que tienen a mosquitos como transmisores (Rigau-Perez *et al.* 1998; Raghavendra *et al.* 2011; Kilpatrick & Randolph, 2012; Wieten *et al.* 2011).
- Para que este control sea efectivo se deben de tener una serie de parámetros bien definidos, como el diseño del programa a utilizar (manejo, sustentabilidad, metas y monitoreo) así como las herramientas más adecuadas para realizarlo (Morrison *et al.*, 2008).
- Las actividades dirigidas al control de la transmisión deben enfocarse al principal vector y deben incluir tanto a las etapas adultas de este, como a las formas inmaduras en las viviendas y alrededores, así como otros lugares en donde se pueda generar contacto vector-humano (OMS, 2009).
- De manera histórica, el éxito que se ha logrado en los programas de erradicación de enfermedades transmitidas por mosquitos ha incluido manejo químico, biológico, uso de productos naturales derivados de plantas y manejo ambiental (Rozendaal, 1997) y son varias las direcciones en las cuales se han depositado las esperanzas para lograr el deseado control.

Ante los obstáculos que el control de vectores plantea se crearon iniciativas de manejo integral de vectores (OMS, 2008), conociendo que algunas enfermedades poseen más de un vector y con experiencias previas en el sector agrícola (manejo integral de plagas) es que se desprenden iniciativas como el Marco de Trabajo Estratégico Global para el Manejo Integral de Vectores (OMS, 2004). En dicho marco, se consideran una serie de principios básicos que permeen las políticas de salud pública, entre ellos se encuentra el asegurar que se utilizan los recursos disponibles en un esquema multidireccional, en donde métodos químicos y no químicos de control se integren a otros hacia el vector y que las estrategias e intervenciones deben de estar adaptadas a la ecología local del vector, epidemiología y recursos. Todo lo anterior guiado por una investigación operacional y además sujeta a un periódico monitoreo y evaluación (OMS, 2004).

A pesar de contar con experiencias en donde los métodos tradicionales de control han sido efectivos, Morrison *et al.* (2008) reconocen dos aspectos que creen fundamentales para implementar programas de control efectivos: los éxitos al erradicar las enfermedades a través del vector son en su mayoría excepciones que duran poco tiempo y, que es necesario desarrollar nuevas tecnologías que puedan implementarse al manejo integral de vectores.

Existe una alternativa genética al control de estos insectos que se desarrolló sin utilizar biotecnología moderna conocida como Técnica de Insectos Estériles (SIT por sus siglas en inglés), la cual ha mostrado resultados efectivos por más de 60 años (Klassen & Curtis, 2005).

La SIT, propuesta por Knippling (1955) consiste en la liberación de machos estériles (pueden ser generados por transgénesis o no) en el área en donde las poblaciones silvestres que se desean controlar se encuentran. El objetivo es que estos compitan por el apareamiento con las hembras silvestres y se produzca una reducción poblacional o eliminación debido a la alta letalidad de embriones así como de las etapas iniciales del desarrollo (Robinson *et al.* 2009).

Los proyectos en los que se utiliza la SIT representan tanto ventajas como retos para su aplicación. Por un lado son sumamente específicos para la especie blanco debido a las barreras para aparearse que existen entre especies de insectos (Gullan & Cranston, 2010), tienen consecuencias directas mínimas hacia otros grupos en el ecosistema al no utilizarse químicos para lograr el control (Hendrichs, 2000). Su operación y efectividad depende de aspectos como la cantidad de especies que son vectores de una enfermedad en la zona, la presencia de especies crípticas, capacidad para la liberación masiva de insectos estériles, rango de dispersión del organismo objetivo, la forma (estadio o sexo) dañina así como otros aspectos que Alphey *et al.* (2010) abordan en un análisis más profundo del tema.

El uso de la SIT se ha generado a través de radiación y uso de quimioesterilizantes para provocar esterilidad en machos por aberraciones cromosómicas (Robinson, 1976). Estos sistemas tienden a ser inestables y reducen la adaptación de los organismos expuestos por lo que se han intentado otras iniciativas. Con el uso de ingeniería genética se han realizado transformaciones con DNA recombinante para ayudar al control de poblaciones de mosquitos vectores de enfermedades.

Hace más de treinta años la Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO) de Australia monitoreó la liberación de machos de la mosca miásica (*Lucilia cuprina*). Se trataba de moscas con una condición semiestéril que se logró con la traslocación al azar de cromosomas producto de radiación (Whitten, 1977) y el objetivo era introducir una característica que disminuyera la adaptación de uno solo de los sexos. Esta técnica es reconocida como “tecnología asociada a la muerte de hembras” (FK por sus siglas en inglés) y se logra debido a la susceptibilidad de un organismo que se encuentra en estado homocigo para cierto carácter.

Las hembras silvestres que se aparean con los machos irradiados tienen fertilidad reducida por los efectos deletéreos sobre el desarrollo de la progenie (muerte inmediata) o por la expresión de alguna característica que resultará en la muerte en estado adulto (muerte retrasada) (Whitten, 1979). A pesar de los esfuerzos realizados, debido a la baja capacidad de supervivencia y competitividad sexual de los machos liberados (Vogt *et al.*, 1985) la técnica FK fue abandonada.

Una vez que se conceptualizó la liberación de insectos machos producto de ingeniería genética que contaran con una característica que pudiera expandirse en la población y resultara solo en detrimento de las hembras (Schliekelman & Gould, 2000a; 2000b) se retomaron los estudios de esta tecnología.

3.1.1.5) *Ae. aegypti* GM con sistema RIDL asociado

Thomas *et al.* (2000) propusieron un nuevo enfoque en el cual se utiliza un transgén para inducir letalidad específica de hembras y aplicarlo en un mecanismo de sexado genético o directamente en un programa de control. El nuevo esquema fue llamado “liberación de insectos portadores de un dominante letal” (RIDL por sus siglas en inglés) y utiliza insectos que no son estrictamente estériles

sino que portan una característica que puede causar la muerte del individuo bajo condiciones específicas.

Dicho sistema funciona cuando machos que fueron liberados al medio y son homocigos de la condición letal compiten con los silvestres por aparearse con las hembras y, en caso de que logren el objetivo, la progenie de estas poseerá una copia del gen en cuestión. La mitad de la progenie de esta cruce será portadora de una copia del transgén ya que la segregación del gen es de tipo mendeliana y aquellas hembras que lo posean morirán pues se trata de un carácter que sólo resulta letal para las éstas. Los machos sobrevivirán pero portarán una copia del gen que diezmará a la población en la siguiente generación (Alphey, 2000).

La RIDL requiere que la línea de un organismo blanco posea una característica genética dominante, específica de sexo y sujeta a una condición que se pueda crear en el laboratorio pero que no exista en el medio natural. La tecnología RIDL desarrollada por Oxitec® consiste en una modificación genética en el genoma de insectos que causa la muerte de las crías (Black *et al.*, 2011), este mecanismo puede suceder de manera diferencial dependiendo del sexo (Heinrich & Scott, 2000) o incluso darse en diferentes tejidos de los insectos (Muñoz *et al.*, 2004). Aunque la disminución en la adaptación de las crías está asociada a la presencia de este gen, el sistema RIDL posee una condición por la cual es posible la supervivencia y desarrollo regular cuando se tiene tetraciclina en el ambiente (Thomas *et al.*, 2000).

El mecanismo de este sistema consiste en liberar una enorme cantidad de machos que portan esta característica y que estos se apareen con las hembras silvestres en una proporción suficiente como para lograr la caída poblacional de los insectos blanco debido a que las crías sobreviven en número menor cuando la tetraciclina está ausente en el medio (Atkinson *et al.*, 2007).

La tecnología RIDL también cuenta con una versión específica para hembras (fsRIDL por sus siglas en inglés), en la cual las crías de una hibridación entre el mosquito GM y las hembras sobreviven de manera diferencial. Lo anterior se logra gracias a que la expresión de la molécula responsable de la letalidad está asociada a procesos transcripcionales exclusivos de hembras o machos (Labbé *et al.*, 2012). La tecnología fsRIDL depende de la expresión de una molécula que resulta letal de una manera condicional (en la ausencia de tetraciclina), en una etapa específica (e.g. el desarrollo de alas durante estadios que llevarían a la adultez) y sólo en hembras (asociada a procesos de splicing alternativo).

Gracias a esta tecnología es que se pueden separar machos de hembras en periodos anteriores a su liberación, además de que la competencia por recursos con sus congéneres que no sean portadores del gen sucederá en etapas previas a la forma infectiva y los machos sobrevivirán hasta la adultez.

3.1.1.5.1) Enfoques moleculares

Los sistemas por los cuales se logra la letalidad asociada a un gen, pueden depender de diferentes construcciones genéticas, sin embargo, la más utilizada es aquella que cuenta con un sistema de transactivador reprimible por tetraciclina (tTA por sus siglas en inglés), es importante entender que el gen *tTA* no es equivalente al sistema tTA, sino que el primero es una secuencia que forma parte del segundo.

Los sistemas tTA consisten en i) un promotor mínimo que funciona con RNA polimerasa II río abajo de una secuencia operadora (*tetO*) proveniente del gen *Tn10* del operon de resistencia a tetraciclina de *Escherichia coli* y ii) una fusión sintética del represor Tet (*TetR*) y el gen que codifica para la

proteína 16 del virus del herpes simplex (VP16), dicha construcción es conocida como *tTA* (Baron *et al.*, 1995). En los primeros sistemas desarrollados con aplicaciones a insectos se contaba con un sistema tTA lineal, en donde la expresión sucede en un loop positivo: el promotor (*tetO*) era estimulado por la producción de la proteína tTA, cuya expresión depende del promotor *tetO* (Fig 4a). En ausencia de tetraciclina este ciclo se repite hasta resultar tóxico para la maquinaria celular.

Los elementos genéticos antes mencionados pueden insertarse en el genoma de los mosquitos junto a otros que permitan la expresión tejido, tiempo y sexo específico, de acuerdo con el tipo de estrategia para el control vectorial que se desee aplicar. Los sistemas fsRIDL dependen de cuatro elementos básicos para su funcionamiento (Labbé *et al.*, 2012) (Fig 4b):

- Elemento reprimible por tetraciclina (tRE) asociado a un gen efector letal.- La expresión del gen letal (e.g. VP16), regulada por el tRE (e.g. *tetO*), resulta en la disrupción de alguna función celular que lleva a la pérdida de adaptación o resulta letal para el organismo portador.
- Promotor específico de tejido.- Gracias a esta secuencia, la expresión del transactivador reprimible por tetraciclina sucede sólo en aquellos tejidos que cuentan con las señales moleculares para que funcione como un promotor, ya que no es constitutivo (e.g. *AeAct-4*).
- Transactivador dependiente de sexo.- Se trata de un gen que codifica para la proteína responsable de activar el tRE (e.g. *tTAV*). Esta molécula tiene afinidad por la tetraciclina, por lo que la presencia del antibiótico en el medio impide el contacto con el tRE y la expresión del gen efector letal.
- Gen reportero.- controlado por un promotor específico, promueve un fenotipo que evidencie la presencia del transgén en los organismos.

Un claro ejemplo de estos sistemas es el desarrollado para el evento de transformación *Aedes aegypti* OX36046C (Fu *et al.*, 2010), cuenta con: a) el gen *DsRed2* bajo el control del promotor *Hr5-IE1* que genera un fenotipo brillante bajo luz fluorescente; b) un gen *tTAV* bajo el control del promotor encontrado en la actina de músculos indirectos de vuelo (IFM) en hembras (*AeAct4*), entre estas dos secuencias se encuentra el codón de inicio para un intrón sujeto de splicing alternativo para hembras y machos; y c) un elemento represible por tetraciclina que promueve la expresión de la proteína VP16.

La efectividad de este constructo genético radica en el hecho de que sólo las hembras de *Ae. aegypti* expresan *Act-4* en los IFMs cuando se desarrollan desde la pupa hacia la adultez, por lo tanto los estadios larvales de ambos sexos sobrevivirán pero la eclosión de los mosquitos hembras portadores de una copia del gen eclosionarán sin alas y serán presa fácil para depredadores y tendrán una capacidad mínima para encontrar fuentes humanas de sangre.

Aún se desconoce el motivo exacto por el cual la expresión de los genes efectores letales resultan deletéreos para las células de los organismos, aunque se sospecha de silenciamiento transcripcional y/o su interferencia en la proteólisis dependiente de ubiquitina (Gong *et al.*, 2005)

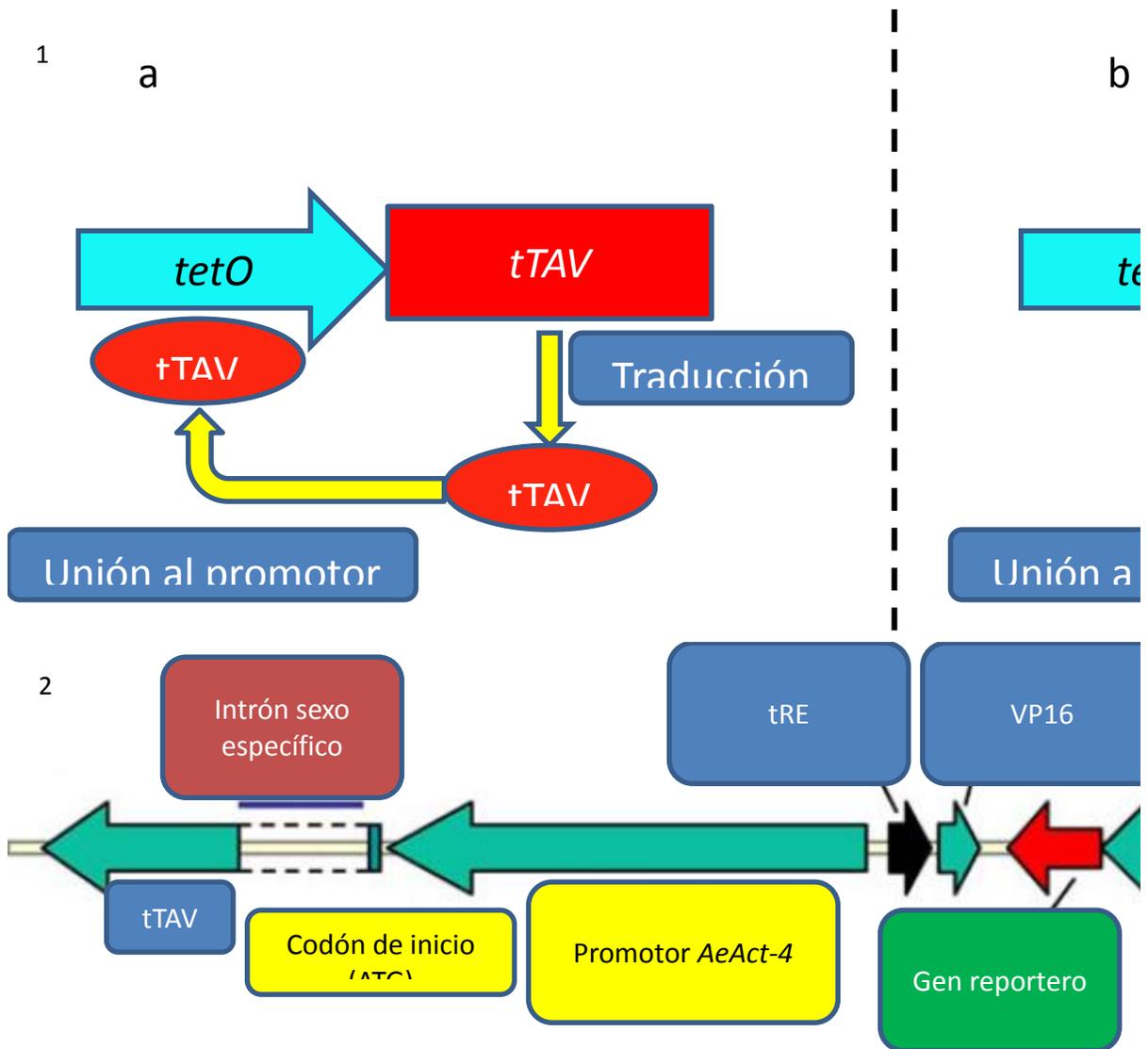


Figura 4. Sistemas RIDL. (1) Elementos básicos de un sistema tTA: a) en ausencia de tetraciclina *tetO* promueve la expresión de *tTAV* y la molécula producto de la traducción se une al promotor en un loop positivo; b) mientras que en presencia del antibiótico (Tc) el polipéptido se une a al antibiótico y se detiene la retroalimentación del sistema. (2) Elementos funcionales típicos de un sistema fsRIDL. Las regiones codificantes son las siguientes de izquierda a derecha: (I) *tTAV* bajo el control de un fragmento del promotor de *AeAct-4*; (II) promotor de *AeAct-4* con un codón sintético que produce splicing alternativo del intron de *AeAct-4* en machos y hembras; (III) el gen efector letal (e.g. *VP16*) está bajo el control de un elemento reprimible por tetraciclina que es susceptible a *tTAV* y: un gen reportero regulado por un promotor específico.

3.1.1.6) Definición de Puntos Finales de Evaluación

Una vez que se han analizado cuáles son las características novedosas en el OGM así como del uso asociado a la tecnología es que se definen las entidades que son sujetas a ser afectadas por estos (EFSA, 2010). Debido a que la ERA es un proceso que utiliza el enfoque científico, para el cual se deben plantear hipótesis específicas que puedan ser probadas o falseadas (Raybould, 2011), es necesario traducir las grandes categorías que las metas de protección representan en puntos finales que sean precisos y medibles. Uno de los más grandes retos en la FP es el establecimiento de puntos finales de evaluación que no solo reflejen las preocupaciones

contenidas en las metas de protección sino que sean atributos medibles y que sean sujetos a una metodología que permita su análisis (Wolt *et al.*, 2010).

Sanvido y colaboradores (2012) establecen una serie de parámetros que los puntos finales de evaluación deben poseer. Los puntos finales de evaluación se entienden como:

- a) Una entidad del ambiente a ser protegida.
- b) Presenta una cualidad medible.
- c) Es susceptible de presentar efectos adversos asociados con el OGM.
- d) Se distingue como una unidad de protección.
- e) Está acompañada por un atributo que proporciona evidencia de dichos efectos en un espacio y tiempo determinados.

El correcto establecimiento de los puntos finales de evaluación no sólo consiste en la representación de metas de protección ambientales que se encuentran en la legislación de los países, sino deben también estar vinculados de alguna manera con las características novedosas del OGM y los potenciales efectos adversos con los que se les puede vincular (EFSA, 2010).

A continuación se muestran una serie de puntos finales de evaluación (PFE) que podrían ser susceptibles de indicar un potencial efecto adverso, y por lo tanto relevantes para la ERA. Para tener mayor claridad de dónde se desprenden estos puntos finales de evaluación, se enlistan de acuerdo a las definiciones de Sanvido y colaboradores (2012) en la Tabla 1.

PFE1) Aumento en la capacidad vectorial de las poblaciones de *Ae. aegypti* para el DENV en las localidades en las cuales se realicen las liberaciones y la tecnología funciona, durante un tiempo de consideración epidemiológica.

PFE2) Aumento en la capacidad vectorial de las poblaciones de *Ae. albopictus* para el DENV en las localidades en las cuales se realicen las liberaciones y la tecnología funciona, durante un tiempo de consideración epidemiológica.

PFE3) Aumento en el número de casos en los cuales la infección por DENV desenlaza en dengue hemorrágico o síndrome de shock por dengue en las poblaciones humanas asociadas a los espacios en los cuales se realizaron las liberaciones en un tiempo de importancia epidemiológica.

PFE4) Disminución de la diversidad de las comunidades de detritívoros y depredadores benéficos que conviven con las poblaciones de *Ae. aegypti*, en las etapas de desarrollo que se encuentran en el medio acuático (huevo, larvas y pupa).

PFE5) Disminución en la diversidad de murciélagos, aves y arácnidos que se alimentan de las poblaciones de *Ae. aegypti* adultos en los sitios de liberación.

PFE6) Invasión de poblaciones vecinas de *Ae. aegypti* con una capacidad vectorial mayor para DENV en el sitio de liberación.

PFE7) Invasión de poblaciones vecinas de *Ae. aegypti* que son menos susceptibles a los métodos de control tradicionales en el sitio de liberación,.

PFE8) Invasión de poblaciones vecinas de mosquitos de otras especies que son transmisoras de otras enfermedades vectoriales en el sitio de liberación.

Tabla 1. Puntos finales de evaluación desglosados en los términos de Sanvido y colaboradores (2012).

PFE	Metas de protección de la cual se desprende	Entidad Ecológica	Cualidad a ser protegida	Susceptibilidad	Atributo que proporciona evidencia de efecto adverso	Espacio y tiempo
1	Salud Humana	Capacidad de transmisión del DENV (todos sus serotipos) de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i>	Disminución de la tasa de transmisión vectorial	Los mosquitos de la especie <i>Ae. aegypti</i> son el objetivo blanco de la tecnología.	Aumento en la capacidad de transmisión	Lugares endémicos donde se pretende realizar la reducción poblacional
2	Salud Humana	Capacidad de transmisión del DENV (todos sus serotipos) de las poblaciones de <i>Ae. albopictus</i>	Disminución de la tasa de transmisión vectorial	Las poblaciones de mosquitos de <i>Ae. albopictus</i> se mantienen en baja incidencia debido a la presencia de <i>Ae. aegypti</i>	Aumento en la capacidad de transmisión	Lugares endémicos donde se pretende realizar la reducción poblacional
3	Salud Humana	Desenlaces en la salud humana por la infección por DENV	Disminución de la tasa de transmisión vectorial	Los humanos presentan diferentes desenlaces cuando son infectados por DENV, influenciado por varios factores	Aumento en el número de casos de dengue hemorrágico y/o síndrome de shock por dengue	Lugares endémicos donde se pretende realizar la reducción poblacional
4	Biodiversidad	Poblaciones de detritívoros y depredadores benéficos que conviven con poblaciones <i>Ae. aegypti</i> en su etapa acuática	Mantenimiento de las poblaciones	Las poblaciones de las especies presentes en el medio pueden presentar relaciones de competencia y depredación	Disminución del número y diversidad de las poblaciones de detritívoros y depredadores benéficos	Medio acuático donde suceden las etapas no adultas de <i>Ae. aegypti</i>
5	Biodiversidad	Poblaciones de murciélagos, aves y arácnidos que se alimentan de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> adultos	Mantenimiento de las poblaciones	Las poblaciones de las especies presentes en el medio pueden presentar relaciones de depredación con <i>Ae. aegypti</i> , para su mantenimiento	Disminución del número y diversidad de las poblaciones que se alimentan de <i>Ae. aegypti</i>	Medio donde sucede la etapa adulta de <i>Ae. aegypti</i>
6	Salud Humana	Poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> con una capacidad vectorial mayor para DENV	Supresión de poblaciones	Las poblaciones de mosquitos invasores pueden mantenerse en bajo número o ausentes debido a la presencia de las poblaciones de	Aumento en las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> con mayor capacidad vectorial para DENV	Sitios en los cuales se pretende realizar la liberación y reducción poblacional

				<i>Ae. aegypti</i> locales		
7	Salud Humana	Poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> que son menos susceptibles a los métodos de control tradicionales	Supresión de poblaciones	Las poblaciones de mosquitos invasores pueden mantenerse en bajo número o ausentes debido a la presencia de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> locales	Aumento en las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> que son menos susceptibles a los métodos de control tradicionales	Sitios en los cuales se pretende realizar la liberación y reducción poblacional
8	Salud Humana	Poblaciones de mosquitos de otras especies que son transmisoras de otros patógenos.	Ausencia de poblaciones	Las poblaciones de mosquitos invasores pueden mantenerse en bajo número o ausentes debido a la presencia de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i>	Aumento en las poblaciones de mosquitos de otras especies que son transmisoras de otras enfermedades vectoriales	Sitios en los cuales se pretende realizar la liberación y reducción poblacional

El objetivo de determinar el contexto del problema es partir de preocupaciones amplias ambientales y transformarlas en términos medibles y que puedan ser sujetos a la evaluación, mientras que la definición del problema tiene como propósito el tomar todas las preocupaciones resultantes del contexto del problema en una serie de proposiciones de riesgo que sean específicas y verificables (Gray, 2012). La FP culmina con la tarea de relacionar ambos módulos a través de hipótesis de riesgo generales.

3.1.2) Definición del problema

Para Wolt y colaboradores (2010), es en la etapa final de la FP en la que la labor del evaluador se vuelve crítica pues ahora le corresponde localizar aquellos postulados en donde la relación de una característica con un punto final de evaluación representan un potencial efecto adverso y separarlas de los que pueden ser descartados sin posterior análisis.

Incluir la relación entre la características novedosa y el posible efecto adverso involucra generalmente establecer los niveles de exposición al MGM y los efectos o consecuencias directas o indirectas asociadas a esta exposición, sobre los elementos del ambiente que se quieren proteger. Sin embargo, en el caso de la liberación al ambiente de mosquitos GM, este enfoque cambia ya que se busca disminuir los niveles de exposición a un agente que causa efectos adversos a la salud humana.

Historicamente se han generado evaluaciones en las que se buscan aquellos efectos adversos por la sustitución de un cultivar convencional por uno modificado genéticamente; esta nueva tecnología GM significa un cambio de paradigma pues la sustitución sucede sobre el método de control vectorial y no sobre el organismo. Debido a que las poblaciones de mosquitos en el medio representan una situación no deseada por si mismos, no se busca preservar a las poblaciones de mosquitos (además de transmitir enfermedades, estos vectores son especies introducidas en los ecosistemas nacionales) sino de encontrar y evitar las situaciones en las que las características novedosas de la tecnología agravarían la situación existente en el medio.

Para lograr la asociación antes descrita se deben plantear hipótesis de riesgo en donde se incluya la característica novedosa, el punto final de evaluación así como la justificación por la cual se sospecha un nexo causal que relacione el posible efecto adverso de la primera sobre el segundo.

A continuación se mencionan las Hipótesis de Riesgo (HR) asociadas al OGM y en la Tabla 2 se encuentran las hipótesis de riesgo en función de los componentes de estas así como la justificación por la cual se identifica un nexo causal entre una característica novedosa y el posible efecto adverso sobre los puntos finales de evaluación.

Tabla 2. Hipótesis de Riesgo en función de las características novedosas, el PFE y el nexo causal de potencial efecto negativo.

HR	Característica novedosa	Efecto adverso potencial	PFE	Justificación
1	El sistema de control vectorial plantea la supresión o disminución de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> con ritmos y en etapas de desarrollo diferentes a los existentes en los métodos convencionales de control de vectores.	Aumento en la capacidad de transmisión del DENV (todos los serotipos y genotipos) en las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> presentes en el medio, como resultado de la liberación de mosquitos GM.	1	La densidad poblacional en la que las etapas larvales de <i>Ae. aegypti</i> se desarrollan parece influenciar valores relacionados con la capacidad vectorial (Gama, 2005; Alto <i>et al.</i> , 2005; 2008a; Walsh <i>et al.</i> , 2011).
2	El sistema de control vectorial está dirigido solamente a las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> .	Aumento en la capacidad de transmisión del vector de las poblaciones de <i>Ae. albopictus</i> como resultado de la liberación de mosquitos GM, la supresión o disminución poblacional.	2	La ausencia o disminución de <i>Ae. aegypti</i> en el medio en el que se desarrolla <i>Ae. albopictus</i> puede repercutir en el desarrollo de características relacionadas con la capacidad vectorial de la especie asiática debido a efectos densodependientes y de desplazamiento competitivo (Alto <i>et al.</i> , 2005).
3	El sistema de control vectorial plantea la supresión o disminución de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> con ritmos y en etapas de desarrollo diferentes a los existentes en los métodos convencionales de control vectorial.	Aumento en la gravedad de desenlaces causados por dengue, debido a la Inmunidad por Potenciamiento Dependiente de Anticuerpos (ADE).	3	Se sugiere que si disminuye la tasa de la transmisión del virus del dengue, debido a la efectividad de la tecnología, podría producirse ADE en las zonas endémicas de alta transmisión (Halstead, 2003; Thammapalo <i>et al.</i> , 2008).
4	La funcionalidad del sistema de control vectorial esta asociada a la ausencia de tetraciclina en el medio.	Aumento en la capacidad para transmitir enfermedades, debido a un incremento en el número de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> en el medio por su liberación, en un medio rico en tetraciclina.	1	La tetraciclina es de amplio uso en la industria agrícola y veterinaria. Se han encontrado rastros de este antibiótico en medios donde podría suceder ovoposición de hembras grávidas de mosquitos portadores del gen letal (Kolpin <i>et al.</i> , 2002; Wen <i>et al.</i> , 2006; Peña <i>et al.</i> , 2007).

5	La tecnología posee un constructo que se insertó con ayuda de elementos transponibles.	Aumento en la capacidad vectorial de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> por pérdida de funcionamiento del gen letal.	1	Los elementos transponibles presentes en el constructo del gen letal pueden encontrarse con fuentes de transposición en las poblaciones silvestres, por lo cual la cópula híbrida GM resultará en individuos viables.
6	El sistema de control vectorial plantea la supresión o disminución de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> con ritmos y en etapas de desarrollo diferentes a los existentes en los métodos convencionales de control vectorial.	Afectación en el sistema acuático en el cual se desarrollan las etapas larvales de <i>Ae. aegypti</i> .	4	Los mosquitos se desenvuelven en ecosistemas complejos (Juliano <i>et al.</i> , 2010), en donde puede haber una serie de organismos que se alimentan o compiten por recurso con mosquitos en el medio acuático (Spielman & Sullivan, 1974; Chandra <i>et al.</i> , 2008; Collins & Blackwell, 2000). Una disminución de las poblaciones de <i>Aedes</i> podría incrementar poblaciones de sus competidores y disminuir poblaciones de sus depredadores en caso de interacciones muy especialistas.
7	El sistema de control vectorial plantea la supresión o disminución de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> con ritmos y en etapas de desarrollo diferentes a los existentes en los métodos convencionales de control vectorial.	Afectación a los organismos que conviven en redes tróficas con las etapas adultas de <i>Ae. aegypti</i> .	5	Existe una variedad de organismos que consumen mosquitos en su etapa adulta (Whitaker, 2004; Jackson <i>et al.</i> , 2005; Córdoba-Aguilar, 2008). Una disminución de las poblaciones de <i>Aedes</i> podría disminuir poblaciones de sus depredadores.
8	El sistema de control vectorial plantea la reducción de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> en un radio y tiempo específico debido a la liberación de organismos GM.	Invasión de poblaciones de la misma especie que son vectores más competentes del DENV.	6	Una vez que se dejen de liberar los mosquitos no quedarán residuos químicos, biológicos o físicos que impidan el establecimiento de otras poblaciones. Las condiciones y recursos en el medio pueden resultar suficientes para que otras poblaciones vecinas, de la misma especie y con mayor competencia vectorial se establezcan en el lugar.
9	El sistema de control vectorial plantea la reducción de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> en un radio y tiempo específico debido a la liberación de mosquitos GM.	Invasión de poblaciones de la misma especie que son transmisores de tipos virales más dañinos.	6	Los genotipos virales pueden estar asociados a la competencia vectorial de mosquitos, podría suceder una invasión por poblaciones con un fondo genético que les permita ser mejores transmisores de tipos virales que no estaban presentes.
10	El sistema de control vectorial plantea la reducción de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> en un radio y tiempo específico debido a la liberación de organismos GM.	Invasión de poblaciones de la misma especie que son menos manejables bajo los esquemas de control utilizados en la zona.	7	Se especula que la resistencia a métodos de control químicos está asociada a diferencias genéticas en las poblaciones de mosquitos, grupos de la misma especie podrían invadir la zona donde se redujo la población.
11	El sistema de control vectorial plantea la reducción de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> en un radio y tiempo específico debido a la liberación de organismos GM.	Invasión de poblaciones de mosquitos de otras especies que son mejores transmisores de otros patógenos.	8	La zona donde se realice la liberación puede tener las condiciones y recursos necesarios para que otros mosquitos vectores se establezcan y transmitan nuevas enfermedades (Shoryer, 1986).

La relación entre las características novedosas asociadas al OGM y un posible efecto adverso se crea al establecer las rutas o los caminos hipotéticos por los cuales un punto final de evaluación pudiera verse afectado, lo anterior resulta en crear Hipótesis de Riesgo. Se entiende como hipótesis de riesgo a una explicación tentativa que se toma como cierta para poder ser sujeta a un análisis posterior (Gray, 2012) y tiene características determinadas bajo el enfoque de FP dentro de una ERA.

Las hipótesis de riesgo son diferentes de las hipótesis científicas debido a que las segundas tratan de describir cómo es el mundo mientras que las primeras plantean las maneras como el mundo debería de ser para que sucediera un efecto adverso. Las hipótesis creadas en la FP son diferentes pues, mientras las hipótesis científicas crean deducciones lógicas de conocimiento existente, las hipótesis de riesgo requieren del planteamiento hipotético del evaluador para seleccionar un camino particular de contingencia de entre todas las alternativas basado en el conocimiento actual (Raybould, 2010).

3.2) Caracterización del Riesgo

Como ya se mencionó antes, el objetivo de la ERA es el fundamentar científicamente la toma de decisiones con respecto a las políticas de uso de OGMs a través de encontrar posibles efectos adversos en el ambiente. Dentro de esquemas de ERA se entiende riesgo como la probabilidad de que un efecto adverso suceda en un organismo, sistema o población causado bajo circunstancias específicas por la exposición a algún agente (OECD, 2003).

Una de las características del riesgo que se presenta en las diferentes definiciones es que este es producto de tres factores: la probabilidad de que este suceda realmente, la consecuencia que este tendría y la magnitud de dicha consecuencia (OGTR, 2014). Es por esto que se disgrega el proceso de la ERA en dos etapas que pueden ser caracterizadas de manera independiente sin que una se deba realizar necesariamente antes que la otra: La Evaluación de exposición y la Evaluación de la magnitud de la consecuencia.

3.2.1) Caracterización de la exposición

Tras la formulación de una hipótesis de riesgo en la FP, es que se considera cómo puede suceder un efecto adverso. El “camino al efecto adverso” se refiere a un modelo conceptual o escenario en una cadena de causas y efectos que relacionan a la característica novedosa con el potencial efecto adverso sobre los puntos finales de evaluación (Raybould, 2010). El camino que este modelo tome puede ser lineal o ramificado y estar compuesto por cuantos pasos sea necesario, sin embargo es de mayor importancia que cada uno de estos “pasos” tenga una formulación que permita la evaluación (Tepfer *et al*, 2013).

Exposición se entiende como la concentración o cantidad de un agente particular que llega a un organismo determinado, sistema o población en una frecuencia específica por un tiempo determinado, (OECD, 2003). Esta etapa pretende establecer cuáles son las condiciones bajo las cuales sucede la exposición y tiene como objetivo evaluar la probabilidad de que sucedan efectos adversos al estar en contacto las características nuevas identificadas y los puntos finales de evaluación; de manera ideal debe describir las fuentes, caminos, rutas y la incertidumbre producto de analizar la exposición (IPCS, 2004).

La caracterización de esta exposición se logra analizando la serie de eventos que deben de suceder para que el potencial efecto adverso ocurra, estos nexos lógicos se denominan “Ruta al Efecto

Adverso” y necesitan de una escala con la que se pueda medir la probabilidad de cada uno de los ellos así como del proceso general.

Determinar cómo se pondera la posibilidad de ocurrencia es complicado debido a que cada Ruta al Efecto Adverso es particular, la Office of the Gene Technology Regulator (OGTR, 2014) sugiere la siguiente escala:

- a) Muy Posible.- Se espera que ocurra en la mayoría de las circunstancias.
- b) Posible.- Podría ocurrir en muchas circunstancias.
- c) Poco Posible.- Podría ocurrir en sólo algunas circunstancias.
- d) Muy poco Posible.- Se espera ocurra en sólo circunstancias muy raras.

Como cualquier proceso científico, esta caracterización tendrá incertidumbre asociada, la cuál es también identificada de acuerdo a la fuente de la que provenga, por lo anterior es útil determinar la cantidad de certidumbre con la que se cuenta que se tiene para caraterizar la exposición. En esta herramienta se incluye también un criterio de “Nivel de confianza” que es determinado de acuerdo al tipo de incertidumbre que se encuentra en el proceso.

Los niveles de confianza utilizados son “Alto” cuando la incertidumbre se deriva de la variación natural de los sistemas biológicos modificados y parentales o se encuentra asociada a la percepción de un riesgo, “Medio” cuando sucede lo anterior y además existen huecos de información que pudieran impactar en el conocimiento certero de los procesos biológicos analizados y “Bajo” cuando se desconoce una gran cantidad de información y existen un gran número de evidencias que se contradicen con otras. Debido a la naturaleza de los sistemas biológicos así como de los antropogénicos que los rodean nunca se encontrará incertidumbre “nula” o “cero”.

Finalmente se toman consideraciones de incertidumbre global o general, en donde se promedian las incertidumbres de cada etapa. Lo anterior es poco útil para realizar un proceso de evaluación de riesgo ambiental a menos que se entiendan las fuentes de incertidumbre y los métodos por los cuales se puede subsanar, lo que se logrará en etapas siguientes.

Tabla 3.1 Evaluación de exposición para la Hipótesis de Riesgo 1 (HR 1).

Hipótesis de Riesgo HR1	La reducción de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> en el medio acuático, y los efectos densodependientes asociados a esta, modifican características del desarrollo de los mosquitos que les hacen mejores vectores del DENV.
Eventos o condiciones que deben suceder para que la característica novedosa genere un efecto adverso sobre los puntos finales de evaluación	Evaluación cualitativa de la posibilidad de que los eventos o condiciones sucedan y la consideración asociada a este estimado
La liberación de los <i>Ae. aegypti</i> GM provoca una reducción de las poblaciones de esta especie presentes en el medio receptor.	Posible Consideración HR1-0 Uno de los supuestos que se toman para hacer esta evaluación es el hecho de que la reducción poblacional lograda por la liberación de mosquitos machos fsRIDL sucede en un menor lapso de tiempo de lo que harían los métodos de control tradicionales. Nivel de confianza: Medio
Los cambios en el número y densidades poblacionales provocan cambios en el desarrollo de los mosquitos	Posible

sobrevivientes.	<p>Consideración HR1A</p> <p>Cuando las densidades larvales de los mosquitos disminuyen, suceden efectos sobre el tamaño que estos alcanzan en las diferentes etapas de desarrollo en su vida. A menores densidades de mosquitos se encontrarán individuos de mayor tamaño.</p> <p>Nivel de confianza: Alto</p>
Los cambios en el desarrollo de los mosquitos influyen en aspectos que modifican la capacidad de los mosquitos hembra para ser transmisores de dengue.	<p>Posible</p> <p>Consideración HR1B</p> <p>La capacidad que los mosquitos presentan para ser infectados por el DENV está influenciada por las barreras fisiológicas que el virus debe sortear para diseminarse y estas dependen tanto del desarrollo durante las etapas previas a la adultez así como del componente genético poblacional.</p> <p>Nivel de confianza: Alto</p>
Las mosquitas más pequeñas tienen una mayor competencia vectorial.	<p>Poco posible</p> <p>Consideración HR1C</p> <p>La capacidad que los mosquitos presentan para ser infectados por el DENV parece tener una mayor relación con el fondo genético de las poblaciones que con el tamaño que presentan y el desarrollo de las barreras fisiológicas que el virus atraviesa para infectar.</p> <p>Nivel de confianza: Medio</p>
Los mosquitos más grandes son mejores vectores de la enfermedad que los pequeños	<p>Posible</p> <p>Consideración HR1D</p> <p>La mayoría de los factores que se encuentran relacionados con el tamaño corporal (sin tener en cuenta el fondo genético de las poblaciones) y que forman parte de la capacidad que los mosquitos tienen para contraer y transmitir una enfermedad parecen mostrar que aquellas hembras de mayor tamaño son mejores transmisoras</p> <p>Nivel de confianza: Medio</p>
Estimación de la Probabilidad de Ocurrencia de la ruta de exposición	<p>Posible</p> <p>Nivel de confianza: Medio</p>

La tecnología fsRIDL no es una estrategia de control vectorial por si misma sino un sistema que puede ser útil para la aplicación de esta (Alphey, 2014) y, al igual que en muchos otros aspectos, la diversidad de la aplicación de los programas globales de control vectorial dependen de las posibilidades y directrices de aquellos que los utilizan (e.g. gobierno, instituciones de salud, universidades). Independientemente del programa utilizado, el empleo de esta herramienta busca la reducción poblacional de una sola especie con una tasa mayor a la de otros métodos (e.g. larvicidas o adulticidas químicos).

Gracias a la diversidad de programas de control, la elección del comparador a utilizar se vuelve crucial: la tasa con la que se presenta la reducción debe de ser cotejada con aquella de los métodos convencionales que son utilizados. Si bien la tecnología no transgénica más parecida

sería la SIT (Alphey, 2002), nuestro país no posee programas de este tipo para reducir las poblaciones de mosquitos y sería poco real evaluar los riesgos comparándola con esta.

La reducción de la progenie de hembras no es inmediata sino que sucede en etapas posteriores a las larvales, lo que hace que suceda una lucha por los recursos dentro de los criaderos acuáticos. La competencia interespecífica en los estadios larvales haría que la efectividad del método fuera aún mayor que otros controles biológicos en donde, aunado a lo anterior, la progenie masculina también es afectada desde momentos previos al desarrollo temprano (Atkinson *et al.*, 2007).

La efectividad de las tecnologías no suele formar parte de las ERAs de cultivos, sin embargo existen preocupaciones particulares sobre la dinámica que sucede en el medio larval y el desarrollo de las poblaciones, así como su impacto sobre la capacidad de los insectos para ser vectores de una enfermedad (abordadas con mayor profundidad más adelante). Debido a lo anterior es importante conocer cuál es la efectividad de la tecnología propuesta.

Los esfuerzos realizados para medir el éxito de las tecnologías de reducción poblacional se pueden clasificar de la siguiente manera: generación de modelos, pruebas de laboratorio, pruebas en jaulas y liberaciones al medio ambiente.

Desde las primeras experiencias con el uso del sistema RIDL en insectos modelo, se especuló sobre la efectividad teórica que esta tecnología podría tener si se comparara con otras no transgénicas, como el SIT. A partir de experiencias de laboratorio se crearon modelos y predicciones que dejaban al sistema RIDL como una excelente opción por abatir a mayor velocidad a las poblaciones blanco de insectos (Thomas *et al.*, 2000), aún mayor cuando se modificaba el número de copias del transgén en cuestión (loci múltiple) en el genoma de los insectos (Schliekelman & Gould, 2000a). Para ambas tecnologías uno de los puntos principales de efectividad reside en las proporciones con las que se liberan a los mosquitos GM y SIT en relación con las poblaciones silvestres.

Los modelajes de las tecnologías fsRIDL o muerte de hembras (FK) aseguran que esta tecnología sería aún más potente debido a que una fracción de machos portadores del constructo permanecen en la población y pueden tenerse efectos que, junto a una presencia de loci múltiples, superarían al SIT. Estos modelos deben de tomar en cuenta cuestiones como la adaptación de los individuos a liberar o el silenciamiento por interferencia que puede suceder al tener varias copias de un gen para que la efectividad de la estrategia sea la óptima (Schliekelman & Gould, 2000a).

Uno de los factores involucrados en la tecnología, es la capacidad para determinar la etapa del desarrollo en la cual el efecto letal sucede. Debido a que las poblaciones de mosquitos son susceptibles a efectos densodependientes (Walsh *et al.*, 2011; 2012), utilizar un sistema que permita letalidad retrasada a estadios previos a los infectivos es aún más efectiva (Phuc *et al.*, 2007).

Aunque existen trabajos en laboratorio que implican a la tecnología bisexual RIDL (Bargielowski *et al.*, 2011; Massonet-Bruneel *et al.*, 2013), la evidencia de la reducción por el sistema fsRIDL realizada en jaulas dentro de condiciones de laboratorio muestra que en un periodo de hasta 20 semanas se puede tener evidencia de ovoposición nula con cocientes de liberación de 8.5-10x de mosquitos GM (Wise de Valdez *et al.*, 2011). Además de las condiciones controladas propias de estas pruebas, no se contempla la entrada de machos de zonas cercanas que sucedería en una liberación a campo abierto.

Aunque los estimados que se tienen en laboratorio son sumamente informativos para crear las predicciones del desempeño de la tecnología en el campo, es necesaria una etapa posterior en la que se incluyan factores ambientales que pueden ser de importancia. La tecnología fsRIDL con un fondo genético de diferentes locaciones de Chiapas fue probada posteriormente y arrojó resultados que denotan la necesidad de periodos más largos para lograr una disminución de poblaciones blanco, lo cual pone en tela de juicio consideraciones como la adaptación de los mosquitos a liberar para tener una herramienta de control vectorial efectiva (Facchinelli *et al.*, 2013).

Lo anterior tiene implicaciones en la manera de planear las liberaciones y el análisis de sus consecuencias, ya que hace evidente la necesidad de determinar previamente el éxito de apareamiento y adaptación de los machos portadores del transgen en función de su contraparte silvestre y cómo repercute esto en la tasa con la que se logra la reducción poblacional hasta la extinción (en caso de que esto sucediera).

Las discrepancias en las predicciones de la efectividad de la introducción de mosquitos portadores de la fsRIDL se puede deber a distintos motivos, como el manejo al que son sujetos en las instalaciones de crianza (Facchinelli *et al.*, 2013) o a factores asociados al proceso de transgénesis (Scott *et al.*, 2002), así como las proporciones de liberación.

Hasta la fecha no existen reportes con resultados sobre experiencias en campo en donde se hayan liberado mosquitos con un sistema fsRIDL asociado, aquellas que se han realizado con la contraparte bisexual presentan evidencias de la efectividad de este método (Harris *et al.*, 2011; 2012; Lacroix *et al.*, 2012) aunque existen dudas sobre su validez (Mumford, 2012).

Consideración HR1/0

Uno de los supuestos que se toman para hacer esta evaluación es el hecho de que la reducción poblacional lograda por la liberación de mosquitos machos RIDL sucede en un menor lapso de tiempo de lo que harían los métodos de control tradicionales.

- **Incertidumbre sobre los hechos.**- Los modelos, pruebas de laboratorio, experimentos en jaulas y experiencias en campo presentan resultados contradictorios sobre el lapso que tardarían en eliminarse las poblaciones de mosquitos liberados en ciertas proporciones, así como en diferentes condiciones ambientales.
- **Incertidumbre en el conocimiento.**- Aunque se han generado datos con mosquitos que poseen el fondo genético de algunas poblaciones mexicanas, no se tiene del todo caracterizado el efecto del transgen sobre la posibilidad de introgresión en las poblaciones silvestres. Tampoco se cuenta con información que hable de la velocidad con la que los métodos de control vectorial tradicionales disminuyen a las poblaciones de mosquitos en las regiones de interés, lo cual complica la comparación.
- **Incertidumbre asociada a la descripción.**- Los resultados de las pruebas realizadas en campo abierto no están del todo claros ni disponibles aún.

Nivel de confianza: Medio

Cuando los métodos de control sobre el vector involucran la reducción poblacional, se puede modificar la dinámica de desarrollo de los mosquitos, lo cual se puede deber al nivel de hacinamiento y la cantidad de recursos disponibles (Fisher *et al.*, 1990). Uno de los efectos que se encuentran cuando disminuyen las densidades de mosquitos, en estado larval, es el aumento en la tasa de supervivencia debido a que el nivel de competencia por los recursos disminuye (Gama *et al.*, 2005; Walsh *et al.*, 2011).

Los experimentos de Walsh y colaboradores (2011; 2012) con *Ae. aegypti* comparan el tamaño adulto que los mosquitos alcanzan y su relación con la densidad, en estas encuentran una relación negativa también. Tanto machos como hembras que se encontraron en tratamientos de baja

densidad alcanzaron tallas mayores, sucediendo de manera más marcada también en los tratamientos con cohortes previas presentes.

Consideración HR1A

Cuando las densidades de los mosquitos disminuyen, suceden efectos sobre el tamaño que estos alcanzan en las diferentes etapas de desarrollo en su vida. A menores densidades de mosquitos se encontrarán individuos de mayor tamaño.

Nivel de confianza: Alto

Desde hace muchos años se ha generado un debate sobre la relación que existe entre la talla de los mosquitos hembras de *Ae. aegypti* y la capacidad que estas tienen como vectores, muchas veces explicado por la implicación de muchos componentes en el potencial para transmitir el virus.

Uno de los componentes a tomar en consideración para determinar la competencia para transmitir un parásito de los mosquitos, son las barreras biológicas que el virus debe atravesar para poder diseminarse a lo largo del cuerpo del insecto y alcanzar zonas específicas para su replicación y retransmisión (Halstead, 2008).

Los experimentos para determinar la relación entre el tamaño y la competencia vectorial de los mosquitos, son varios y han mostrado resultados diversos y en algunas ocasiones contradictorios. Por una parte algunos encuentran una relación negativa en estas características, a medida que los mosquitos son más pequeños también disminuye la infección y diseminación de los agentes virales (Baqar *et al.*, 1980; Grimstad *et al.*, 1984; Grimstad & Walker, 1991; Alto *et al.*, 2005; Alto *et al.*, 2008a; Alto *et al.*, 2008b). Del mismo modo existen estudios que encuentran una relación totalmente opuesta a la antes mencionada (Sumanochitrapon *et al.*, 1998) o que no encuentran relación alguna entre el tamaño que los mosquitos tengan con la posibilidad de infección y diseminación del virus (Bosio *et al.*, 1998).

Los estudios antes mencionados se concentran en demostrar cómo es que los factores ambientales afectan el tamaño de los individuos y su potencial para diseminar al patógeno, lo cual muchas veces se atribuye al desarrollo de las barreras biológicas existentes; sin embargo no consideran el componente genético influenciando ambos aspectos.

