

de eclosión. Posteriormente las larvas se pasarán a bandejas de plástico. Cada bandeja contendrá 3000 larvas en un volumen de 1 litro de agua. Una vez que las larvas lleguen al segundo estadio las mismas serán examinadas utilizando un estereomicroscopio de fluorescencia (Modular Stereomicroscope, Leica, MZ10F). Las larvas transgénicas *Ae. aegypti* RIDL® se verán de color rojo fluorescente. Se criarán las larvas hasta que lleguen a la fase de pupas, luego de la cual se trasladarán las mismas a Cámaras de cría de mosquitos (Mini Mosquito Breeder, Bioquip, 1425DG) y estas se introducirán a jaulas para cría de mosquito (Bug Dorm 1, Bioquip, 1452). En la fase de pupas se hará una selección entre aquellas que sean macho de las hembras. Ya que para los experimentos de competitividad por la copula de la hembra solo se utilizarán machos. Las hembras se eliminarán por congelación a -20°C. Posteriormente los mosquitos pasarán de pupas a adultos dentro de las jaulas de cría. De estos mosquitos se tomarán 10 machos *Ae. aegypti* RIDL® transgénicos y 10 mosquitos *Ae. aegypti* machos nativos, de una colonia previamente establecida, para luego introducir 10 hembras nativas *Ae. aegypti*. Luego las posturas se pondrán a eclosionar mediante el sistema de vacío. Una vez que se tienen las larvas en el segundo estadio estas se observarán mediante el estereomicroscopio de fluorescencia para el conteo de las larvas transgénicas, estas larvas se diferencian de las nativas por que emiten fluorescencia de color rojo. Mientras que las larvas que sean producto del apareamiento de un mosquito *Ae. aegypti* macho nativo con la hembra *Ae. aegypti* nativa no presentarán fluorescencia alguna. A su vez se contarán las larvas que no emiten fluorescencia (Nativas). Finalmente se calculará el porcentaje de larvas transgénicas del total de larvas. Se realizarán réplicas de este experimento con el fin de obtener un valor aproximado de la competitividad del macho transgénico.

## **7. INFORMACIÓN REQUERIDA PARA EVALUACIÓN DE RIESGO:**

### **7.1. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO VIVO MODIFICADO**

#### **7.1.1. CARACTERÍSTICAS DEL ORGANISMO RECEPTOR DEL TRANSGEN**

##### **a. Identificación del organismo (nombre, familia, genero, especie, subespecie, variedades (ubicación taxonómica)).**

El organismo receptor es el mosquito de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (L.) que pertenece al Diptera: Culicidae. El nombre popular es el mosquito de la fiebre amarilla.

##### **b. Distribución geográfica y hábitat natural del organismo, centro de origen y centro de diversidad genética, incluida información sobre depredadores naturales, presas, parásitos, competidores, simbioses y huéspedes (anexar).**

*Ae. aegypti* es una especie tropical de mosquito encontrada entre 15oN y 15oS, por lo general en África y partes de Sudamérica (OMS, 1989). Se originó en África tropical y logró una distribución pantropical en la década de 1930. Hoy en día está distribuida por todo el mundo.

La oviposición es realizada individualmente por las hembras de *Ae. aegypti* en recipientes naturales y artificiales que puedan contener agua. Los huevos son estructuras de supervivencia a largo plazo de estos mosquitos, sobreviviendo hasta seis