Existen una serie de experiencias en las cuales se tomaron en cuenta el tamaño de los individuos junto a las diferencias geográficas y genéticas y se obtuvieron resultados diferentes: tras criar 10 diferentes líneas genéticas de mosquitos de varios lugares del mundo Schneider y colaboradores (2007) encontraron que no existe relación alguna entre el tamaño corporal y la diseminación del virus del dengue en *Ae. aegypti*.

Consideración HR1B

La capacidad que los mosquitos presentan para ser infectados por el DENV está influenciada por las barreras fisiológicas que el virus debe sortear para diseminarse y estas dependen tanto del desarrollo durante las etapas previas a la adultez así como del componente genético poblacional.

- **Incertidumbre sobre los hechos.-** Algunos estudios encuentran una relación inversa y otros directa entre el tamaño y capacidad de los mosquitos para conyugiarse y contagiar el DENV.
- **Incertidumbre en atribuible a la variabilidad.-** No está del todo claro cuál es el papel del desarrollo y del fondo genético en las propiedades de estas barreras.
- **Incertidumbre en el conocimiento.-** No se tiene mucha información sobre la competencia vectorial de las poblaciones de *Ae. aegypti* que se encuentran en el Sureste Mexicano.

Desde hace más de 60 años que se han tratado de identificar cuáles son los atributos de los mosquitos que son importantes para crear predicciones sobre la transmisión de las enfermedades de las cuales son vectores, así como para crear estrategias efectivas de control (Smith et al., 2013). Si bien se han generado un gran número de modelos en los cuales se pretende explicar la dinámica de los contagios de dichos padecimientos, existen aún dudas sobre cuál es el papel de cada parámetro y cómo es que este debe ser ponderado (Klempner *et al.*, 2007).

Aunque fueron muchos los científicos que contribuyeron con la formulación lógica para estudiar la transmisión de las enfermedades de las cuales los mosquitos y otros insectos son vectores (Smith, 2012), se reconoce a Ronald Ross (1905; 1917) y George MacDonald (1968) como los precursores de los sistemas lógicos por los cuales se identifican los parámetros a tomar en cuenta para entender la dinámica de transmisión de varios agentes patógenos.

Después de más de 100 años de innovación en el desarrollo de los modelos de tipo “Ross-MacDonald”, se han encontrado atributos comunes que son importantes para predecir cuáles son las estrategias más efectivas para el control de las enfermedades. Reiner y colaboradores (2013) realizaron un estudio de más de 300 artículos en los que los modelos están incluidos y delimitaron las zonas de mayor preocupación así como de oportunidad de mejora, entre los resultados más sobresalientes se encuentra la presencia de constantes biológicas como la esperanza de vida de los vectores así como las capacidades para alimentarse de sangre, algún índice reproductivo y la habilidad intrínseca del vector para ser contagiado (competencia vectorial).

En el desarrollo básico del modelo Ross-MacDonald se toman en cuenta factores responsables de la capacidad vectorial que se ha utilizado para vectores como *Anopheles spp* (Smith *et al.*, 2012) y, a pesar de ser un modelo ampliamente utilizado (en su forma clásica y modificaciones), posee una serie de limitantes cuando este se pretende utilizar para predecir la dinámica de transmisión del dengue (Fernández-Salas & Flores-Lara, 1995).

También se han planteado algunos parámetros necesarios para un mejor análisis, entre los que destacan: la tasa de alimentación de sangre, el número de veces que se necesita alimentar en un ciclo gonotrófico (Focks *et al.*, 1995), búsqueda y selección del hospedero (Sota, 1992), duración del parásito en estado latente dentro del hospedero vertebrado e invertebrado (Chowell *et al.*, 2006), duración del periodo de infección en el hospedero vertebrado (Roche *et al.*, 2008), estrategias de control existentes (Le Menach *et al.*, 2007), así como el potencial móvil del vector (Roche *et al.*, 2008) como del hospedero (Pongsumpun *et al.*, 2004).

Es necesario aclarar que aunque muchas veces los esfuerzos en las campañas de disminución de la transmisión de dengue se centran en la biología del vector, existen otros parámetros importantes a tomar cuando se plantean los planes de acción, como son el genotipo del virus que infecta (Anderson & Rico-Hesse, 2006) o las respuestas del sistema inmune del hospedero (Adams & Boots, 2006).

La discusión sobre cuáles son los parámetros esenciales para determinar la capacidad vectorial han tenido lugar desde hace varias décadas (Dye, 1986). No hay que olvidar que el nivel en el que suceden las interacciones entre *Ae. aegypti*, el agente viral y el hospedero dependen de cuestiones

celulares, bioquímicas o de comportamiento, que están también influenciados por un componente genético y que este último puede llegar a determinar la competencia del vector (Beerntsen *et al.*, 2000).

La relación que existe entre el tamaño de los mosquitos y el desarrollo de características que les hagan mejores vectores no siempre concuerdan debido a los muchos factores involucrados en la susceptibilidad y habilidad para infectarse y transmitir el patógeno. Las evidencias se pueden dividir de acuerdo a la relación entre el tamaño y la capacidad vectorial como aquellas que encuentran una relación positiva o negativa entre el tamaño y la capacidad vectorial.

Las hembras más grandes son mejores vectores:

Los ciclos naturales por los cuales se transmiten enfermedades de las cuales los mosquitos son vectores dependen de la transmisión durante la ingesta de sangre (Titus & Ribeiro, 1990; Ribeiro & Francischetti, 2003). Las hembras se alimentan de sangre debido a que requieren de aminoácidos de los eritrocitos y proteínas de plasma sanguíneo para sintetizar proteínas vitelinas que sirven en la producción de huevos (Hurd, 2003) y esta conducta puede resultar eventualmente en la ingesta de patógenos que serán retransmitidos en subsecuentes ciclos de ingesta sanguínea.

Algunas experiencias sugieren que existe una relación entre la cantidad de sangre que un artrópodo hematófago puede ingerir por comida y la probabilidad que estos tienen de encontrar patógenos a los que sean susceptibles (Gurtler *et al.*, 1996; Jeffery, 1956). En esos casos, aquellos que sean más grandes y tengan también una mayor capacidad de ingesta serían mejores vectores pues presentan un umbral a la distensión abdominal superior.

La capacidad vectorial se encuentra también influenciada por factores como el tamaño del inóculo viral (Halstead, 2008), la temperatura y duración del periodo extrínseco de incubación (Watts *et al.*, 1987), el periodo de incubación intrínseco (Chan & Johanssen, 2012) y la viremia que produce el genotipo viral (Cummings *et al.*, 2005).

Debido a que el proceso de infección en los mosquitos y la transmisión a hospederos es un proceso que comprende una serie de eventos que están restringidos a un periodo de tiempo, la longevidad de un mosquito adulto hembra ha sido uno de los factores implicados para entender la transmisión de las enfermedades de las cuales son vectores.

El número de mordeduras que una hembra puede realizar a lo largo de su vida se encuentra íntimamente relacionado con el tamaño que los mosquitos presentan en su etapa adulta (Hawley, 1985). El número de veces que un mosquito hembra puede llegar a morder y contagiar a un hospedero es mayor en los adultos de mayor tamaño y que viven por más tiempo (Smith, 1975). Aunque se había considerado que los mosquitos hembra modifican la cantidad de sangre que ingieren a medida que envejecen, parece no existir relación alguna entre estos dos parámetros (Klowden & Lea, 1980).

Es necesario tener presente que se ha encontrado que los mosquitos de menor tamaño presentan distensión abdominal con cantidades menores de sangre y cesan de buscar al hospedero después de la alimentación (Klowden & Lea, 1978), un comportamiento defensivo del hospedero que interrumpa la ingesta de sangre haría que las hembras de mayor tamaño necesitarían de ingestas secundarias múltiples (Nasci, 1991), además de ser más visibles y despertar un mayor comportamiento defensivo del potencial hospedero (Edman & Scott, 1987).

Las hembras de mosquito llegan a dispersarse para encontrar machos con los cuales copular, lugares para ovopositar y alimento, la búsqueda de estos recursos y condiciones a mayores distancias crea un radio de exposición aún mayor cuando las hembras son más grandes y pueden recorrer distancias mayores (Reiter *et al.*, 1995), además de tener requerimientos energéticos que implican una mayor cantidad de mordeduras (Xue *et al.*, 1995b).

Aunque se supone que las hembras de *Ae. aegypti* se dispersan entre 100 y 500 m (McDonald, 1977; Trpis & Hausermann, 1986; Muir & Kay, 1998) y que el vuelo alrededor de los puntos de emergencia es relativamente corto comparado con el de otras especies, se tienen reportes que superan estos estimados y presentan interrogantes relacionadas con la importancia que el tamaño de las hembras tienen en la capacidad de vuelo (Reiter *et al.*, 1995; Honório *et al.*, 2003)

El potencial de vuelo en *Ae. aegypti* es una consecuencia de las reservas presentes en su cuerpo, las cuales a su vez están relacionadas con el desarrollo en las etapas previas a la emergencia pupal (Briegel, 1990). Debido a lo anterior se han explicado experiencias como las de Briegel y colaboradores (2001), en donde aquellas hembras con un menor tamaño corporal producto de una alimentación deficiente o una alta densidad son menos competentes para desplazarse. A lo anterior podemos sumar que los estimados en el laboratorio están hechos por periodos continuos de vuelo y si agregamos a este parámetro el número de días que una hembra vive y tiene para desplazarse, podríamos tener un efecto potenciado entre el tamaño y la capacidad de dispersión.

Las hembras más pequeñas son mejores vectores:

El número de ingestas de sangre que deben realizar por ciclo gonotrófico (McClelland & Conway, 1971) así como la habilidad que estos presentan para morder al potencial hospedero son un par de factores importantes para determinar la competencia vectorial. En experimentos realizados con colonias y condiciones de laboratorio de *Ae. aegypti*, Farjana y Tuno (2013) hallaron que aquellas hembras más pequeñas presentan el fenómeno de la múltiple ingesta en mayor proporción aunque en solo una de las líneas de *Ae. albopictus* que utilizaron y experimentos previos no encontraron dicha relación (Farjana & Tuno, 2012).

Se ha encontrado que el desarrollo de los huevos en los mosquitos hembras de menor tamaño requiere de un mayor número de ingestas de sangre (Reyes-Villanueva, 2004), esto se explica pues presentan reservas energéticas generales bajas (Chambers & Klowden, 1990) y necesitan alimentarse un mayor número de veces a lo largo de su vida.

A pesar de la importancia que el tamaño de los mosquitos plantea con relación a la tasa con la que estos muerden y la habilidad para encontrar a un hospedero, es necesario recordar que existen otros factores involucrados en estos comportamientos como: el metabolismo y la necesidad de mantener reservas energéticas (Xue *et al.*, 1995b), la temporada estacional en la que las mordeduras pueden suceder (Wongkoon *et al.*, 2013), el serotipo de mayor prevalencia en la población (Putnam & Scott, 1995; Platt *et al.*, 1997) o el número de individuos de los que se alimentan que están infectados (Dye, 1986). Existen estudios en los cuales se encuentra que las hembras de mayor tamaño muestran un menor éxito en la ingesta de sangre (Nasci, 1986).

Consideración HR1C

Existe una relación entre la manera en la que se desarrollan los mosquitos en etapas previas a la adulta, y el tamaño que estos alcanzan en su etapa adulta, con elementos que afectan la capacidad que las hembras poseen para contagiarse y transmitir una enfermedad.

- **Incertidumbre en el conocimiento.**- Se desconoce el papel exacto de cada valor relacionado con el tamaño y

la capacidad antes mencionada. Lo cual recae en el modo de transmisión de enfermedades como el Dengue.

- **Incertidumbre asociada a la variabilidad.-** Son muchos los factores que están involucrados en la capacidad de las hembras para contagiarse y retransmitir el virus.

Nivel de confianza: Medio

Consideración HR1D

La mayoría de los factores que se encuentran relacionados con el tamaño corporal (sin tener en cuenta el fondo genético de las poblaciones) y que forman parte de la capacidad que los mosquitos tienen para contraer y transmitir una enfermedad parecen mostrar que aquellas hembras de mayor tamaño son mejores transmisoras.

- **Incertidumbre asociada a los hechos.-** Debido a que varias evidencias mencionadas cuentan con una contraparte que afirma lo contrario y que la evidencia se generó en situaciones de experimentación diferentes, por lo cual es complicado juzgar la validez de una u otra.
- **Incertidumbre en el conocimiento.-** Existe una enorme falta de conocimiento en la biología de los aspectos señalados, ya sea a nivel local o mundial. Muchas de las experiencias mencionadas se realizaron en un contexto diferente al mexicano y su transportabilidad debe analizarse.
- **Incertidumbre asociada a la variabilidad.-** La capacidad que los mosquitos puedan tener como transmisores de un patógeno está conformada por muchas variables. Aquí se toman solo aquellas que están relacionadas con el tamaño y aún así se mantiene incertidumbre con respecto a la participación de cada uno de ellos en el producto total de dichas interacciones.

Nivel de confianza: Medio

Hipótesis de Riesgo HR2

Tabla 3.2 Evaluación de exposición para la HR 2.

Hipótesis de Riesgo HR2	La disminución de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> modifica la dinámica de competencia con las poblaciones de <i>Ae. albopictus</i> y las poblaciones de la especie asiática se desarrollan como mejores vectores del DENV.
Eventos o condiciones que deben suceder para que la característica novedosa genere un efecto adverso sobre los puntos finales de evaluación	Evaluación cualitativa de la posibilidad de que los eventos o condiciones sucedan y la consideración asociada a este estimado.
La liberación de los <i>Ae. aegypti</i> provoca una reducción de las poblaciones de esta especie presentes en el medio receptor.	<p>Posible</p> <p>Consideración HR1/0: Uno de los supuestos que se toman para hacer este análisis es el hecho de que la reducción poblacional lograda por la liberación de mosquitos machos RIDL sucede en un menor lapso de tiempo de lo que harían los métodos de control tradicionales.</p> <p>Nivel de confianza: Medio</p>
Existen especies presentes en el medio que sean transmisoras de dengue.	<p>Muy Posible</p> <p>Consideración HR2A: Desde hace más de 15 años que se tiene reportada la presencia de <i>Ae. aegypti</i> y <i>Ae. albopictus</i> en México, en donde comparten espacios de crianza.</p> <p>Nivel de Confianza: Alto</p>
Las poblaciones de estas especies se ven afectadas por el número de mosquitos (<i>Ae. aegypti</i>) en el medio receptor.	<p>Posible</p> <p>Consideración HR2B: El desarrollo en las poblaciones de mosquitos que comparten condiciones y recursos suele estar ligado, sucediendo relaciones de competencia que presentan mayor o menor simetría entre ellas.</p> <p>Nivel de confianza: Alto</p>
La modificación en la dinámica de competencia causa el aumento en las poblaciones de <i>Ae. albopictus</i> .	<p>Posible</p> <p>Consideración HR2C: La presencia de <i>Ae. aegypti</i> puede limitar el crecimiento de poblaciones</p>

	<p>de <i>Ae. albopictus</i> así como la dinámica de colonización del mosquito asiático, debido a la competencia por recursos y condiciones en ambientes pequeños de extensión y temporalidad como los contenedores artificiales.</p> <p>Nivel de Confianza: Medio</p>
<p><i>Ae. albopictus</i> posee una mayor competencia vectorial para el DENV que <i>Ae. aegypti</i>.</p>	<p>Poco posible</p> <p>Consideración HR2D: De manera general se acepta a <i>Ae. aegypti</i> como más susceptible al DENV.</p> <p>Nivel de Confianza: Medio</p>
<p>La dinámica de competencia modifica aspectos de desarrollo en las poblaciones de <i>Ae. albopictus</i>.</p>	<p>Posible</p> <p>Consideración HR1C Existe una relación entre la manera en la que se desarrollan los mosquitos en etapas previas a la adulta, y el tamaño que estos alcanzan en su etapa adulta, con elementos que afectan la capacidad que las hembras poseen para contagiarse y transmitir una enfermedad.</p> <p>Nivel de Confianza: Medio</p>
<p>Los aspectos de desarrollo provocan que <i>Ae. albopictus</i> sea un mejor vector.</p>	<p>Posible</p> <p>Consideración HR2E: La mayoría de los factores que se encuentran relacionados con el tamaño corporal y que forman parte de la capacidad que los mosquitos tienen para contraer y transmitir una enfermedad parecen mostrar que aquellas hembras de <i>Ae. albopictus</i> de mayor tamaño son mejores transmisoras.</p> <p>Nivel de Confianza: Bajo</p>
<p>Estimación de la Probabilidad de Ocurrencia de la ruta de exposición</p>	<p>Posible Nivel de Confianza: Medio</p>

Ae. aegypti no es el único mosquito invasor que habita en el continente americano, *Ae. albopictus* también es una especie presente en condiciones y recursos muy similares. Se trata de un mosquito originario del continente asiático que plantea una serie de preocupaciones alrededor del mundo debido a su rápida expansión, capacidad como invasor, conducta agresiva de picadura y ser potencial vector de más de 23 virus diferentes (Benedict *et al.*, 2007).

A pesar de encontrarse presentes actualmente en los sitios de transmisión de dengue en México, las invasiones de cada especie de mosquitos no fueron simultáneas. Se sospecha que las primeras poblaciones de *Ae. aegypti* fueron introducidas en barriles con agua traídos por los españoles en el siglo XVI (Fernández, 2009). Aunque seguramente sucedieron interacciones con humanos desde su llegada, no fue sino hasta el siglo XIX que recibió mucha atención debido a las epidemias de dengue y fiebre amarilla (Slosek, 1986).

A principios del siglo XX se crearon los primeros reportes de *Ae. albopictus* en la región continental de Norteamérica (Sprenger & Wuithiranyagool, 1986), teniendo reportes también en las islas de Hawai (Usinger, 1944) y se sospecha que su llegada esta asociada a la entrada de llantas usadas provenientes de zonas asiáticas que estaban infestadas con el mosquito (Hawley *et al.*, 1987). En 1995 se reportó por primera vez como vector de dengue en el continente, después de una investigación realizada durante la epidemia de la enfermedad en Reynosa, Tamaulipas (Ibañez-Bernal *et al.*, 1997).

La historia de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* en México y su participación en la transmisión de dengue es ampliamente descrita por Ibañez-Bernal y Gómez-Dantés (1995) y de esta se pueden desprender tres conclusiones importantes para el análisis: a) Ambos comparten en espacio y tiempo en nuestro país desde los años noventa b) Son de importancia los patrones de colonización que *Ae. albopictus* presenta como potencial transmisor de arbovirus y c) las preferencias en los sitios de crianza y las interacciones que pudieran suceder, cuando sean comunes, son determinantes para el desarrollo de las poblaciones y su papel como vectores.

Ambas especies de mosquitos han sido documentadas en México (Mercado-Hernández *et al.*, 2006), despertando preocupación por las implicaciones epidemiológicas que la presencia de este mosquito representa, así como las interacciones que puedan suceder entre las dos especies invasoras.

Consideración HR2A:

Desde hace más de 15 años que se tiene reportada la presencia de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* en México, en donde comparten espacios de crianza.

- **Incertidumbre en el conocimiento.**- No se cuenta con la caracterización exacta de los sitios en los que se encuentran en simpatria las poblaciones de ambas especies en nuestro país.

Nivel de confianza: Alto

Previamente se mencionaron aquellas condiciones en las cuales las etapas no adultas de *Ae. aegypti* viven y se crían en contenedores, *Ae. albopictus* comparte muchos de los atributos con esta especie de mosquitos y por lo tanto ocupa un nicho donde se encuentran las condiciones y los recursos con la especie objetivo de la tecnología. *Ae. albopictus* ha comprobado ser un buen invasor de zonas en las que *Ae. aegypti* está presente, esto debido a que puede sobrevivir y desarrollarse en un rango más amplio de recursos y hábitats (Hawley, 1988), además ha evolucionado junto a las comunidades humanas, por lo que se encuentran adaptados tanto a un medio selvático como peridoméstico (Knudsen, 1995).

Cuando especies invasoras de insectos colonizan un nuevo lugar y poseen etapas larvales que conviven en tiempo, espacio y condiciones, suelen suceder relaciones de competencia no solo inter sino también intraespecíficas, en las que alguna sea un mejor competidor bajo ciertas situaciones (Krebs & Barker, 1991). El fenómeno previamente mencionado es denominado competencia asimétrica y es de suma importancia cuando se analizan especies que comparten recursos y condiciones de nicho (Lawton & Hassell, 1981).

Debido a que la tecnología propuesta por el sistema RIDL incluye la supervivencia hasta el estado larval, existen preocupaciones relativas a las interacciones que se pueden generar entre especies relacionadas con la GM y los efectos que estas puedan tener en la estructura y epidemiología de los vectores involucrados.

Juliano (2009) describe, en una revisión exhaustiva, como es que las interacciones entre las larvas de mosquitos son centrales en la aplicación de métodos de control y revisa cuáles son los efectos del contexto ecológico en la manera en la cual los mosquitos se estructuran en comunidades. Uno de los factores en los que abunda es en la asimetría de la competencia que puede suceder entre dos especies diferentes y los factores que la provocan.

El lugar de ovoposición es uno de los factores a considerar para determinar como es que larvas se desarrollan ya que la depredación juega un papel mayor y la competencia entre especies no es tan importante en los contenedores de agua efímeros (Washburn, 1995).

Cuando se asume que la competencia interespecifica es un factor importante en el desarrollo larval de estos vectores y se realiza un control dirigido a una sola especie (como en las tecnologías RIDL), aquella especie sobreviviente podría ser más potente como vector de acuerdo a las condiciones que este nuevo escenario plantee y aumentar su capacidad como vector de dengue y otros arbovirus.

La simetría de la competencia es la medición de qué tan dispar es el efecto negativo de una especie sobre la otra (Lawton & Hassell, 1981) y se obtienen a través de experimentos con dos factores básicos involucrados: el tipo de competencia que sucede y la respuesta de cada especie a esta. Una de las conclusiones en la revisión de Juliano (2009) es que la asimetría en la competencia es una norma en la gran mayoría de experimentos y que se esperaría desplazamiento competitivo entre las especies involucradas a menos que sucedieran mecanismos de coexistencia.

Consideración HR2B:

El desarrollo en las poblaciones de mosquitos que comparten condiciones y recursos suele estar ligado, sucediendo relaciones de competencia que presentan mayor o menor simetría entre ellas.

Nivel de confianza: Alto

No es sencillo generar predicciones sobre cual será la dinámica que una población de mosquitos como *Ae. albopictus* podría tener con la reducción de las de *Ae. aegypti*, como lo promueve esta tecnología, sin embargo existen algunos puntos a tener en cuenta sobre la competencia que se genera entre los mosquitos que pasan sus etapas no adultas en contenedores con agua.

Para determinar cuales son las consecuencias de la actividad de una especie sobre otra cuando comparten recursos y condiciones, se han realizado experimentos dentro y fuera del continente en los cuales se varían parámetros como radios poblacionales o limitantes de recursos (Juliano *et al.*, 2009).

En una gran parte de estos experimentos se ha determinado a *Ae. albopictus* como mejor competidor al sortear las diferentes etapas del desarrollo, así como por el tamaño de los adultos y el crecimiento poblacional que presentan (Barrera *et al.*, 1996; Braks *et al.*, 2003). En este tipo de esquemas se tienen condiciones controladas o contenidas y se considera que existe una clara asimetría en la competencia, lo cual explicaría el desplazamiento de una especie por otra en diferentes regiones del continente. A pesar de ser sumamente útiles, estos experimentos no pueden explicar del todo la aparente coexistencia de las dos especies de mosquitos en varias regiones (O'Meara *et al.*, 1995).

El balance antes mencionado o el fracaso en la colonización de la especie asiática del vector se han estudiado tanto en campo como en laboratorio variando algunas condiciones como la temperatura y la humedad (Costanzo *et al.*, 2005), el tiempo y nivel de desecación de los contenedores (Juliano *et al.*, 2002) o muestreando en zonas con cercanía variable a asentamientos humanos (O'Meara *et al.*, 1995).

El resultado de estas experiencias nos revela que las estructuras poblacionales de los mosquitos que comparten contenedores esta influenciada de gran manera por condiciones ecológicas, en donde los recursos no son el único aspecto importante sino la capacidad intrínseca de las especies para sobrevivir en un ambiente de pequeño tamaño y duración, que además está sujeto a otras variaciones.

En los experimentos que se realizan se pueden generar aproximaciones a la dinámica real de estos ambientes en donde en teoría se asemeja a los sistemas dinámicos pero es importante entender que aun no se tienen modelos exactos para entender como es que el aumento o disminución de una población puede incidir en el crecimiento de otra.

Consideración HR2C:

La presencia de *Ae. aegypti* puede limitar el crecimiento de poblaciones de *Ae. albopictus* así como la dinámica de colonización del mosquito asiático, debido a la competencia por recursos y condiciones en ambientes pequeños de extensión y temporalidad como los contenedores artificiales.

- **Incertidumbre en el conocimiento.-** No se tienen caracterizados los niveles de simetría en la relación que existe entre estas especies en las condiciones de las regiones de interés.
- **Incertidumbre asociada a la variabilidad.-** El nivel de simetría que sucede en la competencia de ambas especies está dictado por varios factores, por lo que suele ser específico para cada comunidad.

Nivel de Confianza: Medio

Dentro de los organismos en los cuales se ha investigado más sobre la asimetría y desplazamiento se encuentran las dos especies vectores de dengue y otras enfermedades *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti*. Las dos especies mencionadas no escapan a la norma de la asimetría, sin embargo, el efecto competitivo de una sobre la otra depende de factores ambientales como la fuente de alimento (Juliano, 2009), el periodo de inanición que las larvas pueden soportar (Barrera, 1996), la temperatura (Russell, 1986) y la humedad (Costanzo *et al.*, 2005).

Para ambas especies de mosquitos se ha caracterizado la relación que existe entre el nivel de competencia larval con el de la capacidad que tienen como vectores (ser infectados, diseminar y retransmitir un virus) (Alto *et al.*, 2005; Alto *et al.*, 2008). Aunque existen experiencias que encuentran una relación en la competencia vectorial y el tamaño del mosquito, parece existir una mayor influencia del fondo genético de los individuos (Ver HR1).

Inoculaciones orales para determinar la competencia vectorial de ambas especies al virus del dengue se han realizado en varias partes del mundo, en donde ambas se encuentran asociadas temporal y espacialmente. Algunas experiencias afirman que *Ae. albopictus* posee una mayor capacidad vectorial que su contraparte africana (Vazzeille, 2001) mientras que otras no encuentran diferencias (Paupy *et al.*, 2010), pero se acepta normalmente a *Ae. aegypti* como un vector más competente para el DENV-1 (Chen *et al.*, 1993) y DENV-2 (Vazzeille *et al.*, 2003; Vazzeille *et al.*, 2008). Es necesario entender que las experiencias mencionadas anteriormente son producto de experimentos en los cuales se utilizaron diversos serotipos y genotipos del virus así como de mosquitos.

Consideración HR2D:

De manera general se acepta a *Ae. aegypti* como más susceptible al DENV.

- **Incertidumbre asociada a los hechos.-** Se tienen algunas experiencias que plantean la mayor capacidad vectorial de *Ae. albopictus*.
- **Incertidumbre asociada al conocimiento.-** Las pruebas realizadas contemplan solo algunas líneas de los insectos así como tipos del agente viral.

Nivel de Confianza: Medio

El nivel de competencia intraespecífica es responsable también del tamaño que los mosquitos pueden alcanzar (Ver consideración HR1C), las implicaciones existentes por el incremento de tamaño en caso de que la competencia intraespecífica se redujera son similares a las encontradas con *Ae. aegypti* (Ver consideración HR1D) pero existen algunas reservas al respecto.

Entre las diferencias que presentan las hembras en relación con el tamaño es que aquellas más grandes son menos susceptibles al uso de repelente (Xue *et al.*, 1995a), aunque necesitan de una menor cantidad de ingestas para completar sus ciclo gonotrófico pues retienen una menor cantidad de huevos después de la ovoposición (Farjana y Tuno, 2012).

Otro de los efectos del tamaño es el número de ciclos de ingesta sanguínea que una hembra puede tener, la longevidad de *Ae. albopictus* no parece estar relacionada con el tamaño que este posee después de las etapas larvales del desarrollo (Reiskind & Lounibos, 2009), por lo cual no existe evidencia que indique un mayor número de ciclos gonotróficos en los que pueda infectarse o reinfectar humanos.

Consideración HR2E:
La mayoría de los factores que se encuentran relacionados con el tamaño corporal y que forman parte de la capacidad que los mosquitos tienen para contraer y transmitir una enfermedad parecen mostrar que aquellas hembras de mayor tamaño son mejores transmisoras.

- **La incertidumbre asociada a esta consideración es muy similar a la que se comenta en la HR1D, sin embargo se cuenta con aún menos información sobre la biología de la especie asiática en nuestro continente.**

Nivel de Confianza: Bajo

Hipótesis de Riesgo HR3

Tabla 3.3 Evaluación de exposición para la HR 3

Hipótesis de Riesgo HR3	La tasa con la que sucede la disminución poblacional puede disminuir la frecuencia con la que suceden los contagios con diferentes serotipos de DENV y aumentar el número de desenlaces letales debido al potenciamiento dependiente de anticuerpos (ADE).
Eventos o condiciones que deben suceder para que la característica novedosa genere un efecto adverso sobre los puntos finales de evaluación	Evaluación cualitativa de la posibilidad de que los eventos o condiciones sucedan y la consideración asociada a este estimado
La liberación de los <i>Ae. aegypti</i> liberados provoca una reducción de las poblaciones de esta especie presentes en el medio	<p>Posible</p> <p>Consideración HR10</p> <p>Uno de los supuestos que se toman para hacer este análisis es el hecho de que la reducción poblacional lograda por la liberación de mosquitos machos RIDL sucede en un menor lapso de tiempo de lo que harían los métodos de control tradicionales.</p> <p>Nivel de confianza: Medio</p>
La reducción en las poblaciones de mosquito disminuye el número de contagios por el DENV	<p>Posible</p> <p>Consideración HR3A</p> <p>El número de mosquitos hembras presentes en el medio es menor y la actividad vectorial se reduce.</p>

	Nivel de confianza: Bajo
La incidencia de los serotipos de DENV fluctúa	<p>Posible</p> <p>Consideración H3B</p> <p>Los serotipos presentes en una región fluctúan en prevalencia y aquel que domina en incidencia es después sustituido por otro.</p> <p>Nivel de confianza: Alto</p>
La región es hiperendémica y cuenta con serotipos que promuevan el potenciamiento dependiente de anticuerpos (ADE)	<p>Posible</p> <p>Consideración HR3C</p> <p>En nuestro país, las zonas Este, Suroeste y Sureste cuenta con por lo menos dos serotipos de DENV (hiperendémicas) y los serotipos que más se encuentran (1 y 2) están asociados a las complicaciones clínicas (DFH/DSS).</p> <p>Nivel de confianza: Alto</p>
El decremento de la transmisión de los serotipos de dengue incrementa la incidencia de formas agudas de la enfermedad	<p>Poco Posible</p> <p>Consideración HR3D</p> <p>La baja en el número de contagios de DENV en lugares hiperendémicos y de alta transmisión se asocia al aumento en la incidencia de desenlaces como DSS y DHF debido al ADE, pero se trata de una especulación dentro de un fenómeno producto de más factores epidemiológicos.</p> <p>Nivel de confianza: Medio</p>
La fluctuación de los tipos de DENV se genera en un periodo mayor al de la protección cruzada	<p>Poco posible</p> <p>Consideración HR3E</p> <p>En las regiones de interés suceden fluctuaciones en la predominancia de los serotipos, en particular de DENV-1 y 2 que suceden a lo largo del año. Las estimaciones de los periodos de protección cruzada varían entre algunos meses hasta nueve años, la coincidencia de estos dos factores no parece tener una dinámica mayor que con la aplicación de los otros métodos de control biológico.</p> <p>Nivel de confianza: Bajo</p>
Estimación de la Probabilidad de Ocurrencia de la ruta de exposición	<p>Posible</p> <p>Nivel de confianza: Medio</p>

De manera intuitiva se podría pensar que la reducción en las poblaciones de mosquitos que transmiten alguna enfermedad resultaría en disminución del número de contagios, esto debido a que el vector se encuentra en una proporción menor para contagiar. Lo anterior no resulta del todo cierto.

Para el control de la transmisión del dengue se establece una premisa clave, la enfermedad puede ser abatida si se controlan las poblaciones del mosquito transmisor. A pesar de contarse con ejemplos históricos como en Panamá (Schliessmann & Calheiros, 1974), Singapur (Chan, 1985) o Cuba (Kouri *et al.*, 1989), aun no se encuentra del todo esclarecida cual es la relación entre los índices entomológicos y la incidencia de la enfermedad en los humanos cercanos a las poblaciones de mosquitos (Scott & Morrison, 2010).

El nexo entre los índices utilizados y la incidencia de contagios no ha sido satisfactorio para predecir desenlaces o umbrales de efectividad exactos para los programas de control vectorial. Esto probablemente se deba a que normalmente se estudian las densidades en poblaciones de estadios inmaduros para asociarlas con programas de epidemiología (Neff *et al.*, 1967; Focks & Chadee, 1997; Pontes *et al.*, 2000; Strickman & Kittayapong, 2003) y estos carecen de la capacidad de infectar, aunque pueden ser infectados.

Es necesario hacer notar que lo anterior no significa que la medición de los índices de etapas no adultas del mosquito *Ae. aegypti* deje de ser una herramienta fundamental para el desarrollo de programas que implique el control vectorial. Se tratan de mediciones de suma importancia para el manejo y monitoreo de las poblaciones en los sitios donde prevalece la enfermedad (Fernández, 2009).

Otros factores que hacen difícil el esclarecer la relación entre las pesquisas larvales son la falta medición de la mortalidad para cada etapa del desarrollo (Focks *et al.*, 1993), la productividad asimétrica en todos los contenedores que son centros de crianza (Tun-Lin *et al.*, 1995), la susceptibilidad de las poblaciones de mosquitos o humanos al DENV presente en la zona (Scott & Morrison, 2010) o incluso los movimientos humanos (Stoddard *et al.*, 2013), junto a otros que se desconocen.

A pesar de esfuerzos para hacer operable la captura de *Ae. aegypti* adultos (Fernández-Salas, 2009), la creación de índices con las etapas adultas sigue siendo una tarea de enorme magnitud y establecer la relación de estos con un sistema dinámico y complejo, como lo es el ciclo de la transmisión del DENV, es difícil.

Aunque se desconocen todas las variables involucradas en la transmisión del dengue, existe la posibilidad de desarrollar modelos a partir de experiencias locales que sirvan para determinar cuales son las medidas de manejo más adecuadas así como los umbrales necesarios para abatir la transmisión del dengue (Scott & Morrison, 2010b; Focks *et al.*, 2000).

Consideración HR3A

El número de mosquitas hembras presentes en el medio es menor y la actividad vectorial se reduce.

- **Incertidumbre asociada a la consideración HR3A:**

Esta consideración cuenta con una enorme carga de incertidumbre debido a que no se cuenta con un modelo de transmisión en el cual esté involucrado el número de vectores en el medio.

En las áreas hiperendémicas, los serotipos de DENV presentes suelen co-circular entre los hospederos animales y humanos (Thavara *et al.*, 2006). Las oscilaciones en la prevalencia de un serotipo u otro de manera temporal y geográfica tienen consecuencias epidemiológicas, como la exposición a un nuevo serotipo después de una infección primaria (Cameron & Farrar, 2009).

Aunque los patrones epidemiológicos que los distintos serotipos del dengue pueden ser particulares en cada región geográfica, se tiene caracterizada de manera general la dinámica que este virus posee. El patrón epidemiológico temporal del dengue esta dado por brotes semiperiódicos, en donde la prevalencia del serotipo posee reemplazos cíclicos en cuanto a la dominancia (Nisalak *et al.*, 2003; Adams *et al.*, 2006).

Consideración HR3B

Los serotipos presente en una región fluctúan en prevalencia y aquel que domina en incidencia es después sustituido por otro.

México es un país hiperendémico para el DENV, en el territorio se han reportado aislamiento de los cuatro tipos del virus (Vázquez-Pichardo *et al.*, 2011) en diversos estados, en donde la probabilidad de que sucedieran contagios sería mayor. Lo anterior toma sentido solo si se analiza los ciclos y dinámicas de los serotipos en cada lugar.

Aunque los cuatro serotipos se encuentran y prevalecen circulando a lo largo de México, han existido por lo menos 11 entradas de genotipos en los últimos 30 años, los cuales se encuentran sin traslaparse. Lo anterior podría significar que la co-circulación de la cual se habló antes no necesariamente ha consistido de los mismos entes virales (Carrillo-Valenzo *et al.*, 2010). El único que escapa de esta regla ha sido el genotipo Asiático/Americano, el cual se ha establecido de manera contundente como el mayor de los linajes del DENV-2 en México desde su aparición (Díaz *et al.*, 2002).

El mecanismo por el cual las infecciones por DENV terminan en complicaciones clínicas resulta controversial, pero se sospecha que los serotipos, genotipos y la dinámica que estos tienen en el medio donde existen potenciales hospederos son de suma importancia para el desarrollo de la enfermedad (Gubler *et al.*, 1981; Watts *et al.*, 1999).

Gracias a estudios en retrospectiva en los cuales se monitoreó la incidencia de DHF/DSS y la relación con los serotipos resultantes, se ha asociado al DENV-2 e infecciones primarias con DENV-1 seguidas por secundarias de DENV-2 como participantes de dichas complicaciones (Guzmán *et al.*, 1990; Vaughn, 2000; Sangkawibha *et al.*, 1984). Lo anterior no significa que sean los únicos serotipos involucrados en este desenlace, se ha comprobado el fenómeno de potenciamiento cuando los otros serotipos están involucrados (Gibbons *et al.*, 2007).

Existen regiones en particular en el Este, Suroeste y Sureste del país que son de particular interés pues en el 2013 se aislaron los cuatro serotipos del DENV en Yucatán, Campeche, Chiapas, Tabasco y Veracruz; tres serotipos en Quintana Roo, Oaxaca y Guerrero y dos en Hidalgo (DGAInDre, 2013). Aunque se posee la información de los ciclos en los cuales los serotipos de dengue han sucedido, aun no se cuenta con un modelo de transmisión o virulencia para este virus en el mundo en nuestro país, lo cual hace sumamente complicado el crear predicciones sobre la dinámica de esta patología en zonas hiperendémicas.

Serotipo Circulante				
Estado	1	2	3	4
Campeche	24	19	2	11

Chiapas	97	164	5	4
Guerrero	89	112	0	3
Hidalgo	6	2	0	0
Oaxaca	70	55	0	2
Quintana Roo	444	101	0	10
Tabasco	266	83	2	4
Yucatán	190	83	1	15

Tabla 3.9.2. Número de aislamiento de los distintos serotipos de DENV hasta la semana 52 del año 2013 en los estados del Sureste, Suroeste y Este de México. Fuente: DGAInDre 2013.

Como se muestra en la Tabla 3.9.2., los estados de interés no solo son hiperendémicos sino que además presentan una predominancia en el número de casos por los DENV-1 y 2, serotipos asociados al los desenlaces DFH/DSS.

Consideración HR3C

En nuestro país las zonas Este, Suroeste y Suroeste cuentan con por lo menos dos serotipos de DENV (hiperendémicas) y los serotipos que más se encuentran (1 y 2) están asociados a las complicaciones clínicas (DFH/DSS).

La fiebre clásica por dengue es una enfermedad que puede derivar a padecimientos más severos como la fiebre hemorrágica por dengue (DHF por sus siglas en inglés) o el síndrome de shock por dengue (DSS por sus siglas en inglés), condiciones que afectan de manera muy particular a niños menores de 15 años. Después de la infección por cualquier serotipo de virus del dengue se logra una inmunidad hemotípica pero el individuo es aún susceptible a ser infectado por un serotipo de dengue diferente, salvo en un periodo determinado después de la primera infección en donde se produce una inmunidad cruzada (Martínez, 1998).

Uno de los factores importantes en el desarrollo y desenlace de la infección por el virus del dengue es la interacción de los distintos serotipos con el hospedero. Gracias a la inmunidad hemotípica, aquella persona que fue infectada posee las inmunoglobulinas (Ig) suficientes para evitar un segundo contagio para este serotipo, pero también es posible que suceda una respuesta casi exclusiva de la enfermedad del dengue: aumenta la posibilidad de desarrollar DHF o DSS debido a un incremento en la replicación viral y viremia (Halstead, 2002).

Una de las explicaciones a esta patogénesis particular es la teoría del Potenciamiento Dependiente de Anticuerpos (ADE) (Hawkes & Lafferty, 1967), esta sucede cuando los anticuerpos antidengue no neutralizantes entran en contacto con un virión de dengue, al formarse la unión de ambos elementos se potenciará la capacidad del virus para entrar a las células blanco de la enfermedad debido a receptores FC (receptores del fragmento cristalizante de Ig) (Huang *et al.*, 2006). La Figura 5 explica el ADE, aunque las interacciones moleculares exactas no están aún descritas se puede explicar por la reacción cruzada entre receptores que permiten la entrada y replicación del virus en células del sistema inmune.

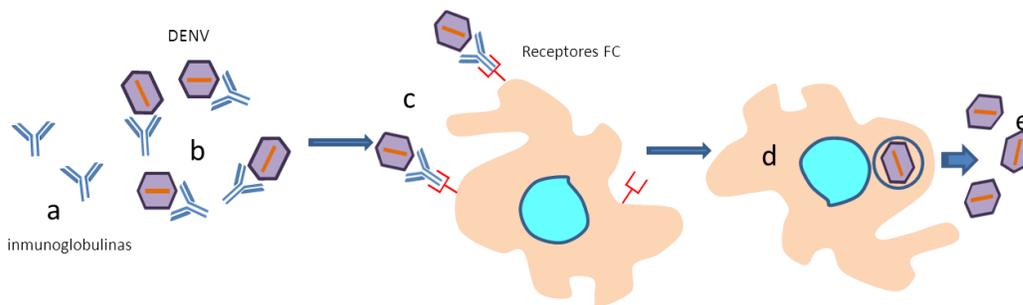


Figura 5. Reacción de Potenciación Dependiente de Anticuerpos: Debido a una infección previa se encuentran anticuerpos (Ig) presentes en el hospedero (a) que identifican a los DENV de un serotipo nuevo después de la infección (b). El reconocimiento del complejo DENV/Ig provoca que los receptores Fc de células del sistema inmune entren en contacto (c) y faciliten la entrada del virus en la célula (d), en donde sucederán una serie de replications. Tras el ciclo de replications y ensamblaje del DENV, los nuevos complejos virales saldrán al torrente sanguíneo, aumentando la viremia (e) y provocando un desenlace de DHF/DSS. Modificado de Whitehead *et al*, 2007

Como ya se mencionó, existe un periodo después de haber contraído a cualquier DENV en el que se posee resistencia cruzada hacia el resto de los serotipos. De suceder lo anterior, la reinfección no tendría el desenlace de dengue febril así como de DHF/DSS.

En zonas de alta incidencia de contagios, este fenómeno puede estar sucediendo y proporcionando una protección de hasta tres años (Reich *et al.*, 2013) para otros serotipos, por lo que la reducción de las poblaciones de *Ae. aegypti* podrían resultar en un menor número de contagios pero en un mayor número de desenlaces que sean mortales, en particular para grupos de riesgo.

Para poder explicar epidemias de DHF en periodos donde campañas de control de vectores sucedían, se generaron nuevos modelos a partir de datos previos que plantean nuevas implicaciones inmunológicas (Nagao & Koelle, 2008): debido al fenómeno de la protección cruzada momentánea a varios serotipos de DENV que sucede después de una infección primaria (Reich *et al.*, 2013) y el fenómeno de ADE, la reducción en la tasa de transmisión desde niveles altos hacia moderados podría tener un efecto contraproducente debido a que aumentaría la incidencia de DHF/DSS.

El trabajo antes mencionado involucra sólo la transmisión, pero también se especuló sobre los índices entomológicos aélicos con este fenómeno: a determinados índices de casa, la paradoja en la que aumentan los casos de DHF a pesar del control se observa nuevamente (Thammapalo *et al.*, 2008) y en aquellos lugares de alta transmisión con presencia de varios serotipos se debe de prestar particular atención en la efectividad de las campañas de control vectorial para establecer el umbral de reducción que pueda causar este fenómeno.

La convivencia de por lo menos dos serotipos de DENV hace que una región sea denominada como "hiperendémica" y sería lógico pensar que es en este tipo de lugares en los cuales sucede el fenómeno de ADE con mayor intensidad, sin embargo existen experiencias en las que lugares con hasta cuatro serotipos diferentes tienen un índice muy bajo de DSS/DHF (Watts *et al.*, 1999; Halstead *et al.*, 2001).

La falta de contundencia en la relación entre un serotipo determinado con el desenlace de una infección se puede deber a que existe una enorme cantidad de factores asociados a la dinámica de

transmisión de esta enfermedad: el genotipo viral, la edad (Guzmán *et al.*, 2002), el grupo humano (Restrepo *et al.*, 2008) o presencia de otra enfermedades en posibles hospederos (Figueroide *et al.*, 2010) son solo algunos de los factores implicados en la manera en la que las poblaciones son afectadas por el virus.

Debido a lo anterior se ha postulado que el ADE no puede por si sólo participar en los patrones con los cuales se manifiestan las complicaciones tras la infección con DENV y que alguna forma de inmunidad cruzada aún desconocida juega, junto a los factores intrínsecos, con la dinámica de los serotipos y la incidencia de DHF/DSS (Adams *et al.*, 2006).

Aunque se supone como positiva a la reducción en el número de contagios de una enfermedad, el dengue es una patología compleja que puede involucrar escenarios diferentes a los pensados de manera intuitiva.

Consideración HR3D

La baja en el número de contagios de DENV en lugares hiperendémicos y de alta transmisión se asocia al aumento en la incidencia de desenlaces como DSS y DHF debido al ADE, pero se trata de una especulación dentro de un fenómeno producto de más factores epidemiológicos.

- **Incertidumbre en el conocimiento.-** No está del todo claro el umbral con el cual se determina la tasa de contagios necesaria para que los desenlaces de DSS y DHF sucedan. No se ha caracterizado del todo el proceso por el cual el ADE sucede
- **Incertidumbre asociada a la variabilidad.-** Las fluctuaciones de los serotipos/genotipos son procesos asociados a muchos factores como la susceptibilidad, así como relaciones entre el hospedero, vector y virus que son complejas.
- **Incertidumbre sobre los hechos.-** El proceso de ADE es solo una de las opciones por las cuales suceden los desenlaces más graves de una infección por DENV. También se obtienen estos escenarios en la presencia de los otros serotipos.

Aunque los cuatro serotipos de DENV se encuentran co-circulando en el territorio mexicano, la mayor representación en los aislamientos está dada por periodos fluctuantes de DENV 1 y 2 (Figura 6); los otros serotipos (DENV-3 y 4) raramente son dominantes en la circulación.

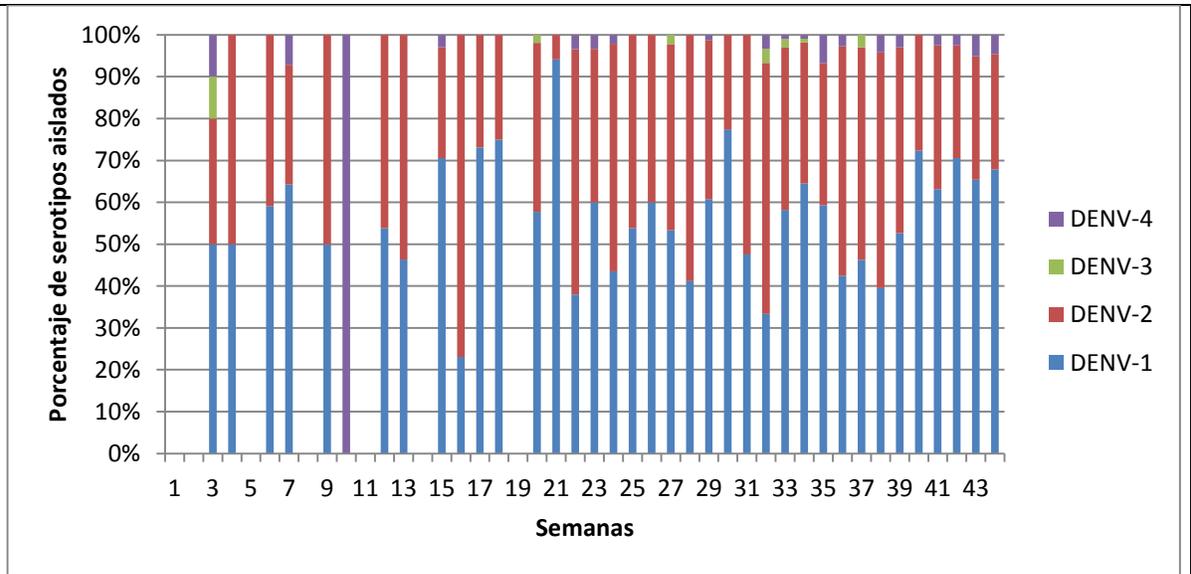
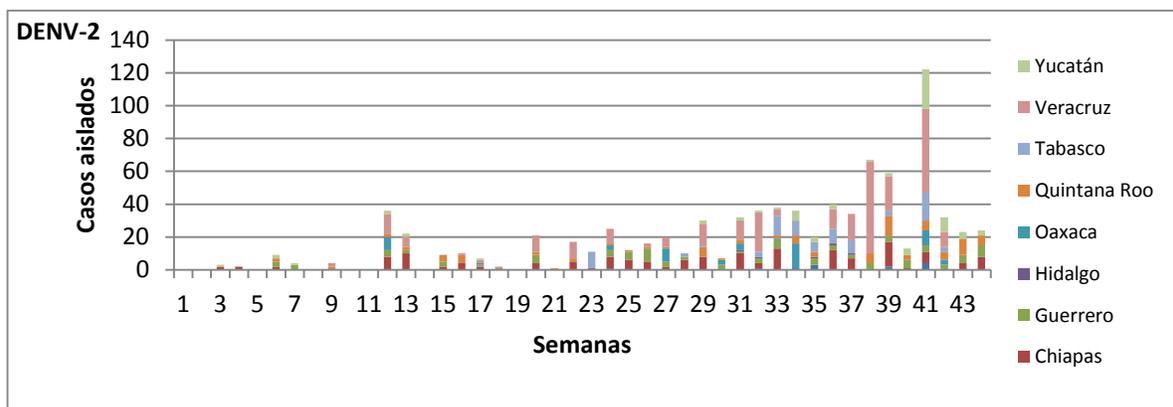
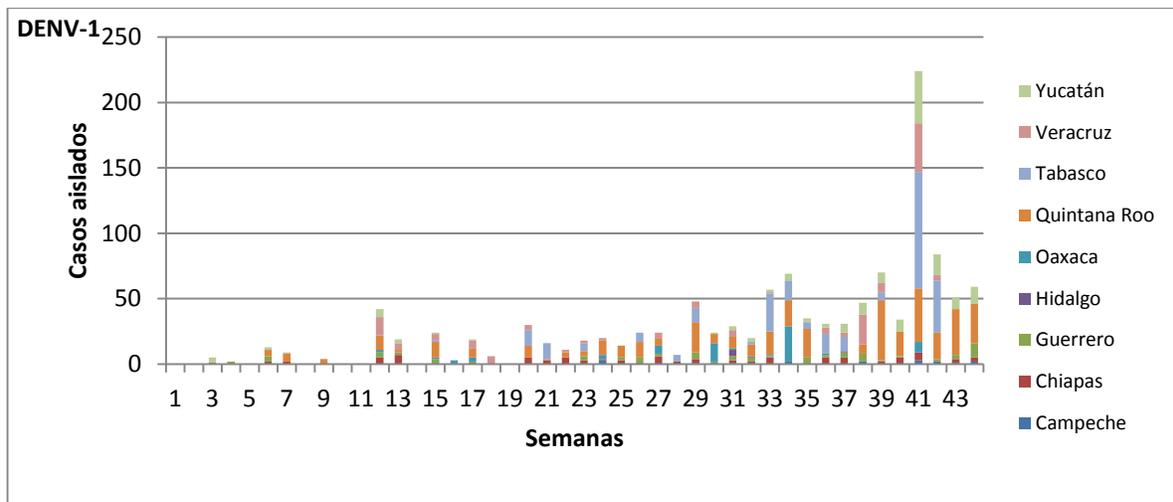


Figura 6. Porcentaje de los distintos serotipos de DENV en los nuevos aislamientos hasta la semana epidemiológica 44 del año 2013 en los estados del Sureste, Suroeste y Este de México. Algunas semanas no se encuentra en el registro de la

Aunque la presencia de los serotipos DENV-1/2 parece tener fluctuaciones cercanas a una proporción 50/50, en la Figura 7 se puede apreciar que la contribución de cada uno de los estados comprendidos en las regiones de interés no es el mismo genotipo. Si bien aún son predominantes los serotipos DENV-1/2, la dinámica que existe entre estos dos a lo largo de las 44 semanas de las cuales se desprende la gráfica es diferente. Lo anterior es de prestar atención por las implicaciones, antes mencionadas, que tiene un serotipo participante como primera o segunda infección.



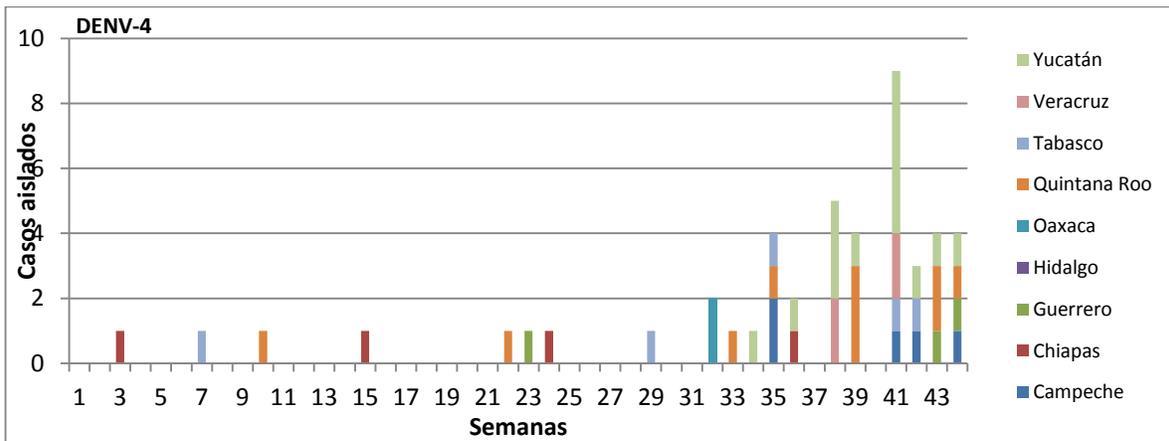
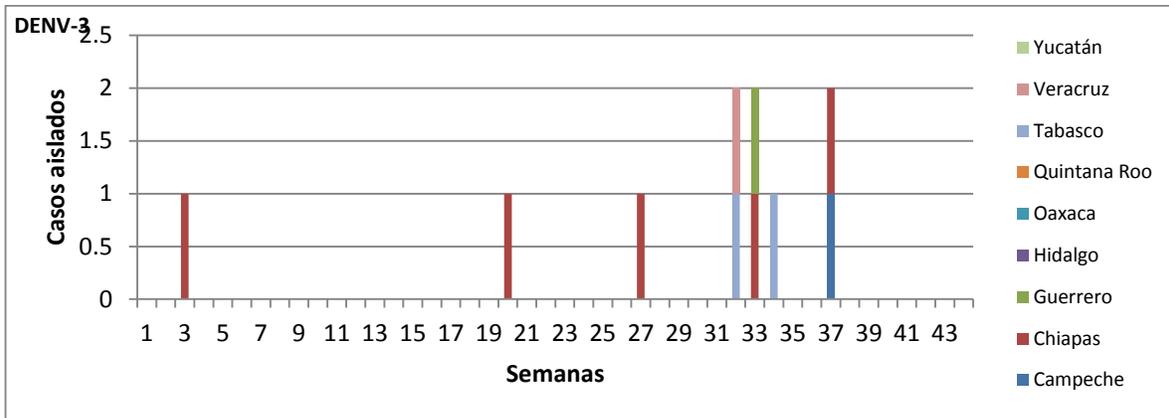


Figura 7. Fluctuaciones en la incidencia de los serotipos DENV 1 (a), 2(b), 3 (c) y 4 (d) y contribución por estados desde la primera semana epidemiológica hasta la 44. Las diferentes gráficas no presentan la misma escala. Fuente: DGAInDre 2013.

Poseer un estimado de la duración de la protección cruzada tras la infección primaria con alguno de los serotipos es de suma importancia para poder pensar en los efectos del ADE y las infecciones heterólogas, ya que parece haber una relación entre el tiempo transcurrido desde la primera infección y la severidad del desenlace tras una segunda (Halstead, 2003; Guzmán *et al.*, 2002b).

Desde hace más de medio siglo que se ha buscado medir cuál es la duración del periodo en el cual una persona que fue infectada no muestra la patología clásica cuando se expone de nuevo al mismo u otro serotipo viral. Los primeros experimentos en los cuales se exploraba la “neutralización por anticuerpos” revelaron que dos meses después de una infección primaria se poseía protección cruzada a virus heterólogos, aunque había observaciones de individuos que no manifestaban el cuadro clásico infeccioso ni otro más severo por hasta año y medio (Sabin *et al.*, 1952).

Estudios mas recientes como el de Ohainle *et al.* (2011) proponen que una segunda infección es de mayor riesgo cuando se involucra la entrada de un nuevo genotipo viral pero estiman un tiempo que va de uno a tres años en el que se tiene la protección cruzada. Esta amplitud en el rango de tiempo no es única para el estudio mencionado, otras experiencias manejan desde cinco a doce meses (Salje *et al.*, 2012) o de seis meses hasta casi nueve años en el otro (Gibbons *et al.*, 2007).

Al igual que el resto de los factores involucrados en la transmisión del DENV y el desenlace que esta tenga en las poblaciones humanas, la presencia de varios serotipos circulando en un área determinada es de considerarse debido a que el desenlace de una infección secundaria depende del tiempo que ha sucedido desde la primera. Esto también debe tomarse en cuenta cuando se realicen las proyecciones de cualquier campaña que pretenda reducir o abatir los contagios usando técnicas de control vectorial.

Una manera en la cual se ha podido incorporar el conocimiento epidemiológico de una región para crear predicciones que ayuden el diseño de campañas de manejo es la aplicación de los serotipos circulantes así como de la protección cruzada a los esfuerzos para modelar la dinámica de la enfermedad (Reich *et al.*, 2013).

<p>Consideración HR3E</p> <p>En las regiones de interés suceden fluctuaciones en la predominancia de los serotipos, en particular de DENV-1 y DENV-2 que suceden a lo largo del año. Las estimaciones de los periodos de protección cruzada varían entre algunos meses hasta nueve años, la coincidencia de estos dos factores no parece tener una dinámica mayor que con la aplicación de los otros métodos de control biológico.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Incertidumbre en el conocimiento.- No se tienen bien caracterizada la relación entre las fluctuaciones de los serotipos y la disminución de poblaciones de vectores por el uso de métodos convencionales de control vectorial. • Incertidumbre asociada a la variabilidad.- Las fluctuaciones de los serotipos/genotipos son procesos asociados a muchos factores como la susceptibilidad, así como relaciones entre el hospedero, vector y virus que son complejas.
--

Hipótesis de Riesgo HR4

Tabla 3.4 Evaluación de exposición para la HR 4.

<p>Hipótesis de Riesgo</p> <p>HR4</p>	<p>La presencia de tetraciclina en el medio hará que las crías portadoras del alelo letal dominante sean viables hasta la etapa adulta y se incrementa la población de mosquitos de <i>Ae. aegypti</i> en el medio.</p>
<p>Eventos o condiciones que deben suceder para que la característica novedosa genere un efecto adverso sobre los puntos finales de evaluación</p>	<p>Evaluación cualitativa de la posibilidad de que los eventos o condiciones sucedan y la consideración asociada a este estimado.</p>
<p>Se liberarán enormes cantidades de mosquitos machos portadores de la tecnología.</p>	<p>Muy Posible</p> <p>Consideración HR4A: La estrategia que usa tecnología RIDL necesita de liberaciones masivas de mosquitos portadores de la construcción genética.</p> <p>Nivel de Confianza: Alto</p>
<p>Aquellas hembras que copularon con los machos GM ovopositarán en flujos de agua que estuvieron en contacto con tetraciclina.</p>	<p>Insignificante</p> <p>Consideración HR4B Los sitios de ovoposición de <i>Ae. aegypti</i> fuera de las zonas de donde es endémico son contenedores artificiales, siendo las piletas de cemento un lugar de alta producción en el Sur de México.</p> <p>Nivel de Confianza: Alto</p>
<p>Existe tetraciclina en los lugares artificiales donde se ovoposita.</p>	<p>Muy Poco Posible</p> <p>Consideración HR4C La tetraciclina se encuentra en mayores concentraciones en las aguas residuales cercanas a los sitios de crianza animal, la presencia de esta en agua de las piletas de almacenaje y fuentes artificiales de</p>

	<p>ovoposición es poco probable.</p> <p>Nivel de Confianza: Medio</p>
<p>La progenie femenina de los mosquitos alcanzará las etapas adultas cuando las larvas se encuentren en contacto con un ambiente rico en tetraciclina</p>	<p>Posible</p> <p>Consideración HR4D La presencia de tetraciclina en el alimento de mosquitos portadores de la tecnología ha resultado en un incremento sobre la capacidad de supervivencia de las poblaciones en el laboratorio.</p> <p>Nivel de Confianza: Medio.</p>
<p>Estimación de la Probabilidad de Ocurrencia de la ruta de exposición</p>	<p>Poco posible Nivel de Confianza: Alto</p>

La estrategia de la tecnología fsRIDL consiste en la liberación en una proporción de mosquitos GM contra silvestres de aproximadamente 10:1 (Wise de Valdez *et al.*, 2011; Facchinelli *et al.*, 2013), por lo que la estrategia necesita de liberaciones masivas de MGM machos que copularán con hembras y lograrán inseminarlas con cigotos portadores del constructo letal. Los descendientes de esta cruce estarían representados por ambos sexos sólo en las etapas no adultas, ya que las larvas hembras tendrían una desventaja adaptativa mortal al emerger de la pupa (Phuc *et al.*, 2007).

Consideración HR4A:

La estrategia llevada en las liberaciones con tecnología RIDL necesita de inundaciones de mosquitos portadores del constructo.

- **Incertidumbre asociada al conocimiento.-** Los radios de liberación dependen de las condiciones del medio, efectividad de la tecnología y objetivos a lograr.

Nivel de Confianza: Alto

Es necesario conocer cuáles son los lugares que podrían ser sitios de crianza para las etapas no adultas de *Ae. aegypti*, para determinar que tan posible sería encontrar a estos individuos junto a restos de tetraciclina, producto de cualquier actividad humana, ya que el contacto con el antibiótico en cantidades suficientes serviría para la crianza y desarrollo de individuos viables hasta etapas adultas.

Las poblaciones de *Ae. aegypti* se desarrollaron en África explotando sitios de crianza como huecos de árboles, internudos y axilas de algunas plantas, así como pequeñas pozas producto de actividad biológica o rocas (Fernández, 2009). Gracias a esta adaptación es que han podido explotar contenedores artificiales en diferentes partes del mundo (Marquetti *et al.*, 2008; Focks & Alexander, 2006).

En México se asocia su presencia a la de contenedores producto de actividad humana (e.g. llantas, cacharos, contenedores de plástico, latas), se reproducen cerca de centros urbanos o semi-urbanos y en el perímetro de las casas. A pesar de lo anterior se les puede también encontrar en sitios naturales que emulan a aquellos de las zonas endémicas (Fernández, 2009).

Las piletas de cemento parecen tener un papel primordial en la producción de larvas de mosquitos en las regiones del Sur de México, teniendo una aportación del 84% (Focks & Alexander, 2006). No debemos perder de vista que el nivel de productividad no sólo implica el número de recipientes en el cuás se realizan las ovoposiciones sino también del número de larvas y adultos que sobreviven en estos.

Aunque *Ae. aegypti* prefiere depósitos de agua con pocos detritos (la materia orgánica en ellos no suele ser demasiada), existen algunas observaciones en donde se especula sobre el uso de tanques sépticos como sitios de crianza (Barrera *et al.*, 2008).

Consideración HR4B

Los sitios de ovoposición de *Ae. aegypti* fuera de las zonas de donde es endémico son contenedores artificiales, siendo las piletas de cemento un lugar de alta producción en el Sur de México.

- **Incertidumbre asociada a los hechos.-** Existen casos poco comunes en los cuales se han observado ovoposiciones en tanques sépticos y canaletas.

La producción alta en piletas de cemento no significa que no existan otros sitios de ovoposición o que estas sean las de mayor incidencia.

Nivel de confianza: Alto

La tecnología fsRIDL no es estrictamente estéril bajo las circunstancias adecuadas, para poder criar suficientes mosquitos antes de una liberación existe una “llave molecular” que consiste en elementos genéticos que responden a tetraciclina. Los constructos pueden ser diversos, pero la tecnología RIDL contiene normalmente esta secuencia genética que reprime la expresión del gen letal cuando se suministra en el medio la cantidad suficiente del antibiótico (Phuc *et al.*, 2007).

Este antibiótico es producido de manera natural y en pequeñas cantidades por *Streptomyces* spp., por lo que su presencia de manera natural está limitada a bajas concentraciones y los mosquitos no tendrían acceso a esta, a menos que se encontrara en el medio por otra fuente. La tetraciclina es un antibiótico de amplio espectro que se utiliza de manera mundial como profiláctico y para dar tratamiento veterinario en ganado, avicultura, acuicultura, como factor de crecimiento y antimicrobiano sobre plantas (Chopra & Roberts, 2001).

El uso intensivo de esta sustancia ha llevado a la contaminación de aguas superficiales y suelo (Nelson *et al.*, 2001), donde puede asociarse con minerales en el medio y otros compuestos orgánicos para después sufrir transformaciones por fotólisis, descomposición térmica, oxidación y biodegradación (Rubert, 2008) pero se le puede también encontrar en su forma activa. Existen algunas evidencias de la presencia activa de la tetraciclina en aguas residuales (Kolpin *et al.*, 2002; Lillenberg *et al.*, 2009), suelo e incluso en el tejido de peces (Wen *et al.*, 2007) y animales de granja (Peña *et al.*, 2007).

A pesar de que puede variar entre cada país y temporada, se ha estimado que las tetraciclinas fueron de los segundos antibióticos más vendidos y utilizados en el mundo (Col & O'Connor, 1987) y su presencia en el medio a través de agua de desecho así como en tejido de animales ha sido estudiada desde hace varias décadas. La presencia de la tetraciclina puede variar dependiendo del modelo agrícola/acuícola así como de la especie involucrada, siendo la bovina la de mayor concentración en músculo (Wen *et al.*, 2006; Peña *et al.*, 2007).

Los valores de tetraciclina pueden alcanzar niveles de hasta 973 µg/kg en los músculos de ganado bovino (Duff, 2005), 200µg/kg en cerdos (Peña *et al.*, 2007), 2.5 µg/kg en pollos (Schneider *et al.*, 2007) y 22 µg/kg en peces (Wen *et al.*, 2006). La presencia de este antibiótico ha levantado preocupaciones con respecto a su contenido en aguas residuales de granjas, ya que se estima que el 80% del antibiótico no es metabolizado y el excremento que termina en aguas residuales posee la carga de este (Duff, 2005). Del mismo modo se estima su presencia en el suelo que fue fertilizado con abono de animales que sufrieron algún tratamiento (Hamscher *et al.*, 2002).

La presencia de este antibiótico disminuye a medida que crece la distancia de las granjas donde se aplica, teniendo en algunas zonas ganaderas una concentración tan alta como 63µg/L (Wei *et al.*,

2011). A pesar de lo anterior, los niveles de tetraciclina en suelo y aguas residuales en donde el flujo es continuo, raramente superan los 50µg/L, teniendo valores promedio muy por debajo de este máximo (Hirsch *et al.*, 1999; Kolpin *et al.*, 2002; Kolpin *et al.*, 2004; Lillenberg *et al.*, 2009).

En nuestro país se tenía una cobertura del 89% de viviendas con acceso a agua entubada, el resto de las viviendas se abastecen de agua potable fuera de la vivienda, de la llave pública, de otra vivienda, de pozos, ríos o arroyos (INEGI, 2011). Estas últimas fuentes son las que podrían significar un potencial mayor de contacto con el agua que contiene el antibiótico.

<p>Consideración HR4C</p> <p>La tetraciclina se encuentra en mayores concentraciones en las aguas residuales cercanas a los sitios crianza animal, la presencia de esta en agua las piletas de almacenaje y fuentes artificiales de ovoposición es poco probable.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Incertidumbre sobre los hechos.- El uso de agua de pozos, ríos y arroyos representa una práctica aún utilizada en México. • Incertidumbre sobre el conocimiento.- Necesario determinar el nivel de cercanía con sitios de crianza animal donde se utiliza este antibiótico. • Incertidumbre asociada a la variabilidad.- El agua residual puede llegar a zonas donde se contenga en pequeños pozos que sirvan como sitios de ovoposición. <p>Nivel de confianza: Medio</p>
--

Existe una situación particular en la que se alimentó con tetraciclina de manera accidental a mosquitos portadores del sistema RIDL: el investigador Paul Reiter, del Instituto Pasteur, suministró comida de gato comercial en la que utilizaban restos de pollo que fueron sometidos al antibiótico como factor de crecimiento: ahora los mosquitos que debían morir en ausencia de tetraciclina tenían una tasa de supervivencia del 18% (Reiter, 2012).

<p>Consideración HR4D</p> <p>La presencia de tetraciclina en el alimento de mosquitos portadores de la tecnología ha resultado en un incremento sobre la capacidad de supervivencia de las poblaciones en el laboratorio</p> <ul style="list-style-type: none"> • Incertidumbre sobre los hechos.- La experiencia de Paul Riter no detalla las cantidades de alimento de gato que se suministró a las larvas de <i>Ae. aegypti</i> y no se cuenta con la concentración del antibiótico en la carne de pollo con el que se elaboró. Por lo anterior resulta complicado determinar los niveles necesarios para lograr ese porcentaje o uno mayor de desarrollo adulto en los portadores del gen. <p>Nivel de confianza: Bajo</p>

Hipótesis de Riesgo HR5

Tabla 3.5 Evaluación de exposición para la HR 5.

<p>Hipótesis de Riesgo</p> <p>HR5</p>	<p>La movilización del constructo transgénico debido a los elementos de transposición endógenos y exógenos hará que la liberación masiva de mosquitos resulte en un aumento de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i>.</p>
<p>Eventos o condiciones que deben suceder para que la característica novedosa genere un efecto adverso sobre los puntos finales de evaluación.</p> <p>Se liberarán enormes cantidades de mosquitos machos portadores de la tecnología.</p>	<p>Evaluación cualitativa de la posibilidad de que los eventos o condiciones sucedan y la consideración asociada a este estimado.</p> <p>Muy Posible</p> <p>Consideración HR4A: La estrategia que usa tecnología RIDL necesita de liberaciones masivas de mosquitos portadores del constructo.</p>

	Nivel de Confianza: Alto
Las hembras con las que copulen los machos tendrán crías portadoras de la tecnología.	Posible Consideración HR5-0 Se asume que <i>Ae. aegypti</i> es una especie monándrica pero existe una serie de evidencias que han demostrado que las larvas emergentes de un solo parche pueden provenir de diferentes padres. Nivel de Confianza: Medio
Los transgenes parten de elementos que participan en transposición.	Muy Posible Consideración HR5A: Debido a que el proceso de transformación implica el uso de elementos que están implicados en la transposición podría suceder una removilización de los constructos que fueron integrados de manera estable en el genoma de los mosquitos. Nivel de confianza: Alto
Los constructos transgénicos pueden transponerse de manera autónoma.	Muy Poco Posible Consideración HR5B: La metodología con la que se transforma a los mosquitos implica que los vectores de inserción son plásmidos con solo uno de los dos componentes necesarios para lograr la movilización futura de los elementos introducidos en el genoma del mosquito. Nivel de Confianza: Alto
Existen elementos endógenos similares a los necesarios para que suceda transposición de los constructos insertados.	Posible Consideración HR5C: <i>Ae. aegypti</i> es un organismo con una gran cantidad de Elementos Transponibles (TE), de los cuales cerca del 70% son transposones de DNA. Por lo anterior es probable que existan elementos genéticos endógenos que forman parte de los procesos de transposición. Nivel de Confianza: Medio
Existen elementos genéticos exógenos similares a los necesarios para que suceda transposición de los constructos insertados.	Muy Poco Posible Consideración HR5D: Aunque la inserción de elementos virales en los genomas de los mosquitos es posible y los virus poseen un genoma que puede contener secuencias similares a los elementos presentes en el proceso de transposición, aquellos sistemas usados hasta ahora no son susceptibles a la movilización por fuentes exógenas. Nivel de Confianza: Alto
Los constructos responsables del sistema genético letal no funcionarán correctamente.	Muy Poco Posible Consideración HR5E: La inmovilidad de los transgenes en la presencia de transposasas exógenas ha sido demostrada para los principales sistemas de transposición. Nivel de Confianza: Alto
La progenie femenina de los mosquitos alcanzará las etapas adultas en donde son vectores y aumentará el número poblacional.	Posible Consideración HR5F: Existe una gran cantidad de secuencias genéticas que comparten características con los TE, probablemente se trate de antiguos elementos con movilidad que ya no son funcionales. El destino de los elementos que se removilizan puede ser la inactividad a nivel transcripcional o por eventos sucesivos. Nivel de Confianza: Medio
Estimación de la Probabilidad de Ocurrencia de la ruta de exposición:	Posible Nivel de Confianza: Alto

Uno de los supuestos de la tecnología implica que aquellas hembras que sean inseminadas por un macho homócigo para la tecnología, ovopositarán individuos que tengan el transgen en por lo menos una copia. De manera general se había establecido el comportamiento sexual de las hembras de *Ae. aegypti* como monándrico (una sola cópula) (Yuval, 2006), esto se puede deber a una confusión con términos como “monógamo” (Jones, 1973) o por experimentos en los cuales se descubrieron estrategias sexuales que impedirían a las hembras recibir el contenido espermático de machos viables (Craig, 1967).

Cuando sucede la copula entre los mosquitos, el macho deposita en el conducto reproductivo una sustancia denominada “matrona”, producida en las glándulas accesorias masculinas, que juega un papel importante en el comportamiento, la inseminación y la ovoposición de las hembras (Hiss & Fuchs, 1972). Dentro de los componentes de la matrona, se han detectado proteínas del fluido seminal (SFP) que producen una serie de cambios fisiológicos y de comportamiento en las hembras (Adlakha & Pillai, 1975). Se cree que estas modificaciones hacen a las hembras menos receptivas a una segunda cópula, por lo menos en el mismo ciclo gonotrófico (Avila *et al.*, 2011).

Aunque las experiencias de laboratorio indican que las hembras que eran inseminadas por un mosquito no podrían tener crías que provinieran de otro macho por las consideraciones anteriores, reportes recientes realizados en condiciones más realistas han encontrado que un porcentaje de las hembras pueden presentar poliandria (Helinski *et al.*, 2012). Lo anterior se puede deber al agotamiento en las reservas seminales, interrupción en la cópula, (Gwads & Craig, 1970) o por altas densidades de mosquitos machos que copulen (Spielman *et al.*, 1967), antes de que sucedan los efectos de las moléculas seminales.

Aunque aún no se ha demostrado que la presencia de semen de múltiples machos en la espermateca de la hembra resulta en la inseminación por distintos padres y la ovoposición de estos embriones, hay algunos ejemplos en mosquitos en los cuales métodos moleculares han demostrado este fenómeno (Yuval & Fritz, 1994; Boyer *et al.*, 2012).

Consideración HR5-0

Se asume que *Ae. aegypti* es una especie monándrica pero existe una serie de evidencias que han demostrado que las larvas emergentes de un solo parche pueden provenir de diferentes padres.

Nivel de Confianza: Medio

Para poder integrar el gen de interés en el genoma de los insectos se desarrollaron técnicas en las cuales se utilizan los elementos transponibles (TE). Inicialmente conocidos como “genes saltarines”, los TE fueron descubiertos por Barbara McClintock (1950) y son secuencias de DNA que se mueven de un lugar a otro dentro del genoma.

Consideración HR5A:

Debido a que el proceso de transformación implica el uso de elementos que están implicados en la transposición podría suceder una removilización de los constructos que fueron integrados de manera estable en el genoma de los mosquitos.

Nivel de confianza: Alto

Para lograr las transformaciones se han utilizado TE de tipo II que tienen entre 9 y 40 pares de bases complementarias y palindrómicas en cada uno de sus extremos, también conocidas como secuencias repetidas de terminales invertidas (ITR).

Los transposones tipo II o transposones de DNA son aquellos que no necesitan de un paso intermedio de RNA para poder integrarse al genoma, ya que poseen dentro de su código genético a la secuencia para la producción de una transposasa. La función de esta molécula es reconocer los ITRs a los lados del transposon, desprenderlo de las secuencias que lo flanqueaban y reinsertarlo en un nuevo sitio (Slotkin & Martienssen, 2007).

La transformación de insectos se ha logrado exitosamente por más de 20 años y los TE más utilizados han sido *Hermes* (Atkinson *et al.* 1993), *Mos1* (Wang *et al.*, 2001), *Minos* (Franz & Savakis, 1991), *mariner* (Medhora *et al.*, 1991) y *piggyBac* (Fraser *et al* 1995).

Los transposones de DNA se pueden clasificar en dos grandes categorías, aquellos que tienen la capacidad de transponerse dentro de la misma secuencia (autónomos) y aquellos que necesitan de una transposasa externa que los movilice (no autónomos), se cree que estos son relictos mutados (Kazazian, 2004).

Las metodologías de transformación pueden ser diversas, pero incluye algunos elementos en común. Para la integración del constructo genético se deben de utilizar dos plásmidos diferentes: el primero posee el transgen de interés y un marcador de transformación para evaluar la efectividad con la que se integra al genoma del insecto, flanqueado con las secuencias palindrómicas. El segundo plásmido (ayudante) posee una secuencia que codifica para alguna enzima que funcionará como elemento de transposición (transposasa) y cuenta con una versión defectuosa de los ITRs, por lo que se trata de un elemento no autónomo (Dafa'alla *et al.*, 2006).

Consideración HR5B:

La metodología con la que se transforma a los mosquitos implica que los vectores de inserción son plásmidos con solo uno de los dos componentes necesarios para lograr la movilización futura de los elementos introducidos en el genoma del mosquito.

Nivel de Confianza: Alto.

Debido a que el sitio en el cual se realiza el reconocimiento por parte de las transposasas se encuentra en la secuencias terminales del transposon y que existe un amplio grupo de familias de estos en los invertebrados (Keeling *et al.*, 2005), aquellos elementos que no son autónomos podría ser removilizados debido a la presencia de transposasas que sean producto del genoma propio de los mosquitos (Feschotte & Pritham, 2007).

Ae. aegypti posee una enorme carga de TE (Arensburger *et al.*, 2011), de los cuales aproximadamente el 70% son transposones de DNA (Feschotte & Pritham, 2007). Esto hace levantar la sospecha de un alta actividad de transposición, lo cual podría significar la removilización de los transgenes vía estímulos endógenos.

Consideración HR5C:

***Ae. aegypti* es un organismo con una gran cantidad de TE, de los cuales cerca del 70% son transposones de DNA. Por lo anterior es probable que existan elementos genéticos endógenos que forman parte de los procesos de transposición.**

- **Incertidumbre en el conocimiento:** Se desconoce cuáles son los elementos genéticos que bordean el constructo transgénico, debido a una inserción que no es "sitio dirigida".

Nivel de Confianza: Medio

La transferencia horizontal de material genético hacia eucariontes es un fenómeno posible (Katzourakis & Gifford, 2010). Se cree que han existido varios eventos de transferencia de material genético con sus simbioses (Klasson *et al.*, 2009) así como los virus que lo infectan (Crochu *et al.*, 2004), por lo que una inserción en las células germinales de los hospederos y la integración de secuencias virales en el genoma de estos puede significar cambios en el fenotipo de los insectos.

Esto abre la posibilidad de contar con elementos exógenos que removilicen aquellos genes insertados previamente. Lo anterior se puede entender pues se han detectado similitudes entre secuencias virales y TE, además de que ambos están flanqueados por el mismo tipo de ITR y poseen algunos dominios comunes (Xiong & Eickbush, 1988).

A pesar de lo anterior, las transposasas responsables de la movilización y removilización de los transposones más utilizados (clase II) no comparten las características antes mencionadas, aunque existen algunos dominios bacterianos que podrían serlo (Wicker *et al.*, 2007). Es importante mencionar que dichos virus con similitudes son retrovirus que necesitan de un paso intermediario de RNA, al igual que los transposones de RNA (clase I).

Consideración HR5D:

Aunque la inserción de elementos virales en los genomas de los mosquitos es posible y los virus poseen un genoma que puede contener secuencias similares a los elementos presentes en el proceso de transposición, aquellos sistemas usados hasta ahora no son susceptibles a la movilización por fuentes exógenas.

Nivel de Confianza: Alto

Debido a la presencia de elementos exógenos y endógenos de transposición, es necesario entender cual es el comportamiento que tienen las secuencias presentes en los vectores de transformación para determinar la efectividad que pudieran presentar una vez que se integrara en poblaciones naturales, aun cuando se trate de machos estériles portadores del sistema fsRIDL (O'Brochta *et al.*, 2003).

El "comportamiento" que tienen los procesos de transposición no solo depende de el sistema de transformación utilizados sino también de la especie en cuestión, cuando se realiza la inserción de un gen novedoso no se tienen muchos elementos para poder determinar la estabilidad del este en el contexto genético particular y existen ejemplos en los cuales la inmovilidad lograda en insectos modelo no es replicada en otros sistemas biológicos (Jasienkiene *et al.*, 1998; Grossman *et al.*, 2001; Perera *et al.*, 2002).

Además de que es importante determinar estos factores para predecir cual es la efectividad y dinámica de las liberaciones de insectos en las diferentes etapas, la estabilidad de estos transgenes puede estar relacionada con el fenotipo de los insectos que los portan y es esencial conocerla para disminuir la incertidumbre que esta pueda causar.

O'Brochta y colaboradores (2003) analizaron una serie de pruebas de transposición y remobilización para los transposones más utilizados en *Ae. aegypti*, al parecer la eficiencia con la que *Mos1*, *Minos*, *Hermes* y *piggyBac* son movilizados es extremadamente baja y la estabilidad de transgénesis debida a movilización seria extremadamente alta. A pesar de lo anterior se pueden encontrar algunos casos de mosaicismo somático en los insectos, tal vez debido a procesos post-transcripcionales.

Se ha considerado particularmente a *piggyBac* con respecto a las capacidad para moverse, la exposición a otras fuentes de movilización ha sido analizada en un rango mayor de estímulos y los resultados aún le declaran como un sistema de transposición poco móvil después de la integración

(Sethuraman *et al.*, 2007), aunque existen procesos de silenciamiento que no están relacionados con la posición o integridad del transgén, pero que no se encuentran del todo caracterizados (Palavesam *et al.*, 2013).

Consideración HR5E:

La inmovilidad de los transgenes en la presencia de transposasas exógenas ha sido demostrada para los principales sistemas de transposición.

- **Incertidumbre sobre los hechos.-** Existen algunos ejemplos de mosaicismo que podrían significar inestabilidad genética, así como una silenciamiento más allá de cuestiones estructurales del gen insertado.

Nivel de Confianza: Alto

El destino de un elemento transponible que sufre de transposición es diverso, el papel que estos han tenido en la evolución de los organismos es ampliamente discutida a medida que se cuenta con bases de datos más extensas y procesadores de datos más potentes (Kazazian, 2004; Feschote & Pritham, 2007). La mayoría de los TE que se encuentran en el genoma del mosquito no son activos (Arensburger *et al.*, 2011) y el motivo se puede deber a muchos procesos moleculares (*e.g.* silenciamiento post transcripcional, heterocormatización) (Feschote & Pritham, 2007), dado lo anterior se puede especular que la movilización del transgén insertado significaría en la pérdida del fenotipo letal deseado y el sistema fsRIDL sería inútil.

Consideración HR5F:

En el genoma de *Aedes aegypti* existe una gran cantidad de secuencias genéticas que comparten características con los TE, probablemente se trate de antiguos elementos con movilidad que ya nos son funcionales. El destino de los elementos que se remobilizan puede ser la inactividad a nivel transcripcional o por eventos sucesivos.

- **Incertidumbre asociada a la variabilidad.-** Es imposible predecir el destino exacto que los elementos genéticos tendrían cuando son movilizados.

Nivel de Confianza: Media

Hipótesis de Riesgo HR6

Tabla 3.5 Evaluación de exposición para la HR 6.

Hipótesis de Riesgo HR6	La dinámica de disminución de las poblaciones de las etapas larvales del mosquito impacta el número y diversidad de las poblaciones de detritívoros e insectos depredadores benéficos que se encuentran en el medio acuático.
Eventos o condiciones que deben suceder para que la característica novedosa genere un efecto adverso sobre los puntos finales de evaluación	Evaluación cualitativa de la posibilidad de que los eventos o condiciones sucedan y la consideración asociada a este estimado
Sucede reducción poblacional de las etapas larvarias debido a la liberación de los mosquitos GM .	<p>Posible</p> <p>Consideración HR1-0 Uno de los supuestos que se toman para hacer esta evaluación es el hecho de que la reducción poblacional lograda por la liberación de mosquitos machos fsRIDL sucede en un menor lapso de tiempo de lo que harían los métodos de control tradicionales.</p> <p>Nivel de confianza: Medio</p>
Los mosquitos mantienen relaciones ecológicas con organismos en el medio acuático.	<p>Muy Posible</p> <p>Consideración HR6A Las interacciones entre mosquitos y otros organismos son importantes, siendo de particular estudio e importancia las de presa y depredador.</p> <p>Nivel de confianza: Alto</p>

Los organismos están presentes en los sitios de crianza de los mosquitos.	<p>Poco Posible</p> <p>Consideración HR6B: La mayoría de las interacciones que suceden con <i>Ae. aegypti</i> en el medio natural no se encuentran presentes en los sitios preferidos para la crianza de etapas larvales (contenedores artificiales), debido al tamaño de los hábitats en los que se han desarrollado así como por la ausencia de depredadores en estos.</p> <p>Nivel de Confianza: Medio.</p>
La disminución de las poblaciones larvarias de los mosquito impacta negativamente a las poblaciones de detritívoros y depredadores benéficos en los contenedores artificiales.	<p>Muy Poco posible</p> <p>Consideración HR6C: Las larvas de mosquitos son en su mayoría detritívoras, al igual que muchos otros organismos presentes en el medio, que podrían tomar su lugar y formar parte de las cadenas tróficas en la que estos insectos participan.</p> <p>Nivel de Confianza: Medio</p>
Estimación de la Probabilidad de Ocurrencia de la ruta de exposición:	<p>Poco Posible</p> <p>Nivel de Confianza: Medio</p>

Los mosquitos (nativos e invasores) son parte de ecosistemas complejos en los cuales participan de redes tróficas como depredadores y presas para organismos propios de la región (Juliano *et al.*, 2010). Las interacciones que suceden pueden variar a lo largo del desarrollo de los mosquitos debido a que presentan diferentes estadios que suceden en diferentes medios (Rickard, 1960); el medio acuático en el que sucede la oviposición sustenta el desarrollo de los huevos, las larvas de diferentes estadios y la pupa (Williams, 2006).

Durante estas etapas acuáticas es que mantienen interacciones con otros organismos dentro de los cuerpos de agua que los contienen (Harris *et al.*, 1994). Los depredadores de mosquitos van desde anfibios (Spielman & Sullivan, 1974), peces (Chandra *et al.*, 2008), insectos acuáticos (Peckarsky, 1982) como otros mosquitos (Collins & Blackwell, 2000; Steffan & Evenhuis, 1981) y copépodos (Marten & Reid, 2007), entre otros.

<p>Consideración HR6A</p> <p>Las interacciones entre mosquitos y otros organismos son importantes, siendo de particular estudio e importancia las de presa y depredador.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Incertidumbre sobre el conocimiento.- Los estudios en los hábitats de los mosquitos son escasos y la información es limitada cuando se explora sobre posibles relaciones ecológicas. <p>Nivel de confianza: Alto</p>

Los hábitats larvales de los mosquitos son diversos, aunque algunas especies pueden desarrollarse a orillas de lagos y pequeñas fosas, la mayoría suceden en contenedores de agua como axilas de árboles (Daugherty & Juliano, 2003), entrenudos de plantas (Sunahara & Mogi, 2002), bromelias (Heard, 1994) y en contenedores artificiales (Sunahara *et al.*, 2002). Las interacciones que suceden en cada uno de estos hábitats (naturales y artificiales) dependen de factores ambientales como las fluctuaciones en la temperatura, el volumen de agua, el tipo y cantidad de nutrientes, así como de las especies capaces de establecerse en los mismos (Sota *et al* 1994, Sunahara & Mogi, 2002).

La coevolución que ha sucedido entre *Ae. aegypti* y las poblaciones humanas ha hecho que los hábitats de estos organismos, fuera de su centro de origen en el continente africano, sean en su mayoría contenedores artificiales (Fernández, 2009), aunque existen algunos reportes que describen la presencia de la especie invasora en contenedores naturales como árboles (Burkot *et al.*, 2007; Mangudo *et al.*, 2010).

Las relaciones y procesos presa-depredador que suceden con las larvas de mosquitos parecen tener una relación con el tipo de hábitat en el que se encuentran, siendo de suma importancia el tamaño del contenedor en el que las larvas se desarrollan (Sunahara *et al.*, 2002). La mayoría de los depredadores y presas que se encuentran referidas en puntos anteriores no comparten los hábitats usuales con *Ae. aegypti*, los cuales se alimentan de detritos orgánicos, algas y protozoarios de vida libre en su mayoría (Fernández, 2009).

Consideración HR6B

La mayoría de las interacciones que suceden con *Ae. aegypti* en el medio natural no se encuentran presentes en los sitios preferidos para la crianza de etapas larvales (contenedores artificiales), debido al tamaño de los hábitats en los que se han desarrollado así como por la ausencia de depredadores en estos.

- **Incertidumbre sobre los hechos.**- Existen algunas evidencias de mosquitos invasores ocupando sitios de crianza naturales, como huecos de árboles.
- **Incertidumbre sobre el conocimiento.**- No existen muchos estudios que revisen cuáles son los organismos que están presentes en los contenedores artificiales, así como los servicios ambientales que pueden representar.
- **Incertidumbre asociada a la variabilidad.**-Las condiciones y recursos en los contenedores pueden variar en cada zona.

Nivel de Confianza: Medio.

Las larvas de los mosquitos son detritívoras en los sitios de crianza, donde componen cierto porcentaje en la alimentación de otros organismos. El papel dentro de estas cadenas tróficas no parece ser exclusivo de los mosquitos, debido a que se encuentran junto con otros organismos que procesan los restos orgánicos presentes (Fang, 2010). Por lo anterior se puede especular que, después de la disminución de estos organismos en contenedores artificiales o naturales, serían sustituidos por otras especies que accedieran a los recursos, incluso las que éstos desplazaron con su llegada.

Es difícil establecer cuál es el papel exacto de las larvas de los mosquitos en la alimentación o control de otros organismos debido a la poca investigación que existe al respecto, mucho más cuando se trata de mosquitos no nativos que se caracterizan por habitar en contenedores artificiales. A pesar de lo anterior, la investigación derivada de la búsqueda de depredadores para usarlos como biocontrol es una herramienta que pudiera subsanar estas ausencias.

Kumar y Hwang (2006) realizaron una extensa recopilación de ejemplos de organismos que se alimentan de mosquitos en sus etapas larvales, así como su potencial como biocontroles. De los organismos señalados son pocos los presentes de manera natural en los hábitats artificiales que han sido colonizados por *Ae. aegypti*, probablemente por el destino y límites que tiene el agua contenida en recipientes. No hay que perder de vista que también suceden en este espacio y periodo otros insectos que presentan etapas metamórficas y que, al igual que los mosquitos, no están ligadas al contenedor a lo largo de toda su vida.

Los odonatos son organismos que pueden convivir con *Ae. aegypti* en zonas distantes a los centros de origen y ocupar contenedores artificiales en donde se alimentan de las larvas del mosquito

(Sebastian *et al*, 1991), la presencia de estos organismos no está restringida al hábitat artificial y efímero pues tienen la capacidad de volar al emerger de la pupa. Más allá del valor cultural que las libelulas poseen, son parte importante de redes tróficas así como proveedoras de otros servicios ambientales (Simaika & Samways, 2008).

<p>Consideración HR6C:</p> <p>Las larvas de mosquitos son en su mayoría detritívoras, al igual que muchos otros organismos presentes en el medio, que podrían tomar su lugar y formar parte de las cadenas tróficas en la que estos insectos participan.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Incertidumbre sobre el conocimiento.-Son pocos los estudios que se han realizado para describir las interacciones bióticas en contenedores como cacharros o piletas. <p>No todos los organismos que pueden estar en estos contenedores artificiales tienen un destino concatenado al agua presente en el medio.</p> <p>Nivel de Confianza: Medio</p>
--

Hipótesis de Riesgo HR7

Tabla 3.7 Evaluación de exposición para la HR 7.

Hipótesis de Riesgo HR7	La dinámica de disminución de las poblaciones de mosquitos en etapas adultas impacta el número y diversidad de las poblaciones de aves, murciélagos y artrópodos que se alimentan de ellos.
Eventos o condiciones que deben suceder para que la característica novedosa genere un efecto adverso sobre los puntos finales de evaluación	Evaluación cualitativa de la posibilidad de que los eventos o condiciones sucedan y la consideración asociada a este estimado
Sucede reducción poblacional de las etapas adultas debido a la liberación de los mosquitos GM .	<p>Posible</p> <p>Consideración HR7A: Sucederá una reducción en las poblaciones de mosquitos adultos con potencia y capacidad mayor a la que sucede con los sistemas de control biológico utilizados.</p> <p>Nivel de confianza:Medio</p>
Los mosquitos adultos mantienen relaciones ecológicas con organismos en el medio ambiente.	<p>Posible</p> <p>Consideración HR7B: Existen experiencias en las cuales se ha encontrado a mosquitos dentro de la dieta de algunos animales pertenecientes a distintos grupos taxonómicos. Su papel como polinizadores es insignificante.</p> <p>Nivel de Confianza: Alto</p>
La disminución de las poblaciones de adultos de los mosquitos impacta la supervivencia de los organismos asociados al medio.	<p>Muy Poco Posible</p> <p>Consideración HR7C: <i>Ae. Aegypti</i> no esta involucrado exclusivamente como parte de la dieta de los organismos que pueden llegar a alimentarse de el.</p> <p>Nivel de confianza: Alto</p>
Estimación de la Probabilidad de Ocurrencia de la ruta de exposición:	<p>Posible</p> <p>Nivel de Confianza: Alto</p>

Como ya se mencionó antes, existe una variedad de estudios que hablan sobre la capacidad y potencia que tendría la liberación de mosquitos GM con un sistema fs-RIDL asociado para reducir las poblaciones de mosquitos silvestres en el ambiente. Aunque en los puntos anteriores

(Consideración 1/0) se estima sobre la reducción de las etapas larvianas de estos insectos, la relación que esta puede tener en los estadios adultos no se encuentra siempre determinada (Focks, 2003, Romero-Vivas & Falconar, 2005; Sivagnaname & Gunasekaran, 2011) y es difícil conocer el número de adultos que pueden existir en el medio cuando se aplican métodos de control sobre poblaciones larvales.

Consideración HR7A:

Sucedirá una reducción en las poblaciones de mosquitos adultos con potencia y capacidad mayor a la que sucede con los sistemas de control biológico utilizados.

- **Incertidumbre en el conocimiento.**- Los modelos que se han generado no siempre reflejan situaciones como el costo en la adaptación que sucede por la modificación genética, efectos densodependientes, éxito de las larvas para alcanzar estadios adultos o migraciones que mosquitos fuera del área de liberación.

No existe certeza sobre el impacto de los métodos de control larvario sobre el número de adultos en el medio.

- **Incertidumbre sobre los hechos.**- Los resultados de las experiencias en jaula difieren en estimar la efectividad del método para reducir a las poblaciones de mosquitos y las experiencias logradas en campo carecen de un consenso científico.

Nivel de Confianza: Medio

Las etapas adultos de los mosquitos ocupan un medio diferente al de las larvas, en este suceden también interacciones con otros animales. Además de la obvia relación con los humanos y las consecuencias sobre la salud de estos últimos, los mosquitos establecen interacciones con otros organismos presentes: son varios los animales que se alimentan de mosquitos en su etapa adulta (fuera del agua), entre los cuales se encuentran pájaros (Beal, 1918; Johnston, 1967), murciélagos (Whitaker, 2004) y arácnidos (Jackson *et al.*, 2005).

Aunque es un fenómeno que no se ha reportado en muchas ocasiones y parece estar aislado en algunas zonas geográficas, los mosquitos también puede ser polinizadores de plantas (Smith, 1913). En realidad se asume que los machos de estos insectos prefieren el néctar de las plantas y el acceso a polen no está del todo comprobado (Fang, 2010).

Consideración HR7B:

Existen experiencias en las cuales se ha encontrado a mosquitos dentro de la dieta de algunos animales pertenecientes a distintos grupos taxonómicos. Su papel como polinizadores es insignificante.

- **Incertidumbre en el conocimiento.**- Aún no se cuenta caracterizado el papel de los mosquitos como polinizadores en nuestro país, sin embargo las experiencias en las que se les da este papel son aisladas y los reportes son pocos.

Nivel de Confianza: Alto

Alrededor del mundo se han reportado experiencias en las cuales los mosquitos juegan un papel importante en la dieta de depredadores ya que representan una enorme biomasa cuando emergen como adultos. Este fenómeno está limitado a sitios específicos del planeta como la Tundra ártica y su efecto recae sobre algunas especies de aves migratorias (Fronhe, 1956), aunque son muchos los casos en los cuales se trata de mitos o concepciones erróneas (Kale, 1968).

Se cree que la dieta de los pájaros que pudieran verse afectados por la desaparición de las especies blanco de la tecnología esta pobremente representada por mosquitos (Fang, 2010), sin embargo existen algunos casos en los que la reproducción de aves se ve disminuida cuando se utiliza algún agente microbial contra mosquitos y otros insectos (no específico) en el medio (Poulin *et al.*, 2010).

Con respecto a los demás organismos que se mencionaron antes, los reportes que se hacen sobre la presencia de mosquitos en las dietas de los organismos es anecdótico o poco factible en la

naturaleza (Griffin *et al.*, 1960; Pritchard, 1964) y no existe evidencia que involucre a *Ae. aegypti* como un eslabón determinante en la alimentación de organismos insectívoros, sumado a lo anterior, la presencia y sucesión ecológica con otras especies de mosquitos podría disminuir la posibilidad de un impacto negativo.