meses. Las larvas y las pupas prefieren el agua relativamente limpia que, por lo general, se encuentra en estos tipos de recipientes: recipientes de almacenamiento de agua, macetas y materiales de desecho como neumáticos, latas, botellas, etc. Los recipientes de materiales de desecho son generalmente las únicas fuentes de mosquitos durante la temporada de lluvias en otros países, pero en los países tropicales esto tiende a ser durante todo el año. La duración de las etapas de larva es aproximadamente 7-9 días y de las etapas de pupa es 2-3 días, pero esto depende de la temperatura, alimentación y competencia por el espacio entre las formas inmaduras. Las zonas preferidas para los mosquitos adultos son ambientes domésticos urbanos en espacios oscuros localizados en el intradomicilio y peridomicilio. *Ae. aegypti* es un mosquito que pica durante el día con dos horas punta, una a media mañana y la otra durante la tarde. El período de vida promedio de adultos es 8-15 días para los mosquitos hembras y 3-6 días para los mosquitos machos en campo. El vuelo espontáneo de adultos se limita a unos 200 metros dependiendo de la disponibilidad de los sitios de cría y de los huéspedes de cuya sangre se alimentan. Sin embargo, la especie se dispersa por el transporte pasivo en los barcos, trenes, etc y El Reglamento Sanitario Internacional exige que los puertos y los aeropuertos estén libres de *Ae. aegypti* en 400 metros. El clima y la disponibilidad de los sitios de cría son los dos factores principales que regulan las poblaciones de *Ae. aegypti* en ambientes urbanos.

*Ae. aegypti* es el vector principal del dengue y dengue grave, y un vector de otros arbovirus, como el chikungunya y fiebre amarilla urbana (Alvarez L, 2006).

El control de vectores es la única manera de controlar o prevenir el dengue. Los métodos actuales, como el uso de insecticidas y enfoques de la conducta (vaciar los recipientes de agua etc.) son de eficacia limitada, especialmente en un país tropical donde el mosquito se cría en pequeños recipientes llenos de agua de lluvia o recipientes de almacenamiento de agua.

El ecosistema del *Ae. aegypti* es el ambiente urbano doméstico o peri-doméstico, que consta de viviendas humanas, casas de la tienda, lugares de culto, etc. *Ae. aegypti* prefiere lugares oscuros de descanso dentro de las casas/edificios. Por lo tanto, el ecosistema objetivo contiene probablemente, pero no exclusivamente, otras especies de invertebrados, como otras especies de mosquito, arañas, reptiles, pequeños animales domésticos como gatos y perros, pájaros y murciélagos.

#### Bibliografía citada:

Álvarez L, Briceño A y Oviedo M. Resistencia al Temephos en poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del occidente de Venezuela. Rev. Colomb. Entomol. 2006; 32: 172-5

#### **c. Grado de parentesco entre donante y receptor**

El organismo receptor o progenitor es *Ae. aegypti*, un mosquito (Diptera: Culicidae). Diptera forma una Orden de Insectos, que es uno de los principales grupos de Arthropoda. Los artrópodos son uno de los principales grupos de animales invertebrados. En relación con *Ae. aegypti*, *Discosoma*, un coral, está muy poco relacionado, como *E. coli*, un procariota. *Tricoplusia ni* y *Drosophila melanogaster* son los dos insectos. T. ni es una palomilla, Orden Lepidoptera. Se cree que los

Lepidópteros se separaron de Diptera hace alrededor de 300 millones de años. *Drosophila* son dípteros, y por lo tanto, más cercanamente relacionados con los mosquitos, que también son dípteros. Se cree que los dípteros superiores, que incluyen *Drosophila*, se han separado de los mosquitos hace alrededor de 260 millones de años (Krzywinski et al, 2006).

#### **d. Distribución en el medio ambiente y mecanismos que utiliza el organismo para sobrevivir en el medio ambiente**

Aunque *Ae. aegypti* se originó en los agujeros de árboles y las depresiones del suelo poco profundo, como los agujeros en las piedras, se ha adaptado a estar más asociado con el ambiente doméstico o peri-doméstico. Las zonas preferidas por los adultos son espacios oscuros abrigados dentro de casas y apartamentos. Los adultos desovan los huevos en agua relativamente limpia y tranquila, que normalmente se encuentra en recipientes en el ambiente urbano: recipientes de almacenamiento de agua, macetas, materiales de desecho como neumáticos, latas, botellas, etc. El ecosistema objetivo es el ambiente urbano doméstico o peri-doméstico, que consta de las viviendas humanas, casas de la tienda, lugares de culto, etc. *Ae. aegypti* prefiere lugares oscuros de descanso dentro de las casas/edificios. Por lo tanto, el ecosistema objetivo contiene probablemente, pero no exclusivamente, otras especies de invertebrados, como otras especies de mosquito y hormigas, arañas, reptiles, pájaros y murciélagos así como pequeños animales domésticos como gatos y perros. Los ecosistemas no objetivos, probablemente, son los alrededores de vegetación, aunque se sabe que si hay presencia humana, *Ae. aegypti* prefiere mucho más permanecer allí, en lugar de volar a la vegetación sin presencia humana. Esto se debe a que prefiere alimentarse de sangre humana antes que de la sangre de otros animales.