<p>Consideración HR7C:</p> <p>Ae. Aegypti no esta involucrado íntimamente como parte de la dieta de los organismos que pueden llegar a alimentarse de el.</p> <p>Incertidumbre sobre los hechos.- Existen un par de ejemplos fuera de nuestro país en los cuales se señala la afectación sobre la supervivencia y capacidad reproductiva de aves cuando se reduce la cantidad de mosquitos, aunque ninguno contempla a <i>Ae. aegypti</i> y el efecto sucede bajo la aplicación de insecticidas no específicos.</p> <p>Nivel de Confianza: Alto</p>

Hipótesis de Riesgo HR8.

Tabla 3.8 Evaluación de exposición para la HR 8.

Hipótesis de Riesgo HR8	La disminución de las poblaciones de <i>Ae aegypti</i> presentes en la zona permitirá la invasión y establecimiento de mosquitos de la misma especie pero de otras regiones, los cuales son mejores transmitiendo el DENV.
Eventos o condiciones que deben suceder para que la característica novedosa genere un efecto adverso sobre los puntos finales de evaluación	Evaluación de la posibilidad de que los eventos o condiciones sucedan y la consideración asociada a este estimado
La liberación de los <i>Ae. aegypti</i> GM provoca una reducción de las poblaciones de esta especie presentes en el medio.	<p>Posible</p> <p>Consideración HR1-0 Uno de los supuestos que se toman para hacer esta evaluación es el hecho de que la reducción poblacional lograda por la liberación de mosquitos machos fsRIDL sucede en un menor lapso de tiempo de lo que harían los métodos de control tradicionales.</p> <p>Nivel de confianza: Medio</p>
Poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> viven en las zonas aledañas a la liberación y comparten características que les permitirían vivir en la zona donde se realizó una reducción poblacional.	<p>Posible</p> <p>Consideración HR8A Las poblaciones más cercanas a las del sitio donde se realiza el control poseen una mayor similitud con las que son objetivo dentro de la tecnología, la cual sería necesaria para ser exitosas colonizando los sitios en los que se realizó la liberación y reducción poblacional.</p> <p>Nivel de Confianza: Alto</p>
Las poblaciones de mosquitos con características similares pueden migrar hacia la zona objetivo de la reducción y establecerse.	<p>Posible</p> <p>Consideración HR8B La capacidad de poblaciones vecinas de <i>Ae. aegypti</i> para recolonizar un lugar donde se estableció una reducción poblacional esta relacionado con el potencial de migración que se ha observado en estos organismos (por medios propios o fuentes antropogénicas). El potencial de desplazamiento a lo largo de la zona sur-pacífica se ve reflejado en el continuo intercambio genético sucedido.</p> <p>Nivel de confianza: Medio</p>
Los mosquitos que se establecen en las zonas son mejores transmisores del DENV.	<p>Poco posible</p> <p>Consideración HR8C</p>

	No existe una relación entre la cercanía de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> con la competencia vectorial de estas. La llegada de colonizadores puede darse desde una fuente cercana como lejana, debido a transporte antropogénico. Nivel de confianza: Bajo
Estimación de la Probabilidad de Ocurrencia de la ruta de exposición:	Posible Nivel de Confianza: Medio

Como se ha comentado a lo largo del documento, *Ae. aegypti* es una especie invasora en muchas partes del mundo (incluyendo México). La capacidad de estos organismos para invadir y establecerse en una zona se debe a la capacidad para sobrevivir y reproducirse en una serie de condiciones en las que el número de sus poblaciones sean suficientes para transmitir su material genético a las siguientes generaciones (Peterson, 2003). Dichas condiciones y recursos forman parte del espacio ecológico multidimensional conocido como nicho (MacArthur, 1972).

Para poder predecir las probabilidades de invasión por una especie que es vector de enfermedades, se han generado proyecciones en las que se toma en cuenta el espacio geográfico potencial de ser ocupado y se realiza un modelamiento paisajístico en el que se reflejen las posibles zonas donde podrían establecerse las poblaciones (Peterson, 2001; Peterson *et al.*, 2005).

Peterson (2003) encuentra dos motivos principales por los cuales una zona no se encuentra habitada por potenciales invasores: a) la capacidad de dispersión de la especie no es suficiente para estar en un lugar que tiene las características necesarias para su supervivencia, crecimiento poblacional y establecimiento o b) las condiciones ecológicas del sitio no permiten que la especies se establezca a pesar de encontrarse en coincidencia geográfica y temporal.

La recolonización por *Ae. aegypti* después de extinciones locales producto de programas de manejo de vectores ha sido reportada (Kaplan *et al.*, 2010) y se podría pensar que las poblaciones de *Ae. aegypti* con cierta vecindad serían capaces de repoblar una zona donde ha sucedido un reducción poblacional cercana a la extinción. Lo anterior debido a que poseen las características necesarias para establecerse donde antes se encontraban organismos íntimamente (nivel de especie) relacionados (Hampton *et al.*, 1990).

La determinación del nicho y el modelaje de paisajismo ecológico de *Ae. aegypti* no sólo útil para analizar las posibles expansiones de esta especie sino que también puede predecir la dinámica que otra especie de mosquitos vectores puede tener cuando las poblaciones del primero fluctúan (Calderón-Arguedas & Troyo, 2007), lo cual sucede en la realidad.

Las estrategias de invasión de los vectores para llegar a un lugar pueden ser diversas (Dueñas *et al.*, 2009), sin embargo se pueden señalar algunos aspectos de relevancia para crear las predicciones sobre reinvasiones. Aunque no se mencionarán a detalle, Peterson y colaboradores (2005) realizan una serie de observaciones importantes para el modelaje de estos aspectos con *Ae. aegypti* en México.

Consideración HR8A

Las poblaciones más cercanas a las del sitio donde se realiza el control poseen una mayor similitud con las que son objetivo dentro de la tecnología, la cual sería necesaria para ser exitosas colonizando los sitios en los que se realizó la liberación y reducción poblacional.

- **Incertidumbre en el conocimiento.**- La relación entre la similitud y la cercanía corresponde a marcadores

genéticos específicos y no necesariamente refleja la similitud de recursos y condiciones con la que las poblaciones sobreviven y crecen.

Nivel de Confianza: Alto

El fenómeno de reinvasión sucede y además se presenta en periodos muy cortos (3 a 5 años) y se expande a distancias kilométricas en lapsos pequeños (Kaplan *et al.*, 2010), por lo que las reinfestaciones de mosquitos representan preocupaciones para los programas epidemiológicos en las regiones donde se aplican programas de manejo vectorial.

La distancia geográfica a la que las poblaciones de *Ae aegypti* se encuentran tiene una relación con el nivel de intercambio genético y estructura poblacional que estos tienen (Gorrochotegui-Escalante *et al.*, 2002), los niveles con los que el aislamiento geográfico y genético suceden así como la relación que guardan entre ellos depende de la zona que se observe: las poblaciones de la costa sur pacífico de México parecen tener un intercambio genético constante y son genéticamente homogéneas (Gorrochotegui-Escalante *et al.*, 2000).

La manera en la que *Ae. aegypti* se transporta a lo largo del territorio mexicano no es un patrón único, las poblaciones que se encuentran a lo largo de los estados de Chiapas, Oaxaca y Guerrero parecen tener una mayor capacidad migratoria en comparación con las que se encuentran en la península de Yucatán (García-Franco, 2002), probablemente debido a los movimientos humanos asociados al comercio. Lo anterior es un caso que ejemplifica como uno de los factores involucrados en el potencial de invasión esta constreñido a la zona en la cual se realizaron los esfuerzos para disminuir las poblaciones de los insectos.

Consideración HR8B

La capacidad de poblaciones vecina de *Ae. aegypti* para recolonizar un lugar donde se estableció una reducción poblacional está relacionado con el potencial de migración que se ha observado en estos organismos (por medios propios o fuentes antropogénicas). La capacidad para desplazarse a lo largo de la zona sur-pacífico se ve reflejada en el continuo intercambio genético sucedido.

- **Incertidumbre asociada a la variabilidad.**- Las migraciones pueden suceder desde fuentes más lejanas debido a la participación de humanos en el transporte de los mosquitos por distancias superiores a las de vuelo.

Nivel de Confianza: Medio

Como se mencionó antes, la capacidad que un mosquito posee para ser infectado e infectar un virus como el dengue se debe a una serie de factores que se podrían dividir entre ambientales y genéticos. La recolonización después de una reducción poblacional implicaría cambios mínimos en los factores ambientales en los que la población se ve involucrada, y sería relevante observar las diferencias genéticas que pudieran determinar la competencia vectorial de los colonizadores en comparación con la población local extinta (Black *et al.*, 2002).

Junto a la variación genética y geográfica, *Ae. aegypti* presenta una variación en la susceptibilidad a la infección por el DENV (Wallis *et al.*, 1985; Tardieux *et al.*, 1990; Miller & Mitchell, 1991) así como otros flavivirus (Aitken *et al.*, 1977; Rosen *et al.*, 1985; Tabachnik *et al.*, 1985) que se puede relacionar con la distribución espacial de las poblaciones (Gubler *et al.*, 1979).

La habilidad que los mosquitos poseen para desplazarse (natural o artificialmente) hacia áreas donde puede sobrevivir es uno de los factores que toma relevancia cuando existen barreras que causaron el aislamiento inicial de poblaciones que ahora poseen distribuciones geográficas diferentes (Peterson, 2003). De manera intuitiva se pensaría que las poblaciones más cercanas serían las primeras en colonizar un sitio donde sucedió reducción poblacional, las cuales tendrían

un fondo genético y competencia vectorial similar pero investigaciones realizadas en México demostraron que el origen geográfico de las poblaciones no necesariamente es indicativo de la competencia vectorial (Bennet *et al*, 2002).

Lo anterior se puede deber a la actividad humana que transporta huevos, larvas o adultos en grandes distancias y puede causar que poblaciones distantes geográficamente sean similares o viceversa, por lo que se debe de tener un enfoque particular por regiones; también es de importancia mencionar que la tasa con la que suceden infecciones en los mosquitos esta controlada por mas de un gen, y la segregación independiente de los alelos responsables puede crear un gradiente de susceptibilidad en poblaciones cercanas como lejanas (Black *et al*, 2002).

<p>Consideración HR8C</p> <p>No existe una relación entre la cercanía de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> con la competencia vectorial de estas. La llegada de colonizadores puede darse desde una fuente cercana como lejana, debido a transporte antropogénico.</p> <ul style="list-style-type: none"> Incertidumbre asociada a la variabilidad.- Las fuentes de llegada de las poblaciones de msoquitos depende de condiciones sumamente específicas de la zona que se quiera describir (e.g. cercanía a puertos, carreteras, geografía). <p>Nivel de Confianza: Bajo</p>
--

Hipótesis de Riesgo HR9.

Tabla 3.9 Evaluación de exposición para la HR 9.

<p>Hipótesis de Riesgo</p> <p>HR9</p>	<p>La disminución de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> presentes en la zona permitirá la invasión y establecimiento de mosquitos de la misma especie pero de otras regiones, que son portadores de un genotipo viral que es más dañino para las poblaciones humanas.</p>
<p>Eventos o condiciones que deben suceder para que la característica novedosa genere un efecto adverso sobre los puntos finales de evaluación</p>	<p>Evaluación cualitativa de la posibilidad de que los eventos o condiciones sucedan y la consideración asociada a este estimado.</p>
<p>La liberación de los <i>Ae. aegypti</i> GM provoca una reducción de las poblaciones de esta especie presentes en el medio.</p>	<p>Posible</p> <p>Consideración HR1-0 Uno de los supuestos que se toman para hacer esta evaluación es el hecho de que la reducción poblacional lograda por la liberación de mosquitos machos fsRIDL sucede en un menor lapso de tiempo de lo que harían los métodos de control tradicionales.</p> <p>Nivel de confianza: Medio</p>
<p>Poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> viven en las zonas aledañas a la liberación y comparten características que les permitirían vivir en la zona donde se realizó una reducción poblacional</p>	<p>Posible</p> <p>Consideración HR8A Las poblaciones más cercanas a las del sitio donde se realiza el control poseen una mayor similitud con las que son objetivo dentro de la tecnología, la cual sería necesaria para ser exitosas colonizando los sitios en los que se realizó la liberación y reducción poblacional.</p> <p>Nivel de Confianza: Alto</p>
<p>Las poblaciones de mosquitos pueden migrar hacia la zona objetivo de la reducción y establecerse</p>	<p>Posible</p> <p>Consideración HR8B La capacidad de poblaciones vecinas de <i>Ae. aegypti</i> para recolonizar un lugar donde se estableció una reducción poblacional esta relacionado con el potencial de migración que se ha observado en esto organismos (por medios propios o fuentes antropogénicas). El potencial de desplazamiento a lo largo de la zona sur-pacífica se ve reflejado en el continuo</p>

	intercambio genético sucedido. Nivel de confianza: Medio
Los mosquitos que se establecen en las zonas son transmisores de serotipos o genotipos de DENV que son más dañinos para la salud humana	Posible Consideración HR9A La colonización de distintas poblaciones de mosquitos, con diferentes niveles de susceptibilidad a serotipos y genotipos específicos, puede generar la entrada de tipos virales con un mayor potencial de expansión dentro de las poblaciones de los artrópodos. Nivel de Confianza: Bajo
Estimación de la Probabilidad de Ocurrencia de la ruta de exposición:	Posible Nivel de Confianza: Medio

Como se mencionó antes, el DENV tiene cinco serotipos circulando en el mundo, la secuenciación del RNA viral permite verificar la variación que existe dentro de cada una de estas líneas y clasificarlas en grupos que son genéticamente diferentes: los genotipos (Rothman, 2009). La clasificación de dichos genotipos se subordinan a la de los serotipos por no presentar evidencias serológicas, sin embargo pueden representar distintos desenlaces clínicos y epidemiológicos (Zuckerman *et al.*, 2009).

Se ha mencionado que la gravedad de la enfermedad por una infección de DENV se debe a la reinfección con un segundo serotipo que sucede fuera del periodo de protección cruzada, sin embargo se especula sobre la virulencia de cada tipo viral. La “hipótesis de la virulencia” sugiere que existen líneas de DENV que son intrínsecamente más virulentas que otras y causan una viremia mayor en aquellos individuos infectados, la cual termina en un desarrollo más severo de la enfermedad (Weaver & Vasilakis, 2009).

Los genotipos dentro de cada serotipo se encuentran señalados en la Tabla 3.9.1, según Weaver y Vasilakis (2009).

Serotipo	Genotipo	Línea a la que representan
DENV-1	I	Sureste asiático, China y Este de África.
	II	Tailandia en 1950-1960.
	III	Selvática de Malasia.
	IV	Islas del Oeste del Pacífico y Australia.
	V	América, Oeste de África y pocas de Asia.
DENV-2	Asiático 1	Malasia y Tailandia.
	Asiático 2	Vietnam, China, Taiwán, Sri Lanka y Filipinas.
	Cosmopolita	Distribución amplia en Australia, Este y Oeste de África, Islas del Pacífico y del Océano Índico, Subcontinente Indio y Latinoamérica.
	Sureste Asiático/Americano	Tailandia, Vietnam y América 1989-2009.
	Selvático	Encontrado en humanos, mosquitos de bosque y monos centinelas en el Oeste de África y Sureste Asiático.
DENV-3	I	Indonesia, Malasia, Filipinas e Islas del Sur de Pacífico.
	II	Tailandia, Vietnam y Bangladesh.
	III	Sri Lanka, India, África Y Samoa.
	IV	Puerto Rico, Latinoamérica y Centroamérica, Tahití (1965).
DENV-4	I	Tailandia y Filipinas.
	II	Indonesia, Malasia, Tahití, el Caribe y América.

	III	Muestras Tailandesas diferentes al grupo I.
	IV	Selváticas de Malasia

La línea viral a la que cada uno de los serotipos representa se indica de acuerdo a los sitios donde se aislaron, no necesariamente a la permanencia actual en la zona. La presencia de distintos serotipos en una zona así como el recambio de estos depende de una serie de factores (e.g. movimientos de poblaciones humanas y de vectores).

La dinámica epidemiológica de los países donde se encuentra el DENV es sumamente diversa debido al gran número de factores biológicos, físicos e históricos que rodean la transmisión de este virus. A pesar de la diversidad de escenarios, se puede entender que los países endémicos tienen, de manera general, una co-circulación de múltiples serotipos y genotipos virales (Loroño-Pino *et al.*, 1999).

La situación en nuestro país es ligeramente diferente a la de los otros sitios endémicos pues la co-circulación de los distintos tipos virales no es tan evidente, de manera general sucede un continuo remplazo: un sólo serotipo domina en incidencia durante un tiempo específico y sólo en el DENV-2 se modifican los genotipos virales involucrados (Carrillo-Valenzo *et al.*, 2010).

Los virus que infectan de manera más eficiente y se diseminan más eficientemente en un hospedero invertebrado tendrán también una mejor posibilidad de ser transmitidos en los ciclos humano-mosquitos responsables de los brotes epidemiológicos (Salazar *et al.*, 2010). La relación que existe entre el fondo genético de las poblaciones de mosquitos y la capacidad de los tipos virales de dengue se ha comprobado para algunos genotipos (Bosio *et al.*, 1998; 2000; Armstrong & Rico-Hesse, 2001).

Esta susceptibilidad a distintos tipos virales puede estar ligada a la manera en la que los serotipos o genotipos se desplazan en un territorio: los movimientos de poblaciones de mosquitos pueden significar la entrada de serotipos o genotipos que presentan diferentes niveles de virulencia en las poblaciones humanas.

Consideración HR9A

La colonización de distintas poblaciones de mosquitos, con diferentes niveles de susceptibilidad a serotipos y genotipos específicos, puede promover la entrada de tipos virales con un mayor potencial de expansión dentro de las poblaciones de los artrópodos.

- **Incertidumbre asociada al conocimiento.**- No se cuenta con el registro exacto de las poblaciones de mosquitos, genotipos presentes en cada zona, ni el modelo que nos ayude a predecir los movimientos virales a nuevas zonas.
- **Incertidumbre asociada a la variabilidad.**- Se tienen caracterizados algunos marcadores moleculares que nos ayudarían a predecir la susceptibilidad de poblaciones de mosquitos a diferentes tipos virales, pero la infección y diseminación del DENV en las poblaciones de artrópodos está también asociada a otros factores.

Hipótesis de Riesgo HR10

Tabla 3.10 Evaluación de exposición para la HR 10.

Hipótesis de Riesgo HR10	La disminución de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> presentes en la zona permitirá la invasión y establecimiento de mosquitos de la misma especie pero de otras regiones, que son menos susceptibles a los métodos de control tradicionales
Eventos o condiciones que deben suceder para que la característica novedosa genere un efecto adverso sobre los puntos finales de evaluación	Evaluación de la posibilidad de que los eventos o condiciones sucedan y la consideración asociada a este estimado

<p>La liberación de los <i>Ae. aegypti</i> GM provoca una reducción de las poblaciones de esta especie presentes en el medio.</p>	<p>Posible</p> <p>Consideración HR1-0 Uno de los supuestos que se toman para hacer esta evaluación es el hecho de que la reducción poblacional lograda por la liberación de mosquitos machos fsRIDL sucede en un menor lapso de tiempo de lo que harían los métodos de control tradicionales.</p> <p>Nivel de confianza: Medio</p>
<p>Poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> viven en las zonas aledañas a la liberación y comparten características que les permitirían vivir en la zona donde se realizó una reducción poblacional</p>	<p>Posible</p> <p>Consideración HR8A</p> <p>Las poblaciones más cercanas a las del sitio donde se realiza el control poseen una mayor similitud con las que son objetivo dentro de la tecnología, la cual sería necesaria para ser exitosas colonizando los sitios en los que se realizó la liberación y reducción poblacional.</p> <p>Nivel de Confianza: Alto</p>
<p>Las poblaciones de mosquitos pueden migrar hacia la zona objetivo de la reducción y establecerse</p>	<p>Posible</p> <p>Consideración HR8B</p> <p>La capacidad de poblaciones vecinas de <i>Ae. aegypti</i> para recolonizar un lugar donde se estableció una reducción poblacional esta relacionado con el potencial de migración que se ha observado en estos organismos (por medios propios o fuentes antropogénicas). El potencial de desplazamiento a lo largo de la zona sur-pacífica se ve reflejado en el continuo intercambio genético sucedido.</p> <p>Nivel de confianza: Medio</p>
<p>Los mosquitos que se establecen en las zonas son más difíciles de controlar con los métodos actuales.</p>	<p>Posible</p> <p>Consideración HR10</p> <p>Las poblaciones de mosquitos llegan a desarrollar fenotipos resistentes a insecticidas por la presión selectiva que esto presenta. Las poblaciones humanas llegan a ejercer esta presión selectiva que aumenta la tasa con la que sucede esta disminución de susceptibilidad, el nivel de susceptibilidad depende de la genética poblacional y la intensidad de dicha presión.</p> <p>Nivel de Confianza: Bajo</p>
<p>Estimación de la Probabilidad de Ocurrencia de la ruta de exposición:</p>	<p>Posible Nivel de Confianza: Bajo</p>

Uno de los principales problemas que los programas de control vectorial han tenido es el desarrollo de resistencia en las poblaciones de mosquitos que se desean abatir. Como se mencionó antes, la principal herramienta que se ha utilizado para detener el avance de las poblaciones de mosquitos en las zonas urbanas ha sido el uso de insecticidas químicos, los cuales pueden dejar de ser efectivos cuando se les utiliza indiscriminadamente (Butler, 2011).

Existen dos mecanismos por los cuales se puede seleccionar resistencia a insecticidas químicos en *Ae. aegypti* (Lima *et al.*, 2011):

- a) Vía metabólica.- Aumenta la actividad de enzimas detoxificadoras (e.g. esterasas), junto a la acción de oxidasas (e.g. citocromo P450s) o glutatión S-transferasas (GSTs).
- b) Vía estructural.- Por modificaciones moleculares de los sitios de unión a insecticidas, como acetilcolinesterasa o puertas de canal de sodio.

Este proceso hace que algunos fenotipos de mosquitos no sean susceptibles a los compuestos que se utilizan de manera común, el cual se puede presentar en diferentes proporciones dentro de poblaciones naturales (Martins *et al.*, 2009) así como de laboratorio (Gómez *et al.*, 2011). No hay que olvidar que el desarrollo de estas resistencias está asociado a los centros humanos donde se han utilizado de manera amplia una serie de insecticidas, y la alta tasa con la que suceden se debe a la presión selectiva que no sucede fuera de estos lugares (Ponlawat *et al.*, 2005; Kamgang *et al.*, 2011).

Una base de datos en la cual se analice la distribución de poblaciones que son resistentes a insecticidas de amplio uso es de suma ayuda para conocer la posibilidad que estas tienen para migrar y acceder a zonas en las cuales existen condiciones y recursos suficientes para su establecimiento y crecimiento poblacional. Algunos programas de control vectorial nacionales poseen una extensa serie de estudios que analizan dicho fenómeno (García *et al.*, 2009), sin embargo son pocos los que se han realizado en nuestro país.

<p>Consideración HR10 Las poblaciones de mosquitos llegan a desarrollar fenotipos resistentes a insecticidas por la presión selectiva que esto presenta. Las poblaciones humanas llegan a ejercer una presión selectiva que aumenta la tasa con la que sucede esta disminución de susceptibilidad, el nivel de susceptibilidad depende de la genética poblacional y la intensidad de dicha presión.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Incertidumbre en el conocimiento.- La susceptibilidad de poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> a insecticidas está pobremente descrita. <p>Nivel de Confianza: Bajo</p>
--

Hipótesis de Riesgo HR11

Tabla 3.11 Evaluación de exposición para la HR 11.

<p>Hipótesis de Riesgo HR11</p>	<p>La disminución de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> presentes en la zona permitirá la invasión y establecimiento poblaciones de otras especies de mosquitos, los cuales son mejores transmitiendo el DENV y son vectores de otras enfermedades.</p>
<p>Eventos o condiciones que deben suceder para que la característica novedosa genere un efecto adverso sobre los puntos finales de evaluación</p>	<p>Evaluación cualitativa de la posibilidad de que los eventos o condiciones sucedan y la consideración asociada a este estimado</p>
<p>La liberación de los <i>Ae. aegypti</i> GM provoca una reducción de las poblaciones de esta especie presentes en el medio.</p>	<p>Muy Posible</p> <p>Consideración HR1-0 Uno de los supuestos que se toman para hacer esta evaluación es el hecho de que la reducción poblacional lograda por la liberación de mosquitos machos fsRIDL sucede en un menor lapso de tiempo de lo que harían los métodos de control tradicionales.</p> <p>Nivel de confianza: Medio</p>
<p><i>Ae. aegypti</i> convive en espacio y tiempo con otras especies de mosquitos que comparten recursos y condiciones.</p>	<p>Posible</p> <p>Consideración HR11A</p> <p><i>Ae. aegypti</i> es la especie vector predominante en los sitios de crianza que están asociados a las zonas altamente urbanizadas. La diversidad de vectores en el medio incrementa a medida que los criaderos se alejan de los asentamientos humanos.</p> <p>Nivel de confianza: Medio</p>
<p><i>Ae. albopictus</i> es capaz de invadir las zonas donde <i>Ae. aegypti</i> se encontraba.</p>	<p>Posible</p> <p>Consideración HR11B</p>

	<i>Ae. albopictus</i> se ha reportado en coincidencia con <i>Ae. aegypti</i> en varias zonas del país y existen experiencia donde una especie invade zonas donde la otra se encontraba. Nivel de confianza: Alto
Existen otras especies de mosquitos que son capaces de establecerse en las zonas en las que <i>Ae. aegypti</i> se encontraba y son vectores de enfermedades.	Poco Posible HR11C Consideración Aunque se tienen reportes de <i>Culex quinquefasciatus</i> en varios estados de la región, no muestran una predisposición para sobrevivir en los mismos rangos de recursos y condiciones que <i>Ae. aegypti</i> . Nivel de confianza: Medio
Estimación de la Probabilidad de Ocurrencia de la ruta de exposición:	Posible Nivel de Confianza: Medio

Cuando poblaciones de mosquitos transmisores de enfermedades modifican sus comportamientos, números, distribución o evolución de cualquier modo y pueden ocupar un sitio nuevo se les denomina vectores emergentes o resurgentes (Forattini, 1998) y dependiendo de la capacidad competitiva, una población de vectores emergentes puede crear un nicho ecológico con las condiciones y recursos que antes eran utilizados por otra especie.

La tecnología propuesta en este tipo de control se diferencia de las otras por ser especie específica, debido a que las barreras de reproducción son altamente restrictivas en los insectos no sucedería una reducción poblacional de los otros mosquitos que habitan en las condiciones y recursos que *Ae. aegypti*.

Los establecimientos urbanos tienen como característica crear un ambiente con un alto nivel de heterogeneidad, debido a que las construcciones están asociadas a una actividad particular (e.g. llantas usadas, piletas, cementerios) y las condiciones así como recursos pueden variar a unos cuantos metros de distancia (Kinzig *et al.*, 2005). La heterogeneidad del paisaje presente en el medio puede tener efectos en la diversidad de insectos presentes en los lugares donde *Ae. aegypti* se desarrolla (Chaves *et al.*, 2010), ya que la especie compartiría con otros mosquitos que son posibles vectores y que mantienen relaciones ecológicas con este.

Las especies que se encuentran relacionadas con *Ae. aegypti* dependen de muchos factores y es complicado nombrar a todos los posibles vectores que se verían influenciados por una reducción específica del mosquito blanco, sin embargo existe especial interés en especies como *Ae. albopictus* y mosquitos del género *Culex*.

La simpatria que *Ae. aegypti* tiene con otras especies de mosquitos está relacionada con la serie de recursos en los que las etapas de desarrollo se encuentran, siendo de particular interés los sitios donde suceden las etapas larvales. El nivel de urbanización segrega a las especies con las que el vector africano se encuentra presente, sin embargo parece haber un gradiente hacia las zonas de vegetación que permite la presencia de comunidades de vectores más diversas (Braks *et al.*, 2003; Rey *et al.*, 2006; Honório *et al.*, 2009).

Consideración HR11A

Ae. aegypti es la especie vector predominante en los sitios de crianza que están asociados a las zonas altamente urbanizadas. La diversidad de vectores en el medio incrementa a medida que los criaderos se alejan de los asentamientos humanos.

- **Incertidumbre en el conocimiento.**- Los sitios de crianza son diversos en cuanto a recursos y condiciones debido a la heterogeneidad del medio urbano.

Ae. albopictus es relevante debido a las similitudes ecológicas con la especie objetivo, la expansión a nivel mundial (Knudsen, 1995) y la cantidad de enfermedades de las que es vector (**Consideración HR2F**).

Ae. albopictus es un vector agresivo de mordedura diurna, con la capacidad de colonizar hábitats con contenedores de agua naturales así como artificiales, peri-domésticos, domésticos y en ambiente templados así como tropicales. El éxito de su colonización en varias regiones del mundo se atribuye a la resistencia contra la desecación que sus huevos poseen, ya que pueden ser transportados en contenedores artificiales por largas distancias (Hawley, 1988).

Se cuenta con información sobre la presencia de *Ae. albopictus* en varios estados del país (Ponce *et al*, 2004), aunque el nivel de infestación en cada una de las zonas no se conoce con certeza. A pesar de lo anterior se tienen registros en los que el mosquito asiático ha desplazado temporal o definitivamente a las poblaciones de *Ae. aegypti* y creado un nicho donde se pensaba solo existía este último (Kaplan, 2010).

Aunque ambas especies comparten espacialmente algunas regiones, cada una tiene preferencia por sitios en función de la cercanía a los humanos, el nivel de vegetación, desarrollo de las poblaciones, entre muchos otros factores (Hornby *et al*, 1994; Braks *et al*, 2003).

Consideración HR11B

Ae. albopictus se ha reportado en coincidencia con *Ae. aegypti* en varias zonas del país y existen experiencia donde una especie invade zonas donde la otra se encontraba.

- **Incertidumbre en el conocimiento.**- Es complicado generar predicciones sobre esta hipótesis cuando no se conocen las condiciones locales donde se aplicaría la tecnología. Aunado a la falta de conocimiento que se menciona en la HR2.

Además de los mosquitos del genero *Aedes*, *Culex* es un grupo de estos vectores de importancia epidemiológica pues es capaz de transmitir un gran número de patógenos (Newman *et al.*, 2011). De especial interés es *Culex quinquefasciatus* debido a su distribución en zonas urbanas (Frankie, 1978) y, aunque se acepta que los recursos y condiciones que ambos explotan son diferentes, se les puede hallar en sitios comunes durante sus etapas larvarias (Calderón-Arguedas *et al.*, 2009; Troyo *et al*, 2008).

Culex quinquefasciatus es un mosquito de distribución cosmopolita, aunque se le encuentra con mayor frecuencia en áreas tropicales y subtropicales en asociación con establecimientos humanos. Las hembras adultas ovopositan en cuerpos grandes de agua con alto contenido de materia en descomposición aunque las larvas también se pueden encontrar en contenedores artificiales (David *et al.*, 2012).

Es considerado como el mejor vector del virus de la Encefalitis de San Luis y del virus del Oeste del Nilo (Sardelis *et al.*, 2001). Este último se ha aislado en regiones del norte y sureste del país desde la década pasada, aunque su asociación vectorial no se ha demostrado del todo (Ramos & Falcón-Lezama, 2004). La distribución exacta de *Cx. quinquefasciatus* en nuestro país es desconocida, teniendo reportes en los estados ubicados en el norte del país (de la Mora-Covarrubias *et al.*, 2008) y en la península de Yucatán (García-Rejón *et al.*, 2008), aunque se presume su presencia en otros estados del sur, este y sureste de México.

La cercanía ecológica y aprovechamiento de recursos entre *C. quinquefasciens* y *Ae. aegypti* se ha estudiado poco, sin embargo parece ser que estos insectos no son fuertes competidores y explotan recursos y condiciones fuera del nicho de la especie objetivo, sin embargo es necesario mencionar que se trata de una especie oportunista y que su vigilancia no debe descuidarse (Leyva *et al*, 2012).

Consideración HR11C

Aunque se tienen reportes de *C. quinquefasciatus* en varios estados de la región, no muestran una predisposición para sobrevivir en los mismos rangos de recursos y condiciones que *Ae. aegypti*.

Incertidumbre en los hechos.- Se han reportado ambas especies sucediendo en el mismo espacio físico y temporal.

Incertidumbre en el conocimiento.- No se conoce del todo el posible traslape en los rangos de recursos y condiciones en los que las poblaciones de ambas especies pueden sobrevivir y aumentar en número.

Incertidumbre en la variabilidad.- No se puede hablar de *C. quinquefasciens* como “ente único” y cada una de las poblaciones se puede estudiar de manera individual en función de los recursos y condiciones que aprovechan.

3.2.2) Caracterización de las consecuencias

Una vez que se han caracterizado las rutas hacia un efecto adverso en forma de HR y se determinó cual es la posibilidad para que estas sucedan, es necesario caracterizar las consecuencias de los desenlaces planteados. La evaluación de consecuencias parte de dos preguntas: ¿Representa el escenario planteado por la HR un problema? y ¿Qué tan seria es la magnitud de la consecuencias? (OGTR, 2014).

La caracterización de las consecuencias esta ligada no solo a los PFE, sino a los servicios que estos nos proporcionan: la incidencia en la transmisión de un virus así como sus diferentes desenlaces tienen poco sentido de ser estudiados en esta sección a menos que se entienda la carga para la sociedad que estos aspectos representan (*e.g.* costo de medicamentos, tratamientos, ausentismo en las labores cotidianas).

Debido a lo anterior es importante comprender que se trata de una tarea complicada pues no existe un tabulador único que permita asignar magnitudes equivalentes cuando se trata de salud humana, estabilidad ecológica o servicios ecosistémicos. Aunque se trate de una labor complicada, existen algunas sugerencias para poder caracterizar de manera objetiva la magnitud de las consecuencias.

Para la OGTR (2014), la evaluación de un potencial efecto adverso debe tener en cuenta las siguientes consideraciones básicas:

- a) La severidad de la consecuencia.- esto responde a la magnitud con la que se vieron modificadas las propiedades que son deseables de mantener (de manera estática o por la dinámica que poseían antes del efecto adverso). *E.g.* Duplicación en el número de casos de dengue, pérdida de diversidad β .
- b) La extensión espacial con la que sucede el impacto. *E.g.* Aumento en el número de casos de DHF en una población de tres municipios, pérdida de la biodiversidad de artrópodos en las piletas de cemento de un cementerio.
- c) La extensión temporal en la que sucede el impacto.- esta no sólo esta dada por la duración de un potencial efecto adverso sino también por la frecuencia con la que esta sucede. *E.g.* Mayor duración de la temporada con la que los picos de contagios por el virus sucede, número de contagios que una persona sufre durante una misma temporada.

- d) Los potenciales efectos adversos acumulativos.- son aquellos que no repercuten en la actividad a realizar sino también suman a las que se realizaban de manera previa o regular. *E.g.* Incapacidad para utilizar los métodos de nebulización durante los periodos de liberación.
- e) Reversibilidad del potencial efecto adverso.- cuanto tiempo e inversión de recursos representaría recobrar las condiciones o dinámicas previas del sistema donde se trabaja después de un impacto adverso. *E.g.* Se deben de integrar proyectos de restauración y conservación para las poblaciones de murciélagos, uso nebulización con agentes químicos tóxicos para reducir el número de mosquitos en el ambiente.

La creación de escalas que combinen las consideraciones antes mencionadas parecería ser un proceso “hecho a la medida” para cada una de las hipótesis de riesgo creadas en la evaluación previa. La que se utiliza contempla cada uno de los factores contemplados y les califica como: Insignificantes, Menores, Intermedios y Altos (OGTR, 2014).

Mucha de esta “ponderación discrecional” se debe a que cada uno de los proyectos que involucran la liberación de la tecnología OGM estará adscrito a diferentes localidades, poblaciones objetivo, poblaciones humanas y responderá a diferentes necesidades y objetivos. A pesar de lo anterior se pueden generar algunas conclusiones a partir de este ejercicio hipotético sobre las probables consecuencias:

Consecuencia de la HR1.- La reducción de las poblaciones de *Ae. aegypti* en el medio acuático, y los efectos densodependientes asociados a esta, modifican características del desarrollo de los mosquitos que les hacen mejores vectores de DENV.

Se trata de las mismas poblaciones de mosquitos participando en una dinámica diferente de desarrollo, las cuales implican efectos densodependientes sobre algunas de las características que influyen la capacidad de las hembras para poder participar de los eventos necesarios en el contagio a humanos.

Esta dinámica sucede en cada uno de los recipientes donde los estadios larvales suceden debido a que no existe una clara conexión entre un recipiente artificial y otro. Aunque las lluvias y movimientos de agua por humanos podrían transportar larvas de un contenedor a otro, se supone que los sitios de crianza son artificiales y efímeros.

Los efectos densodependientes y su relación con el desarrollo de los mosquitos está demostrado (**Consideración HR1A**), sin embargo se desconoce la relación exacta entre las densidades y aquellas características involucradas en la capacidad para transmitir un patógeno.

Para poder determinar las consecuencias de tener mosquitos que se desarrollan en sitios con menores densidades larvales se necesita conocer cuál es la tasa de reducción poblacional y su impacto sobre los elementos asociados a la capacidad para ser vectores de algún patógeno, así como las implicaciones que lo anterior tiene en la incidencia y transmisión de las enfermedades. Ambas implicaciones son desconocidas y los modelos disponibles no han mostrado ser útiles para generar predicciones en *Ae.aegypti* (Fernández-Salas & Florez-Leal, 1995; Jansen & Beebe, 2010), es posible que se necesiten generar datos particulares en las zonas donde se desea liberar.

La consecuencia de este fenómeno está ligada con los tipos de criaderos que se presenten en la zona. La heterogeneidad de contenedores de agua provee una variedad de recursos y condiciones a las diferentes poblaciones de mosquitos que ahí se desarrollan, y el impacto que tiene el hacinamiento en los mosquitos está asociado a la cantidad de recursos presentes en los sitios de

crianza (Arrivillaga & Barrera, 2004). La duración, profundidad (Barrera *et al.*, 2006), salinidad (Clark *et al.*, 2004) y temperatura (Mohammed & Chadee, 2011) de los contenedores son condiciones asociadas con la talla que los mosquitos presentan durante el desarrollo larval y etapas adultas potencialmente infectivas.

Es importante mencionar que la tecnología no parece tener implicaciones en ninguna de las condiciones y recursos antes mencionadas, aunque la disponibilidad de recursos será mayor debido a la baja en densidades larvales, y el genotipo de aquellas hembras que no son producto de una cruce en la que participaron machos con el constructo letal será el mismo. Debido a lo anterior, el efecto de las reducción en densidades larvales se espera sea poco, aunque no se conoce del todo cuál es la participación de cada uno de los factores presentes en un cuerpo de agua que sirve como criadero.

La estimación de la consecuencia se genera a partir del comparador, para conocer el nivel del impacto que la reducción de poblaciones genera es necesario tener la información base sobre las campañas de control vectorial cuando se utilizan métodos convencionales. Comparar la dinámica de reducción con ambos métodos es sin duda una útil herramienta para dimensionar el impacto de la tecnología genética.

Incertidumbre en el conocimiento.- Se desconoce el nivel de impacto que cada uno de los factores (recursos y condiciones) tiene sobre la talla de mosquitos, así como de los efectos que esto pudiera tener sobre la capacidad de los mosquitos para ser vectores del dengue. Tampoco está aclarada la diferencia entre los métodos convencionales de control y el control por el sistema fsRIDL en lo que refiere a la dinámica de reducción de poblaciones vectoriales.

Tabla 3.2.1 Estimación del nivel de consecuencia. Se establece y justifica el nivel de consecuencias de la HR 1.

Aspecto	Nivel	Incertidumbre	Justificación
La severidad de la consecuencia	Menor	Media	Los mosquitos hembras sin el constructo letal poseen el mismo fondo genético y se desarrollan en condiciones y recursos similares en etapas previas y subsecuentes a la aplicación de la tecnología. Los métodos convencionales de control vectorial promueven una reducción poblacional que resulta en efectos densodependientes sobre el tamaño de los mosquitos, en mayores lapsos de tiempo
La extensión espacial con la que sucede el impacto	Desconocido	Alta	Esta consideración dependerá de la cantidad de mosquitos a ser liberada, de acuerdo a la proporción necesaria en relación con los silvetres. La extensión del fenómeno esta focalizada a cada criadero, los cuales son heterogéneos en el medio urbano.
La extensión temporal en la que sucede el impacto	Desconocido	Alta	Para estimar este parámetro es necesario tener el modelo de transmisión, el número de generaciones y la tasa con la que sucederían los efectos densodependientes.
Los potenciales efectos adversos acumulativos	Intermedio	Media	Necesario retirar los otros tipos de control (de ser necesario para la generación de datos).
No reversibilidad del potencial efecto adverso	Menor	Baja	No existiría un gran efecto pues solo basta con dejar de aplicar la tecnología para que las poblaciones regresaran a su nivel y dinámica basal.
Evaluación Global de la Consecuencia	Menor	Media	El desarrollo no adulto de <i>Ae. aegypti</i> está dado por un gran número de factores que no se verían afectados por la tecnología fsRIDL en comparación con los métodos de control vectorial convencionales, aunque la densidad larval y los efectos en su variación deben de ser tomados en cuenta.

			La capacidad para ser vectores obedece a muchos factores, entre ellos genéticos, y el papel de cada uno de estos aún no se encuentra determinado.
--	--	--	---

Consecuencia de la HR2.- La disminución de las poblaciones de *Ae. aegypti* modifica la dinámica de competencia con las poblaciones de *Ae. albopictus* y los individuos de la especie asiática se desarrollan como mejor vectores del DENV.

El análisis de esta consecuencia podría ser similar a la Consecuencia de la HR1, sin embargo los efectos densodependientes no operan exactamente igual en ambas especies de mosquitos y la extensión temporal con la sucede este impacto está adscrita a la biología de *Ae. albopictus*. Sin embargo sigue vigente la consideración en la que el mosquito asiático y su aumento en la capacidad de transmitir dengue no está influenciada por un componente genético pues no se considera la invasión de nuevas poblaciones de estos si no cambios en el desarrollo de las existentes.

Uno de los motivos por los cuales puede resultar de preocupación la presencia en mayor o menor proporción de las especies involucradas en esta hipótesis de riesgo reside en el hecho de que la capacidad para ser infectados y el comportamiento de cada una no es el mismo. Lima-Camara (2010) realizó una extensiva revisión de las diferencias que existen en los ciclos circadianos de ambas especies en diferentes etapas fisiológicas así como en condiciones artificiales y de laboratorio, que además están involucrados en la transmisión de patógenos.

En los estudios mencionados se analizan factores directamente relacionados con la capacidad de los mosquitos vectores para transmitir alguna enfermedad, tales como las horas pico en las cuales se realizan las mordidas a humanos o biorritmos de picadura (Trpis *et al.*, 1973; Almeida *et al.*, 2005; Delatte *et al.*, 2010) o periodos de mayor ovoposición (Trexler *et al.*, 1996; Gomes *et al.*, 2006). Las horas con las que suceden estos fenómenos son de suma importancia pues pueden llegar a coincidir o sincronizarse con actividades humanas que pongan en riesgo de contagio a las poblaciones humanas, como inicios de jornadas o entrada a escuelas (Fernández, 2009).

Ambos mosquitos tienen un biorritmo de picadura diurno y suelen morder con mayor intensidad en los periodos de amanecer y atardecer (Lima-Cámara, 2010), aunque existen algunas variaciones en la áreas con luz eléctrica (Chadee & Martinez, 2000), probablemente debido a diferencias en la fotosensibilidad (Kawada *et al.*, 2005).

Los biorritmos previamente descritos son aproximados pero es necesario entenderlos en el contexto donde las poblaciones se desarrollan. Las conductas de picadura están influenciados no solo por la cantidad y tipo de luz a las que los mosquitos están expuestos sino que también obedecen a aspectos endógenos (Klowden, 1996), la disponibilidad de organismos de los cuales alimentarse (Lima-Cámara, 2010) o las temporadas de sequia y lluvia presentes (Atmosoedjono *et al.*, 1972).

Otra diferencia importante entre estas dos especies es la preferencia de algunos medios para alimentarse, mientras que *Ae. albopictus* se alimenta y cría en el exterior de las viviendas donde se alimenta principalmente de sangre de humanos y mamíferos domésticos (aunque puede presentar ingestas oportunista de otros animales) (Richards, 2006); *Ae. aegypti* presenta una preferencia por el interior de las casas y zonas peridomésticas con una alta proporción de ingestas de sangre humana (Casas-Martinez *et al.*, 2013).

El comportamiento exofílico o endofílico de las dos especies toma importancia en la distribución de estas a lo largo del gradiente de urbanización que representan los establecimientos humanos. La especie africana presenta una mayor distribución en cercanía a los humanos y parece tener una ventaja de desarrollo en zonas urbanas (Paupy *et al.*, 2009), pero en el gradiente hacia regiones rurales o selváticas se diluye este establecimiento y aumenta la proporción de *Ae. albopictus* ocupando contenedores (Braks *et al.*, 2003).

Ae. albopictus tendría un mayor impacto sobre la salud humana que *Ae. aegypti* en zonas rurales o semirurales donde los ritmos de picadura fueran diferentes a los de la especie africana y coincidieran con aquellos de actividad humana.

El mosquito asiático es además transmisor de por lo menos otros 23 patógenos y, aunque su capacidad para transmitir DENV se ha analizado (menor que *Ae. aegypti*; Consideración HR2D) junto con la de otros virus, aún se desconoce este parámetro para muchos otros patógenos de importancia médica y veterinaria (Consideración HR2F).

Incertidumbre en el conocimiento.- El nivel con el que las poblaciones humanas se verían afectadas depende de la cercanía y tipo de asentamientos humanos del sitio en el que se plantea la reducción de mosquitos: *Ae. albopictus* tienen una menor presencia a medida que aumenta el nivel de urbanización. Los efectos densodependientes en las poblaciones de *Ae. Albopictus* podrían no ser iguales que en *Ae. aegypti*, en función de su capacidad como vectores de patógenos.

Tabla 3.2.2 Estimación del nivel de consecuencia. Se establece y justifica el nivel de consecuencias de la HR 2.

Aspecto	Nivel	Incertidumbre	Justificación
La severidad de la consecuencia	Intermedio	Media	Las poblaciones de <i>Ae. albopictus</i> poseen el mismo fondo genético, el cual tiene un gran peso en la capacidad para infectarse, diseminar y transmitir el DENV. A pesar de lo anterior se trata de organismos que transmiten otra serie de enfermedades y se trata de una región donde el medio rural es extenso y podría establecerse fácilmente. El nivel de afectación depende de características asociadas al nivel de urbanización en el sitio. Se desconoce cual sea la relación de este componente con el resto de enfermedades de las que es transmisor.
La extensión espacial con la que sucede el impacto	Desconocido	Alta	Esta consideración dependerá de la extensión de mosquitos a ser liberada. La extensión del fenómeno esta focalizada a cada criadero, los cuales son heterogéneos en el medio urbano.
La extensión temporal en la que sucede el impacto	Desconocido	Alta	Para estimar este parámetro es necesario tener el modelo de transmisión, el número de generaciones y la tasa con la que sucederían los efectos densodependientes (diferente a <i>Ae. aegypti</i>)
Los potenciales efectos adversos acumulativos	Intermedio	Media	Necesario retirar los otros tipos de control, en caso de tener métodos convencional de control vectorial se podrían tener señales cruzadas sobre la efectividad de control vectorial.
No reversibilidad del potencial efecto adverso	Intermedio	Media	Basta con dejar de aplicar la tecnología para que las poblaciones regresaran a su nivel y dinámica basal, aunque puede ser que suceda colonización de la especie asiática de manera definitiva (analizada en la HR11).
Evaluación Global de la Consecuencia	Intermedio	Alta	Las modificaciones sobre las poblaciones de <i>Ae. albopictus</i> están asociadas al desarrollo de características que están dadas por el medio en el que las etapas larvales crecen, el componente genético se mantiene estable por tratarse de las mismas poblaciones.

			Aún se desconoce cuál es el papel de cada una de estas características en la capacidad de las poblaciones de la especie asiática para ser vectores de DENV y otras enfermedades.
--	--	--	--

Consecuencia de la HR3.- La tasa con la que sucede la disminución poblacional puede disminuir la frecuencia con la que suceden los contagios con diferentes serotipos de DENV y aumentar el número de desenlaces letales debido al potenciamiento dependiente de anticuerpos (ADE).

Definir la incidencia de la infección por dengue muchas veces no es suficiente para poder entender el impacto que logra sobre las poblaciones humanas, para poder comprender esta carga se deben también explorar los diferentes escenarios en los que dichas infecciones terminan. La severidad con la que la enfermedad se desarrolla puede clasificarse en tres categorías: fiebre por dengue, dengue hemorrágico y síndrome de choque por dengue, cada una de estas posee implicaciones propias.

Las formas febriles normalmente se tratan de manera ambulatoria o desde casa, sucediendo incluso infecciones asintomáticas, pero las complicaciones en la infección (DHF y DSS) representan un enorme impacto en los sistemas de salud pública para los países y las economías familiares (Suaya *et al.*, 2007). La determinación de este impacto juega un enorme papel para moldear las decisiones que se toman con respecto a la enfermedad, aunque muchas veces es complicada de realizar.

Una de las maneras para calcular el impacto del dengue en la sociedad (junto a muchas otras enfermedades) son los DALYs. Estas unidades calculan la distancia que existe entre el estado ideal de salud en una población sana y libre de enfermedades y el estado que sucede debido a una aflicción (OMS, 2014), tienen la ventaja de ser utilizados ampliamente y tomar en cuenta factores más allá del número de infecciones y muertes. Además de ser utilizados en otras enfermedades, estos estimados han servido en una serie de estudios para ilustrar la carga económica y social particular del dengue (Meltzer *et al.*, 1998; Clark *et al.*, 2005).