Los mosquitos no son un contribuyente significativo para los procesos ambientales como la producción primaria, movimiento de nutrientes, y la descomposición de la materia orgánica, aunque las larvas se alimentan de pequeñas cantidades de detritus orgánico, que está presente en el recipiente del sitio de cría.

La forma de supervivencia a largo plazo de *Ae. aegypti* son los huevos, que pueden sobrevivir aproximadamente de 6 meses hasta 1 año, en condiciones adecuadas. La eclosión ocurre cuando se exponen al agua; la viabilidad y la tasa de eclosión disminuyen en almacenamiento con el tiempo. El crecimiento y el desarrollo dependen de la temperatura, con un desarrollo más rápido en los climas más cálidos.

#### **e. Mecanismos de polinización y reproducción (polinización cruzada con otras especies vegetales cultivadas o silvestres)**

El intercambio de materiales genéticos entre diferentes especies de insectos en el ambiente natural no ocurre casi nunca porque los insectos intercambian gametos internamente y tienen comportamientos de apareamiento y estructuras complejas para prevenir el apareamiento entre especies. Incluso en condiciones de laboratorio, el apareamiento entre las especies cercanamente relacionadas, *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* no tiene como resultado híbridos fértiles. Por lo tanto, estas barreras de apareamiento limitan algunos genes introducidos a la especie que los contiene (Nasci et al, 1989, Nazni et al, 2009). *Ae. aegypti* se aparee sexualmente basándose en una

variedad de señales, incluyendo el batir de alas de la hembra así que existen barreras específicas para el apareamiento con otras especies (Cator et al, 2009). Las hembras se aparean sólo una vez en su vida y necesitan alimentarse de sangre (es decir, picar a los humanos) para permitir que los huevos se desarrollen.

Los insectos muertos en el medio ambiente no constituyen peligro alguno ya que este material no contiene compuestos tóxicos solo proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos minerales, grasas y otros compuestos orgánicos. Los depredadores, parásitos y presas que potencialmente estén expuestos por ingestión a estas proteínas y DNA de los insectos modificados no presentan riesgo algunos de que las mismas sean toxicas o que incorporen estos fragmentos de DNA ya que resulta muy difícil o casi imposible de que estos sean incorporados en los genes por esta ruta. Hasta el momento no se tiene conocimiento de que esto haya sucedido.

#### **f. Potencial de transmisión e intercambio genético con otros organismos**

La posible transmisión de materiales genéticos a otros organismos es limitada porque los insectos intercambian gametos internamente y tienen comportamientos de apareamiento y estructuras complejos para prevenir el apareamiento entre especies. Es el efecto deseado de la propuesta examinar la competitividad de apareamiento en jaulas en el laboratorio contenido.

#### **g. Características fenotípicas y genéticas relevantes**

Dos rasgos se han introducido en el mosquito.

**Letalidad condicional:** El segundo rasgo que se ha introducido es la proteína tTAV, que no es tóxica, pero es perjudicial para el mosquito ya que se expresa en una cantidad suficiente para reprimir la transcripción normal de la célula. En la modificación particular, OX513A, esto ocurre si se crían con la ausencia de un complemento alimenticio: la tetraciclina.