En el fenómeno del ADE sucede una baja en el número de contagios por DENV seguida por una epidemia en donde aumenta el número de desenlaces críticos. Aunque estos estallidos epidémicos pueden suceder en otras circunstancias, el ADE se caracteriza por ser el resultado de la circulación de un serotipo diferente al que caracterizaba los contagios en las épocas de baja incidencia (Thammapalo *et al.*, 2008). Por lo anterior es de suponer que el marco de referencia no es el periodo sin enfermedad sino la dinámica epidémica que sucede cuando sólo un serotipo circula, con los métodos de control convencionales asociados a este.

Los casos de DF, DSS y DHF tienen impactos diferentes y la comparación de escenarios epidemiológicos es una tarea complicada, sin embargo se pueden aplicar algunos modelos en los que se utilizan DALYs para ejemplificar la carga de una epidemia con casos agudos contra una incidencia regular de casos de DF (Clark *et al.*, 2005).

El ADE es un fenómeno no del todo descrito y los análisis sobre las consecuencias no son más que especulaciones, sin embargo existen algunas experiencias internacionales en las que se adjudican periodos epidémicos a este fenómeno que pueden servir como fuente de información.

La ciudad de Delhi, en la India, tiene una historia de epidemias documentada desde hace más de 30 años. Aunque habían existido algunos casos de DHF en 1988, no fue sino hasta 1996 que se registró su primer estallido epidemiológico con la forma aguda de la infección con 8,900 casos y una mortalidad del 4.2% (Dar *et al.*, 1999). Cerca de 15 años después sucedió otra epidemia de

DHF, pero esta vez estaba acompañado por la aparición del DENV-3 en el territorio (Dash *et al.*, 2005) y se sospecha la acción del ADE en el aumento repentino de los casos agudos de la enfermedad (Dash *et al.*, 2006). A pesar de la epidemia y el nuevo escenario planteado, la proporción de casos mortales no aumento notablemente aún en la presencia de DENV1-4: teniendo mortalidad del 4.14% en 2003, 4.9% en 2004 y 3.6% en 2005 (Gupta *et al.*, 2006).

Casos como el de India son una buena herramienta para comparar la dinámica regular de transmisión y aquella asociada al ADE, determinar las consecuencias no en función de un escenario libre de transmisión sino aquel en el cual se aplican (de ser el caso) los métodos de control convencionales.

Incertidumbre asociada al conocimiento.- No se tienen esclarecida la aplicabilidad de los modelos de ADE, difícil comparar muchos desenlaces no tan graves o subclínicos (DF) contra un aumento en el número de complicaciones que pudieran ser mortales (DHF/DSS).

Tabla 3.2.3 Estimación del nivel de consecuencia. Se establece y justifica el nivel de consecuencias de la HR 3.

Aspecto	Nivel	Incertidumbre	Justificación
La severidad de la consecuencia	Intermedio	Media	El número de casos de DHF y DSS podría aumentar, sin embargo no parece haber una relación particular del ADE con los desenlaces mortales.
La extensión espacial con la que sucede el impacto	Desconocido	Alta	Depende de la extensión en la que se reduzca la frecuencia de contagios, la cual no necesariamente está asociada a la reducción poblacional de mosquitos.
La extensión temporal en la que sucede el impacto	Desconocido	Alta	Asociado a los periodos epidemiológicos con los que circulan los serotipos y suceden los contagios. Los cuales muchas veces no están descritos.
Los potenciales efectos adversos acumulativos	Marginal	Baja	No parece haber relación con cualquier otra práctica que disminuya la frecuencia con la que suceden los contagios.
No reversibilidad del potencial efecto adverso	Menor	Baja	Las campañas de salud que han fracasado son un buen testimonio del aumento en la frecuencia de contagios cuando se abandona un método de control vectorial, aunque no se conoce del todo la tasa con la que sucedería esto y su impacto en los casos de ADE.
Evaluación Global de la Consecuencia	Menor	Media	Aunque existen evidencias en el trabajo de laboratorio, aún no se determina la relación entre el número de desenlaces mortales y frecuencia de contagios para el DENV. Se desconocen el papel del ADE en las epidemias por este virus.

Consecuencia de la HR4.- La presencia de tetraciclina en el medio hará que las crías portadoras del alelo letal dominante sean viables hasta la etapa adulta y se incremente la población de mosquitos de *Ae. aegypti* en el medio.

Debido a los altos niveles de reproducción de los insectos, asociados a la cuantiosa ovoposición y un tiempo generacional corto, es de esperarse que el crecimiento de una población sea exponencial aún con alta mortalidad. A pesar de lo anterior, la expectativa de que los número y densidades de estos tengan un aumento indefinido difícilmente sucede en la realidad debido a los muchos factores bióticos y abióticos asociados al crecimiento poblacional (Gullan & Cranston. 2010).

Para generar la predicción sobre el efectos que tendría una liberación de mosquitos machos en el ambiente sobre la salud humana es necesario conocer varios aspectos, como la capacidad para copular e inseminar hembras que estos mosquitos tienen, el número de hembras presentes en el medio que pueden resultar embarazadas por la cópula y el número de crías que son ovopositadas.

Una de las etapas críticas en el desarrollo de tecnologías de mosquitos GM es la investigación en cambios sobre la adaptación y comportamiento que puedan afectar la compatibilidad que estos tienen con el ambiente en donde se pretenden liberar, así como la competencia que estos tienen con mosquitos de la misma y distinta especie (Facchinelli *et al.*, 2011).

Gracias a esta necesidad es que se cuentan con información sobre la capacidad que los machos liberados tienen para copular y llevar sus genes a las siguientes generaciones (Facchinelli *et al.*, 2013), aunque el enfoque con el que fueron construidos no explora la falla de la tecnología sino el éxito para reducir las poblaciones. A pesar de que los modelos mencionados sirvan como herramienta auxiliar, no se cuenta con un modelo que suponga el aumento poblacional debido a las migraciones de mosquitos no GM.

Conociendo el éxito para reproducirse se pueden crear predicciones sobre el número de mosquitos en las siguientes generaciones que resultarán de las cópulas debido a las liberaciones de mosquitos GM (Robert *et al.*, 2013) y así estimar la participación que estos puedan tener en un hipotético crecimiento poblacional. Las consideraciones contenidas en esta caracterización aplican a la ausencia de esterilidad de los mosquitos, ya sea por tetraciclina en el medio (HR4) o por la pérdida de efectividad del constructo asociado a fenómenos moleculares (HR5).

La cantidad de machos y hembras en las especies donde se tienen dimorfismo sexual es importante para el crecimiento y viabilidad de las poblaciones (Jenouvier *et al.*, 2010) y la modificación de este cociente sexual tiene implicaciones sobre la dinámica y estructura de estas (Emlen & Oring, 1977). La liberación masiva de mosquitos machos distorsionaría el cociente con el que las poblaciones suceden normalmente (aunque no siempre caracterizados) y pueden participar de la tasa con la que las densidades de mosquitos crece en las siguiente generaciones.

La combinación del conocimiento de la capacidad para copular de los machos que han sido liberados y son estériles, junto al número de ellos que realmente se aparearía con hembras debido a las proporciones sexuales es de gran ayuda para determinar el impacto de estas liberaciones sobre la ovoposición. Es de importancia tomar en cuenta que un porcentaje de las hembras tienen la capacidad para aparearse con más de un macho y esto puede modificar las predicciones (Helinski *et al.*, 2012).

La implantación de los huevos en parches es sólo una parte del camino que los mosquitos pasan hasta la adultez, la dinámica de desarrollo es diferente en los ambientes acuáticos y terrestres por una serie de componentes que ambos escenarios no comparten.

Las poblaciones de los estadios inmaduros para *Ae. aegypti* están sujetas a una serie de constricciones que les permiten sobrevivir hasta el estado adulto, en donde pueden fungir como vectores (Knox *et al.*, 2010). Los motivos por los cuales una población no crece de manera indefinida pueden estar dados por muchos factores sin embargo, la cantidad de organismos que pueden crecer en el medio en un periodo determinado (capacidad de carga) está muchas veces determinada por los recursos y condiciones que ahí se encuentran (Miller & Spoolman, 2014).

Los tipos de hábitat que *Aedes* escoge para realizar la ovoposición pueden ser de muchos tipos (Dom *et al.*, 2013) pero comparten una serie de características y limitantes, los pulsos y la cantidad

de nutrientes en el medio no son demasiados a lo largo de las temporadas y el agua presente depende de las lluvias y el nivel de desecación que suceda en el sitio (Trpis & Hausermann, 1986).

Los factores que se han encontrado tienen una enorme relación con el crecimiento de las poblaciones de mosquitos en etapas larvales son la temperatura (Monteiro *et al.*, 2007), el contenido de alimento en el medio (Arrivillaga & Barrera, 2004), las densidades larvales (Smith *et al.*, 2012) así como el contenido de agua en los contenedores (naturales y artificiales) (Sota & Mogi, 1992). Todos estos factores pueden tener un impacto tan fuerte como para favorecer el crecimiento de aquellas poblaciones que poseen una mayor capacidad para prolongar el desarrollo, sobrevivir en condiciones de hacinamiento o a la desecación (Juliano *et al.*, 2002).

Un mayor número de mosquitos machos en el ambiente pueden aumentar el número de cópulas que suceden y también resultar en un número mayor hembras. Aunque la tecnología está diseñada para no permitir la supervivencia de vectores potenciales, podría suceder un aumento asociado a un medio rico en tetraciclina. El escenario anterior sólo sería posible si el medio tiene recursos y condiciones suficientes para este nuevo ritmo de crecimiento poblacional, lo cual depende de la capacidad de carga del medio.

Una de las maneras para comprender cómo es que las poblaciones de mosquitos crecerían, es cotejar las principales limitantes para el crecimiento de las poblaciones con la capacidad de carga que poseen los potenciales sitios de crianza. Es una tarea difícil debido a la heterogeneidad del medio urbano, ya que los recursos y condiciones que cada establecimiento humano puede proveer no son constantes; a pesar de esta complicación, se puede aproximar con estudios como el de Smith y colaboradores (2013).

Debido a las preferencias de crianza de *Ae. aegypti* y el efecto que tienen las condiciones del sitio donde las etapas larvales suceden, sería intuitivo pensar que la mayor influencia sobre el crecimiento de las poblaciones no se encuentra dado por el número de adultos en el medio sino por la variación de las condiciones y recursos en un medio donde los flujos de energía son limitados.

Como se ha mencionado en repetidas ocasiones en el documento, aún se desconoce el papel de cada uno de los factores involucrados en la transmisión de la enfermedad y las especulaciones sobre el resultado de un aumento en el número de vectores debe de ser tomado con mucho cuidado (Scott & Morrison, 2003). Este último enlace causal entre la liberación de machos viables y el aumento en la incidencia de enfermedades vectoriales es, probablemente, el más complicado de lograr.

Tabla 3.2.4 Estimación del nivel de consecuencia. Se establece y justifica el nivel de consecuencias de la HR 4.

Aspecto	Nivel	Incertidumbre	Justificación
La severidad de la consecuencia	Intermedio	Media	El crecimiento de las poblaciones de mosquitos se encontraría asociada a la capacidad de carga que el medio tiene, aunque el número de machos es también un factor a tener en cuenta. Se desconoce el papel exacto que un aumento poblacional pueda tener sobre el nivel de transmisión de la enfermedad.
La extensión espacial con la que sucede el impacto	Desconocida	Alta	Depende del alcance de la liberación, la presencia de tetraciclina en el medio y la capacidad de carga del medio con las nuevas densidades poblacionales
La extensión	Intermedio	Media	Se asume que la capacidad de carga del medio es el factor principal

temporal en la que sucede el impacto			para que la densidad de mosquitos se mantenga y que esta se encuentra agotada con las poblaciones actuales. Por lo anterior no podría sostener un aumento poblacional por muchas generaciones (las cuales son cortas).
Los potenciales efectos adversos acumulativos	Intermedio	Alta	Si se dejan de utilizar los otros tipos de control vectorial se podrían modificar las fuerzas que constriñen el crecimiento poblacional de los mosquitos.
No reversibilidad del potencial efecto adverso	Menor	Media	Si la capacidad de carga del medio se ha alcanzado se espera que los números de mosquitos en el medio disminuyan una vez que las liberaciones acaben.
Evaluación Global de la Consecuencia	Intermedio	Media	La capacidad de carga en el medio es un factor importante para predecir un aumento poblacional de los mosquitos en caso de que las cópulas con insectos GM dieran como resultado a crías viables. Un mayor número de machos no significa un aumento en las poblaciones de vectores en el medio, la relación no se encuentra descrita del todo.

Consecuencia de la HR5.- La movilización del constructo transgénico debido a los elementos de transposición endógenos y exógenos hará que la liberación masiva de mosquitos resulte en un aumento de las poblaciones de *Ae. aegypti*.

Las consideraciones para caracterizar esta sección son muy similares a las mencionadas en la Consecuencia de la HR4, sin embargo no dependen de la presencia de tetraciclina sino de la tasa con la que suceden los fenómenos moleculares por los cuales se pierde la efectividad del constructo.

En caso de que se liberen mosquitos que poseen el contexto genético para silenciar a los genes responsables de esta tecnología, serían individuos viables y con capacidad de transmitir esta característica “silenciadora” a su progenie. Bajo este esquema tenemos un mosquito que es viable dentro de una población de millones de mosquitos a ser liberados, contra los cuales competirá por aparearse con las hembras que se encuentran en el medio.

Aquellos mosquitos con el contexto genómico para el silenciamiento pueden poseer una ventaja selectiva enorme con respecto al resto de la población, debido a que las generaciones que sean susceptibles al control genético no tienen oportunidad de sobrevivir (Hedrick, 2011). A pesar de que este escenario es posible, no se tienen indicios que permitan esclarecer la fuente del silenciamiento (el mecanismo genético hipotético) y resulta imposible especular al respecto.

Otro escenario posible es la liberación de poblaciones de mosquitos con un gran porcentaje de mosquitos viables, lo cual se podría deber a la acumulación de un enorme número de eventos individuales de silenciamiento o por coalescencia (Hedrick, 2011) hacia un mosquito con el contexto genético seleccionado para la crianza previa a las liberaciones (los cuales serían evidentes desde el desarrollo de la tecnología).

En caso de que la característica se fijara en las poblaciones de mosquitos de la zona, significaría en la pérdida de efectividad tecnológica, situación que no contribuye al riesgo, pues es un método de control vectorial que no era utilizado con anterioridad y bastaría con regresar a las medidas de control convencionales.

Incertidumbre en el conocimiento.- El evento por el cual sucedería un silenciamiento del transgén se dará por fuentes que resultan complicadas de caracterizar, sin embargo es necesario comprender el número de individuos en los que este podría suceder. Conocer el porcentaje de mosquitos en el que sucede el silenciamiento puede ser un factor a tomar en cuenta para determinar la ventaja adaptativa que necesitaría para ser fijada en la población.

Tabla 3.2.5 Estimación del nivel de consecuencia. Se establece y justifica el nivel de consecuencias de la HR 5.

Aspecto	Nivel	Incertidumbre	Justificación
La severidad de la consecuencia	Menor	Media	Un contexto genético asociado al silenciamiento de la tecnología sucedería a nivel de los individuos y su fijación en las poblaciones es sumamente improbable. La fijación implicaría en la pérdida de efectividad de la tecnología pero no contribuye en la formación de poblaciones de mosquitos con mayor capacidad para transmitir el DENV, aunque el aumento en el número de aplicaciones de insecticidas (de ser necesario) para abatir esta creciente poblacional podría aumentar la la severidad de las consecuencias.
La extensión espacial con la que sucede el impacto	Desconocido	Alta	Depende del alcance de la liberación, la tasa con la que los constructos de la tecnología pierde efectividad y la capacidad de carga del medio con las nuevas densidades poblacionales
La extensión temporal en la que sucede el impacto	Intermedio	Alta	Se asume que la capacidad de carga del medio es el factor principal para que la densidad de mosquitos se mantenga y que esta se encuentra agotada con las poblaciones actuales. Por lo anterior no podría sostener un aumento poblacional por muchas generaciones (las cuales son cortas).
Los potenciales efectos adversos acumulativos	Intermedio	Media	Si se dejan de utilizar los otros tipos de control vectorial se podrían modificar las fuerzas que constriñen el crecimiento poblacional de los mosquitos.
No reversibilidad del potencial efecto adverso	Menor	Media	Si la capacidad de carga del medio se ha alcanzado se espera que los números de mosquitos en el medio disminuyan una vez que las liberaciones acaben.
Evaluación Global de la Consecuencia	Menor	Media	La presencia de individuos en los cuales suceda el silenciamiento de la tecnología está limitada al porcentaje de eventos individuales, la fijación del contexto genético de estos significaría la pérdida de la efectividad tecnológica pero no presenta riesgos extras. La capacidad de carga del medio limitaría el crecimiento de las poblaciones, no parece haber una relación entre el nuevo contexto genotípico (potencial a ser fijado) y el aprovechamiento de un mayor rango de recursos y condiciones.

Consecuencia de la HR6.- La dinámica de disminución de las poblaciones de las etapas larvales del mosquito impacta el número y diversidad de las poblaciones de detritívoros y odonatos que se encuentran en el medio acuático.

En general se puede hablar de esta consecuencia como insignificante debido a las características del medio en el que se desarrollan los mosquitos invasores, son organismos que se establecen en medio efímeros y de pequeña extensión (contenedores artificiales) y su efecto dentro y alrededor de estos no parece tener impacto sobre características ambientales que sean deseable para el humano.

Se tienen bien caracterizados muchos de los servicios ambientales que los mosquitos proveen (USFWS, 2014), la mayoría de estos está asociada a cuerpos de agua que son permanentes o por lo menos poseen una temporalidad que coincide con las estaciones. Los sitios de crianza de *Ae. Aegypti*

difieren de esta descripción pues se encuentran asociados a la fuente de alimento para completar los ciclos gonotróficos: los humanos.

No existe una gran cantidad de experiencias en las que los organismos que se alimentan de los mosquitos sean especialistas de estos y aquellos que lo son tienen una biología asociada a los

cuerpos pequeños y efímeros de agua (Nilsson & Soederstroem, 1988; Higgins & Merrit, 1999), por lo que la consideración anterior podría aplicar para estos últimos.

La llegada de organismos invasores tiene consecuencias evolutivas en el ecosistema debido a que se genera un rearrreglo en las características y relaciones bióticas que ahí suceden, lo cual se puede deber a la exclusión por competencia, desplazamiento de nicho, depredación o extinción. El impacto ambiental que suceda por estas invasiones no sólo depende de la biología de los organismos (e.g. plagas o vectores) sino también de los lugares en donde sucede el establecimiento (Mooney & Cleland, 2001).

Incluso si se asumiera que la presencia de los mosquitos invasores, después de décadas, pudiera significar en un desplazamiento de las condiciones y recursos con las que el medio ambiente cuenta para permanecer de manera estable, no debemos olvidar que los sitios de crianza son en su mayoría contenedores artificiales.

Además de la corta temporada con la que puede suceder el desarrollo de las poblaciones de organismos en el medio artificial (e.g. el recambio de los contenedores o de su contenido), existen diferencias entre las estructuras ecológicas que se logran en cada uno los hábitats que podrían sugerir que la contribución a la estabilidad del medio ambiente de los contenedores no es de tanta importancia (Yee *et al.*, 2012).

Tabla 3.2.6 Estimación del nivel de consecuencia. Se establece y justifica el nivel de consecuencias de la HR 6.

Aspecto	Nivel	Incertidumbre	Justificación
La severidad de la consecuencia	Marginal	Baja	Las especies asociadas a los contenedores no parecen estar involucradas en procesos de mucha importancia ni depender únicamente de las interacciones con mosquitos para mantenerse. Las interacciones en el medio artificial que colonizaron los mosquitos suceden desde unas cuantas décadas. El impacto que pueden tener los contenedores y la biota asociada a estos es sumamente bajo, en comparación con los cuerpos de agua en los cuales las larvas de mosquitos se desarrollan cuando se encuentran en los centros de origen donde evolucionaron por mucho más tiempo.
La extensión espacial con la que sucede el impacto	Menor	Baja	Se trata de interacciones y comunidades que se encuentran en contenedores artificiales pequeños, los cuales no son abandonados por algunas de las especies en ninguna etapa de su vida.
La extensión temporal en la que sucede el impacto	Menor	Baja	Los sitios de crianza de las etapas larvales suelen ser cuerpos de agua efímeros en contenedores de agua artificiales.
Los potenciales efectos adversos acumulativos	Marginal	Baja	No parece haber conexión con las actividades humanas asociadas a esta tecnología con el daño a las comunidades de insectos, a menos que el uso de insecticidas las beneficie.
No reversibilidad del potencial efecto adverso	Marginal	Baja	Cuando se dejan de liberar los mosquitos, se podrían restaurar las poblaciones de mosquitos en el medio así como sus relaciones con otros insectos, a menos que hayan sido sustituidas por otras larvas acuáticas.
Evaluación Global de la Consecuencia	Marginal	Baja	La disminución se da en poblaciones de especies invasoras, las cuales tienen poco tiempo existiendo en el territorio, con funciones que pueden ser sustituidas por otros detritívoros en las comunidades, en sitios de crianza de pequeño espacio y temporalidad, y que parecen no prestar algún servicio ecosistémico alguno.

Consecuencia de la HR7.- La dinámica de disminución de las poblaciones de mosquitos en etapas adultas impacta el número y diversidad de las poblaciones de aves, murciélagos y artrópodos que se alimentan de ellos.

Las implicaciones en la dieta de otros organismos que se consideran de interés podría dividirse en dos etapas de acuerdo a la aplicación de la tecnología: efectos durante las liberaciones y efectos una vez que se ha reducido las poblaciones de mosquitos. El medio contaría con un mayor número de mosquitos que servirían de alimento debido a que son necesarias las liberaciones masivas, pero el efecto a largo plazo es la disminución de recursos para los organismos que se alimentan de su etapa adulta.

La extensión del impacto depende no solo del número de organismos que están ligados a las poblaciones adultas sino también de la dependencia que estos presentan por alimentarse en mayor o menor medida de los insectos. En general no parece haber organismos que involucren a los mosquitos como parte única o esencial de su dieta, se vuelve aun menor la dependencia cuando se tienen en cuenta que se trata solo de una especie de estos artrópodos.

Una de las pocas evidencias sobre el impacto negativo de la eliminación de mosquitos (Poulin *et al.*, 2010) contempla el uso de insecticidas de amplio espectro, los cuales no son específicos y eliminan a un rango de insectos. La situación anterior dista de la tecnología selectiva de especie y se asemeja a la situación de control vectorial utilizada de manera convencional.

Tabla 3.2.7 Estimación del nivel de consecuencia. Se estable y justifica el nivel de consecuencias de la HR 7.

Aspecto	Nivel	Incertidumbre	Justificación
La severidad de la consecuencia	Marginal	Baja	<i>Aedes aegypti</i> no parece ser exclusivo e indispensable para relaciones ecológicas con los organismos que comparten con ellos en el ambiente.
La extensión espacial con la que sucede el impacto	Desconocido	Alta	Esta consideración dependerá de la extensión de mosquitos ha ser liberada.
La extensión temporal en la que sucede el impacto	Mayor	Baja	De tener éxito la supresión, se buscaría que la baja poblacional se mantuviera durante un largo periodo.
Los potenciales efectos adversos acumulativos	Marginal	Baja	No parece haber conexión con las actividades humanas asociadas a esta tecnología con el daño a las comunidades de insectos, a menos que el uso de insecticidas las beneficie.
No reversibilidad del potencial efecto adverso	Marginal	Baja	Cuando se dejan de liberar los mosquitos, se podrían restaurar las poblaciones de mosquitos en el medio así como sus relaciones con otros insectos, a menos que hayan sido sustituidas por otras especies en alguna etapa de su vida.
Evaluación Global de la Consecuencia	Menor	Baja	Los mosquitos adultos no representan ser la fuente exclusiva de animales en nuestro país ni parece haber organismos especializados en esta especie. Si comparamos con los métodos convencionales que se utilizan para control de vectores, el impacto de insecticidas de amplio espectro disminuye un mayor número de especies de artrópodos que son alimento de organismos de valor para los ecosistemas.

Consecuencia de la HR8.- La disminución de las poblaciones de *Ae. aegypti* presentes en la zona permitirá la invasión y establecimiento de mosquitos de la misma especie pero de otras regiones, los cuales son mejores transmitiendo el DENV.

La emergencia, reemergencia o aparición de una enfermedad novedosa para humanos a través de vectores puede plantear una serie de escenarios en los cuales confluyen factores de riesgo que puedan llevar a una epidemia, un aumento en la incidencia de la enfermedad dentro de las subpoblaciones de un hospedero potencial (IOM, 2003).

La caracterización de una consecuencia que implica un desenlace epidemiológico implica predecir la magnitud resultante de cambios sobre uno o varios de los factores involucrados (e.g. densidades de vectores, susceptibilidad a insecticidas) y resulta sumamente compleja aún conociendo las condiciones específicas de un sitio de liberación.

A pesar de lo anterior, se cuenta con una gran cantidad de información sobre los resultados de campañas de control vectorial que han mostrado un éxito temporal a corto plazo, ya sea por la emergencia, reemergencia o aparición de nuevos vectores y patógenos (IOM, 2008).

Gracias a esta enorme cantidad de datos es que se puede presumir sobre los impactos que sucederían cuando se modifican los factores causales, lo cual es de particular interés para caracterizar las consecuencias de aquellos escenarios en los que se encuentra involucrada una reducción/colonización vectorial y aumento en la incidencia de una enfermedad.

Los factores causales de estas epidemias pueden ser muchos y no siempre tratarse de los mismos, sin embargo se puede clasificar en aquellos que pertenecen a los cambios demográficos y sociales humanos o a las condiciones naturales (Wilcox & Gluber, 2005).

La consecuencia es difícil de caracterizar si no se cuenta con un par de datos como la tasa de migración que sucede de los territorios cercanos, sabemos que existe gracias a estudios de estructura en genética de poblaciones pero la magnitud y relación que esto tengan es desconocida; los genotipos que hacen de las poblaciones mejores o peores vectores no parecen tener una relación.

A pesar de la falta de conocimiento podemos saber cosas si se explora la tecnología y las constricciones en el apareamiento existentes entre las especies de mosquitos. En teoría no tendría por que suceder un reemplazo poblacional pues la tecnología esta diseñada para la especie *Ae. aegypti* y operaría también sobre los vecinos invasores de la misma especie.

La duda puede resultar de los protocolos con los que está diseñada la campaña para disminuir las poblaciones si se deja de aplicar cualquier control vectorial podrían llegar las poblaciones más susceptibles, pero depende del éxito y sustentabilidad que este tenga.

Tabla 3.2.8 Estimación del nivel de consecuencia. Se estable y justifica el nivel de consecuencias de la HR 8.

Aspecto	Nivel	Incertidumbre	Justificación
La severidad de la consecuencia	Intermedio	Baja	Las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> son aún susceptibles al método de control planteado por la tecnología, a menos que se abandone la estrategia. Depende de la diferencia en el potencial para transmitir DENV por cada población.
La extensión espacial con la que sucede el impacto	Desconocido	Alta	Estará constreñida a la zona donde se realizó la liberación y logró una reducción, el reemplazo poblacional sólo puede suceder en donde la población original está ausente.
La extensión temporal en la que sucede el impacto	Intermedio	Media	El objetivo de la tecnología es disminuir a la población objetivo, el reemplazo poblacional puede ser definitivo si se abandona la estrategia.

Los potenciales efectos adversos acumulativos	Marginal	Baja	La entrada de otras poblaciones de la misma especie no parece tener alguna relación con las actividades que sucederían en los sitios de liberación.
No reversibilidad del potencial efecto adverso	Menor	Baja	Bastaría con continuar con la estrategia pues las poblaciones son susceptibles a la reducción por esta tecnología.
Evaluación Global de la Consecuencia	Menor	Media	Las poblaciones migrantes de mosquitos son de la misma especie y susceptibles a los métodos de control genéticos. Las poblaciones con potencial para migrar no están consideradas pues se desconoce el sitio de liberación.

Consecuencias de la HR9.- La disminución de las poblaciones de *Ae. aegypti* presentes en la zona permitirá la invasión y establecimiento de mosquitos de la misma especie pero de otras regiones, que son portadores de un genotipo viral que es más dañino para las poblaciones humanas.

Una de las más notables experiencias en las cuales se ha registrado un desenlace epidemiológico por la llegada de una sepa viral con mayor potencial de virulencia es en el Virus del Oeste del Nilo, el cual tiene como vector a mosquitos del género *Culex* y como reservorio a una considerable cantidad de aves y otros vertebrados (Campbell *et al.*, 2002).

Aunque normalmente se trata de un virus que depende de las migraciones de aves y esto hace que su transmisión no sea tan rápida, en los años noventa y principios de nuestro siglo sucedieron epidemias y periodos epizooticos que no respondían al modelo normal, lo cual después se explicó y confirmó por la entrada de una sepa viral mejor adaptada al medio y transmisión (Lanciotti *et al.*, 1999), así como causante de una viremia mayor en hospederos susceptibles (Brault *et al.*, 2004a)

La presencia de este virus se encontraba asociada a escasos periodos epidémicos y el desarrollo de la enfermedad en humanos y animales raramente era mortal, con su llegada al continente americano se modificó este paradigma. El resultado de la entrada de un virus con mayor potencial para ser diseminado fue la mayor epidemia de meningoencefalitis en la historia de Estados Unidos con cerca de 3000 casos y 284 muertes en humanos, así como 14500 casos en equinos con una mortalidad del 30% (Campbell *et al.*, 2002).

La experiencia anterior nos ejemplifica la necesidad de permanecer pendientes no solo al número de caso que resultan de una emergencia o reemergencia vectorial sino también a los serotipos/genotipos virales que se encuentran involucrados con estos. Hay que mencionar que este caso corresponde a un escenario específico, donde resultan de mayor importancia el amplio rango de vectores (más de 60 especies de mosquitos) así como hospederos (más de 330 vertebrados) para el virus (CDC, 2014), caso que no sucede con el DENV en México.

Tabla 3.2.9 Estimación del nivel de consecuencia. Se establece y justifica el nivel de consecuencias de la HR 9.

Aspecto	Nivel	Incertidumbre	Justificación
La severidad de la consecuencia	Intermedio	Alta	Aunque el impacto de la entrada de una nueva variedad viral se ha comprobado, los otros factores que determinan el tipo de transmisión se mantienen estables (aunque se desconoce cuál es el impacto de cada uno en esta).
La extensión	Desconocido	Alta	Estará constreñida a la zona donde se realizó la liberación, el

espacial con la que sucede el impacto			reemplazo poblacional sólo puede suceder en donde la población original está ausente.
La extensión temporal en la que sucede el impacto	Intermedio	Alta	Las poblaciones de mosquitos que lleguen serán también susceptibles a la tecnología y sujetos a la disminución poblacional, a menos que se abandone la estrategia utilizada.
Los potenciales efectos adversos acumulativos	Marginal	Baja	La entrada de otros serotipos por poblaciones de la misma especie no parece tener alguna relación con las actividades que sucederían en los sitios de liberación.
No reversibilidad del potencial efecto adverso	Intermedio	Baja	La sustitución en las poblaciones de mosquitos puede suceder de manera definitiva, sin embargo no se trata de un <i>status quo</i> deseable desde el principio.
Evaluación Global de la Consecuencia	Intermedio	Alta	Los mosquitos que son transmisores del nuevo tipo viral también son susceptibles a la tecnología GM así como a las convencionales. Los factores involucrados en la transmisión de un nuevo agente viral se mantienen estables, con la excepción del agente mismo. Aunque se desconoce el papel exacto de cada uno de estos en los contagios y brotes epidémicos.

Consecuencias de la HR10.- La disminución de las poblaciones de *Ae. aegypti* presentes en la zona permitirá la invasión y establecimiento de mosquitos de la misma especie pero de otras regiones, que son menos susceptibles a los métodos de control tradicionales.

Es un poco paradójico, si sucede una reducción poblacional significa que la tecnología fue exitosa en cierta medida y que esta operaría también sobre las poblaciones que llegan desde otras regiones; pero si se abandona el proyecto y se regresa a las prácticas tradicionales (por el motivo que sea) entonces bastaría con regresar al método novedoso. Sería un daño irreversible si no fuera posible utilizar el método nuevamente y no existieran otras alternativas.

La entrada de una población resistente no se tiene del todo caracterizada en función de sus consecuencias, se trata de responder: ¿Qué sucedería con el número de casos de infecciones por DENV y sus posibles desenlaces si los insecticidas utilizados de manera regular no fueran efectivos? Para contestar esta pregunta, en algunas otras enfermedades vectoriales, se ha modelado una pérdida de hasta el 56% de los beneficios de una campaña de control vectorial (malaria) (OMS, 2012b).

Aún no se tiene calculado el impacto del desarrollo de resistencia para el dengue, sin embargo se desarrollan modelos como el de Luz y colaboradores (2011), en donde se puede calcular el impacto económico que significa una estrategia de control vectorial cuando esta variable se centra involucrada.

A lo largo de la evaluación se ha mencionado la dificultad de asignar una ponderación a cada uno de los factores que están involucrados en la transmisión de DENV dentro de la compleja dinámica que sucede entre el patógeno, los vectores y los humanos. Cuando se calcula el impacto de la resistencia a un insecticida, los esfuerzos se han centrados en revisar el efecto que una estrategia fallida tienen sobre las densidades poblacionales y poco se ha analizado la capacidad que los mosquitos resistentes tienen para ser infectados e infectar (Rivero *et al.*, 2010).

El desarrollo de la resistencia en mosquitos se puede categorizar en: resistencia metabólica, específica de sitio, resistencia de penetración y resistencia debido a comportamiento. De las

anteriores, las primeras dos se han investigado ampliamente gracias al conocimiento de genética, bioquímica y biología molecular (Hemingway & Ranson, 2000).

La presión selectiva producto de insecticidas sucede cuando estos son aplicados en el medio donde los mosquitos se encuentran, sin embargo existen una serie de parámetros de la biología de los insectos que suelen verse también afectados por la presencia de la resistencia a los productos utilizados (Berticat *et al.*, 2002; Hardstone *et al.*, 2009; Rivero *et al.*, 2011).

En algunos casos estos parámetros pueden afectar negativamente la longevidad, la capacidad para infectarse, el comportamiento y otros factores relacionados con la capacidad de los insectos como vectores, resultando en poblaciones de insectos que no representan una amenaza tan grave como se piensa regularmente (Rivero *et al.*, 2010).

En el caso específico de *Ae. aegypti* se especula que el nivel de resistencia para un par de insecticidas de amplio uso está relacionado con un costo en la adaptación producto de la acumulación de alelos con efectos negativos sobre esta (Martins *et al.*, 2012; Jaramillo-O *et al.*, 2014), al igual que una disminución en aspectos relacionados con su capacidad como vector (Bellinato *et al.*, 2012). Se desconocen aún cuales son los parámetros exactos y su participación en la capacidad de los vectores de dengue para transmitir el virus.

Tabla 3.2.10 Estimación del nivel de consecuencia. Se establece y justifica el nivel de consecuencias de la HR 10.

Aspecto	Nivel	Incertidumbre	Justificación
La severidad de la consecuencia	Marginal	Media	No se trata de un desarrollo de resistencia por la población objetivo, sino de una población inmigrante y que tendría menor adaptación al medio. Los mosquitos que llegan tendrían problemas para desempeñarse en el medio, debido a la presencia de los alelos de resistencia que disminuyen su adaptación.
La extensión espacial con la que sucede el impacto	Desconocida	Alta	Estará constreñida a la zona donde se realizó la liberación, el reemplazo poblacional sólo puede suceder en donde la población original está ausente o en baja proporción.
La extensión temporal en la que sucede el impacto	Menor	Baja	Las poblaciones de mosquitos que lleguen serán también susceptibles a la tecnología y sujetos a la disminución poblacional, a menos que se abandone la estrategia utilizada.
Los potenciales efectos adversos acumulativos	Mayor	Alta	Las prácticas de control vectorial no GM se verían afectadas: las poblaciones de mosquitos inmigrantes no serían controlables por los métodos conocidos por las poblaciones humanas.
No reversibilidad del potencial efecto adverso	Menor	Baja	La sustitución en las poblaciones de mosquitos puede suceder de manera definitiva, sin embargo no se trata de un <i>status quo</i> deseable desde el principio.
Evaluación Global de la Consecuencia	Menor	Media	El desarrollo de resistencia a insecticidas está asociado a la acumulación de alelos que resulta en pérdida de adaptación de los mosquitos. Las poblaciones sobreviven gracias a la alta presión selectiva del medio. Los migrantes no tendrían capacidad para aumentar en número cuando no existen los métodos de control que crean resistencia. Los migrantes son aún susceptibles a la reducción poblacional por el uso de la tecnología GM.

Consecuencias de la HR11.- La disminución de las poblaciones de *Ae. aegypti* presentes en la zona permitirá la invasión y establecimiento poblaciones de otras especies de mosquitos, los cuales son mejores transmitiendo el DENV y son vectores de otras enfermedades.

Predecir el resultado de la sustitución de una población de mosquitos por otra es complicado en términos epidemiológicos, debido a lo rápido que se puede modificar la relación de los arbovirus con sus hospederos, una simple sustitución molecular puede significar un brote epidemiológico sin precedentes (Brault *et al.*, 2004). Sin embargo se han realizado esfuerzos para determinar el desenlace epidemiológico con experiencias sucedidas en otros países así como resultados de estudio en laboratorio para despejar las dudas planteadas por estos escenarios.

Después de las epidemias sucedidas alrededor del mundo en los últimos años, asociadas a *Ae. albopictus* (Bonilauri *et al.*, 2008; Pages *et al.*, 2009; Reiter *et al.*, 2006), este mosquito y su potencial efecto en regiones donde el DENV se encuentran han recibido particular atención. Lambrechts y colaboradores (2010) realizaron un enorme trabajo para despejar las dudas con respecto a la participación de este mosquito en la transmisión de virus, las siguientes conclusiones se destilan de este:

- a) *Ae. albopictus* nunca ha participado en los brotes epidémicos de dengue en los lugares donde domina sobre *Ae. aegypti*.
- b) Cuando se considera el proceso total de infección y diseminación del DENV, *Ae. aegypti* resulta más susceptible a ser transmisor del DENV.
- c) Aunque la especie asiática es menos efectiva como vector del virus de dengue, es necesario permanecer atentos a la posible modificación en los patrones de transmisión debido a la compleja interacción con las sepas virales.

Aunque *Ae. aegypti* es el mejor transmisor de DENV, existen escenarios epidemiológicos que involucran a *Ae. albopictus* y la transmisión de otros arbovirus, entre ellos Chikungunya y muchos otros de importancia epizootica.

La infección por el virus de Chikungunya (CHIKV) se caracteriza por daño a colágeno y alteraciones sobre el metabolismo del tejido conectivo en el cartílago que termina por causar dolor en articulaciones. El impacto sobre los individuos se manifiesta en una debilidad general, que puede ser intensa en los días de mayor gravedad y dolor sobre las articulaciones, este último padecimiento puede persistir por varios días y necesitar de hospitalización. A diferencia del DENV el dolor de articulaciones puede ser crónico y persistir por un largo periodo en la vida de aquellas personas que fueron infectadas (Borgherini *et al.*, 2008).

Un par de experiencias describen el impacto sobre la calidad de vida en la población después de epidemias por CHIKV (Soumahoro *et al.*, 2009; Ramachandran *et al.*, 2012). Aunque ambos reportan impacto sobre la salud de los individuos infectados, se puede concluir que una epidemia por CHIKV resulta en una etapa inicial donde los impactos son graves y estos disminuyen a medida que el tiempo pasa hasta ser moderados tras un año (Soumahoro *et al.*, 2009).

Ae. albopictus y *Ae. aegypti* son transmisores del CHIKV y la tasa de infección/diseminación del virus no parece ser diferente entre uno y otro, así que se podría pensar que la sustitución de una población por otra no causaría epidemias de Chikungunya. A pesar de lo anterior, la participación de uno y otro en los brotes epidemiológicos se ha asociado al tipo de asentamientos humanos: teniendo un impacto mayor la especie africana sobre las poblaciones más urbanizadas y funcionando a la inversa con la asiática (Paupy *et al.*, 2010).

Aunque *Ae. albopictus* no sea un mejor transmisor del DENV, juega un papel importante en la transmisión de otros virus en el mundo. Estudios que han sido realizados en campo así como en laboratorio indican la participación en la transmisión de más de 22 virus diferentes (Paupy *et al.*, 2009), entre los cuales destacan el virus de la fiebre amarilla (YF) (Mitchell *et al.*, 1991; Miller &

Ballinger, 1988), el virus de la encefalomielitis equina venezolana (VEEV) (Turell & Beaman, 1992), el Virus del Oeste del Nilo (WNV) (Holick *et al*, 2002), virus de la encefalitis equina del este (EEE) y oeste (WEE) (Mitchell *et al*, 1991), virus de Chikungunya (Soumahoro, 2010), virus de La Crosse (LAC) (Gerhardt *et al.*, 2001) e incluso de virus que no habían caracterizado antes (Francy *et al*, 1990). De estos virus por lo menos 16 tienen el potencial para ser transmitidos por líneas Norte y Suramericanas de *Ae. albopictus* (Mitchell, 1991) y más de nueve han sido aislados del mosquito asiático viviendo en condiciones naturales en nuestro continente (Moore & Mitchell, 1997).

Dentro de los virus previamente mencionados se encuentran algunos que representan un problema de salud humana y veterinaria en el continente americano y México, lo cual puede dar indicios de la problemática que resultaría del establecimiento y crecimiento poblacional del mosquito asiático en regiones donde antes se encontraba *Ae. aegypti* (Paupy *et al.*, 2009). Desde el siglo pasado hasta ahora se aislaron en diferentes animales y humanos el VEE, EEE, WEE (Ulloa *et al.*, 2004), el virus de Saint Louis (Zárate, 1978; Goldsmith *et al.*, 1979), el WNV (Blitvich *et al.*, 2003; Garrido-Pérez, 2004) y se tienen reportes concretos sobre la aparición de Chikungunya en nuestro país (CNNMEXICO, 2014), también existen aspectos de la enfermedad y sus transmisión que levantan sospechas sobre su presencia en diferentes regiones del territorio (Soumahoro *et al.*, 2010).

El virus de Chikungunya es de particular interés por tener a *Ae. albopictus* como un vector que se expande rápidamente en el mundo (Reiter *et al.*, 2006), por la manera en la que se ha manifestado en los últimos años así como por las implicaciones que tiene en la salud y el desarrollo humano (Pialoux *et al*, 2007), existe ejemplos en los cuales se han producido epidemias repentinas de esta en países donde no se tenían reportes previos (Enserink, 2006).

El Virus del Oeste del Nilo (WNV) es otro arbovirus de importancia epidémica debido su rápida expansión en Norteamérica, los impactos que este tienen sobre las poblaciones humanas se calcula menores. Lo anterior se debe a que el porcentaje de personas que desarrollan síntomas y tienen un desenlace fatal es muy bajo, aunque se cree que la incidencia e impacto de la enfermedad debe ser mayor al que se ha calculado en las últimas décadas (CDC, 2014).

Ae. albopictus no parece tener una notoria participación en la transmisión de WNV, además de tener poca susceptibilidad en comparación con otras especies; el mosquito que se vuelve de interés pues es buen transmisor de este patógeno además de compartir condiciones y recursos con las poblaciones objetivo de la tecnología es *C. quinquefasciatus* (Akhter *et al.*, 1982).

El resto de zoonosis que pueden ser transmitidas por estos organismos así como sus impactos en el medio ambiente son también difíciles de caracterizar pues los datos disponibles para nuestro país son escasos, los ejercicios de extrapolar información de otros escenarios internacionales es complicado incluso con enfermedades humanas. Por lo anterior, y para evitar la especulación con poco sentido, se debe de abordar este tema con la carga de incertidumbre que le caracteriza.

Tabla 3.2.11 Estimación del nivel de consecuencia. Se establece y justifica el nivel de consecuencias de la HR 11.

Aspecto	Nivel	Incertidumbre	Justificación
La severidad de la consecuencia	Intermedio	Alta	<i>Ae. aegypti</i> es un mejor vector para el DENV, pero las otras especies de mosquitos pueden participar de epidemias o epizootias por otros virus que aún no se tienen bien caracterizadas en nuestro país o continente.
La extensión espacial con la	Desconocido	Alta	Estará constreñida a la zona donde se realizó la liberación, el reemplazo poblacional sólo puede suceder en donde la población

que sucede el impacto			original está ausente.
La extensión temporal en la que sucede el impacto	Mayor	Alta	El desplazo poblacional puede suceder de manera definitiva, las especies invasoras no pueden ser manejadas con la misma tecnología, por lo que sería necesario utilizar métodos particulares para la zona.
Los potenciales efectos adversos acumulativos	Intermedio	Alta	La entrada de otras poblaciones puede significar la pérdida de respuesta a epidemias o epizootias por desconocimiento al nuevo escenario de transmisión vectorial.
No reversibilidad del potencial efecto adverso	Mayor	Media	La sustitución en las poblaciones de mosquitos puede suceder de manera definitiva, a menos que las poblaciones objetivo se puedan recuperar tras abandonar la tecnología.
Evaluación Global de la Consecuencia	Mayor	Alta	<i>Ae. aegypti</i> es el mejor transmisor de DENV en los periodos de brotes epidémicos. La invasión por mosquitos de otras especies puede ser definitiva y la tecnología GM no plantea supresión de otras especies, las cuales pueden estar asociadas a patógenos responsables de epidemias y epizootias.

3.3) Estimación del riesgo

Como se mencionó antes, el riesgo se mide a partir de la combinación de la posibilidad de que un efecto adverso suceda y la magnitud de la consecuencia de este efecto adverso. Para poder generar esta estimación se han construido matrices que combinan ambos elementos, la OGTR (2014) propone una que es de mucha utilidad por ser simple y operacional (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Matriz para la estimación de riesgo. Modificada de OGTR (2014)

		Estimación del Riesgo			
Posibilidad	Muy Posible	Bajo	Moderado	Alto	Alto
	Posible	Insignificante	Bajo	Alto	Alto
	Poco Posible	Insignificante	Bajo	Moderado	Alto
	Muy Poco Posible	Insignificante	Insignificante	Bajo	Moderado
		Marginal	Menor	Intermedio	Mayor
		Consecuencias			

La estimación del riesgo para cada una de las HR que fueron formuladas se muestra en la Tabla 3.3. Como se puede apreciar, la ERA asociada a esta tecnología en el contexto del este, sur y sureste de México sólo cuenta con tres HR de las cuales se pueda concluir un riesgo Alto, una con un riesgo Moderado asociado, seis con un riesgo Bajo y una con un riesgo Insignificante.

Hipotesis de Riesgo	Exposición	Nivel de las Consecuencias	Estimación del Riesgo
HR1.- La reducción de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> en el medio acuático, y los efectos densodependientes asociados a esta, modifican características del desarrollo de los mosquitos que les hacen mejores vectores de DENV.	Posible	Menor	Bajo
HR2.- La disminución de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> modifica la dinámica de competencia con las poblaciones de <i>Ae. albopictus</i>	Posible	Intermedio	Alto

y los individuos de la especie asiática se desarrollan como mejor vectores del DENV.			
HR3.- La tasa con la que sucede la disminución poblacional puede disminuir la frecuencia con la que suceden los contagios con diferentes serotipos de DENV y aumentar el número de desenlaces letales debido al potenciamiento dependiente de anticuerpos (ADE).	Posible	Menor	Bajo
HR4.- La presencia de tetraciclina en el medio hará que las crías portadoras del alelo letal dominante sean viables hasta la etapa adulta y se incremente la población de mosquitos de <i>Ae. aegypti</i> en el medio.	Poco Posible	Intermedio	Medio
HR5.- La movilización del constructo transgénico debido a los elementos de transposición endógenos y exógenos hará que la liberación masiva de mosquitos resulte en un aumento de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> .	Posible	Menor	Bajo
HR6.- La dinámica de disminución de las poblaciones de las etapas larvales del mosquito impacta el número y diversidad de las poblaciones de detritívoros y odonatos que se encuentran en el medio acuático.	Poco Posible	Marginal	Insignificante
HR7.- La dinámica de disminución de las poblaciones de mosquitos en etapas adultas impacta el número y diversidad de las poblaciones de aves, murciélagos y artrópodos que se alimentan de ellos.	Posible	Menor	Bajo
HR8.- La disminución de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> presentes en la zona permitirá la invasión y establecimiento de mosquitos de la misma especie pero de otras regiones, los cuales son mejores transmitiendo el DENV.	Posible	Menor	Bajo
HR9.- La disminución de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> presentes en la zona permitirá la invasión y establecimiento de mosquitos de la misma especie pero de otras regiones, que son portadores de un genotipo viral que es más dañino para las poblaciones humanas.	Posible	Intermedio	Alto
HR10.- La disminución de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> presentes en la zona permitirá la invasión y establecimiento de mosquitos de la misma especie pero de otras regiones, que son menos susceptibles a los métodos de control tradicionales.	Posible	Menor	Bajo
HR11.- La disminución de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> presentes en la zona permitirá la invasión y establecimiento poblaciones de otras especies de mosquitos, los cuales son mejores transmitiendo el DENV y son vectores de otras enfermedades.	Posible	Mayor	Alto

El objetivo de toda esta evaluación no es poder agrupar a estos riesgos y calificar al uso de la tecnología en una escala global o única, sino identificar las características de su uso que resultarían en un impacto y generar recomendaciones para su uso y manejo (o prohibición de este) de manera segura (en caso de suceder).