**Fluorescencia:** El primero es un gen marcador fluorescente, DsRed2 que permite que los mosquitos modificados de la especie OX513A tengan un fenotipo fluorescente al reaccionar a las iluminaciones de una longitud de onda específica. La expresión de esta proteína no tóxica ayudará a la detección en el laboratorio y el campo.

h. Información sobre supervivencia, incluidas la estacionalidad, la capacidad para formar estructuras de supervivencia por ejemplo: semillas, esporas o esclerocios, dormancia, latencia

Véase la respuesta a la sección 5.1.1 d. Los mosquitos se han modificado para incluir mutaciones letales dominantes dentro de su estructura genética (Alphey et al, 2002; Phuc et al, 2007). El elemento letal reprimible de tTAV es un rasgo de auto mitigación en el ambiente, ya que la progenie que hereda el elemento genético va a morir, sin acceso a los niveles de complemento alimenticio que se requiere para reprimir el elemento letal. El uso de este sistema proporciona un sistema protegido de mitigación letal al lanzamiento de las razas autocidas de *Ae. aegypti* OX513A. La penetrancia del rasgo letal reprimible es tal que sólo un número muy pequeño (hasta 2-3%) de hembras

heterocigotos puede sobrevivir en condiciones óptimas del laboratorio en la próxima generación. Estas son débiles y es improbable que se apareen o se alimenten de sangre debido a los efectos sub-letales de la variable del gen y es probable que mueran rápidamente en condiciones ambientales.

Estos genes no otorgan una ventaja selectiva al insecto; todo lo contrario, otorgan una desventaja muy importante. Si el mantener el nuevo gen no tiene ninguna ventaja para un organismo, el gen no persistirá. En consecuencia, cualquier material genético transferido hipotéticamente se perdería rápidamente antes que extenderse, de cualquier población no objetivo que podría estar expuesta a ellos, como los mosquitos *Aedes* en zonas inmediatamente adyacentes a cualquier zona de lanzamiento.

**i. Características patogénicas, tóxicas, u otras características que pueden ser perjudiciales para la salud humana y animal.**

Los mosquitos *Ae. aegypti* son vectores conocidos de arbovirus, lo que conduce a las enfermedades del dengue, chikungunya y la fiebre amarilla en las regiones tropicales y sub-tropicales del mundo. Los mosquitos *Aedes aegypti* en esta propuesta se han contenido en un centro libre de virus en el Reino Unido, un país que no tiene los virus del dengue o chikungunya, o *Ae. aegypti* en el ambiente.

**j. Historia de las modificaciones genéticas previas del organismo receptor**

No es aplicable

**7.1.2. CARACTERÍSTICAS DEL ORGANISMO DONANTE DEL MATERIAL GENÉTICO:**

Relacionado a los elementos a, b, se detallan en la tabla

**Tabla 1: Elementos genéticos introducidos en los mosquitos de OX513A *Ae. aegypti***

Elemento genético	Organismo donante y nombre común	Referencia	Función	Comentarios
piggyBac 3'	<i>Trichoplusia ni</i> (Polilla medidora de la col)	Cary et al Virology 1989 Sep: 172(1): 156-159 Thibault et al 1999	Elemento transponible de ADN con supresiones de secuencias para prevenir la movilidad.	
Act5C	<i>Drosophila melanogaster</i>		Elemento promotor que	

	(La mosca del vinagre)		lleva la expresión del gen marcador	
DsRed2	<i>Discosoma</i> (Coral)	Ip and Wan (2004) Luminescence (Chichester) 19(3): 148	El gen marcador de la fluorescencia roja de la proteína	El marcador fluorescente se ha utilizado en una amplia gama de especies vertebradas e invertebradas como genes marcadores, no confiere ninguna ventaja o desventaja al receptor y no tiene consecuencias ecológicas adversas o de otro tipo derivadas de su incorporación en el mosquito.
Drosomycin 3' UTR	<i>Drosophila melanogaster</i> (La mosca del vinagre)		Señal de poliadenilación	
TetO <sub>7</sub>	<i>Escherichia coli</i> (bacterias)	Gossen M and Bujard H (1992) Proc Natl Acad Sci USA (89(12): 5547-5551	El sitio de unión no codificante para el elemento tTAV	
Hsp70	<i>Drosophila</i> sp. (La mosca del vinagre)		Elemento promotor que lleva el elemento de tTAV	
Adh intron	<i>Drosophila</i> sp. (La mosca del vinagre)		Mejora la expresión del gen	
tTAV	El ADN sintético basado en una fusión de las secuencias de <i>Escheichia</i>	Gossen M and Bujard H (1992) Proc Natl Acad Sci USA (89(12): 5547-5551	El Activador transcripcional reprimible de tetraciclina	La proteína de tTAV se une y activa la expresión del elemento de respuesta a

	coli y el virus del herpes simple (activador transcripcional de VP16)	Gong et al (2005)		tetraciclina (tRE), que incluye la secuencia específica de ADN a la que se une tTA (tetO). tTA también une la tetraciclina con una alta afinidad, que entonces no puede unir el ADN. EN efecto tTA actúa como un interruptor regulado de tetraciclina. Una expresión de alto nivel de tTA es perjudicial para las células, ya que puede reprimir la transcripción normal. tTA se ha utilizado en hongos, ratones, plantas y cultivos mamíferos sin ningún efecto adverso sobre el medio ambiente o la salud humana.
3'UTR	<i>Drosophila</i> sp. (La mosca del vinagre)		Señal de poliadenilación	
piggyBac 5'	<i>Trichoplusia ni</i> (Polilla medidora de la col)	Cary et al Virology 1989 Sep: 172(1): 156-159	Elemento transponible de ADN con supresiones de secuencias para prevenir la movilidad.	

**a. Identificación (ubicación taxonómica)**

**b. Nombre común**

**c. Descripción de la distribución geográfica y del hábitat natural del organismo, incluida información sobre depredadores naturales, presas, parásitos, competidores, simbioses y huéspedes**

*Trichoplusia ni* (Hübner) (Gusano medidor de la col) un miembro de la Lepidoptera: Noctuidae es una plaga que se alimenta de las hojas de las plantas Crucíferas y por esto causa pérdidas económicas, pero también se alimenta de legumbres, tomates y algodón.

*Drosophila melanogaster* (Meigen) un miembro de la familia Diptera. Se conoce como mosca de la fruta o mosca del vinagre.

*Discosoma sp* son corales marinos de colores. Están muy extendidos en el ambiente marino y ha habido muchos lanzamientos transgénicos en campo en los que se ha utilizado como un gen marcador (nueve lanzamientos que contenían el gen DsRed o variantes se encuentran registrados en la base de datos en EEUU (<http://www.isb.vt.edu/CFDOCS/fieldtests3.cfm>)).

*Escherichia coli* es una bacteria que está muy extendida en el ambiente y en el tracto gastrointestinal humano. Algunas razas pueden causar enfermedades, a veces graves, pero también hay razas benignas de laboratorio que se utilizan en la construcción de plásmidos para la transformación genética.

El virus Herpes simple tipo 1 es un virus humano, por lo general asociado con infecciones de los labios, la boca y la cara. Es el virus de Herpes simple más común y muchas personas lo desarrollan durante la infancia. VHS-1 a menudo causa úlceras (lesiones) dentro de la boca, como fiebres (herpes labial), o infección ocular (especialmente la conjuntiva y la córnea). También puede llevar a la infección del revestimiento del cerebro (meningoencefalitis). Se transmite por contacto con saliva infectada. Antes de la edad adulta, 30-90% de las personas desarrollan anticuerpos contra el VSH-1.

La construcción genética incluye segmentos de DNA originalmente encontrados en el genoma de cinco especies distintas: *Trichoplusia ni* (insecto), *Drosophila melanogaster* (insecto), *Discosoma sp.* (coral), *Escherichia coli* (bacteria) y el virus Herpes simplex.

Es importante resaltar que la recopilación de toda la información solicitada, relacionada con la bionomía y comportamiento de cada uno de los organismos relacionados con el receptor, enmarca una gran cantidad de información, que no se llega a expresar en la bionomía y comportamiento del *Ae. aegypti*, dado que los segmentos de DNA responden a los siguientes criterios, por tal motivo se suministro la información que cubría los aspectos más relevante asociados a la biología, ecología y comportamiento del *Ae. aegypti* RIDL®.