4) Análisis de Resultados

Después de observar los resultados, se podría considerar que la aplicación de esta tecnología es segura, debido a que la mayoría de las HR generadas representan un riesgo menor o igual a moderado, salvo aquellas que implican la invasión de otras especies de mosquitos vectores. Sin embargo existen algunas situaciones en la que uno sólo riesgo “Alto” podría significar desenlaces tan graves como una epidemia de DH o DSS.

Debido a la particularidad de las tecnologías, su aplicación con diferentes organismos y en diferentes ambientes receptores, no existe un método que pueda generar conclusiones sobre “riesgo único y global”. La estimación de un escenario de riesgo está hecha para considerar las estrategias que podrían ser requeridas para un mejor manejo a los riesgos individuales.

Una vez que se ha logrado estimar aquellos potenciales efectos adversos, la posibilidad de que estos sucedan y el daño que estos podrían producir, se deben de identificar cuáles son aquellos riesgos que necesitan de acciones específicas para ser evitados o mitigados.

4.1) Medidas de manejo

La ERA es un proceso que se desenvuelve independientemente de las medidas de manejo, a pesar de que la segunda se alimenta de este y ambos comparten características. La separación conceptual permite integridad y objetividad del proceso de evaluación y agrega transparencia al proceso. A pesar de lo anterior, no hay que olvidar que cada uno de los pasos involucrados en el análisis global de una tecnología está interconectado y se puede tratar de un proceso iterativo.

Las acciones que se pueden proponer para lograr el manejo de riesgo se traducen en medidas que responden sobre: a) la prioridad con la que se deben realizar b) la mejor estrategia de acción c) y la pertinencia o capacidad real para realizar la acción. Estos tres factores permiten evaluar el impacto que se podría tener si se aplicaran las medidas de manejo sobre los riesgos caracterizados previamente.

Resulta intuitivo pensar que aquellos escenarios en los que se encontró un riesgo mayor son los que merecen de una mayor prioridad de manejo, lo cual es cierto, pero carece de sentido si no lo visualizamos en función de comprender cuáles son los mecanismos que son necesarios para que la disminución de este suceda así, como las acciones que se encuentran disponibles.

No existe un umbral particular para determinar qué riesgos deben de ser manejados en función del potencial desenlace cuando estos suceden, y la tarea para determinar las medidas de manejo cae en manos de aquellos que están involucrados en la toma de decisiones sobre las actividades producto y asociadas a los OGMs que se desean utilizar.

La liberación de mosquitos GM en el ambiente, las posibles consecuencias que esta tenga y la capacidad de reversibilidad de cualquier proceso que desencadenen en efectos adversos dependen del enfoque genético y ecológico con el que se realicen. Una "tecnología estéril" (como la abordada con el sistema fsRIDL) puede prevenir la transmisión vertical de material genético mientras se evalúan las características necesarias para determinar con mayor certeza algunos de los riesgos mencionados. Aunque es posible (muy poco posible) que exista transmisión horizontal de transgenes por mecanismos no identificados, la mayor preocupación se encuentra en el flujo de genes por vía sexual (Benedict & Robinson, 2003).

El manejo no sólo se centra en la disminución de cierto riesgo sino en el reconocimiento de zonas del conocimiento que pueden ser atendidas para poseer un conocimiento mayor sobre algún fenómeno involucrado en el riesgo mismo. De acuerdo al enfoque precautorio, durante la evaluación de riesgo se deben identificar los límites que la incertidumbre sobre la caracterización del riesgo representa para determinar el nivel necesario de manejo de riesgo, pronosticar sobre la efectividad que las opciones de manejo de incertidumbre tienen y seleccionar las medidas más apropiadas. Al tratarse de un ejercicio hipotético, la cantidad de información restante para poder hacer este análisis es muy grande.

Una de las virtudes del proceso global de ERA es el reconocimiento explícito de todos aquellos factores en los que existen elementos asociados a incertidumbre, este proceso de análisis arrojó una serie de incertidumbre que son contempladas en categorías conceptuales a continuación. Las fuentes de incertidumbre fueron consideradas en lo anterior para ser tratadas en esta sección.

Es necesario clarificar que la clasificación en modo de preguntas no refleja la prioridad de atenderse, ni el nivel de riesgo o HR al que pudieran estar asociadas. A continuación se muestran los campos de incertidumbre caracterizados en el proceso así como las medidas de manejo recomendadas para atenderlos.

Suficiencia y pertinencia de información.- La insuficiencia de datos puede hacer que un fenómeno sea percibido como inexistente, sin embargo se trataría de un supuesto que el evaluador debe hacer explícito en la realización de la ERA y para evitar que se trate de un proceso altamente subjetivo.

- a) ¿Cuántos estudios y dónde deben de suceder para ser utilizados contexto de la liberación?

Una de las consideraciones más importantes es determinar el número y calidad de los datos que se requieren para poder realizar un análisis que refleje los riesgos reales de las liberaciones, para lo cual existen algunos parámetros para calificar las diferentes fuentes de donde provienen la información utilizada. Una de las maneras en las que se puede evaluar información cuando se duda de la pertinencia que esta tenga sobre los sitios, organismos y tecnología a analizar está descrita por factores como:

- 1) Cercanía de las experiencias a las condiciones que se quieren analizar ¿En el mismo país? ¿En el mismo ecosistema? ¿En el mismo organismo? ¿En el mismo tipo de comunidades?
- 2) Contexto científico en el que se generó ¿Estudio de biología básica? ¿Estudio relativo al efecto del organismo en el ambiente? ¿Estudio de los efectos del OGM particular en el ambiente?
- 3) Protocolos de Investigación ¿Estudios validados internacionalmente? ¿Publicados en revistas arbitradas? ¿Comentarios personales?

La decisión sobre la pertinencia de la información es una prerrogativa del evaluador de riesgo así como de aquellos involucrados en el sistema de regulación, pero estas preguntas pueden proporcionar una guía para tomar decisiones.

Sitio de liberación.- Debido a que se trata de una ERA para una liberación al ambiente hipotética, en dónde se ha trabajado con el contexto de algunas regiones de nuestro país, se cuenta con muy poca precisión sobre las condiciones de los sitios en los que se pudiera realizar. Los sitios contenidos en estas regiones pueden resultar sumamente heterogéneos y no permitirían la generalización para ciertos valores, aquellos atributos que se pueden conocer una vez que se ha determinado la zona en la que se tiene planeada la liberación son las siguientes:

- a) ¿Qué porcentaje de sitios de crianza son artificiales?
- b) ¿Cuáles son los sitios de crianza preferidos y mayor producción de la especie en la zona de liberación?
- c) ¿Con qué especies de mosquitos patógenos (*Ae. albopictus* y *C. quinquefasciens*) conviven *Ae. aegypti* en los sitios de crianza?
- d) ¿Qué otros organismos se encuentran en los contenedores donde sucede la etapa larvaria de los mosquitos?
- e) ¿Qué especies y en qué proporción existen en los sitios de crianza?
- f) ¿Cuáles son los tipos virales que circulan en la zona?
- g) ¿De dónde proviene el agua que las poblaciones humanas almacenan en los contenedores donde los mosquitos ovopositan?

- h) ¿Cuál es la cercanía a fuentes de tetraciclina (sitios de crianza y aprovechamiento animal)?

El primer acercamiento para resolver estas incertidumbres puede llevar al evaluador a pensar en protocolos de investigación necesarios para generar todos estos datos faltantes, derivando en una serie de requerimientos para obtener información que ya existe en otras fuentes de datos o experiencias. Lo anterior no quiere decir que se debe evitar generar información necesaria sino que se debe reconocer aquella con la que se cuenta y priorizar esfuerzos hacia la que no se posee aún y tiene relevancia para la estimación de riesgos.

El desarrollo de las actividades relacionadas con la liberación de mosquitos GM se debe de entender como un proceso que involucra actores locales, su participación puede resultar de gran utilidad para comprender la situación vectorial: instituciones de salud locales, programas universitarios de investigación, sistemas de información geográfica (e.g. INEGI) así como las asociaciones locales en las que los pobladores se agrupan pueden ser de ayuda esclareciendo algunas de las dudas mencionadas antes.

Una fuente de importancia y utilidad para responder a estas interrogantes es la actividad que desarrollan los monitores de índices y ecología larvaria involucrados en las pesquisas larvianas: la continua participación de los técnicos y monitores en las investigaciones brinda una oportunidad para conocer estos parámetros y se recomienda su participación en el diseño de estrategias así como en el proceso de evaluar el riesgo. Los sitios de crianza larval, así como las condiciones, recursos e interacciones que suceden en estos levantan una serie de dudas que pueden ser resueltas cuando se involucran a las personas que se han dedicado a su análisis de manera periódica (de existir los programas).

Los sistemas de salud locales también son una excelente fuente de información y experiencia para determinar la relación que existe entre los vectores, el patógeno y las poblaciones de hospederos (tipos virales ciculantes) de la región donde se pretende desplegar una estrategia de control genético. La consulta e integración de los actores involucrados en dichos sistemas es recomendable.

La comunidad humana con la que los vectores y patógenos conviven puede llegar a jugar un papel determinante en la manera en la que suceden dichas interacciones: es en sus casas y la cercanía de estas donde suceden la ovoposición y el desarrollo larvario, así como la transmisión. La comunicación con las comunidades asentadas en o alrededor del sitio de liberación puede llevar a comprender asuntos relacionados con el desarrollo de las larvas (e.g. tipo de alimento de las larvas) o la fuente de recursos (e.g. agua cercana a sitios donde pueda haber tetraciclina), por lo que se recomienda diseñar estrategias en las que se incluya el conocimiento contenido en estos grupos sociales.

La tecnología.- Depende no sólo de aquellas características intrínsecas del mosquito GM, sino de cómo estas conviven con el ambiente y cumplen la función para la que se les diseñó. Aunque una parte de estos corresponde a los datos que se han generado durante el desarrollo y prueba del evento y pueden ser propiedad de aquellos responsables de este, hay otra variedad que depende del comportamiento y efectividad del mosquito en las condiciones del lugar en el que se pretende liberar.

- a) ¿Dónde se inserto el transgén?
b) ¿Cuál es el porcentaje con el que se producen mosaicos de la tecnología?

- c) ¿Cuál es la concentración mínima de tetraciclina para inactivar la función de los genes de represión?
- d) ¿Cuál es la capacidad de los machos GM para aparearse con las hembras?
- e) ¿Cuál es el ritmo con el que la tecnología reduce a las poblaciones de mosquitos en campo abierto, jaulas y laboratorio?
- f) ¿Cuál es la cantidad y frecuencia con la que se desean liberar los mosquitos GM?
- g) ¿Cuáles son los datos sin procesar que se han encontrado en las experiencias realizadas en el campo que han mostrado efectividad en la reducción?
- h) ¿Por qué es diferente la reducción en campo con aquellos estimados en laboratorio y contención en campo?

La resolución de incertidumbre de esta sección puede dividirse en dos etapas: determinar valores que son inherentes al desarrollo de la tecnología en las etapas previas al contacto con las condiciones presentes en el ambiente y aquellos resultados de las liberaciones en un ambiente similar al que se pretende liberar.

El proceso de inserción genética y posterior selección de los eventos de transformación pueden determinar la efectividad con la que se expresan las características deseadas en los mosquitos GM, el uso de algunos sistemas particulares puede significar inserciones que resulten inertes a cualquier proceso de transposición no previsto o deseado (Dafa'alla *et al.*, 2006; Nimmo *et al.*, 2006).

Durante el proceso de transformación genética, se pueden resolver preguntas como la precisión con la que un transgén es integrado así como los efectos fenotípicos inmediatos que se observan, como la concentración de tetraciclina necesaria para sobrevivir hasta etapas adultas. Usualmente los desarrolladores de la tecnología contemplan estas mediciones en etapas previas a la liberación, sin embargo es necesario tenerlas presentes.

Puede resultar de utilidad reconocer el contexto genético de las poblaciones silvestres objetivo y los efectos de un transgén sobre estas, ya sea que se deseen modificar y liberar mosquitos machos de estas poblaciones o se trate de determinar fenómenos moleculares (*e.g.* silenciamiento por transposición o mosaicismo) sobre la progenie producto de la estrategia de control genético, cada uno de estos dependerá del diseño específico y es difícil mencionarles de manera general.

Debido a que esta tecnología no contempla la permanencia de un transgén en las poblaciones sino la supresión o extinción local de estas, son de particular interés parámetros que ayuden a entender la dinámica de reducción, así como posibles fuentes de reintroducción. Determinar cual es la adaptación de los mosquitos GM es un componente importante en los programas de control genético, en términos de efectividad y bioseguridad, ya que se asume que el proceso de transformación tiene un costo sobre la capacidad de sobrevivir y aparearse en los machos transformados (Lee *et al.*, 2009).

Cuando se pretende determinar la efectividad de esta tecnología en función del desempeño de los machos, se pueden medir atributos de los machos que provoquen la reducción poblacional en mayor o menor medida (*e.g.* capacidad de vuelo, competencia para copular), teniendo en cuenta atributos propios de las poblaciones objetivo (*e.g.* paridad, número de cópulas).

Estas experiencias se pueden generar en diferentes niveles de complejidad: en el laboratorio (Wise de Valdez *et al.*, 2011), en jaulas (Facchinelli *et al.*, 2013) o a campo (Harris *et al.*, 2011; Lacroix *et al.*, 2012); los resultados de cada una de estas pueden variar dependiendo de las condiciones con

las que los mosquitos se enfrenten o el diseño experimental utilizado, discrepancias que deben de ser atendidas para el responsable manejo de incertidumbre.

Otro factor a tener en cuenta son las fluctuaciones en recursos y condiciones que suceden a lo largo del año, las cuales pueden depender de la región donde se desee realizar la liberación e implicar repeticiones estacionales (de ser necesarias). La selección de comparadores para determinar una línea basal que explique la dinámica regular en la zona es también recomendable, la cual incluya sitios similares a la liberación en donde no se realice ningún tipo de control vectorial o se mantenga aquel acostumbrado (químico, biológico o físico) para poder comparar las tasa de reducción de cada estrategia (de existir) (Benedict & Robinson, 2003).

De ser necesario realizar pruebas contenidas que contemplen condiciones similares a las del ambiente receptor, una serie de experiencias desarrolladas a partir del Proyecto “Estrategias genéticas para el control de la transmisión del virus del dengue (FNIH/GCGH/Universidad de California, Davis y CRISP/INSO Tapachula, Chiapas, México)” son de suma ayuda para el desarrollo de los experimentos; así como de la interacción con los actores locales para realizar un proyecto como este de manera segura (Facchinelli *et al.*, 2011; 2013; Ramsey *et al.*, 2014).

Métodos de control vectorial convencionales.- La ERA se basa en la comparación con los riesgos propuestos por los sistemas que carecen de la tecnología GM. De particular interés es determinar elementos de la reducción poblacional y los efectos que los cambios en las densidades de mosquitos puedan tener sobre características asociadas a la capacidad vectorial, así como el impacto sobre las comunidades en las que los mosquitos se encuentran.

- a) ¿Cuáles son los métodos de control vectorial utilizados en la zona de liberación?
- b) ¿Cuál es el ritmo con el que la tecnología convencional usada en la zona reduce a las poblaciones de mosquitos en estado larvario y adulto?
- c) ¿Qué sucede con el tamaño de los individuos cuando se realiza una reducción poblacional con el control genético?
- d) ¿Qué sucede con el tamaño de los individuos cuando se realiza una reducción poblacional por vías convencionales?
- e) ¿Cuál es la relación entre la reducción de las poblaciones larvales y la de los adultos?
- f) ¿Cuál es el impacto de los métodos convencionales utilizados sobre los organismos que conviven con *Ae. aegypti* en los contenedores artificiales?

La resolución de la incertidumbre considerada por estas preguntas puede resultar una tarea complicada debido a que pueden existir sitios en los cuales no se cuente con los métodos de control vectorial o en donde no se analice el impacto de las medidas de manera sistemática. Para determinar la dinámica de reducción de las poblaciones de mosquitos (de existir), se recomienda involucrar a aquellos que realizan y monitorean las medidas de control.

La efectividad con la que se realizan las intervenciones se puede medir de acuerdo a diferentes parámetros, como los índices aélicos larvales (de casa, de recipiente, de Breateu) (Fernández, 2009) o aquellos que consideran conteos de etapas adultas. Es importante entender que para la resolución de incertidumbre sobre el riesgo se debe de tener claro cuál es el comparador necesario, aquellas HR que involucraron la reducción y dinámica en etapas larvales son cotejables con los valores obtenidos de las pesquisas larvales.

Las intervenciones para el control vectorial del dengue pueden incluir control biológico, químico, ambiental o manejo vectorial integral, comprender el enfoque con el cual se lidia en la zona donde se pretende liberar (de existir) es uno de los primeros pasos para generar la comparación.

La efectividad, entendida como la reducción de alguno de los parámetros entomológicos mencionados, de las estrategias de control significa el punto basal cuando se quieren comparar los efectos que se pueden obtener con el uso de mosquitos GM. Erlanger y colaboradores (2008) realizan un análisis en el que se pueden comparar las distintas estrategias, su análisis puede ser de suma utilidad cuando se busque esclarecer algunos de estos puntos.

Los diferentes niveles de mortalidad en las poblaciones que se encuentran en contenedores hace que la relación entre densidades de larvas y adultos no sea precisa y universal (Romero-Vivas & Falconar, 2005). Lo anterior hace necesario generar medidas propias para la resolución de preguntas que involucren el efecto de las diferentes estrategias (convencional y GM) sobre las poblaciones adultas de estos organismos, como verificar el índice de adultos en reposo (Fernández, 2009).

El desarrollo de los individuos dentro de las poblaciones que están relacionadas con efectos densodependientes también es un aspecto sobre el cual se recomienda investigar, para aquellas a las cuales se les aplica un método convencional de control como para aquellas sujetas a la interacción con los mosquitos GM. Estudios como el de Rebollar-Tellez y colaboradores (1995), Gama y colaboradores (2005) y Walsh y colaboradores (2011; 2012), pueden ser de utilidad para disipar la incertidumbre relacionados con estos efectos.

Poblaciones de *Ae. aegypti* locales.- El establecimiento de poblaciones que antes no se encontraban debido a la reducción poblacional en las zonas donde se liberaron mosquitos GMs.

- a) ¿Cuál es la dinámica de migración de las poblaciones en la zona?
- b) ¿Cuál es la susceptibilidad de las poblaciones locales a los serotipos que circulan en la zona?
- c) ¿Cuál la susceptibilidad de las poblaciones vecinas a los insecticidas?
- d) ¿Cuál la susceptibilidad de las poblaciones vecinas a los insecticidas utilizados de manera convencional en la zona?

Aunque se puede partir de las distancias máximas de vuelo de *Ae. aegypti* y las barreras naturales (e.g. montañas o lagos) para determinar la capacidad de dispersión natural que las poblaciones pudieran tener, no hay que olvidar que la presencia de estos mosquitos invasores alrededor del mundo es el resultado del desplazamiento antropogénico de insectos durante etapas resistentes al transporte por cientos o miles de kilómetros.

Lo anterior hace que determinar los patrones de migración sean complicados, sin embargo se pueden utilizar estudios de genética de poblaciones como el de Gorrochetegui-Escalante y colaboradores (2002) para establecer aquellas zonas en las que sucede flujo genético y poder hipotetizar sobre el potencial movimiento de poblaciones cercanas o lejanas.

La resistencia que una población de mosquitos tenga a un insecticida particular se centra en la identificación del mecanismo posible de resistencia, si se debe a un fenómeno monogénico o poligénico y si este tiene algún costo asociado a la adaptación de los mosquitos. El análisis de este fenómeno a través de una región completa implica la caracterización genética de las poblaciones que ahí se encuentran y puede resultar en una labor titánica (Barbosa *et al.*, 2011). Sin embargo se pueden realizar esfuerzos que permitan predecir la distribución de algunos marcadores moleculares asociados a dicha resistencia (Saavedra-Rodríguez *et al.*, 2008).

La determinación de aquellos alelos importantes por señalar dependerá de la zona en la que se desee liberar, no sólo por motivos geográficos sino también por el uso de sustancias insecticidas

que se tiene en la región: sería de poco sentido recolectar datos para entender la hipotética llegada de insectos resistentes a una sustancia que no se utiliza pues los métodos convencionales de control no se verían comprometidos.

El movimiento de diferentes tipos virales es similar a la de las resistencias, con una importante excepción: los mosquitos no cotransportan los insecticidas, pero pueden hacerlo con los tipos virales. La llegada de un nuevo tipo viral puede depender de las poblaciones invasoras de mosquitos y la susceptibilidad que estas presenten.

Transmisión del DENV.- Se carece de un modelo de transmisión para el DENV por *Ae. aegypti* en nuestro país y los modelos teóricos no parecen ser operativos.

- a) ¿Cuál es el modelo de transmisión en el país y la zona?
- b) ¿Cuáles son los factores implicados en los modelos de transmisión y cómo ponderarlos?
- c) ¿Cuál es el efecto de la competencia vectorial sobre la transmisión del DENV?
- d) ¿Cuánto influye la genética en la competencia vectorial?

Encontrar la relación que existe entre características de las poblaciones de mosquitos, el ambiente, las características de los DENV presentes y la transmisión del DENV en poblaciones humanas es probablemente uno de los mayores retos para aquellos involucrados en el control vectorial. De acuerdo a los indicadores entomológicos producto de las pesquisas larvales se puede estimar un nivel de riesgo entomológico (OPS, 1994), sin embargo son varios los ejemplos en los cuales la relación entre estas medidas y los casos de dengue que se presentan en un sitio particular es variable (Pontes *et al.*, 2000; Scott & Morrison, 2004).

Son muchos los factores involucrados en la transmisión de un patógeno, una revisión de Kuno y Chang (2005) describen cuáles pueden ser los elementos involucrados para los arbovirus, sin embargo es necesario entender cuáles son los que se ven modificados de manera particular por el uso de mosquitos GM, para poder diseñar las estrategias más pertinentes al esclarecimiento de la información restante. En el caso de esta evaluación se detectaron tres posibles fuentes de modificación importantes: la densidad de vectores (con los efectos densodependientes asociados), la migración de mosquitos con un genotipo diferente y los tipos de DENV asociados.

Los factores asociados a la transmisión del dengue así como su ponderación dependerá de la zona y actores (vectores, patógenos y hospederos) involucrados. La construcción de las predicciones se puede lograr a través de modelos y simulaciones o evaluaciones pre y post aplicación de la tecnología, sin embargo es de suma importancia mantener actividades de monitoreo en las cuales se relacionen las densidades poblacionales con el número de casos de dengue así como sus descensos. Scott y Morrison (2004) hacen una excelente revisión de estos aspectos.

Sobre otras especies de mosquitos vectores.- El establecimiento o cambio en la dinámica de desarrollo que resulte en un aumento en la actividad vectorial de poblaciones que antes no se encontraban, debido a la reducción poblacional en las zonas donde se liberaron mosquitos GMs

- a) ¿Cuáles son las condiciones en las que sobreviven las especies de mosquitos vectores de la zona?
- b) ¿Cuál es el nivel de simetría en la competencia entre *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*?
- c) ¿Quién es más susceptible al DENV entre *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti*?

La capacidad de otras especies para establecerse, crecer en número e interactuar con el ambiente cuando los números de las poblaciones de *Ae. aegypti* disminuyen o sucede una extinción local es uno de los parámetros de importancia para manejar la incertidumbre (forma parte de algunas hipótesis con mayor riesgo asociado).

Las especies que se encuentran involucradas en cada uno de los escenarios puede variar, así como las condiciones y recursos que determinen las relaciones que existen entre ellas y el vector objetivo de la tecnología, por lo que es necesario realizar un análisis puntual de la región donde se desea desplegar dicho enfoque de control genético. Peterson y colaboradores (2009) analizan una serie de estudios en los que se consideran los recursos y condiciones presentes en localidades particulares y que podrían utilizarse para modelar algunas interacciones entre las especies de interés.

5) Discusión y Conclusiones

La innovación tecnológica que significa el uso de insectos modificados GM como herramienta para el biocontrol plantea una serie de retos para la manera en la que se entienden los esquemas de control vectorial. De particular interés es la manera en la que se construye una ERA alrededor de esta novedosa tecnología.

Las guías y marcos de trabajo diseñados para realizar una evaluación de este tipo se han realizado teniendo en cuenta principalmente cultivos GM para aplicaciones agrícolas y las experiencias de lidiar con este tipo de organismos han nutrido los procedimientos para realizar ERAs después de varias décadas. Las diferencias más grandes de estos tipos de OGMs son las siguientes:

El uso de las plantas a gran escala se ha distinguido por la liberación al ambiente de productos en los cuales se desea se exprese una característica que de una ventaja ante cierto tratamiento con respecto a los convencionales (e.g. resistencia a insectos y herbicidas); el uso de un sistema como el fsRIDL espera se obtenga la diseminación de una característica que disminuya el valor adaptativo de la siguiente generación de vectores.

El éxito del uso de la herramienta tecnológica consistirá en la reducción o extinción local de poblaciones de mosquitos, cuya presencia se encuentra asociada a un decremento en la salud y es indeseable. En contraste, la desaparición de los organismos parentales o parientes silvestres de los cultivos agrícolas sería considerada una consecuencia altamente negativa por la pérdida de germoplasma que estaría asociada a esta.

Las barreras estrictas de reproducción presentes en los insectos hacen que las hipótesis en las que se involucra un flujo de genes a especies cercanamente emparentadas sean fáciles de refutar, el objetivo de este flujo es una población blanco y específica. El flujo de genes entre los OGMs vegetales, los cultivos convencionales y parientes cercanos es un fenómeno usual que conforma un importante factor en la caracterización de la exposición en plantas.

La efectividad de la tecnología no se analiza normalmente en la ERA de plantas pues no representa un fenómeno que cause directamente algún daño ambiental o a la salud humana, mientras que la falta de potencia para reducir poblaciones de mosquitos debido a algún fallo en la herramienta de los mosquitos GM pudiera resultar en desenlaces negativos.

Estas diferencias ilustran el concepto de “caso por caso” en una ERA, ya que, aunque se comparten algunas inquietudes (e.g. alergenicidad y toxicidad de moléculas en cadenas tróficas)

las HR que se plantean a lo largo del proceso son diferentes a las implicadas cuando se analizan cultivos GM (las cuales pueden ser compartidas entre especies vegetales de uso agrícola). El impacto de estas consideraciones sobre el paradigma existente para realizar ERAs es de importancia pero se debe reconocer que la Formulación del Problema sigue siendo un enfoque que se puede adaptar a una diversidad de OGMs.

Los riesgos sólo se pueden caracterizar en función de aquellos elementos que son novedosos gracias a la tecnología utilizada, para poder lograr esto se deben de comparar con los riesgos que son propios e inherentes al comparador que fue escogido. De manera regular se escoge como comparador al organismo parental no modificado, por tener experiencia histórica en cultivos donde se utilizan un número limitado de estrategias tecnológicas (resistencia a herbicida, proteínas Cry, resistencia a estrés hídrico o interferencia por RNA).

Esta ERA no es la única que se ha generado para la liberación ambiental de mosquitos GM, Beech y colaboradores (2009) generaron junto a un grupo de trabajo en Malasia una serie de escenarios de riesgo. En la ERA antes mencionada se identificaron 31 casos que serían equivalente a Hipótesis de Riesgo y de esto sólo dos pudieron ser catalogados como “de bajo riesgo”, dejando al resto como “de riesgo despreciable”. La diferencia en estas dos evaluaciones se debe principalmente a que en la primera se trató de relacionar características indeseables de las poblaciones de vectores (e.g. incidencia de mordedura, capacidad para transmitir algún virus, una mayor longevidad) directamente con las características novedosas de los mosquitos y no se analizaron nexos causales más complejos (e.g. efectos densodependientes sobre el desarrollo, competencia asimétrica por recursos en el ambiente entre dos especies).

La diferencia con la ERA de Beech y colaboradores (2009) evidencia la necesidad de contar con información de la modificación genética pero también con atributos de la biología del mosquito y el ambiente en donde la especie a ser suprimida o disminuida se desarrolla.

Los procesos biológicos a los que están sujetas las poblaciones de mosquitos determinan características que no resultan evidentes cuando pensamos sólo en aquellas características que consideramos indeseables, un buen ejemplo de esto se encuentra en HR como la HR1 y HR2 en donde se analizan los cambios en el tamaño debido a efectos densodependientes y su efecto indirecto en la capacidad de estos organismos para ser vectores de alguna enfermedad; si sólo se buscara un nexo causal directo entre la presencia del constructo genético novedoso y la capacidad para ser vectores sería imposible visualizar escenarios que pueden resultar de importancia.

Morris (2011) también realiza una ERA en donde se analizan no sólo los riesgos sino los beneficios que una intervención de este tipo podría tener, sin embargo es difícil comparar ambos trabajos debido a que nuestra legislación establece que los beneficios del uso de OGM no forma parte de la ERA sino que puede influir en los tomadores de decisiones cuando se busca la autorización para este tipo de actividades. A pesar de que es un trabajo sumamente interesante, la pertinencia de este en el presente esta restringida a lo mencionado.

El ambiente en el que serán liberados los mosquitos GM es de crucial importancia también y, aunque se trata de una ERA hipotética en ambos casos, se pueden contar con algunas referencias mayores que sirvan para crear escenarios que impliquen conexiones causales entre una característica novedosa y un efectos indeseables. Gracias a estos supuestos es que es posible crear un andamiaje común para futuras ERA que se enfoquen en sitios y ambientes particulares.

El control vectorial a través de una herramienta genética supone una serie de retos para determinar el comparador más indicado ya que existen HR en las que tiene poco sentido comparar

con la versión convencional, la cual se considera un organismo de poco valor que deseamos limitar en el ambiente. Lo anterior no quiere decir que existen otras HR en las cuales es de suma utilidad tener como comparador al organismo no modificado, sino que la elección de estas entidades está sujeta a los riesgos que son identificados.

El método de control vectorial y las tecnologías asociadas a este (adulticidas o larvicidas químicos, biocontrol por depredadores) son quizás los comparadores más correctos para las HR en las que se involucra el proceso de reducción poblacional producto de la liberación de mosquitos GM. Una de las condicionantes o supuestos en el proceso por el cual sucede un efecto adverso involucra tasas de reducción diferentes a aquellas conseguidas por los métodos convencionales, esto hace que diferenciar la efectividad de cada uno de los enfoques se vuelva de suma importancia.

Con la intención de generar la comparación antes mencionada se debe de contar con la información de línea base que permita caracterizar a ambas herramientas de control y, si bien el proceso para explorar la tecnología GM y su efectividad en campo nos ha dado datos y directrices, es complicado encontrar información sobre el desempeño de los métodos convencionales dentro de las campañas de control vectorial.

Muchas de las HR implicaban el impacto de una tasa desconocida de reducción poblacional, que podría tener implicaciones en varios factores que están implicados en la capacidad de transmitir un patógeno por parte de las poblaciones de mosquitos. Este valor es de suma importancia por la dinámica que se genera debido a los efectos densodependientes de las reducciones poblacionales, pero no es exclusivo del enfoque de control genético.

El análisis del impacto que las estrategias convencionales (control larval y de adultos) tienen, es necesario pues las consideraciones y riesgos detectados en esta evaluación no son ajenas a estos métodos de control vectorial: la reducción poblacional sucede también en el enfoque no GM pero muchas veces se desconocen las consecuencias sobre el desarrollo hasta el estado adulto e infectivo de los mosquitos.

Cotejar los dos valores de reducción (convencional y GM) será de suma importancia para el diseño futuro de programas que involucren a cualquiera de las alternativas, el hecho de que el uso de OGMs en nuestro país se encuentre más estrictamente regulado no significa que sea más riesgoso o que alternativas como el uso de insecticidas dentro de esquemas de control vectorial integral no deban tomar en cuenta las implicaciones producto de las estrategias diseñadas.

Es necesario entender cuál es la relación que existe entre las poblaciones de mosquitos y la transmisión de un patógeno como el DENV, como se ha explicado de manera recurrente a lo largo de esta evaluación, los modelos de transmisión no parecen aún ser precisos para la transmisión de este virus.

Las pruebas que se realicen para probar conceptos como el fsRIDL deben de tener claro cuál es el objetivo de las liberaciones de mosquitos GM: reducir las poblaciones de vectores silvestres o disminuir la incidencia de los contagios y descenlaces por DENV. Lo anterior significa diferentes niveles de complejidad cuando se diseñan los protocolos de investigación y aquellos involucrados deben de ser conscientes de los alcances que pueden llegar a tener sus conclusiones. El hecho de conseguir una reducción poblacional no significa que se pueda extrapolar esta tendencia hacia el nivel de incidencia producto de las mordeduras del insecto.

El monitoreo vectorial, al nivel de desarrollo que se realice (pesquisas larvianas o de adultos), debe de estar acompañado de un monitoreo epidemiológico que sea más estricto a medida que

poblaciones humanas se encuentren más relacionadas con el tiempo y espacio en los cuales una tecnología como esta se despliega. Las consecuencias de la reducción poblacional pueden ser difíciles de predecir debido a la complejidad del fenómeno de transmisión y desarrollo de la enfermedad, pero esto no debe ser un impedimento para realizar campañas de monitoreo sobre las consecuencias de dicha dinámica.

La consideración anterior no sólo aplica para el uso de esta herramienta biotecnológica sino para cualquier enfoque que pretenda la supresión poblacional o extinción local de mosquitos, el uso de mosquitos GM dentro de alguna estrategia puede tener diferencias en la tasa y especificidad de reducción pero los fenómenos que provocarían los efectos densodependientes en los valores relacionados con la transmisión del virus no tienen que serlo necesariamente.

El modelo de transmisión del dengue es posiblemente una de las mayores incógnitas con las que se cuenta en nuestro país y el resto del mundo, ya sea por la complejidad del fenómeno o por la necesidad de generar modelos particulares para cada población de vectores, tipos virales involucrados, poblaciones humanas y ambiente en el que suceden las interacciones entre estos entes.

Los fenómenos ecológicos alrededor de las poblaciones de mosquitos suelen ser complejas por la distribución de poblaciones vecinas de la misma especie, presencia de otros vectores con los que puedan competir por condiciones y recursos, así como el desplazamiento de otras poblaciones que acompaña a la migración humana. Caracterizar a las poblaciones de mosquitos a las que la tecnología se encuentra dirigida puede ser un buen e intuitivo comienzo, sin embargo es necesario tener en cuenta que eventualmente se puede modificar la dinámica vectorial de un sitio con el objetivo de despejar la incertidumbre asociada a este análisis.

De particular interés pueden ser aquellos vectores a los cuales se ha asociado especialmente con los mosquitos objetivo, especies como *Ae. albopictus* y *Culex spp* fueron destacados en esta evaluación, pero son consideraciones que pueden cambiar una vez que se defina el sitio de liberación. Probablemente una de las mejores fuentes de información para conocer estos aspectos, y muchos otros asociados a la biología de los *Ae. aegypti*, sea el acercamiento e inclusión de aquellos involucrados en los programas de control y monitoreo ya establecidos.

Existen sitios en nuestro país que poseen programas de monitoreo vectorial que han obtenido resultados de pesquisas larvales por más tiempo y podrían brindar de una mejor línea base de información para el desarrollo de una liberación ambiental, lo cual se recomienda de consideración cuando se diseñen las estrategias de control vectorial con uso de mosquitos GM.

La realización de una ERA hipotética podría tener poco sentido debido a la poca resolución que esta tiene con respecto al enfoque "caso por caso": en este ejercicio no se contó con un sitio específico de liberación (ambiente receptor); sólo se abordaron las mecánicas básicas que puede tener un sistema fsRIDL sin tener en cuenta las consideraciones particulares del evento de transformación (OGM) como el desempeño para copular; y no se consideró un enfoque particular de control vectorial (uso previsto) en el que esta herramienta pudiera estar asociada.

Debido a lo anterior se obtuvo una caracterización del riesgo cuya mayor contribución fue la detección de incertidumbre a lo largo del proceso, lo cual era de esperar en ausencia de datos precisos para realizar análisis particulares. Probablemente la detección de los sitios en los cuales la información sea necesaria sea una de las acciones más importantes cuando se trata de generar un esquema de bioseguridad para OGM, esto puede orientar la manera en la que las actividades se realizan y evitar trabajos infuctuosos o abandonos de proyectos cuando aquellos que los

realizan se ven abrumados por la cantidad de consideraciones necesarias en un proyecto que ha llevado una enorme cantidad de tiempo y recursos.

Orientar las investigaciones que están relacionadas con bioseguridad cuando se realiza un proyecto particular con OGMs no debe de ser una labor que consuma recursos de manera desmedida, siempre y cuando se realice en las etapas indicadas de desarrollo de la misma. El análisis previamente hecho se encuentra distante de ser una ERA operable para sortear la regulación de las actividades que involucren mosquitos GM, sin embargo se trata de un ejemplo de como se pueden realizar evaluaciones que dependan de experiencias previas para detectar riesgos así como fuentes de incertidumbre.

La atención y cooperación con los encargados de regular esta área en nuestro país puede ser de suma ayuda para el desarrollo de actividades que involucren a cualquier OGM. La ERA es sólo una de las consideraciones para realizar trabajos de bioseguridad en México, existen otros mecanismos contenidos en la LBOGM que se deben de tomar en cuenta a lo largo de las actividades y que pueden llegar a plantear barreras para la investigación y limitar el uso seguro de los OGMs si no son tomadas en cuenta desde las etapas de desarrollo tempranas de alguna biotecnología.

Por último es necesario aclarar que este ejercicio no se trata de una recomendación hacia los tomadores de decisiones o consideraciones éticas sobre el uso de esta tecnología en poblaciones humanas; dichos aspectos son ampliamente discutidos en otras investigaciones (Wermelinger *et al.*, 2014) que pueden ser tomados en cuenta para el uso seguro de herramientas biotecnológicas pero que no corresponden a la ERA que se plantea desde el inicio. Aunque no se trata de un análisis de tipo técnico sobre la efectividad de los sistemas evaluados, este último aspecto es de suma importancia pues uno de los supuestos básicos de varias HR es que existe una reducción poblacional en tiempo y dinámica diferente a los métodos convencionales y la existencia de controversias sobre la eficacia de las intervenciones que implican mosquitos GM deben de ser resueltas de la manera más transparente posible para disipar incertidumbre que no permite caracterizar los riesgos de forma certera.

6) Referencias

AHTEG Ad Hoc Technical Experts Group on Risk analysis and Risk Management (2012) *Guidance on risk assessment of living modified organisms*. UNEP/CBD/BS/COP-MOP/6/1. http://bch.cbd.int/onlineconferences/guidance_ra

Adams, B. & Boots, M. (2006). Modeling the relationship between antibody-dependent enhancement and immunological distance with application to dengue. *Journal of Theoretical Biology* 242(2): 337-346.

Adams, B. Holmes, E.C. Zhang, C. Mammen, M.P. Nimmannitya, S. Kalayanaroj, S. & Boots, M. (2006) Cross-protective immunity can account for the alternating epidemic pattern of dengue virus serotypes circulating in Bangkok. *PNAS* 103 (38): 14234-14239.

Adlakha, V. & Pillai, M.K. (1975). Involvement of male accessory gland substance in the fertility of mosquitoes. *Journal of Insect Physiology* 21(8): 1453-1455.

Aitken, T.H.G. Downs, W.G. & Shope, R.E. (1977). *Aedes aegypti* strain fitness for yellow fever virus transmission. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 26: 985-990.

Akhter, R. Hayes, C.G. Baqar, S. & Reisen, W.K. (1982). West Nile virus in Pakistan. III. Comparative vector capability of *Culex tritaeniorhynchus* and eight other species of mosquitoes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 76(4):449-53.

Almeida, A.P. Baptista, S.S. Sousa, C.A. Novo, M.T. Ramos, H.C. Panella, N.A. Godsey, M. Simoes, M.J. Anselmo, M.L. Komar, N. Mitchell, C.J. & Ribeiro, H. (2005). Bioecology and vectorial capacity of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Macao, China, in relation to dengue virus transmission. *Journal of Medical Entomology* 42: 419-428.

Alphey, L. (2000). Is RIDL the Answer? *ISB News Report* May 2000: 8-10.

Alphey, L. (2002). Re-engineering the sterile insect technique. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 32(10): 1243-1247.

Alphey, L. (2014). Genetic Control of Mosquitoes. *Annual Review of Entomology* 59: 205-224.

Alphey, L. Benedict, M. Bellini, R. Clark, G.G. Dame, D.A. Service, M.W. & Dobson, S.L. (2010). Sterile-Insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 10(3): 295-311.

Alto, B.W. Lounibos, L.P. Higgs, S. & Steven, J.A. (2005). Larval competition differentially affects arbovirus infection in *Aedes* mosquitoes. *Ecology* 86(12): 3279-3288.

Alto, B.W. Lounibos, L.P. Mores. C.N. & Reiskind, M.H. (2008). Larval competition alters susceptibility of adult *Aedes* mosquitoes to dengue infection. *Proceedings of The Royal Society* 275: 463-471.

Alto, B.W. Reiskind, M.H. & Lounibos, L.P. (2008b). Size Alters Susceptibility of Vectors to Dengue Virus Infection and Dissemination. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 79(5): 688-695

- Anderson, J.R. & Rico-Hesse, R. (2006). *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. *American Journal of Medicine and Hygiene* 75(5): 886-892
- Angel, R.M. & Valle, J.R. (2013). Dengue Vaccines: Strongly touted but not a reality just yet. *PLoS Pathogens* 9(10): e1003551.
- Arensburger, P. Hice, R.H. Wright, J.A. Craig, N.L. & Atkinson, P.W. (2011). The mosquito *Aedes aegypti* has a large genome size and high transposable element load but contains a low proportion of transposon-specific piRNAs. *BMC Genomics* 12: 606.
- Armstrong, P.M. & Rico-Hesse, R. (2001). Differential Susceptibility of *Aedes aegypti* to infection by the American and Southeast Asian Genotypes of Dengue Type 2 Virus. *Vector Borne Zoonotic Diseases* 1(2): 159-168.
- Arrivillaga, J. & Barrera, R. (2004). Food as a limiting factor for *Aedes aegypti* in water-storage containers. *Journal of Vector Ecology* 29(1): 11-20.
- Atkinson, P.W. Warren, W.D. & O'Brochta, D.A. (1993). The hobo transposable element of *Drosophila* can be cross-mobilized in houseflies and excises like the *Ac* element of maize. *PNAS* 90: 9693-9697.
- Atkinson, M.P. Zu, Z. Alphey, N. Alphey, L.S. Coleman, P.G. & Wein, L.M. (2007). Analyzing the control of mosquito-borne disease by a dominant lethal genetic system. *PNAS* 104: 9540-9545.
- Atmosoedjono, S. van Peenan, P.F.D. See, R. & Soroso, J.S. (1972). Man-biting activity of *Aedes aegypti* in Djakarta, Indonesia. *Mosquito News* 32: 467-469.
- Avila, F.W. Sirot, L.K. LaFlamme, B.A. Rubinstein, C.D. & Wolfner, M.F. (2011). Insect Seminal Fluid Proteins: Identification and Function. *Annual Review of Entomology* 56: 21-40.
- Baqar, S. Hayes, C.G. & Ahmed, T. (1980). The effect of larval rearing conditions and adult age on the susceptibility of *Culex tritaenio-rhynchus* to infection with West Nile virus. *Journal Mosquito News* 20 (2): 165-171.
- Barbosa, S. Black, W.C. IV & Hastings, I. (2011). Challenges in estimating insecticide selection pressures from mosquito field data. *PLoS Neglected Disease* 5(11): e1387.
- Bargielowski, I. Nimmo, D. Alphey, L. & Koella, J.C. (2011). Comparison of life history characteristics of the genetically modified OX513A line and wild type strain of *Aedes aegypti*. *PLoS ONE* 6(6): e20699.
- Barnard, D.R. (2000). *Global collaboration for development of pesticides for public health. Repellents and toxicants for personal protection position paper*. Ginebra: World Health Organization.
- Baron, A. Freundlieb, S. Gossen, M. & Buiard, H. (1995) Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter. *Nucleic Acids Research* 23 (17): 3605-3606.
- Barrera, R. (1996). Competition and resistance to starvation in larvae of container-inhabiting *Aedes* mosquitoes. *Ecological Entomology* 21:112-127.

- Barrera, R. Amador, M. & Clark, GG. (2006). Ecological factors influencing *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) productivity in artificial containers in Salinas, Puerto Rico. *Journal of Medical Entomology* 43(3): 484-492.
- Barrera, R. Amador, M. Diaz, A. Smith, J. Muñoz-Jordan, J.L. & Rosario, Y. (2008). Unusual productivity of *Aedes aegypti* in septic tanks and its implications for dengue control. *Medical and Veterinary Entomology* 22(1): 62-69.
- Beal, F.E.L. (1918). *Food habits of the swallows, a family of valuable native birds*. U.S. Department of Agriculture Bulletin 619.
- Beech, C.J. Koukidou, M. Morrison, N.I. & Alphey, L. (2012). Genetically modified insects: Science, use, status and regulation. En International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ed). *Collection of Biosafety Reviews- Vol 6* (pp. 66-124) Trieste: ICGEB.
- Beech, C.J. Nagaraju, J. Vasan S.S. Rose R.I. Othman R.Y. Pillai V. & Saraswathy T.S. (2009). Risk analysis of a hypothetical open field release of a self-limiting transgenic *Aedes aegypti* mosquito strain to combat dengue. *AsPac Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 17(3):99-111.
- Beerntsen, B.A. James, A.A. & Christensen, B.M. (2000). Genetics of mosquito vector competence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64(1): 115-137.
- Bellinato, T.F. Martins, A.J. & Valle, D. (2012). Fitness evaluation of two Brazilian *Aedes aegypti* field populations with distinct levels of resistance to the organophosphate temephos. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 107(7): 916-922.
- Benedict, M.Q. & Robinson, A.S. (2003). The first release of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. *TRENDS in Parasitology* 19(8): 349-355.
- Bennet, K.E. Olson, K.E. Muñoz, M.L. Fernandez-Salas, I. Farfan-Ale, J.A. Higgs, S. Black, W.C. IV & Beaty, B.J. (2002). *American Journal of Tropical Meicine and Hygiene* 67(1): 85-92.
- Berghammer, A.J. Klinger, M. & Wimmer, E.A. (1999). A universal marker for transgenic insects. *Nature* 402: 370-371.
- Berticat, C. Boquien, G. Raymond, M. & Chevillon, C. (2002). Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genetical Research* 79(1): 41-47.
- Benedict M.K. & A.S. Robinson. (2003). The first release of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. *Trends in Parasitology* 19(8): 349-355.
- Benedict, M.Q. Levine, R.S. Hawley, W.A. & Lounibos, L.P. (2007). Spread of the tiger: Global Risk of invasion by the Mosquito *Aedes albopictus*. *Vector Borne Zoonotic Diseases* 7(1):76-85.
- Black, W.C.IV. Alphey, L. & James, A.A. (2011). Why RIDL is not SIT. *Trends in Parasitology* 27(8): 362-370
- Black, W.C. IV. Nennett, K.E. Gorrochótegui-Escalante, N. Barillas-Mury, C.V. Fernández-Salas, I. Muñoz, M.L. Farfán-Alé, J.A. Olson, K.E. & Beaty, B.J. (2002). Flavivirus Susceptibility in *Aedes aegypti*. *Archives of Medical Research* 33: 379-388.

- Blitvich, B.J. Fernandez-Salas, I. Contreras-Cordero, J.F. Marlenee, N.L. Gonzalez-Rojas, J.I. Komar, N. Gubler, D.J. Calisher, C.H. & Beaty B.J. (2003) Serologic Evidence of West Nile Virus Infection in Horses, Coahuila State, Mexico. *Emerging Infectious Disease* 9(7): 853-856.
- Bonilauri, P. Bellini, R. Calzolari, M. Angelini, R. Venturi, L. Fallacara, F. Cordioli, P. Angelini, P. Venturelli, C. Meriardi, G. & Dottori, M. (2008). Chikungunya virus in *Aedes albopictus*, Italy. *Emerging Infectious Diseases* 14(5): 853-854.
- Borgherini, G. Poubeau, P. Jossaume, A. Goux, A. Cotte, L. Michault, A. Arvin-Berod, C. & Paganin, F. (2008). Persistent Arthralgia Associated with Chikungunya Virus: A study of 88 Adult Patientes on Reunion Island. *Clinical Infectious Diseases* 47(4): 469-475.
- Bosio, C.F. Beaty, B.J. & Black, W.C.IV. (1998). Quantitative genetics of vector competence for dengue 2 virus in *Aedes aegypti*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59(6): 965-970.
- Bosio, C.F. Fulton, R.E. Salasek, M.L. Beaty, B.J. & Black, W.C. IV. (2000). Quantitative Trait Loci That Control Vector Competence for Dengue-2 Virus in the Mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics* 156: 687-698.
- Boyer, S. Toty, C. Jacquet, M. Lempérie, G. & Fontenille, D. (2012). Evidence of Multiple Inseminations in the Field in *Aedes albopictus*. *PLoS ONE* 7(8): E42040.
- Braks, M.A.H. Honório, N.A. Louernço-de-Oliveira, R. Juliano, A.S. & Lounibos, L.P. (2003). Convergent habitat segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in southeastern Brazil and Florida. *Journal of Medical Entomology* 40: 785-794.
- Brault, A.C. Langevin, S.A. Bowen, R.A. Panella, N.A. Biggerstaff, B.J. Miller, B.R. & Komar, N. (2004). Differential virulence of West Nile Strains for American crows. *Emerging Infectious Disease* 10(12): 2161-2168.
- Brault, A.C. Powers, A.M. Ortiz, D. Estrada-Franco, J.G. Navarro-Lopez, R. (2004). Venezuelan equine encephalitis emergence enhanced vector infection from a single amino acid substitution in the envelope glycoprotein. *PNAS* 1010(31): 11344-11349.
- Briegel, H. (1990). Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Phisiology* 36(3): 165-172.
- Briegel, H. Knûsel, I. & Timmermann, S.E. (2001). *Aedes aegypti*: size, reserves, survival, and flight potential. *Journal of Vector Ecology* 26(1): 21-31.
- Brink, J. McKelvey, M. & Smith K (2004) Conceptualizing and measuring modern biotechnology. En: *The Economic Dynamics of Modern Biotechnology*. 2004. McKelvey, M. Rickne, A. & J. Laage-Hellman (eds) Edward Elgar Publishing Limited. 20-43 pp
- Brogdon, W.G. & McAllister, J.C. (1998). Insecticide resistance and vector control. *Emerging Infectious Diseases* 4(4): 605-613.
- Bud, R. (1994). *The Uses of Life: A History of Biotechnology*. Nueva York:Cambridge Univesrity Press.

- Burkot, T.R. Handzel, T. Schmaedik, J. Tufa, J. Roberts, J.M. & Graves, P.M. (2007). Productivity of natural and artificial containers for *Aedes polynesiensis* and *Aedes aegypti* in four American Samoan villages. *Medical and Veterinary Entomology* 21(1): 22-29.
- Butler, D. (2011). Mosquitoes score in chemical war. *Nature* 475: 19.
- Calderon-Arguedas, O. & Troyo, A. (2007). Evaluación del nicho ecológico de formas larvales de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) en una comunidad urbana de San José, Costa Rica. *Parasitología latinoamericana* 62(3-4): 142-147.
- Calderón-Arguedas, O. Troyo, A. Solano, M.E. Avendaño, A. & Beier, J.C. (2009). Urban mosquito species (Diptera: Culicidae) of dengue endemic communities in the Greater Puntarenas area, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 57(4): 1223-1234.
- Cameron, P. & Farrar, J. (2009). Changing Patterns of Dengue Epidemiology and Implications for Clinical Management and Vaccines. *PLoS Medicine* 6(9): e1000129.
- Campbell, G.L. Marfin, A.A. Lanciotti, R.S. & Gubler, D.J. (2002). West Nile Virus. *Lancet Infectious Diseases* 2(9): 519-529.
- Carrillo-Valenzo, E. Danis-Loazano, R. Velasco-Hernández, J.X. Sánchez-Burgos, G. Alpuche, X. López, I. Rosales, C. Baronti, C. de Laballerie, X. Holmes, E.C. & Ramos-Catañeda, J. (2010). Evolution of dengue virus in Mexico is characterized by frequent lineage replacement. *Archive of Virology* 155(9): 1401-1412.
- Casas-Martinez, M. Orozco-Bonilla, A. Muñoz-Reyes, M. Ulloa-García, A. Bond, J.G. Valle-Mora, J. Weber, M. & Rojas, J.C. (2013). A new tent trap for monitoring the daily activity of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Journal of Vector Ecology* 38(2): 277-288.
- Catteruccia, F. Nola, T. Loukeris, T.G. Blass, C. Savakis, C. Kafatos, F. & Andrea, C. (2000). Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Nature* 405: 959-962.
- CDB. (2002). *Protocolo de Cartagena sobre la Bioseguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica*, Montreal: Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica.
- CDC. (2014). West Nile Virus in the United States: Guidelines for Surveillance, Prevention, and Control. <http://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/wnvGuidelines.pdf> (Consultado el 9 de Junio del 2014).
- CDC. (2014). *West Nile Virus Transmission* <http://www.cdc.gov/westnile/transmission/> (Consultado el 29 de Mayo del 2014)
- Chadee, D.D. & Matinez, R. (2000). Landing periodicity of *Aedes aegypti* with implications for dengue transmission in Trinidad, West Indies. *Journal of Vector ecology* 25: 158-163.
- Chambers, G.M. & Klowden, M.J. (1990). Correlation of nutritional reserves with critical weight for pupation in larval *Aedes* mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association* 6: 394-399.
- Chan, K.L. (1985). Singapore`s dengue haemorrhagic fever control programs: a case study on the succesful control of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* using mainly environmental measures as a part of integrated vector control. Tokyo: Southeast Asian Medical Information Center.

- Chan, M. & Johanssen, M.A. The Incubation periods of dengue viruses. *PLoS ONE* 7(11): e50972.
- Chandra, G. Bhattacharjee, I. Chatterjee, S.N. & Ghosh, A. (2008). Mosquito control by larvivorous fish. *Indian Journal of Medical Research* 127: 13-27.
- Chaves, L.F. Harrington, L.C. Keogh, C.L. Ngunyen, A.M. & Kitron U.D. (2010). Blood feeding patterns of mosquitoes: random or structured? *Frontiers in Zoology* 7(3): 1-11
- Chen, W.J. Wei, H.L. Hsu, E.L. & Chen, E.R. (1993). Vector competence of *Aedes albopictus* and *Ae. aegypti* (Dipter: Culicidae) to dengue 1 virus on Taiwan: development of the virus in orally and parenterally infected mosquitoes. *Journal of Medical Entomology* 30 (3): 524-530.
- Chopra, I. & Roberts, M. (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65(2): 232-260.
- Chowell, G. Diaz-Dueñas, P. Miller, J.C. Alcazar-Velazco, A. Hyman, J.M. Fenimore, P.W. & Castillo-Chavez, C.. (2006). Estimation of the reproduction number of dengue fever from spatial epidemic data. *Mathematical Biosciences* 208: 571-589.
- Chowell, G. & Sánchez, F. (2006). Climate-based descriptive models of dengue fever: the 2002 epidemic in Colima, México. *Journal of Environmental Health* 68: 40-44
- Christophers, S.R. (1960). *Aedes aegypti* (L.) the Yellow Fever mosquito. Its life story, bionomics and structure. Cambridge University Press.
- Clark, D.V. Mammen, M.P. Nisalak, A. Puthimethee, V. & Endy, T.P. (2005). Economic impact of dengue fever/dengue hemorrhagic fever in Thailand at the family and population levels. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 72(6): 786-791.
- Clark, T.M. Flis, J.B. & Remold, S.K. (2004). Differences in the effects of salinity on larval growth and developmental programs of a freshwater and euryhaline mosquito species (Insecta: Diptera, Culicidae). *The Journal of Experimental Biology* 207: 2289-2295
- CNNMEXICO. (2014, 26 de Junio). La Secretaría de Salud confirma el primer caso de chikungunya en México Recuperado el 22 de Julio del 2014 de <http://mexico.cnn.com/nacional/2014/06/26/la-secretaria-de-salud-confirma-el-primer-caso-de-chikungunya-en-mexico>
- Coates, C.J. Jasinkien, N. Miyashiro, L. & James, A.A. (1998). Mariner transposition and transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *PNAS* 95 (7):3748-3751.
- Col, N.F. & O'Connor, R.W. (1987). Estimating Worldwide Current Antibiotic Usage: Report of Task Force 1. *Clinical Infectious Diseases* 9(S3): S232-S243.
- Collins, L.E. & Blackwell, A. (2000). The biology of *Toxorhynchites* mosquitoes and their potential as biocontrol agents. *Biocontrol* 21(4): 105-116
- Cohen, S.N. Chang, A.C.Y. Boyer, H.W. & Helling, R. (1973). Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids *In Vitro*. *PNAS* 70(11): 3240-3244.
- Córdoba-Aguilar, A. (2008). *Dragonflies and Damselflies: Model Organisms for Ecological and Evolutionary Research*. Oxford: Oxford University Press.

- Costanzo, K.S. Kesavaraju, B. & Juliano S.A. (2005). Condition-specific competition in container mosquitoes: the role of noncompeting life-history stages. *Ecology* 86: 3289-3295.
- Coutinho-Abreu, I.V. Zhu, K.Y. & Ramalho-Ortigao, M. (2010). Transgenesis and paratransgenesis to control insect-borne diseases: Current status and future challenges. *Parasitology International* 59(1):1-8
- Covello, V.T. & Merkholer, M.W. (1993). *Risk Assessment Methods: Approaches for Assessing Health and Environmental Risks*. Nueva York: Springer Science & Business Media.
- CONAVE. (2012). Aviso epidemiológico de Dengue: incremento de casos de Dengue en México CoNaVe/2012/04/DENGUE 05/julio/2012
- CONAVE. (2011). Alerta epidemiológica Dengue: Circulación de DENV-3 en México DGE/2011/04/DENGUE 20/ OCTUBRE/ 2011
- Craig, G.B. (1967). Mosquitoes: Female Monogamy Induced by Male Accessory Gland Substance. *Science* 156(3781): 1499-1501.
- Crochu, S. Cook, S. Attoui, H. Charrel, R.N. De Chesse, R. Belhouchet, M. Lemasson, J. de Mico, P. & de Lamballerie, X. (2004). Sequences of flavivirus-related RNA viruses persist in DNA form integrated in the genome of *Aedes* spp. Mosquitoes. *Journal of General Virology* 85: 1971-1980.
- Cummings, D.A.T. Schwartz, I.B. Billings, L. Schaw, L.B. & Burke, D.S. (2005). Dynamic effects of antibody-dependent enhancement on the fitness of viruses. *PNAS* 102: 15259-15264.
- Dafa'alla, T.H. Condon, G.C. Condon, K.C. Phillips, C.E. Morrison, N.I. Jin, L. Epton, M.J. Fu, G. & Alphey, L. (2006). Transposon-free insertion for insect genetic engineering. *Nature biotechnology* 24(7): 820-821.
- Dantes, H.G. Koopman, S.J. Addy, C.L. Zarate, M.L. Marin, M.A. Longini Junior, I.M. Gutierrez, E.S. Rodriguez, V.A. García, L.G. & Mirelles, E.R. (1998). Dengue epidemics on the Pacific Coast of México. *International Journal of Epidemiology* 17 (1): 178-186.
- David, R.M. Ribeiro, G.S. & de Freitas, R.M. (2012). Bionomics of *Culex quinquefasciatus* within urban areas of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil. *Revista de Saúde Pública* 46(5): 858-865.
- Dar, L. Broor, S. Sengupta, S. Xess, I. & Seth, P. (1999). The First Major Outbreak of Dengue Haemorrhagic Fever in Delhi, India. *Emerging Infectious Diseases* 5(4): 589-590.
- Dash, A.P. Raghavendra, K. & Pillai, M.K.K. (2007). Resurrection of DDT: a critical approach. *Indian Journal of Medical Research* 126: 1-3.
- Dash, P.K. Parida, M.M. Saxena, P. Abhyankar, A. Singh, C.P. Tewari, K.N. Jana, A.M. Sekhar, K. & Rao, P.V.L. (2006). Reemergence of dengue virus type-3 (subtype-III) in India: Implications for increased incidence of DHF & DSS. *Virology Journal* 3:55.
- Dash, P.K. Saxena, P. Abhyankar, A. Bhargava, R. & Jana, A.M. (2005). Emergence of dengue virus type-3 in northern India. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 36(2): 370-377.

Daugherty, M.P. & Juliano, S.A. (2003). Leaf scraping beetle feces are a food resource for tree hole mosquito larvae. *The American Midland Naturalist* 150: 181-184.

De la Mora-Covarruvias, A. Rubio-Arias, H.O. & Jiménez-Catro, J.A. (2008). Vigilancia entomológica de *Culex quinquefasciatus* Say, 1823, vector de enfermedades arbovirales en la zona urbana de Ciudad Juárez, Chihuahua, México. *Universidad y Ciencia* 24(2): 101-109.

Delatte, H. Desvars, A. Bouetard, A. Bord, S. Gimonneau, G. Vourch, G. & Fontenille, D. (2010). Blood-feeding behavior of *Aedes albopictus*, a vector of Chikungunya on La Reunion. *Vector Borne Zoonotic Disease* 10: 249-258.

DGAIInDre. (2013). Panorama Epidemiológico de Fiebre por Dengue y Fiebre Hemorrágica por Dengue: Información publicada en la Semana Epidemiológica 52 http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/panodengue/PANORAMAS_2014/panodengue_sem_05_2014.pdf

Diaz, F.J. Farfán-Ale, J.A. Olson, K.E. Loroño-Pino, M.A. Gubler, D.J. Blair, C.D. Black, W.C.IV & Beaty, B.J. (2002). Genetic variation within pre-membrane coding region of dengue viruses from the Yucatan peninsula of Mexico. *American Journal of Medicine and Hygiene* 67(1): 93-101.

Dom, N.C. Ahmad, A.H. & Isamil, R. (2013). Habitat Characterization of *Aedes* Sp. Breeding in Urban Hotspot Area. *Social and Behavioral Sciences* 85: 100-109.

Dueñas, D.C. Llinás, G.A. Panzetta-Dutari, G.M. & Gardenal, C.N. (2009). Two different routes of colonization of *Aedes aegypti* in Argentina from neighboring countries. *Journal of Medical Entomology* 46(6): 1344-1354.

Duff, B. (2005). *Presence of tetracycline antibiotics in surface water. A study of the presence/absence of tetracycline in the Raccoon river watershed.* Des Moines water works laboratory.

Dye, C. (1986). Vectorial capacity: Must we measure all its components? *Parasitology Today* 2(8): 203-209.

Edman, J.D. & Scott, T.W. (1987). Host defensive behavior and the feeding success of mosquitoes. *International Journal of Tropical Insect Science* 8(4): 617-622

EFSA. (2006). Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. *The EFSA Journal*, 99, 1-100.

EFSA. (2010). Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants. *EFSA Journal* 8(11): 1-111

Emlen, S.T. & Oring, L.W. (1977). Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. *Science* 197: 215-223.

EPA. (1976). *Health Risk and Economic Impact Assessments of Suspected Carcinogens: Interim Procedures and Guidelines.* *Federal Register* 41 (102): 21402-21045.

EPA. (1998). Guidelines for ecological risk assessment. *Federal Register* 63(93): 26846-26924.

- Erlanger, T.E. Keiser, J. & Utzinger, J. (2008). Effect of dengue vector control interventions on entomological parameters in developing countries: a systematic review and meta-analysis. *Medical and Veterinary Entomology* 22(3): 203-221.
- Enserink, M. (2006). Massive Outbreak Draws Fresh Attention to Little-Known Virus. *Science* 311(5764): 1085.
- Esu, E. Lenhart, A. Smith, L. & Horstick O. (2010). Effectiveness of peridomestic space spraying with insecticide on dengue transmission; systematic review. *Tropical Medicine and International Health* 15(5): 619-631.
- Evans, J. Wood, G. & Miller, A. (2006). The risk assessment policy gap: An example from the UK contaminated land regime. *Environmental International: a journal of environmental science, risk and health* 32(8): 1066-1071
- Facchinelli, L. Valerio, L. Ramsey, J.M. Gould, F. Walsh, R.K. Bond, G. Robert, M.A. Loyd, A.L. James, A.A. Alphey, L. & Scott, T.W. (2013). Field Cage Studies and Progressive Evaluation of Genetically-Engineered Mosquitoes. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7(1): e2001.
- Facchinelli, L. Valerio, L. Bond, J.G. Wise de Valdez, M.R. Harrington, L.C. Ramsey, J.M, Casas-Martinez, M. & Scott, T.W. (2011). Development of a Semi Field System for Contained Field Trials with *Aedes aegypti* in Southern Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (2): 248-256.
- Fang, J. (2010). A world without mosquitoes. *Nature* 466: 432-434.
- Farjana, T. & Tuno, N. (2012). Effects of body size on multiple blood feeding and egg retention of *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae). *Medical Entomology and Zoology* 63(2): 1-9.
- Farjana, T. & Tuno, N. (2013). Multiple Blood Feedin in Host-Seeking Behavior in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 50(4): 838-846.
- FDA. (1996). *Approved Drug Products with Therapeutic Equivalence Evaluations (Orange Book)* pp. v-xxii
- Fernández, I.S. (2009). *Biología y Control de Aedes aegypti: Manual de Operaciones*. Nuevo León: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Fernández-Salas, I. & Flores-Leal, A. (1995). Epidemiología del dengue en México. *Salud Pública de México* 37(Su1): 45-52.
- Feschote, C. & Pritham, E.J. (2007). DNA Transposons and the Evolution of Eukaryotic Genomes *Annual Reviews of Genetics* 41: 331-368.
- Figueredo, M.A.A. Rodriguez, L.C. Barreto, M.L. Lima, J.W.O. Costa, M.C.N. Morato, V. Blanton, R. Vasconcelos, P.F.C., Nunes, M.R.T. & Teixeira, M.G. (2010). Allergies and diabetes as risk factors for dengue hemorrhagic fever: Results of a Case Control Study. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4(6): e699.
- Fillinger, U. Ndenga, B. Githeko, A. & Lindsay, S.W. (2009). Integrated malaria vector control with microbial larvicides and insecticide-treated nets in western Kenya: a controlled trial. *Bulletin of World Health Organization* 87: 655-665.

- Fisher, I.J. Bradshaw, W.E. & Kammeyer, C. (1990). Fitness and Its Correlates Assessed by Intra- and Interspecific Interactions among Tree-Hole Mosquitoes. *Journal of Animal Ecology* 59(3): 819-829.
- Focks, D.A. (2003). *A review of Entomological Sampling Methods and Indicators for Dengue Vectors*. Gainesville: World Health Organization.
- Focks, D.A. & Alexander, N. (2006). *Multicountry study of Aedes aegypti pupal productivity survey methodology. Findings and recommendations.* , Ginebra: World Health Organization.
- Focks, D.A. & Chadee, D.E. (1997). Pupal survey: an epidemiologically significant surveillance method for *Aedes aegypti*: an example using data from Trinidad. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 56: 159-167.
- Focks, D.A. Brenner, J.H. & Daniels, E. (2000). Transmission thresholds for dengue in terms of *Aedes aegypti* pupae per person with discussion of their utility in source reduction efforts. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 62(1): 11-18.
- Focks, D.A. Daniels, E. Haile, D.G. & Keesling, J.E. (1995). A simulation Model of the Epidemiology of Urban Dengue Fever: Literature Analysis, Model Development, Preliminary Validation, and Samples of Simulation Results. *American Journal Of Tropical Medicine and Hygiene* 53(5): 489-506.
- Focks, D.A. Haile, D.G. Daniels, E. & Mounts, G.A. (1993). Dynamic life table model for *Aedes aegypti* (L.)(Diptera: Culicidae): Simulation results and validation. *Journal of Medical Entomology* 30: 1108-1028.
- Foot, R.H. (1961). Book Reviews: *Aedes Aegypti* (L.), the Yellow Fever Mosquito. Its life history, bionomics, and structure. *Science* 133(3463): 1473-1474.
- Forattini, O.P. (1998). Culicidae mosquitos as emerging vectors of disease. *Revista de Saude Publica* 32(6): 497-502.
- Francis, D.B. Karabastos, N. Wesson, D.M. Moore, C.G. Laznick, J.S. Niebylski, M.L. Tsai, T.F. & Craig, G.B. (1990). A new arbovirus from *Aedes albopictus*, an Asian mosquito established in the United States. *Science* 250 (4988): 1738-1740
- Frankie, G.W. (1978). Ecology of Insects in Urban Environments. *Annual Reviews in Entomology* 23: 367-387.
- Franz, G. & Savakis, C. (1991). Minos, a new transposable element from *Drosophila hydei* is a member of the Tc1-like family of transposons. *Nucleic Acids Research* 19(23): 6646.
- Fraser, M.J. Cary, L. Boonvisudhi, K. & Wang, H.G. (1995). Assay for movement of Lepidopteran transposon IFP2 in insect cells using baculovirus genome as a target DNA. *Virology* 211: 397-407.
- Fronhe, W.C. (1956). The Biology of Northern Mosquitoes. *Public Health Reports* 71(6): 616-622
- 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. & Alphey, L.. (2010) Female-specific flightless phenotype for mosquito control. *PNAS* 107: 4550-4554.

Gama, R.A. de Carvalho, K.A. Ferreira, R.M. Eiras, A.E. & de Resende, M.C. (2005). Efeito da densidade larval no tamanho de adultos de *Aedes aegypti* criados em condições de laboratório. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38(1): 64-66.

García, G.P. Flores, A.E. Fernández-Salas, I. Saavedra-Rodríguez, K. Reyes-Solis, G. Lozano-Fuentes, S. Bonf, J.G. Casas-Martinez, M. Ramsey, J.M. García-Rejón, J. Domínguez-Galera, M. Ranson, H. Hemingway, J. Eisen, L. & Black, W.C.IV. (2009). Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in México. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3(10): e531.

Garcia-Franco, F. de Lourdes, M.M. Lozano-Fuentes, S. Fernandez-Salas, I. Garcia-Rejon, J. Beaty, B.J. & Black, W.C. IV. (2002). Large Genetic Distances Among *Aedes aegypti* Populations Along the South Pacific Coast of Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 6(5): 594-598.

García-Rejón, J.E. Farfan-Ale, J.A. Ulloa, A. Flores-Flores, L.F. Rosado-Paredes, E. Baak-Baak, C. Loroño-Pino, M.A. Fernández-Salas, I. & Beaty, B.J. (2008). Gonotrophic cycle estimate for *Culex quinquefasciatus* in Mérida, Yucatán, México. *Journal of The American Mosquito Control Association* 24(3): 344-348.

Garrido-Pérez, S.M.G. Beltrán-Moha, A.S. Piña-Gutierrez, O.E. & Hernández-Martínez, E. (2004). Estudio serológico de arbovirus en población expuesta en municipios de riesgo en Tabasco, México. *Salud en Tabasco* 10(003): 275-281.

Gerhardt, R.R. Gottfried, K.L. Apperson, C.S. Davis, B.S. Erwin, P.C. Smith, A.B. Panella, N.A. Powell, E.E. & Nasci, R.S. (2001) First isolation of La Crosse virus from naturally infected *Aedes albopictus*. *Emergent Infectious Diseases* 7:807–811.

Gibbons, R.V. Kalanarooj, S. Jarman, R.G. Nisalak, A. Vaughn, D.W. Endy, T.P. Mammen, M.P. & Srikiathachorn, A. (2007). Analysis of repeat hospital admissions for dengue to estimate the frequency of third or fourth dengue infections resulting in admissions and dengue hemorrhagic fever, and serotype sequences. *American Journal of Tropical medicine and Hygiene* 77: 910-913.

Goldsmith, R.S. Zárate, M.L. Cedeño-Ferreira, J. & Paz, A.E. (1979). Seroepidemiologic studies in Oaxaca, Mexico. II. Survey for arbovirus antibody. *Archivos de investigación médica* 10(4):239-259.

Gomes, A.S. Sciavico, C.S. & Eiras, A.E. (2006). Periodicidade de oviposicao de femeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) em laboratorio e campo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39(4): 327-332.

Gómez, A. Seccacini, E. Zerba, E. & Licastro, S. (2011). Comparison of the insecticide susceptibilities of laboratory strains of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 106(8); 993-996.

Gong, P. Epton, M.J. Fu, G. Scaife, S. Hiscox, A. Condon, K.C. Condon, G.C. Morrison, N.I. Kelly, D.W. Dafa'lla, T. Coleman, P.G. & Alphey, L. (2005). A dominant lethal genetic system for autocidal control of the Mediterranean fruitfly. *Nature Biotechnology* 23(4): 453-456.

Gorrochotegui-Escalante, N. Fernandez-Salas, I. Beaty B.J. & Black, W.C. IV. (2000). Genetic isolation by distances among *Aedes aegypti* populations along the northeastern coast of Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 62: 200-209.

- Gorochotegui-Escalante, N. Gomez-Machorro, C. Lozano-Fuentes, S. Fernandez-Salas. de Lourdes, M.M. Farfan-Ale, J.A. García-Rejón, J. Beaty, B.J. & Black, W.C. IV. (2002). Breeding Structure of *Aedes aegypti* Populations in Mexico Varies by Region. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 66(2); 213-222.
- Gray, A. (2012). Problem Formulation in Environmental Risk Assessment for Genetically Modified Crops: A Practitioner's Approach. En International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ed). *Collection of Biosafety Reviews- Vol 6* (pp. 10-65) Trieste: ICGEB
- Gratz, N.G. (1999). Space Sprays for the Control of *Aedes aegypti* in the Western Pacific. *Denge Bulletin* 23: 80-83.
- Griffin, D.R. Webster, F.A. & Michael, C.R. (1960). The Echolocation of Flying Insects by Bats. *Animal Behaviour* VII (3-4): 141-154.
- Grimstad, P.R. Haramis, P.R. & Linn, D. (1984). *Aedes triseriatus* (diptera: culicidae) and la crosse virus iii. Enhanced oral transmission by nutrition-deprived mosquitoes. *Journal of Medical Entomology* 21(3): 249-256.
- Grimstad P.R. & Walker, E.D. (1991). *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae) and La Crosse Virus. IV. Nutritional Deprivation of Larvae Affects the Adult Barriers to Infection and Transmission. *Journal of Medical Entomology* 28 (3): 378-386.
- Grossman, G.L. Rafferty, C.S. Clayton, J.R. Stevens, T.K. Mukabayire, O. & Benedict, M.Q. (2001). Germline transformation of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, with the piggyback transposable element. *Insect Molecular Biology* 10(6): 594-604.
- Gubler, D.J. (1997). Dengue and dengue hemorrhagic fever, its history and resurgence as a global public health problem. en Gubler, D.J. & Kuno, G. (eds). *Dengue and dengue hemorrhagic fever* (pp.1-22). Londres: CAB International.
- Gubler, D.J. (1998). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews* 3(11): 480-496.
- Gubler D.J. (2002). Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as public health, social and economic problem in the 21st century. *TRENDS in Microbiology* 2(10):100-103.
- Gubler, D.J. (2004). Cities spawn epidemic dengue viruses. *Nature Medicine* 19(2): 129-130.
- Gubler, D.J. & Kuno, G. (1997). *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Washington: CAB International.
- Gubler, D.J. & Meltzer, M. (1999). Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. *Advances in Virus Research* 53: 35-70.
- Gubler, D.J. Nalim, S. Tan, R. Saipan, H. & Saroso, J.S. (1979). Variation in susceptibility to oral infection with dengue viruses among geographic strains of *Aedes aegypti* . *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 28: 1045-1052.
- Gubler, D.J. Suharyono, W. Lubis, I. Eram, S. & Gunarso, S. (1981). Epidemic dengue 3 in central Java, associated with low viremia in man. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 30(5): 1094-1099.

Gullan P.J. & P.S. Cranston. (2010). Reproduction. En: Gullan P.J. & P.S. Cranston (eds.) *The insects: An Outline of Entomology* (pp. 121-150). West Sussex: Jhon Wiley & Sons

Gupta, E. Dar, L. Geentanjali, K. & Broor, S. (2006). The changing epidemiology of dengue in Delhi, India. *Virology Journal* 3:92-

Gurtler, R.E. Cecere, M.C. Castanera, M.B. Canale, D. Lauricella, M.A. Chuit, R. Cohen, J.E. & Segura E.L. (1996). Probability of Infection with *Trypanosoma cruzi* of the Vector *Triatoma infestans* fed on infected humans and dogs in northwest Argentina. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 55 (1): 24-31.

Guzmán, M.G. Kouri, G.P. Bravo, J. Soler, M. Vazquez, S. & Morier, L. (1990). Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiologic study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 42(2): 179-184.

Guzmán, M.G. Kouri, G.P. Bravo, J. Valdez, L. Vazquez, S. & Halstead, S.B. (2002). Effect of age on outcome of secondary dengue infections. *International Journal of Infectious Diseases* 6(2): 118-124.

Guzmán, M.G. Kouri, G. Valdés, L. Bravo, J. Vázquez, S. & Halstead, S.B. (2002b). Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. *Pan American Journal of Public Health* 11(4): 223-227.

Gwads, R.W. & Craig, G.B. (1970). Female polygamy due to inadequate semen transfer in *Aedes aegypti*. *Mosquito News* 30(3): 355-360.

Hales, S. & Woodward, A. (2003). Climate change will increase demands on malaria control in Africa. *The Lancet* 362 (9398): 17750.

Hales, S. & Panhuis, V.W. (2005). A new strategy for dengue control. *The Lancet* 365 (9459): 551-552.

Hales, S. de Wet, N. Maindonald, J. & Woodward, A. (2002). Potential effect of population and climate changes on global distribution of dengue fever: an empirical model. *The Lancet* 360(9336): 830-834.

Halstead, S.B. (2003). Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Advances in Virus Research* 60: 421-467

Halstead, S.B. (2002). Dengue hemorrhagic fever: two infections and antibody dependent enhancement, a brief history and personal memoir. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 54(3): 171-179.

Halstead, S.B. (2008). Dengue Virus-Mosquito Interactions. *Annual Review of Entomology* 53(15):15.1-15.9

Halstead, S.B. Streit, T.G. Lafontant, J.G. Putvatana, R. Russel, K. Sun, W. Kanesa-Thasan, N. Hayes, C.G. & Watts, D.M. (2001). Haiti: Absence of Dengue Hemorrhagic Fever Despite Hyperendemic Dengue Virus Transmission. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 65(3): 180-183.

- Hampton, L.C. Lockwood, J.P. & Craddock, E.M. (1990). Extinction and recolonization of local populations on a growing shield volcano. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87: 7055-7057.
- Hamscher, G. Sczesny, S. Hoper, H. & Nau, H. (2002). Determination of Persistent Tetracycline Residues in Soil Fertilized with Liquid Manure by High-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry* 74(7): 1509-1518.
- Hardstone, M.C. Lazzaro, B.P. & Scott, J.G. (2009). The effect of three environmental conditions on the fitness of cytochrome P450 monooxygenase-mediated permethrin resistance in *Cules pipiens quinquefasciatus*. *BMC Evolutionary Biology* 9:42.
- Harris, A.F. McKemey, A.R. Nimmo, D. Curtis, Z. Black, I. Morgan, S.A. Oviedo, N. Lacroix, R. Naish, N. Morrison, N.I. Collado, A. Stevenson, J. Scaife, S. Dafa'alla, T. Fu, G. Phillips, C. Miles, A. Raduan, N. Heard, S.B. (1994). Pitcher-Plant midges and mosquitoes: A processing chain commensalism. *Ecology* 75(6): 1647-1660.
- Harris, A.F. Nimmo, D. McKemey, A.R. Kelly, N. Scaife, S. Donnelly, C.A. Beech, C. Petrie, D.W. & Alphey, L. (2011). Field performance of engineered male mosquitoes. *Nature Biotechnology* 29: 1034-1037.
- Harris, A.F. McKemey, A.R. Nimmo, D. Curtis, Z. Black, I. Morgan, S.A. Oviedo, M.N. Renaud Lacroix, R. Naish, N. Morrison, N.I. Collado, A. Stevenson, J. Scaife, S. Dafa'alla, T. Fu, F. Phillips, C. Miles, A. Raduan, Kelly, N. Beech, C. Donnelly, C.A. Petrie, W.D. & Alphey, L. (2012). Successful suppression of a field mosquito population by sustained release of engineered male mosquitoes. *Nature Biotechnology* 30: 828-830
- Hawkes, R.A. & Lafferty, K.J. (1967). The enhancement of virus infectivity by antibody. *Virology* 33: 250-261.
- Hawley, W.A. (1985). The effect of larval density on adult longevity of a mosquito, *Aedes sierrensis*: epidemiological consequences. *Journal of American Mosquito Control Association* 2: 61-62
- Hawley, W.A. (1988). The biology of *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association* Supplemento 1: 1-40.
- Hawley, W.A. Reiter, P. Copeland, R.S. Pumpuni, C.B. & Craig, G.B. Jr. (1987). *Aedes albopictus* in North America: probable introduction in used tires from northern Asia. *Science* 236 (4805): 1114-1116.
- Hayes, K.R. (2004). *Robust methodologies for ecological risk assessment: Best practice and current practice in ecological risk assessment for Genetically Modified Organisms*. Tasmania: CSIRO: Biodiversity sector.
- Heard, S.B. (1994). Pitcher-plant midges and mosquitoes: a processing chain commensalism. *Ecology* 75: 1647-1660.
- Hedrick, P.W. (2011). *Genetics of Populations*. Nueva York: Jones & Bartlett Publishers.
- Heinrich, J.C. & Scott, M.J. (2000). A repressible female-specific lethal genetic system for making transgenic insect strains suitable for a sterile-release program. *PNAS* 97: 8229-8232.

- Helinski, M.E.H. Valerio, L. Facchinelli, L. Scott, T.W. Ramsey, J. & Harrington, L.C. (2012). Evidence of Polyandry for *Aedes aegypti* in Semifield Enclosures. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 86(4): 635-641.
- Hemingway, J. & Ranson, H. (2000). Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. *Annual Review of Entomology* 45: 371-391.
- Hendrichs J. (2000). The sterile insect technique against key insect pests. *Sustainable Development International* 2: 75-79.
- Higgins, M.J. & Merritt, R.W. (1999). Temporary woodland ponds in Michigan: Invertebrate seasonal patterns and trophic relationships. En Batzer, D.P. Rader, R.B. and Wissinger, S.A. (eds.) *Invertebrates in Freshwater Wetlands of North America: Ecology and Management* (p. 279-297). Nueva York: John Wiley and Sons.
- Hill, J. Lines, J. & Rowland, M. (2006). Insecticide-treated nets. *Advances in Parasitology* 61: 77-128.
- Hill, R.A. (2005). Conceptualizing risk assessment methodology for genetically modified organisms, *Environmental Biosafety Research* 4 (2): 67-70.
- Hill, R.A. & Sandashonga, C. (2003). General principles for risk assessment of living modified organisms: Lessons from chemical risk assessment. *Environmental Biosafety Research* 2:81-88.
- Hirsch, R. Ternes, T. Haberer, K. & Kratz, K.L. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *The Science of the Total Environment* 225 (1-2): 109-118.
- Hiss, E.A. & Fuchs, M.S. (1972). The effect of matron on oviposition in the mosquito, *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology* 18(11): 2217-2227.
- Holick, J. Kyle, A. Ferraro, W. Delaney, R.R. & Iwaseczko, M. (2002). Discovery of *Aedes albopictus* infected with West Nile virus in south eastern Pennsylvania. *Journal of the American Mosquito Control Association* 18: 131.
- 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. Rusch, D.B. Lai, Z. Kraft, C.L. Abril, J.F. Anthouard, V. Arensburger, P. Atkinson, P.W. Baden, H. de Berardinis, V. Baldwin, D. Benes, V. Biedler, J. Blass, C. Bolanos, R. Boscus, D. Barnstead, M. Cai, S. Center, A. Chaturverdi, K. Christophides, G.K. Chrystal, M.A. Clamp, M. Cravchik, A. Curwen, V. Dana, A. Delcher, A. Dew, I. Evans, C.A. Flanigan, M. Grundschober-Freimoser, A. Friedli, L. Gu, Z. Guan, P. Guigo, R. Hillenmeyer, M.E. Hladun, S.L. Hogan, J.R. Hong, Y.S. Hoover, J. Jaillon, O. Ke, Z. Kodira, C. Kokoza, E. Koutsos, A. Letunic, I. Levitsky, A. Liang, Y. Lin, J.J. Lobo, N.F. Lopez, J.R. Malek, J.A. McIntosh, T.C. Meister, S. Miller, J. Mobarry, C. Mongin, E. Murphy, S.D. O'Brochta, D.A. Pfannkoch, C. Qi R. Regier, M.A. Remington, K. Shao, H. Sharakhova, M.V. Sitter, C.D. Shetty, J. Smith, T.J. Strong, R. Sun, J. Thomasova, D. Ton, L.Q. Topalis, P. Tu, Z. Unger, M.F. Walenz, B. Wang, A. Wang, J. Wang, M. Wang, X. Woodford, K.J. Wortman, J.R. Wu, M. Yao, A. Zdobnov, E.M. Zhang, H. Zhao, Q. Zhao, S. Zhu, S.C. Zhimulev, I. Coluzzi, M. della Torre, A. Roth, C.W. Louis, C. Kalush, F. Mural, R.J. Myers, E.W. Adams, M.D. Smith, H.O. Broder, S. Gardner, M.J. Fraser, C.M. Birney, E. Bork, P. Brey, P.T. Venter, J.C. Weissenbach, J. Kafatos, F.C. Collins, F.H. & Hoffman, S.L. (2002). The Genome Sequence of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae* *Science* 298 (5591): 129-149

- Honório, N.A. Gonçalves, M.C. Monteiro, F.S.B. de Avelar, M.F.M. & Chagastelles, O.S. (2009). The spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a transition zone, Rio de Janeiro, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública* 25(6): 1203-1214
- Honório, N.A. Silva, W.C. Leute, P.J. Gonçalves, J.M. Lounibos, L.P. & Lourenço-de-Oliveira, R. (2003). Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an Urban Endemic Dengue Area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 98(2): 191-198.
- Hornby, J.A. Moore, D.E. & Miller, T.W. (1994). *Aedes albopictus* distribution, abundance, and colonization in Lee County, Florida and its effect on *Aedes aegypti*. *Journal of American Mosquito Control Association* 10: 307-319.
- Huang, F. Kirpatrick, D. Jiang, X. Gygi, S. & Sorkin A. (2006). Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within kinase domain. *Molecular Cell* 21(6): 737-748.
- Hurd, H. (2003). Manipulation of medical important insect vectors by their parasites. *Annual Review of Vector Ecology* 48:141-161.
- Ibañez-Bernal, S. Briseño, B. Mutebi, J.P. Argot, E. Rodríguez, G. Martínez-Campos, R.F. de La Fuente-San Roman, P. Tapia-Conyer, R. & Flisser, A. (1997). First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, Mexico. *Medical and Veterinary Entomology* 11(4): 305-309.
- Ibañez-Bernal, S. & Gómez-Dantés, H. (1995). Los vectores del Dengue en México: Una Revisión Crítica. *Salud Pública* 37(1): 53-63.
- INEGI. (2011). Porcentaje de viviendas particulares habitadas con disponibilidad de agua por entidad federativa. 1990 a 2010
<http://www.inegi.org.mx/sistemas/sisept/default.aspx?t=mviv09&s=est&c=22242>
- IOM. (2003). *Microbial threats to health: emergence, detection, and response*. Washington: The National Academy of Sciences Press.
- IOM. (2008). *Vector-Borne Diseases: Understanding the Environmental, Human Health, and Ecological Connections, Workshop Summary*. Washington: The National Academy of Sciences Press.
- IPCS. (2004). *IPCS Risk Assessment Terminology*. Ginebra: World Health Organization.
- Jackson, R.R. Nelson, X.J. & Sune, G.O. (2005). A spider that feeds indirectly on vertebrate blood by choosing female mosquitoes as prey. *Proceedings of the National Academy of the United States of America* 102(42): 15155-15160.
- James C. (2013). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013. *ISAAA Brief No. 46-2013*. ISAAA Ithaca..
- Jansen, C.C. & Beebe, N.W. (2010). The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next? *Microbes and Infection* 12(4): 272-279.

- Jaramillo-O, N. Fonseca-González, I. & Chaverra-Rodríguez, D. (2014). Geometric Morphometrics of Nine Isolates of *Aedes aegypti* with Different Resistance Levels to Lambda-Cyhalothrin and Relative Fitness of One Artificially Selected for Resistance. *PLoS ONE* 9(5): e96379.
- Jasinkiene, N. Coates, C.J. Benedict, M.Q. Cornel, A.J. Rafferty, S.C. James, A.A. & Collins, F.H. (1998). Stable transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, with the *Hermes* element from the housefly. *PNAS* 95: 3743-3747.
- Jeffery, G.M. (1956). Blood meal volume in *Anopheles quadrimaculatus*, *A. albimanus* and *Aedes aegypti*. *Experimental Parasitology* 5(4): 371-375
- Jenouvier, S. Caswell, H. Barbraud, C. & Weimerskirch, H. (2010). Mating behavior, population growth, and the operational sex ratio: A periodic two-sex model approach. *The American Naturalist* 175 (6): 739-752.
- Jones, J.C. (1973). Are Mosquitoes Monogamous? *Nature* 242: 343-344.
- Johnson I.S. (1983). Human insulin from recombinant DNA technology. *Science* 219 (4585): 632-637.
- Johnston, R.F. (1967). Seasonal variation in the food of the Purple Martin, *Progne subis*, in Kansas. *Ibis* 109: 8-13.
- Juliano, S.A. (2009). Species Interaction among Larval Mosquitoes: Context Dependence across Habitat Gradients. *Annual Review of Entomology* 54: 37-56.
- Juliano, S.A. Lounibos, L.P. Nishimura, N. & Greene, K. (2010). Your worst enemy could be your best friend: predator contributions to invasion resistance and persistence of natives. *Oecologia* 162(3): 709-718.
- Juliano, S.A. O'Meara, G.F. Morrill, J.R. & Cutwa, M.M. (2002). Desiccation and thermal tolerance of eggs and the coexistence of competing mosquitoes. *Oecologia* 130 (3): 458-469.
- Kale, H.W. (1968). The Relationship of Purple Martins to Mosquito Control. *The Auk* 85(4): 654-661.
- Kalitzky, M. & Borowski, P. (2006). *Molecular Biology of the Flavivirus*. Norfolk: Horizon Scientific Press
- Kamgang, B. Marcombe, S. Chandre, F. Nchoutpouen, E. Nwane, P. Etang, J. Corbel, V. & Paupy, C. (2011). Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Central Africa. *Parasites and Vectors* 4:79
- Kaplan, L. Kendell, D. Robertson, D. Livdahl, T. & Khatchikian, T. (2010). *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Bermuda: extinction, invasion, invasion and extinction. *Biological Invasions* 12:3277–3288
- Katzourakis, A. & Glifford, R.J. (2010). Endogenous viral elements in animal genomes. *PLoS Genetics* 6(11): e1001191.
- Kawada, H. Takemura, S.Y. Arikawa, K. & Takagi, M. (2005). Comparative study on nocturnal behavior of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Journal of Medical Entomology* 42(3): 312-318.
- Kazazian, H.H. (2004). Mobile Elements: Drivers of Genome Evolution. *Science* 303: 1626-1632.

- Keeling, P.J. Burger, G. Durnfor, D.G. Lang, B.F. Pearl, R.E. Roger, A.J. & Gray, M.W. (2005). The tree of eukaryotes. *Trends in Ecology Evolution* 20(12): 670-676.
- Kinzig, A.P. Warren, P. Martin, C. Hope, D. & Katti, M. (2005). The effects of human socioeconomic status and cultural characteristics on urban patterns of biodiversity. *Ecology and Society* 10(1): 23.
- Klempner, M.S. Unnasch T.R. & Hu, L. (2007). Taking a bite out of Vector- Transmitted Infectious Diseases. *New England Journal of Medicine* 356(25); 2567-2569.
- Knipling, E.F.(1955). Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *Journal of Economical Entomology* 48:459-469.
- Knox, T.B. Nguyen, Y.T. Vu, N.S. Kay, B.H. & Ryan, P.A. (2010). Quantitative relationship between immature and emergent adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations in water storage container habitats. *Journal of Medical Entomology* 47(5): 748-758.
- Knudsen, A.B. (1995). Global Distribution and Continuing Spread of *Aedes albopictus*. *Parassitologia* 37: 91-97
- Klassen W. & Curtis C.F. (2005). History of the Sterile Insect Technique. En Dyck, V.A. Hendrichs, J. & A.S. Robinson (eds): *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area Wide Integrated Pest Management* (3-36). Nueva York :Springer.
- Klasson, L. Kambris, Z. Cook, PE. Walker, T. & Sinkins, SP. (2009). Horizontal gene transfer between *Wolbachia* and the mosquito *Aedes aegypti*. *BMC Genomics* 10: 33
- Klowden, M.J. (1996). Endogenous factors regulating mosquito host-seeking behavior. *Ciba Foundation Symposium* 200: 223-232.
- Klowden, M.J. & Lea, A.O. (1978). Blood meal size as a factor affecting continued host-seeking by *Aedes aegypti*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 27 (4): 827-831.
- Klowden, M.J. & Lea, A.O. (1980). Physiologically old mosquitoes are not necessarily old physiologically. *The American Journal Of Tropical Medicine and Hygiene* :1460-1464
- Kilpatrick, A. M. & Randolph, S. E. (2012). Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. *The Lancet* 380(9857):1946-1955.
- Koh, B.K.W. Ng, L.C. Kita, Y. Tang, C.S. Ang, L.I. Wong, K.Y. James, L & Goh, K.T. (2008). The 2005 Dengue Epidemic in Singapore: Epidemiology, Prevention and Control. *Annals of the Academy of Medicine in Singapore* 37: 538-545.
- Kohler, G. & Milstein, C.. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.
- Kolpin, D. Furlong, E. Meyer, M. Thurman, E.M. Zaugg, S. Barber, L. & Buxton, H. (2002). Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environmental Sciences and Technology* 36: 1202-1211
- Kolpin, D, Skopec, M. Meyer, M.T. Furlong, E.T. & Zaugg, S.D. (2004). Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. *The Science of the Total Environment* 328: 119-120

- Kouri, G.P. Gusman, M.G. Bravo, J.R. & Triana, C. (1989). Dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic. *Bulletin of the World Health Organization* 67: 375-380.
- Krebs, R.A. & Barker, J.S.F. (1991). Coexistence of Ecologically Similar Colonizing Species: Intraspecific and Inter-specific Competition in *Drosophila aldrichi* and *D. buzzanti*. *Australian Journal of Zoology* 39(5): 579-593.
- Kumar, R. & Hwang, J. (2006). Larvicidal efficacy of aquatic predators: A perspective for mosquito control. *Zoological Studies* 45(5): 447-466.
- Kuno, G. (2007). Research on dengue and dengue-like illness in East Asia and the Western Pacific during the first half of the 20th century. *Reviews in Medical Virology* 17: 327-341.
- Kuno, G. & Chang, G.J. (2005). Biological transmission of arboviruses: Reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *Biological Microbiology Reviews* 18(4): 608-637.
- Kuzmack, A.M. & McGaughy, R.E. (1975). *Quantitative risk assessment for community exposure to vinyl chloride*. U.S Environmental Protection Agency.
- Labbé, G.M.C. Scaife, S. Morgan, S.A. Curtis, Z.H. & Alphey, L. (2012). Female-Specific Flightless (fsRIDL) Phenotype for Control of *Aedes albopictus*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6(7): e1724
- Lacroix, R. McKemey, A.R. Raduan, N. Kwee, L.W. Hong, W.M. Guat, T.N. Rahidah, S.A.A. Salman, S. Subramaniam, S. Nordin, O. Hanum, N.A.T. Angamuthu, C. Marlina, S.M. Lees, R.S. Naish, N. Scaife, S. Gray, P. Labbé, G. Beech, C. Nimmo, D. & Alphey, L. (2012). Open Field Release of Genetically Engineered Sterile Male *Aedes aegypti* in Malaysia. *PLoS ONE* 7(8):e42771.
- Lambrechts, L. Scott, T.W. & Gubler, D.J. (2010). Consequences of the Expanding Global Distribution of *Aedes albopictus* for Dengue Virus Transmission. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4(5): e646.
- Lanciotti, R.S. Roehrig, J.T. Deubel, V. Smith, J. Parker, M. Steele, K. Crise, B. Volpe, K.E. Crabtree, M.B. Scherret, J.H. Hall, R.A. MacKenzie, J.S. Cropp, C.B. Panigrahy, B. Ostlund, E. Schmitt, B. Malkinson, M. Banet, C. Weissman, J. Komar, N. Savage, H.M. Stone, W. McNamara, T. & Gubler, D.J. (1999). Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science* 286(5448): 2333-2337.
- Lawton, J.H. & Hassell, M.P. (1981). Asymmetrical competition in insects. *Nature* 289: 793-795
- LBOGM. (2005). Ley De Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, Diario Oficial de la Federación, México, 18 de marzo del 2005.
- Le Menach, A. Takala, S. McKenzie, F.E. Perisse, A. Harris, A. Flahault, A. & Smith, D.L. (2007). An elaborated feeding cycle model for reductions in vectorial capacity of night-biting mosquitoes by insecticide-treated nets. *Malaria Journal* 6:10.
- Lee, H.L. Joko, H. Nazni, W.A. & Vasan, S.S. (2009). Comparative life parameters of transgenic and wild strain of *Aedes aegypti* in the laboratory. *Dengue Bulletin* 33:103-114.

- Lengeler, C. (2009). Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2: CD000363.
- Leyva, M. Marquetti, M.C. & Montada, D. (2012). Segregación de nicho de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 64(2): 206-211.
- LGEEPA. (2014). Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, Diario Oficial de la Federación, México, 16 de enero del 2014
- Lillenberg, M. Yurchenko, S. Kipper, K. Herodes, K. Pihl, V. Sepp, K. Lohmus, R. & Lembit, N. (2009). Simultaneous determination of fluoroquinolones, sulfonamides and tetracyclines in sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography eslectrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216: 5949-5954
- Lima, E.P. Santos, M.H.P. de Araújo, A.P. Gomes, E.V.S. da Silva, U.M. Nogueira, L.O. Santana, A.E.G. Nogueira, C.B. de Paiva, C.C.N. Goulart, M.O.F. Wilding, C.S. Junqueira, C.F.A. & de Melo, M.A.V.S. (2011). Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasites and Vectors* 4: 5
- Lima-Camara, T.N. (2010). Activity patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) under natural and artificial conditions. *Oecologia Australis* 14(3): 737-744.
- Loroño-Pino, M.A. Cropp, C.B. Farfán, J.A. Vorndam, A.V. Rodríguez-Ângulo, E.M. Rosado-Paredes, E.P. Flores-Flores, L.F. Beaty, B.J. & Gluber, D.J. (1999). Common occurrence of concurrent infections by multiple dengue virus serotypes. *American Journal of Medicine and Hygiene* 61(5): 725-730.
- Lourenço-de-Oliveira, R. (2008). Rio de Janeiro against *Aedes aegypti*: yellow fever in 1908 and dengue in 2008. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 103(7): 627-628
- Luz, P.M. Vanni, T. Medlock, J. Paltiel, A.D. & Galvani, A.P. (2011). Dengue vector control strategies in an urban setting: an economic modeling assessment. *Lancet* 377(9778): 1673-1680.
- MacArthur, R.H. (1972). *Geographical Ecology: Patterns in the Distribution of Species*. New York: Harper & Row.
- MacDonald, G. Cuellar, C.B. & Foll, C.V. (1968). The dynamics of malaria. *Bulletin of the World Health- Organization* 38: 743-755
- Maciel-de-Freitas, R. Codeço, C.T. & Lourenço-de-Oliveira, R. (2007). Body size-associated survival and dispersal rates of *Aedes aegypti* in Rio de Janeiro. *Medical Veterinary and Entomology* 21: 284-292
- Mangudo, C. Aparicio, J.P. & Gleiser, R.M. (2010). Trees holes as larval habitats for *Aedes aegypti* in public areas in Aguaray, Salta province, Argentina. *Journal of Vector Ecology* 36(1): 227-230.
- Marquetti, M.C. Bisset, J. Leyva, M. García, A. & Rodriguez, M. (2008). Comportamiento estacional y temporal de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en la Habana, Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 60(1):62-67

- Marten, G.G. & Reid, J.W. (2007). Cyclopoid copepods. *Journal of American Mosquito Control Association* 23: 65-92.
- Martins, A.J. Lins, R.M. Linss, J.G. Peixoto, A.A. & Valle, D. (2009). Voltage-gated sodium channel polymorphism and metabolic resistance in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* from Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 81: 108-115.
- Martins, A.J. Ribeiro, C.De.M. Bellinato, D.F. Peixoto, A.A. Valle, D. & Lima, J.B.P. (2012). Effect on insecticide Resistance on Development, Longevity and Reproduction of Field or Laboratory Selected *Aedes aegypti* Populations. *PLoS ONE* 7(3): e31889.
- Martínez, E. (1998). *Dengue y dengue hemorrágico*. Buenos Aires: Editorial Universitaria Quilmes 589 pp.
- Matalerz, P. (2005). *The True story of DDT, PCB, and Dioxin*. Wroclaw :Wydawnictwo Chemiczne.
- Massonet-Beuneel, B. Corre-Catelin, N. Lacroix, R. Lees, R.S. Hoang, K.P. Nimmo, D. Alphey, L. & Reiter, P. (2013). Fitness of Transgenic Mosquito *Aedes aegypti* Carrying a Dominant Lethal Genetic System. *PLoS ONE* 8(5): e62711.
- Maxwell, C.A. Msuya, E. Sudi, M. Njunwa, K.J. Carneiro, I.A., & Curtis, C.F. (2002). Effect of community-wide use of insecticide-treated nets for 3-4 years on malarial morbidity in Tanzania. *Tropical Medicine and International Health* 7(12): 1003-1008
- McClelland, G.A.H. & Conway, G.R. (1971). Frequency of Blood Feeding in the Mosquito *Aedes aegypti*. *Nature* 232: 485-486.
- McClintock, B. (1950). The origin and behavior of mutable loci in maize. *PNAS* 36(6):344-355.
- McDonald, P.T. (1977). Population Characteristics of Domestic *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Villages on the Kenya coast: Dispersal between villages. *Journal of Medical Entomology* 14(1): 49-53.
- McGraw, E.A. & O'Neill, S.L. (2013). Beyond insecticides: new thinking on ancient problem. *Nature Reviews* 11 (Marzo 2013): 181-193.
- McMichael, A.J. Woodruff, R.E. & Hales, S. (2006). Climate change and human health: present and future risks. *The Lancet* 367(9513): 859-69.
- Medhora, M. Maruyama, K. & Hartl, D.L. (1991). Molecular and functional analysis of the *mariner* mutator element *Mos1* in *Drosophila*. *Genetics* 128: 777-784.
- Meltzer, M.I. Rigau-Pérez, J.G. Reiter, P. & Gubler, D.J. (1998). Using disability-adjusted life years to assess the economic impact of dengue in Puerto Rico: 1984-1994. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59(2): 265-271.
- Mercado-Henández, R. Aguilar-Gueta, J.D. Fernández-Salas, I. & Earl, P.R. (2006). The association of *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus* in Allende, Nuevo León , México. *Journal of the American Mosquito Control Association* 22(1): 5-9.

- Miller, B.R. & Ballinger, M.E. (1988). *Aedes albopictus* mosquitoes introduced into Brazil: vector competence for yellow fever and dengue viruses. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82: 476-477.
- Miller, B.R. & Mitchell, C.J. (1991). Genetic selection of a flavivirus-refractory strain of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 45: 399-407.
- Miller, G. & Spoolman, S. (2014). *Essentials of Ecology*. Canada: Cengage Learning.
- Miller, L.H. Sakai, R.K. Romans, P. Gwadz, R.W. Kantoff, P. & Hyden, H.G.. (1987). Stable Integration and Expression of a Bacterial Gene in the Mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 237 (4816): 779-781
- Mitchell, C.J. (1991). Vector competence of North and South American strains of *Aedes albopictus* for certain arboviruses. *Journal of the American Mosquito Association* 7: 446-451.
- Mohammed, A. & Chadee, D.D. (2011). Effect of different temperatures regimens on the development of *Aedes aegypti* (L.)(Diptera: Culicidae) mosquitoes. *Acta Tropica* 119:38-43.
- Monteiro, L.C.C. de Souza, J.R.B. & de Albuquerque, C.M.R. (2007). Eclosion rate, development and survivorship of *Aedes albopictus* (Skuse)(Diptera: Culicidae) under different water temperatures. *Neotropical Entomology* 36(6):966-971.
- Mooney, H.A. & Cleland, E.E. (2001). The evolutionary impact of invasive species. *PNAS* 98(10): 5446-5451.
- Moore, C.G. & Mitchell, C.J. (1997). *Aedes albopictus* in the United States: Ten-Year Presence and Public Health Implications. *Emerging Infectious Diseases* 3(3): 329-334.
- Morries, J. (2011). Open field release of a self-limiting transgenic *Aedes aegypti* strain to combat dengue- a structured risk-benefit analysis. *AsPac Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 19(3): 107-110.
- Morrison, A.C. Zielinski-Gutierrez, E. Scott, T.W. & Rosenberg, T. (2008). Defining Challenges and Proposing Solutions for Control of the Virus Vector *Aedes aegypti*. *PLoS Medicine* 5(3): 362-366.
- Morel, C.M. Touré, Y.T. Dobokhotov, R. & Oduola, A.M.J. (2002). The mosquitone genome- a breakthrough for public health. *Science* 298:79.
- Mosier, N. & Ladisch M.R. (2011). *Modern Biotechnology: Connecting Inovations in Microbiology and Biochemistry to Engineering Fundamentals*. John Wiley & Sons. 464pp
- Muir, L.E. & Kay, B.H. (1998). *Aedes aegypti* survival and dispersal estimated by mark-release-recapture in northern Australia. *American Journal of Medicine and Hygiene* 58(3): 277-282.
- Mumford, J.D. (2012). Science, Regulation, and Precedent for Genetically Modified Insects. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6(1): e1504.
- Muñoz, D. Jimenez, A. Marinotti, O. & James, A.A. (2004). The *AeAct-4* gene is expressed in the developing flight muscles of female *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* 13(5): 563-568.
- Murray, C.J. (1994). Quantifying the burden of disease: the technical basis for disability-adjusted life years. *Bulletin of the World Health Organization* 72(3): 429-445.

- Nagao, Y. & Koelle, K. (2008). Decreases in dengue transmission may act to increase the incidence of dengue hemorrhagic fever. *PNAS* 105(6): 2238-2243.
- Nasci, R.S. (1986). The size of emerging and host-seeking *Aedes aegypti* and the relation of size to blood-feeding success in the field. *Journal of American Mosquito Control Association* 2(1): 61-62
- Nasci, R.S. (1991). Influence of larval and adult nutrition on biting persistence in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 28(4): 522-526.
- Neff, J.M. Morris, L. Goncalvez-Alcover, R. Coleman, P.H. Lyss, S.B. & Negron, H. (1967). Dengue fever in a Puerto Rican community. *American Journal of Epidemiology* 86: 162-184
- Nelson, M. Hillen, W. & Greenwald, R.A. (2001). *Tetracyclines in Biology, Chemistry and Medicine*. Suiza: Birkhauser.
- Newman, C.M. Cerutti, F. Anderson, T.K. Hamer, G.L. Walker, E.D. Kitron, U.D. Ruiz, M.O. Brawn, J.A. & Goldberg, T.L. (2011). *Culex flavivirus* and West Nile Virus mosquito coinfection and positive ecological association in Chicago, United States. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 11(8): 1099-1105.
- Nilsson, A.N. & Soederstroem, O. (1988). Larval consumption rates, interspecific predation, and local guild composition of egg-overwintering *Agabus* (Coleoptera, Dystiscidae) species in vernal ponds. *Oecologia* 76: 131-137.
- Nimmo, D.D. Alphey, L. Meredith, J.M. & Eggleston, P. (2006). High efficiency site-specific genetic engineering of the mosquito genome. *Insect Molecular Biology* 15(2):129-136.
- Nisalak, A. Endy, T.P. Nimmannitya, S. Kalayanarooj, S. Thisyakorn, U. Scott, R.M. Burke, D.S. Hoke, C.H. & Vaughn D.W. (2003). Serotype-specific virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 68: 191-202.
- Nishiura H & Halstead. (2007). Natural history of dengue virus (DENV)-1 and DENV-4 Infections: Reanalysis of classic studies. *Journal of Infectious Diseases* 195(7): 1007-1013
- Normile, D. (2013). First Dengue Virus Type in 50 Years. *Science Insider* (Consultado el 17 de Junio del 2014). <http://news.sciencemag.org/health/2013/10/first-new-dengue-virus-type-50-years>.
- NRC. (1983). *Risk Assessment in the Federal Government: Understanding the process*. Washinton: National Academy Press.
- O'Brochta, D.A. Sethraman, N. Wilson, R. Hice, R.H. Pinkerton, A.C. Levesque, C.S. Bideshi, D.K. Jasinskiene, N. Coates, C.J. James, A.A. Lwhane, M.J. & Atkinson, P.W. (2003). Gene vector and transposable element behavior in mosquitoes. *Journal of Experimental Biology* 206: 3823-3834.
- O'Brochta, D. Warren, W.D. Saville, K.J. & Atkinson, P.W. (1995). *Hermes*, a Functional Non-Drosophilid Insect Gene Vector From *Musca domestica*. *Genetics* 142: 907-914.
- OGTR Office of the Gene Technology Regulator Australia. (2014) *Risk Analysis Framework*. Australia: Commonwealth of Australia,

- Ohainle, M. Balmaseda, A. Macalalad, A.R. Tellez, Y. Zody, M.C. Saborío, S. Nuñez, A. Lennon, N.J. Birren, B.W. Gordon, A. Henn, M.R. & Harris, E. (2011). Dynamics of dengue disease severity determined by the interplay between viral genetics and serotype-specific immunity. *Science Translational Medicine* 3(114): 114-128.
- O'Meara, G.F. Evans, L.F. Gettman, A.D. & Cuda, J.P. (1995). Spread of *Aedes albopictus* and decline of *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) in Florida. *Journal of Medical Entomology* 32(4): 554-562.
- OECD. (1986). *Recombinant DNA Safety Considerations: Safety considerations for industrial, agricultural and environmental applications of organisms derived by recombinant DNA techniques*. Paris: OECD.
- OECD. (2003). Description of selected key generic terms used in chemical hazard/risk assessment. *OECD Environment, Health and Safety Publications: Series on Testing and Assessment 44*. 92 pp
- OMS. (1988). *Environmental management for vector control Training and information materials*. Ginebra: World Health Organization
- OMS. (2002). Manual for indoor residual spraying Application of residual spraying for vector control. Ginebra: World Health Organization.
- OMS. (2004). *Global Strategic Framework for Integrated Vector Management*. Ginebra: World Health Organization.
- OMS. (2006). Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance. Ginebra: World Health Organization.
- OMS. (2007). Global Malaria Program insecticide-treated mosquito nets: a WHO Position Statement. Ginebra: World Health Organization.
- OMS. (2008). WHO position statement on integrated vector management. Ginebra: World Health Organization.
- OMS. (2009). *Dengue: Guías para el Diagnóstico, Tratamiento, Prevención y Control*. Ginebra: World Health Organization/ Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases.
- OMS. (2012). *Global Strategy for Dengue Prevention and Control 2012-2020*. Ginebra: World Health Organization.
- OMS. (2012b). *Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors (GPIRM)*. Ginebra: World Health Organization Press.
- OMS. (2014). Metrics: Disability-Adjusted Life Year (DALY) http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/metrics_daly/en/ (Consultado el 30 de Junio del 2014).
- ONU. (2005). Emerging challenges – new findings: emerging and re-emerging infectious diseases: links to environmental change. En Harrison P (ed.) *GEO Yearbook 2004/5: an overview of our changing environment* (pp. 72-80). Nairobi: United Nations Environment Programme (UNEP).
- OPS. (1994). *Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: guidelines for prevention and control*. Scientific Publication no 548. Washington.

- OPS. (2010). *Dengue: Guías para enfermos en la región de las Américas*. La Paz: OPS/OMS.
- Pages, F. Peyrefitte, C.N. Mve, M.T. Jarjaval, F. Brisse, S. Itean, I. Gravier, P. Nkoghe, D. & Grandadam, M. (2009). *Aedes albopictus* mosquito: the main vector of the 2007 Chikungunya outbreak in Gabon. *PLoS ONE* 4(5): 10.1371.
- Pages, F. Peyrefitte, C.N. Mve, M.T. Jarjaval, F. Brisse, S. Itean, I. Patrick, G. Tolou, H. Nkoghe, D. & Grandadam, M. (2009). *Aedes albopictus* Mosquito: The Main Vector of the 2007 Chikungunya Outbreak in Gabon. *PLoS ONE* 4(3): e4691.
- Palavesam, A. Esnault, C. & O'Brochta, D.A. (2013). Post-Integration Silencing of *piggyBac* Transposable Elements in *Aedes aegypti*. *PLoS ONE* 8(7): e68454.
- Paupy, C. Delatte, H. Bagny, L. Corbel, V. & Fontenille, D. (2009). *Aedes Albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes and infection* 11(14):1177-1185.
- Paupy, C. Ollomop, B. Kamgang, B. Moutailler, S. Rousset, D. Demanou, M. Hervé, J.P. Leroy, E. & Simard, F. (2010). Comparative Role of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in the Emergence of Dengue and Chikungunya in Central Africa. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 10(3): 259-266.
- Peckarsky, B.L. (1982). Aquatic Insect Predator-Prey Relations. *BioScience* 32(4): 261-266.
- Peña, A. Lino, C.M. Alonso, R. & Barceló, D. (2007). Determination of tetracycline antibiotic residues in edible swine tissues by liquid chromatography with spectrofluorometric detection and confirmation by mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4973-4979.
- Perera, O.P. Harrel, R.A. & Handler, A.M. (2002). Germ-line transformation of the South American malaria vector, *Anopheles albimanus*, with a piggyback/EGPF transposon vector is routine and highly efficient. *Insect Molecular Biology* 11(4): 291-297.
- Peterson, A.T. (2001). Predicting Species Geographic Distributions Based on Ecological Niche Modeling. *The Condor* 103: 599-605.
- Peterson, A.T. (2003). Predicting the Geography of Species Invasions via Ecological Niche Modeling. *The Quarterly Review of Biology* 78(4): 419-433.
- Peterson, A.T. Martinez-Campos, C. Nakazawa, Y. & Martínez-Meyer, E. (2005). Time-specific ecological niche modeling predicts spatial dynamics of vector insects and human dengue cases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 99: 647-655.
- Phuc, H.M. 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. & Alphey, L. (2007). Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. *BMC Biology* 5:11.
- Pialoux, G. Gauzère, B.A. Jaurebiguerry, S. & Strobel, M. (2007). Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *The Lancet Infectious Diseases* 7: 319-327.
- Platt, K.B. Linthicum, K.J. Myint, K.S.A. Innis, B.L. Lerdthusnee, K. Vaughn, D.W. (1997) Impact of dengue virus infection on feeding behavior of *Aedes aegypti*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 57: 119–125.

- Ponce, G. Flores, A.E. Badii, M.H. Fernández, I. & Rodríguez, M.L. (2004). Bionomía de *Aedes albopictus* (Skuse). *Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición de la Universidad Autónoma de Nuevo León* 5(2). 1-14.
- Pongsumpun, P. Patanarapelert, K. Sripom, M. Varamit, S. & Tang, M. (2004). Infection Risk to Travelers Going to Dengue Fever Endemic Regions. *Sotheast Asian Journal of Tropical Medical Public Health* 35(1): 155-159.
- Ponlawat, A. Scott, J.G. & Harrington, L.C. (2005). Insecticide Susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* across Thailand. *Journal of Medical Entomology* 42(5): 821-825.
- Pontes, R.J. Freeman, J. Oliveira-Lima, J.W. Hodgson, J.C. & Spielman, A. (2000). Vector densities that potentiate dengue outbreaks in a Brazilian city. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 63: 378-383.
- Poulin, B. Lefebvre, G. & Paz, L. (2010). Red flag for green spray: adverse trophic effects of *Bti* on breeding birds. *Journal of Applied Ecology* 47(4): 884-889.
- Pritchard, G. (1964). The prey of adult dragonflies in northern Alberta. *Canadian Entomologist* 96: 821-825
- Putnam, J.L. & Scott, T.W. (1995) Blood-feeding behavior of dengue-2 virus-infected *Aedes aegypti*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 52: 225–227
- Raghavendra, K. Barik, T. K. Reddy, B. P. N. Sharma, P. & Dash, A.P. (2011). Malaria vector control: from past to future. *Parasitology research* 108(4): 757-79.
- Raghavendra, K. & Subbarao, S.K. (2002). Chemical insecticides in malaria vector control in India. *ICMR Bulletin* 32:1–7
- Ramachandran, V. Malaisamy, M. Ponnaiah, M. KaliaperuamI, K. Vadivoo, S. & Gupte, M.D. (2012). Impact of Chikungunya on Health Related Quality of Life in Chennai, South India. *PLoS ONE* 7(12): e51519.
- Ramos, C. & Falcón-Lezama, J.A. (2004). La fiebre del Nilo Occidental: una enfermedad emergente en México. *Salud Pública de México* 46(5): 488-490.
- Ramsey, J.M. Bond, J.G. Macotel, M.E. Facchinelli, L. Valerio, L. Brown, D.M. Scott, T.W. & James, A.A. (2014). A regulatory Structure for Working with Genetically Modified Mosquitoes: Lessons from Mexico. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8(3): e2623.
- Raybould, A. (2006). Problem formulation and hypothesis testing for environmental risk assessment of genetically modified crops. *Environmental Biosafety Research* 5(3): 119-125.
- Raybould, A. (2010). Reducing uncertainty in regulatory decision-making for transgenic crops: More ecological research or clever environmental risk assessment? *GM Crops* 1: 25-31
- Raybould, A. (2011). The bucket and the searchlight: formulating and testing risk hypotheses about the weediness and invasiveness potential of transgenic crops. *Environmental Biosafety Research* 9 (3): 123-133.

Rebollar-Tellez, E.A. Lloroño-Pino, M.A. Rodríguez-Angulo, E.M. & Farfán-Ale, J.A. (1995). Blood feeding frequency and life expectancy of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in an urban area of Merida City, State of Yucatan, Mexico. *Revista Biomédica* 6: 135-141.

Reich, N.G. Shrestha, S. King, A.A. Rohan, P. Lesseler, J. Kalayanarooj, S. Yoon, I.K. Gibbons, R.V. Burke, D.S. & Cummings, D.A.T. (2013). Interactions between serotypes of dengue highlighting epidemiological impact of cross-immunity. *Journal of the Royal Society Interface* 10: 20130414.

Reiner RC, Jr., Perkins TA, Barker CM, Niu T, Chaves LF, Ellis, A.M. George D.B. Le Menach, A. Pulliam, J.R.C., Bisanzio, D. Buckee, C. Chiyaka, C. Cummings, D.A.T. García, A.J. Gattton, M.L. Gething, P.W. Hartley, D.M. Johnston, G. Klein, E.Y. Michael, E. Lindsay, S.W. Lloyd, A.L. Piggot, D.M. Reisen, W.K. Ruktanonchai, N. Singh, B.J. Tatem, A.J. Kitron, Hay, S.I. Scott, T.W. & Smith D.L. (2013) A systematic review of mathematical models of mosquito-borne pathogen transmission: 1970–2010. *Journal of the Royal Society Interface* 10: 20120921.

Reiskind, M.H. & Lounibos, L.P. (2009). Effects of intraspecific larval competition on adult longevity in the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Medical Veterinary Entomology* 23(1): 62-68.

Reiter, P. (2012). A letter to Oxitec from Paul Reiter <http://www.oxitec.com/a-letter-to-oxitec-from-paul-reiter-mphil-dphil-fres/>

Reiter, P. Amador, M.A. Anderson, R.A. & Clark, G.G. (1995). Dispersal of *Aedes aegypti* in a urban area after blood feeding as demonstrated by rubidium-marked eggs. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 52: 177-179

Reiter, P. Fontenille, D. & Paupy, C. (2006). *Aedes albopictus* as an epidemic vector of chikungunya virus: another emerging problem? *The Lancet Infectious Diseases* 6(8): 463-464.

Restrepo, B.N. Ramirez, R.E. Arboleda, M. Alvarez, G. Ospina, M. & Diaz, F.J. (2008). Serum Levels of Cytokines in Two Ethnic Groups with Dengue Virus Infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 79(5): 673-677.

Rey, J.R. Nishimura, N. Wagner, B. Braks, M.A.H. O'Connell, S.M. & Lounibos, L.P. (2006). Habitat segregation of mosquito arbovirus vectors in South Florida. *Journal of Medical Entomology* 43: 1134-1141.

Reyes-Villanueva, F. (2004). Egg development may require multiple bloodmeals among small *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) field collected in Northeastern México. *Florida Entomologist* 87(4): 630-632.

Ribeiro, J.M.C. & Francischetti, M.B. (2003). Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annual Review of Entomology* 48: 73-88

Ribeiro, J.M.C. Rossignol, P.A. & Spielman, A. (1984). Role of mosquito saliva in blood vessel location. *Journal of Experimental Biology* 108:1-7.

Ribeiro, J.M.C. (2000). Blood finding in mosquitoes: probing time and salivary gland haemostatic activities in representatives of three genera (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*). *Medical and Veterinary Entomology* 14:142-148.

- Rivero, A. Magaud, A. Nicot, A. & Vézilier, J. (2011). Energetic cost of insecticide resistance in *Culex pipiens* mosquitoes. *Journal of Medical Entomology* 48(3): 694-700.
- Rivero, A. Vézilier, J. Weill, M. Read, A.F. & Gandon, S. (2010). Insecticide control of vector-borne diseases: When is insecticide resistance a problem? *PLoS Pathogens* 6(8): e1001000.
- Richards, S.L. Ponnusamy, L. Unnasch, T.R. Hassan, K.H. & Apperson, C.S. (2006). Host-Feeding Patterns of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Relation to Availability of Human and Domestic Animals in Suburban Landscapes of Central North Carolina. *Journal of Medical Entomology* 43(3): 543-551.
- Rickard, S.C. (1960). *Aedes aegypti* (L.) *The yellow Fever Mosquito Its Life History, Bionomics and structure*. Nueva York: Cambridge University Press.
- Rigau-Pérez, J. G. Clark, G. G. Gubler, D. J. Reiter, P. Sanders, E. J. & Vorndam, A. V. (1998). Dengue and dengue haemorrhagic fever. *The Lancet* 352(9132): 971-977.
- Robert, M.A. Legros, M. Facchinelli, L. Valerio, L. Ramsey, J.M. Scott, T.W. Gould, F. & Lloyd, A.L. (2013). Field case studies and progressive evaluation of Genetically-Engineered Mosquitoes. *Journal of Medical Entomology* 49(6): 1177-1188.
- Roberts, D. (1999). Mosquitoes (Diptera: *Culiciade*) Breeding in Brackish Water: Female Ovipositional Preferences or Larval Survival?. *Journal of Medical Entomology* 33(4): 525-530
- Robinson, A.S. (1976). Progress in the use of chromosomal translocations for the control of insect pests. *Biological Review* 51(1): 1-24
- Robinson, A.S. Knols, B.G.J. Voigt, G. & Hendrichs, J. (2009). Conceptual framework and rationale. *Malaria Journal* 8(Supl 2): S1
- Roby, J.A. Funk, A. & Khromykh, A.A. (2012). Flavivirus Replication and Assembly en Shi P (ed.) *Molecular Virology and Control of Flaviviruses*. (pp. 21-50) Norfolk: Horizon Scientific Press.
- Roche, B. Guégan, J. & Bousquet, F. (2008). Multi-agent systems in epidemiology: a first step for computational biology in the study of vector- borne disease transmission. *BMC Bioinformatics* 9:435.
- Rogan, J.W. & Chen, A. (2005). Health risks and benefits of bis(4-chlorophenyl)-1,1,1-trichloroethane (DDT). *The Lancet* 366: 763-773.
- Romero-Vivas, C.M. & Falconar, A.K. (2005). Investigation of relationships between *Aedes aegypti* egg, larvae, pupae, and adult density indices where their main breeding sites were located indoors. *Journal of the American Mosquito Control Association* 21(1): 15-21.
- Rose, R.I. (2001). Pesticides and Public Health: Integrated Methods of Mosquito Management. *Emerging Infectious Diseases* 7(1): 17-23
- Rosen, L. Rozeboom, L.E. Gubler, D.J. Lien, J.C. & Chaniotis, B.N. (1985). Comparative susceptibility of mosquito species and strains to oral and parental infection with dengue and Japanese encephalitis viruses. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 34: 603-615
- Ross, R. (1905). The logical basis of the sanitary policy of mosquito reduction. *Science* 22: 689-699

- Ross, R. (1917). An application of the theory of probabilities to the study of *a priori* pathometry. *II Proceedings of the Royal Society of London* 92 (638): 204-230.
- Rothman, A.L.(2009). *Dengue Virus*. Boston: Springer Science & Business Media.
- Rozendaal, J.A. (1997). *Vector Control: Methods for Use by Individuals and Communities*. Ginebra: World Health Organization.
- Rubert, K.F. (2008). *Tetracycline Antibiotic Distribution and Transformation in Aquatic Systems*. Madison: ProQuest.
- Rubin, G. & Sprading, C.A.. (1982) . Genetic Transformation with Transposable Element Vectors. *Science* 218 (22): 348- 353
- Russell, R.C. (1986). Larval Competition Between the Introduced Vector of Dengue Fever in Australia, *Aedes aegypti* (L), and a Native Container-Breeding Mosquito, *Aedes notoscriptus* (Skuse) (Diptera, Culicidae). *Australian Journal of Zoology* 34(4): 527 – 534.
- Saavedra-Rodriguez, K. Strobe, C. Flores, A.S. Fernández, I.S. Ranson, H. Hemingway, J. & Black W.C. IV. (2008). Quantitative trait loci mapping of genome regions controlling permethrin resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics* 180: 1137–1152.
- Sabin, A.B. (1952). Research on dengue during World War II. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1: 30-50.
- Salazar, I.M. Loroño-Pino, M.A. Farfán-Ale, J.A. Olson, K.E. & Beaty, B.J. (2010). American and American/Asian genotypes of dengue virus differ in mosquito infection efficiency: candidate molecular determinants of productive vector infection. *Revista Biomédica* 21: 121-135.
- Salje, H. Lessler, J. Endy, T.P. Curriero, F.C. Gibbons, R.V. Nisalak, A. Nimmannitya, S. Kalayanarooj, S. Jarman, R.G. Thomas, S.J. Burke, D.S. & Cummings D.A.T. (2012). Revealing the microscale spatial signature of dengue transmission and immunity in an urban population. *PNAS* 109(24): 9535-9538
- Sangkawibha, N. Rojanasuphot, S. Ahandrik, S. Viriyapongse, S. Jatanasen, S. Salitul, V. Phanthumachinda, B. & Halstead, S.B. (1984). Risk factor in dengue shock syndrome: A prospective epidemiology study in Rayong, Thailand I. The 1980 Outbreak. *American Journal of Epidemiology* 120(5): 653-669.
- Sanvido, O. Romeis, J. Gathmann, A. Gielkens, M. Raybould, A. & Bigler F. (2012). Evaluating environmental risk of genetically modified crops: ecological harm criteria for regulatory decision-making. *Environmental Science & Policy*, 15, 82-91.
- Sardelis, M.R. Turell, M.J. Dohm, D.J. & O'Guinn, M.I. (2001). Vector Competence of Selected North American *Culex* and *Coquillettidia* Mosquitoes for West Nile Virus. *Emerging Infectious Diseases* 7(6): 1018-1022.
- Scott, T.W. & Morrison, A. (2003). *Aedes aegypti* density and the rise of dengue virus transmission. En Talen W & TW Scott (eds.) *Ecological Aspects for Application of Genetically Modified Mosquitoes* (pp.187-206) Dordrecht: FRONTIS.
- Scharipa, A. (2006). DDT: a polluted debate in malaria control. *The Lancet* 368 (9553): 2111-2113.

- Schliekelman, P. & Gould, F. (2000a). Pest control by the Introduction of a Conditional Lethal Trait on Multiple Loci: Potential, Limitations, and Optimal Strategies. *Journal of Economic Entomology* 93(6): 1543- 1565
- Schliekelman, P. & Gould, F. (2000b). Pest Control by the Release of Insects Carrying a Female-Killing Allele on Multiple Loci. *Journal of Economic Entomology*. 93 (6): 1566-1579
- Schliessmann, D.J. & Calheiros, L.B. (1974). A review of the status of the yellow fever and *Aedes aegypti* eradication programs in the Americas. *Mosquito News*: 1-9
- Schneider, J.R. Mori, A. Romero-Severson, J. Chadee, D.D. & Severson, D.W. (2007). Investigations of dengue-2 susceptibility and body size among *Aedes aegypti* populations. *Medical and Veterinary Entomology* 21: 370-376.
- Schneider, M.J. Braden, S.E. Reyes-Herrera, I. & Donoghue, D.J. (2007). Simultaneous determination of fluoroquinolones and tetracyclines in chicken muscle using HPLC with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* 846(1-2): 8-13.
- Scott, T.W. & Morrison, A.C. (2004). *Aedes aegypti* density and the risk of dengue-virus transmission En: Takken W, Scott TW (eds.): *Ecological aspects for the application of genetically modified Mosquitoes* (pp. 187-206). Netherlands: Kluwer Academic Publishers
- Scott, T.W. & Morrison, A.C. (2010). Longitudinal field studies will guide a paradigm shift in dengue prevention en: Atkinson PW (Ed) *Vector Biology, Ecology and Control* (pp 139-161). Nueva York: Springer.
- Scott, T.W. & Morrison, A.C. (2010b). Vector Dynamics and Transmission of Dengue Virus: Implications for Dengue Surveillance and Prevention Strategies en Rithman A.L. (ed.) *Dengue Virus, Current Topics in Microbiology and Immunology* (pp.116-124). Nueva York: Springer
- Scott, T.W. Takken, W. Knols, B.G.J. & Boete, C. (2002). The Ecology of Genetically Modified Mosquitoes. *Science* 298: 117-119.
- Sebastian, A. Sein, M.M. Thu, M.M. & Corbet, P.S. (1991). Suppression of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* L. Diptera: Culicidae by augmentative release of the dragonfly *Crocothemis servilia* Drury Odonata: Libellulidae. *Opuscula Zoologica Fluminensia* 72: 1-5
- Seijo, A. (2009). Dengue 2009: cronología de una epidemia. *Archivo Argentino de Pediatría*. 107 (5): 387-389.
- Sethuraman, N. Fraser, M.J. Eggleston, P. & O'Brochta, D.A. (2007). Post-Integration stability of *piggYBac* in *Aedes aegypti*. *Insect Biochemical and Molecular Biology* 37(9): 941-951.
- Shroyer, D.A. (1986). *Aedes albopictus* and arboviruses: A concise review of the literature. *Journal of the American Mosquito Association* 2: 424-428.
- Siler, J.F. Hall, M.W. & Hitchens, A.P. (1926). *Dengue: its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity, and prevention*. Manila: Philippine Bureau of Science.

- Simaika, J.P. & Samways, M.J. (2008). Valuating dragonflies as service providers. En: Cordoba A.A. (ed): *Dragonflies and Damselflies: Model Organisms for Ecological and Evolutionary Research*. Oxford: Oxford University.
- Sinkins, S.P. (2007). Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science* 316 (5832): 1718-1723
- Sivagnaname, N. & Gunasekaran, K. (2012). Need for an efficient adult trap for the surveillance of dengue vectors. *Indian Journal of Medical Research* 136: 739-749.
- Slosek, J. (1986). *Aedes aegypti* mosquitoes in the Americas: A review of their interactions with the human population. *Social Science & Medicine* 23(3): 249-257.
- Slotkin, R.K. & Martienssen, R. (2007). Transposable elements and the epigenetic regulation on the genome. *Nature Reviews Genetics* 8: 272–285
- Smith, C.E. (1975). The significance of mosquito longevity and blood-feeding behavior in the dynamics of arbovirus infections. *Medical Biology* 55 (5): 288-294.
- Smith, D.L. (1913). Mosquitoes Pollinating Orchids. *Science* 37(962): 867.
- Smith, D.L. Perkins, T.A. Tusting, L.A. Scott, T.W. & Lindsay, S.W. (2013). Mosquito Population Regulation and Larval Source Management in Heterogenous Environments. *PLoS ONE* (8): e71247.
- Smith, D.L. Battle, K.E. Hay, S.J. Barker, C.M. Scott, T.W. & McKenzie F.E. (2012). Ross, MacDonald, and Theory for the Dynamics and Control of Mosquito-Transmitted Pathogens. *PLoS Pathogens* 8(4): e1002588
- Sota, T. (1992). Variable host selection by mosquitoes and the dynamics of mosquito-borne disease. *Medical entomology and zoology* 43(1): 1-11.
- Sota, T. & Mogi, M. (1992). Interspecific variation in desiccation survival time of *Aedes* (*Stegomyia*) mosquito eggs is correlated with habitat and egg size. *Oecologia* 90(3): 353-358.
- Sota, T. Mogi, M. & Hayamizu, E. (1994). Habitat stability and the larval mosquito community in treeholes and other containers on a temperate Island. *Researches on Population Ecology* 36(1): 93-104.
- Soumahoro, M. Gérardin, P. Boëlle, P. Perrau, J. Fianu, A. Pouchot, J. Malvis, D. Flahault, A. Favier, F. & Hanslik, T. (2009). Impact of Chikungunya Virus Infection on Health Status and Quality of Life: A Retrospective Cohort Study. *PLoS ONE* 4(11): e7800.
- Soumahoro, M. Fontenille, D. Turbelin, C. Pelat, C. Boyd, A. Flahault, A. & Hanslik, T. (2010). Imported Chikungunya Virus Infection. *Emerging Infectious Diseases* 16(1): 162-163.
- Sperança, M.A. & Capurro, M.L. (2007). Perspectives in the control of infectious diseases by transgenic mosquitoes in the post-genomic era: a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 102 (4):425-433.
- Spielman, A.A. & Sullivan, J.J. (1974). Predation on peridomestic mosquitoes by hylid tadpoles on Grand Bahama Island. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 23: 704-709.

- Spielman, A. Leahy, M.G. & Skaff, V. (1967). Seminal Loss in Repeatedly Mated Female *Aedes aegypti*. *Biological Bulletin* 132(3): 404-412,
- Sprenger, D. & Wuithiranyagool, T. (1986). The discovery and distribution of *Aedes albopictus* in Harris County, Texas. *Journal of the American Mosquito Control Association* 2(2): 217-219.
- Steffan, W, & Evenhuis, N.L. (1981). Biology of Toxorhynchites. *Annual Review of Entomology* 26: 159-181.
- Strickman, D. & Kittayapong, P. (2003). Dengue and its vectors in Thailand: calculated transmission risk from total pupal counts of *Aedes aegypti* and association of wing-length measurements with aspects of the larval habitat. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 68: 209-217.
- Stoddard, S.T. Forshey, M.B. Morrison, A.C. Paz-Soldan, V.A. Vazquez-Pokopec, G.M. Astete, H. Reiner, R.C. Vilcarromero, S. Elder, J.P. Halsey, E.S. Kochel, T.J. Kitron, U. & Scott, T.W. (2013). House –to-house human movement drives dengue virus transmission. *PNAS* 110(3): 994-999.
- Suaya, J.A. Shepard, D.S. & Beatty, M. (2007) Dengue: Burden of Disease And Cost Of Illness. En WHO Scientific Working Group, Report on Dengue. Ginebra: WHO Press.
- Sumanochitrapon, W. Strickman, D. Sithiprasasna, R. Kittayapong, P. & Innis, B.L. (1998). Effect of size and Geographic origin of *Aedes aegypti* on oral infection with Dengue-2 Virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 58(3): 283-286.
- Sunahara, T. & Mogi, M. (1997). Distribution of larval mosquitoes among bamboo-stump pools with vary in persistence and resource input. *Researches on Population Ecology* 39(2): 173-179.
- Sunahara, T. Ishizaka, K. & Mogi, M. (2002). Habitat size determining the opportunity for encounters between mosquito larvae and aquatic predators. *Journal of Vector Ecology* 27(1): 8-20.
- Tabachnick, W.J. Wallis, G.P. Aitken, T.H. Miller, B.R. Amato, G.D. Lorenz, L. Powell, J.R. & Beaty, B.J. (1985). Oral infection of *Aedes aegypti* with yellow fever virus: geographic variation and genetic considerations. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 34(6):1219-1224.
- Tardieux, I. Poupel, O. Lapchin, L. & Rodhain, F. (1990). Variation among strains of *Aedes aegypti* in susceptibility to oral infection with dengue virus type 2. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 43: 308-313.
- Tepfer, T. Racovita, M. & Craig, W. (2013). Putting problem formulation at the forefront of GMO risk analysis. *GM Crops and Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain* 4(1): 10-15.
- Thammapalo, S. Nagao, Y. Sakamoto, W. Saengtharatip, S. Tsujitani, M. Nakamura, Y. Coleman, P.G. & Davies, C. (2008). Relationship between Transmission Intensity and Incidence of Dengue Hemorrhagic Fever in Thailand. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2(7): e263.
- Thavara, U. Siriyasatein, P. Tawatsin, A. Asavadachanukorn, P. Anantapreecha, S. Wongwanich, R. & Mulla, M.S. (2006). Double infection of heteroserotypes of dengue viruses in field populations of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and serological features of dengue viruses found in patients in Southern Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine of Public Health* 37(3): 468-479.

- Thomas, D.D. Donnelly, C.A. Wood, R.J. & Alphey, L.S. (2000). Insect Population Control Using a Dominant, Repressible, Lethal Genetic System. *Science* 287(5462): 2474-2476.
- Titus, R. & Ribero J.M.C. (1990). The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne disease. *Parasitology today* 6:157-60.
- Trexler, J.D. Apperson, C.S. & Schal, C. (1996). Diel oviposition patterns of *Aedes albopictus* (Skuse) and *Aedes triseriatus* (Say) in the laboratory and field. *Journal of Vector Ecology* 22: 64-70.
- Troyo, A. Calderón-Arguedas, O. Fuller, D.O. Solano, M.E. Avendaño, A. Arheart, K.L. Chadee, D.D. & Beier, J.C. (2008). Seasonal profiles of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larval habitats in an urban area of Costa Rica with a history of mosquito control. *Journal of Vector Ecology* 33(1): 76-88.
- Trpis, M. & Hausermann, W. (1986). Dispersal and other parameters of *Aedes aegypti* in an African village and their possible significance in epidemiology of vector-borne diseases. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 35(6): 1263-1279.
- Trpis, M. McClelland, G.A.H. Gillett, J.D. Teesdale, C. & Rao, T.R. (1973). Diel periodicity in the landing of *Aedes aegypti* on man. *Bulletin of the World Health Organization* 48: 623-629.
- Tun-Lin, W. Kay, B.H. & Barnes, A. (1995). Understanding productivity, a key to *Aedes aegypti* surveillance. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 53: 595-601
- Turell, M.J. & Beaman, J.B. (1992). Experimental transmission of Venezuelan Equine Encephalomyelitis virus by a strain of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) from New Orleans, Louisiana. *Journal of Medical Entomology* 29(5): 802-805.
- Turusov, V. Rakitsky, V. & Tomatis, L. (2002). Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): ubiquity, persistence, and risks. *Environmental Health Perspectives* 110: 125-128
- Ulloa, A. Langevin, S.A. Mendez-Sanchez, J.D. Arredondo-Jimenez, J.I. Raetz, J.L. Powers, A.M. Villarreal-Treviño, C. Gubler, D.J. & Komar, N. (2004). Serologic survey of domestic animals for zoonotic arbovirus infections in the Lacandón Forest region of Chiapas, Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 3(1): 3-9
- USFWS. (2004). *Environmental Effects of Mosquito Control* Washington D.C: U.S. Fish & Wildlife Service.
- Usinger, R.L. (1944). Entomological Phases of the Recent Dengue Epidemic in Honolulu. *Public Health Reports (1896-1979)* 59(13): 423-430.
- Vasilakis, N. & Scott, S.C. 2008. The history and evolution of human dengue emergence. En Maramorosch, K. Shatkin, A.J. & Murphy, F.A. (eds.) *Advances in Virus Research* (pp.8-29). Londres: Academic Press.
- Vaughn, D.W. (2000). Invited Commentary: Dengue Lessons from Cuba. *American Journal of Epidemiology* 152(9): 800-803.
- Vázquez-Pichardo, M. Rosales-Jiménez, C. Nuñez-León, A. Rivera-Osorio, P. de la Cruz-Hernández, S. Ruiz-López, A. González-Mateos, S. López-Martínez, I. Rodríguez-Martínez, J.C.

- López-Gatell, H. & Alpuche-Aranda, C. (2011). Dengue serotypes in México during 2009-2010. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México* 68(2): 103-110.
- Vazzeille, M. Mousson, L. Rakatoarivony, I. Villeret, R. Rodhan, F. Duchemin, J.B. & Failloux, A.B. (2001). Population Genetic Structure and Competence as a Vector for Dengue Type 2 Virus of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Madagascar. *American Journal of Medicine and Hygiene* 65(5): 491-497.
- Vazzeille, M. Moutailler, S. Pages, F. Jarjaval, F. & Failloux, A.B. (2008). Introduction of *Aedes albopictus* in Gabon: What consequences for dengue and chikunguya transmission? *Tropical Medicine and International Health* 13(9): 1176-1779.
- Vazzeille, M. Rosen, L. Mousson, L. & Failloux, A.B. (2003). Low Oral Receptivity for Dengue Type 2 Viruses of *Aedes albopictus* from Southeast Asia compared with that of *Aedes aegypti*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 68(2): 203-208.
- Vogt, W.G. Woodburn, T.L. & Foster, G.G. (1985). Ecological Analysis of Field Trials Conducted to Assess the Potential of Sex-linked Translocation Strains for Genetic Control of the Australian Sheep Blowfly, *Lucilia cuprina* (Wiedemann). *Australian Journal of Biological Science* 38: 259-273.
- Wallis, G.P. Aitken, T.H. Beaty, B.J. Lorenz, L. Amato, G.D. & Tabachnick, W.J. (1985). Selection for susceptibility and refractoriness of *Aedes aegypti* to oral infection with yellow fever virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 34: 1225-1231.
- Walton, E.W. (2007). Larvivorous fish including *Gambusia*. *Journal of the American Mosquito Control Association* 23 (sp2): 184-220.
- Walsh, R.K. Bradley, C. Apperson, C.S. & Gould, F. (2011). An experimental Field Study of Delayed Density Dependence in Natural Populations of *Aedes albopictus*. *PLoS ONE* 7(4): e35959.
- Walsh, R.K. Facchinelli, L. Ramsey, J.M. Bond, J.G. & Gould F. (2012). Assessing the impact of density dependence in field populations of *Aedes aegypti*. *Journal of Vector Ecology* 36(2):300-307.
- Wang, W. Severs, L. & Iatrou, K. (2001). *Mariner (Mos1)* transposase and genomic integration of foreign gene sequences in *Bombyx mori* cells. *Insect Molecular Biology* 9(2): 145-155.
- Washburn, J.O. (1995). Regulatory factors affecting larval mosquito populations in container and pool habitats: implications for biological control. *Journal of the American Mosquito Control Association* 11: 279-283.
- Watson, J.D. & Crick, F.H.C. (1953). A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171: 737-738.
- Watts, D.M. Porter, K.R. Putvatana, P. Vasquez, B. Calampa, C. & Halstead, S.B. (1999). Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *The Lancet*
- Watts, D.M., Burke, D.S. Harrison, B.A. Whitmire, R.E. & Nisalak, A. (1987). Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for dengue 2 virus. *American Journal of Medicine and Hygiene* 36:143-152.

- Weaver, S.C. & Vasilakis, N. (2009). Molecular Evolution of Dengue Viruses: Contributions of Phylogenetics to Understanding the History and Epidemiology of the Preeminent Arboviral Disease. *Infection, Genetics and Evolution* 9(4): 523-540.
- Wei, R. Feng, G. Huang, S. Chen, M. & Wang, R. (2011). Occurrence of veterinary antibiotics in animal wastewater and surface around farms in Jiangsu Province, China. *Chemosphere* 82(11): 1408-1414.
- Wen, Y. Wang, Y. & Feng, Y. (2006). Simultaneous residue monitoring of four tetracycline antibiotics in fish muscle by in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Talanta* 70: 153-159.
- Wemeling, D.A. Pacheco, F.A. & Horta, M.A. (2014) The use of modified mosquitoes in Brazil for the control of *Aedes aegypti*: methodological and ethical constraints. *Saúde Pública* 30(11): Press release.
- Whitaker, J.O. (2004). Prey Selection in a Temperate Zone Insectivorous Bat Community. *Journal of Mammalogy* 85(3): 460-469.
- Whitehead, S.S. Blaney, J.E. Durbin, A.P. & Murphy, B.R. (2007). Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature Reviews Microbiology* 5: 518-528.
- Whitten, M.J. (1977). Current status of genetic control of the Australian sheep blowfly, *Lucila cuprina* (Wiedemann) (Diptera: Caliphoridae). En White, D. & J.S. Packer (eds.) *Proceedings of the XV International Congress of Entomology* (pp. 129-139). Entomological Society of America.
- Whitten, M.J. (1979). The use of genetically selected strains for pest replacement or suppression. En Hoy, M.A. & J.J. McKelvey (eds.) *Genetics in Relation to Insect Management* (pp. 31-40). Nueva York: The Rockefeller Foundation.
- Wicker, T. Sabot, F. Hua-Van, A. Bennetzen, J.L. Capy, P. Chalhoub, B. Flavell, A. Leroy, P. Morgante, M. Panaud, O. Paux, E. Sanmiquel, P. & Schulman, A.H. (2007). A unified classification system for eukaryotic transposable elements *Nature Reviews Genetics* 8: 973-982.
- Wilcox, B.A. & Gluber, D.J. (2005). Disease ecology and the global emergence of zoonotic pathogens. *Environmental Health and Preventive Medicine* 10(5):263-272.
- Williams, D.D. (2006). *The Biology of Temporary Waters*. Oxford: Oxford University Press.
- Williams, R.E. Bennet, G.W. & Hill, C. (2010). Mosquitoes in and around the home. *Purdue Extension* E-26-W.
- Wise de Valdez, M.R. Nimmo, D. Betz, J. Gong, H. James, A.A. Alphey, L. & Black, W.C.IV. (2011). Genetic elimination of dengue mosquitoes. *PNAS* 108: 4772-4775.
- Wolt, J.D. Keese, P. Raybould, A. Fitzpatrick, J.W. Burachik, M. & Gray A. (2010). Problem formulation in the environmental risk assessment for genetically modified plants. *Transgenic Response* 19: 425-436.
- Wongkoon, A. Jaroensutasinee, M. & Jaroensutasinee K. (2013). Distribution, seasonal variation & dengue transmission prediction in Sisaket, Thailand. *Indian Journal of Medical Research* 13(3): 347-353.

Xiong, Y. & Eickbush, T.H. (1988). Similarity of Reverse Transcriptase-like Sequences of Virus, Transposable Elements, and Mitochondrial Introns. *Molecular Biology and Evolution* 5(6): 675-690.

Xue, R.D. Barnard, D.R. & Schreck, C.E. (1995a). Influence of body size and age of *Aedes albopictus* on human host attack rates and the repellency of deet. *Journal of the Mosquito Control Association* 11(1): 50-53.

Xue, R.D. Edman, J.D. & Scott, T.W. (1995b). Age and Body Size Effects on Blood Meal Size and Multiple Blood Feeding by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 32 (4): 471-474.

Yee, D.A. Allgood, D. Kneitel, J.M. & Kuehn, K.A. (2012). Constitutive differences between natural and artificial container mosquito habitats: vector communities, resources, microorganism, and habitat parameters. *Journal of Medical Entomology* 49(3): 482-491.

Yuval, B. (2006). Mating systems of blood-feeding flies. *Annual Reviews of Entomology* 51: 413-440.

Yuval, B. & Fritz, G.N. (1994). Multiple mating in female mosquitoes: evidence from a field population *Aedes freboni* (Diptera: Culicidae). *Bulletin of Entomological Research* 84(1): 137-139.

Zárate, M.L. (1978). Arbovirus y Arbovirosis en México. *Ciencia Veterinaria* 2: 157-182.

Zuckerman A.J. (2009). *Principles and Practice of Clinical Virology*. Nueva York: John Wiley and Sons.