**d. Distribución en el medio ambiente - Véase la respuesta a 7.1.2c**

**e. Características biológicas relevantes: Grado de parentesco entre donante y receptor, Mecanismos que utiliza el organismo para sobrevivir en el medio ambiente, Mecanismos de reproducción, Potencial de transmisión e intercambio genético con otros organismos**

El organismo receptor o progenitor es *Ae. aegypti*, un mosquito (Diptera: Culicidae). Diptera forma una Orden de Insectos, que es uno de los principales grupos de Arthropoda. Los artrópodos son uno de los principales grupos de animales invertebrados. En relación con *Ae. aegypti*, *Discosoma*, un coral, está sólo muy poco relacionado, como *E. coli*, un procariota. *Trichoplusia ni* y *Drosophila melanogaster* son los dos insectos. *T. ni* es una palomilla, Orden Lepidóptera. Se cree que los Lepidópteros se separaron de Diptera hace alrededor de 300 millones de años. *Drosophila* son dípteros, y por lo tanto, más cercanamente relacionados con los mosquitos, que también son dípteros. Se cree que los dípteros superiores, que incluye *Drosophila*, se separaron de los mosquitos hace alrededor de 260 millones de años (Krzywinski et al, 2006).

**f. Características patogénicas véase respuesta a 7.1.2c y a continuación:**

*Trichoplusia ni* es una plaga que se alimenta de las hojas de las plantas Crucíferas y es una plaga de plantas reconocida. En los tres primeros estadios, limitan su alimentación a la superficie inferior de la hoja, dejando intacta la superficie superior. En el cuarto y quinto estadios mastican grandes agujeros, y por lo general, no se alimentan del margen de la hoja. Sin embargo, en el caso de la col, se alimentan no solamente de las hojas de envoltura, sino que también pueden perforar la cabeza en proceso de desarrollo. Las larvas consumen tres veces su peso en plantas cada día (McEwen and Hervey 1960).

*Drosophila melanogaster*, conocida como la mosca del vinagre. La mosca del vinagre es una plaga ocasional molesta que se encuentra cerca de la fruta dañada o agrietada y tiene una gama amplia de huéspedes. Se desovan los huevos en el tejido carnoso dañado o expuesto y las larvas se alimentan de las bayas. El daño principal de esta plaga en las uvas, sin embargo, son los organismos de putrefacción ácida que transmite de racimo a racimo en el viñedo. No es una plaga de importancia económica y se utiliza ampliamente como una especie modelo de insectos en investigación de laboratorio.

*Escherichia coli* es una bacteria que está muy extendida en el ambiente y en el tracto gastrointestinal (GI) humano. Algunas razas pueden causar enfermedades en humanos, a veces graves, pero también hay razas benignas de laboratorio que se utilizan en la construcción de plásmidos para la transformación genética.

El virus Herpes simple tipo 1 es un virus humano, por lo general asociado con infecciones de los labios, la boca y la cara. Es el virus de Herpes simple más común y muchas personas lo desarrollan durante la infancia. VHS-1 a menudo causa úlceras (lesiones) dentro de la boca, como fiebres (herpes labial), o infección ocular (especialmente la conjuntiva y la córnea). También puede llevar a la infección del

*Transferencia y evaluación de nueva alternativa de control de Aedes aegypti mediante el uso de mosquitos transgénicos en Panamá*

**d. Distribución en el medio ambiente - Véase la respuesta a 7.1.2c**

**e. Características biológicas relevantes: Grado de parentesco entre donante y receptor, Mecanismos que utiliza el organismo para sobrevivir en el medio ambiente, Mecanismos de reproducción, Potencial de transmisión e intercambio genético con otros organismos**

El organismo receptor o progenitor es *Ae. aegypti*, un mosquito (Diptera: Culicidae). Diptera forma una Orden de Insectos, que es uno de los principales grupos de Arthropoda. Los artrópodos son uno de los principales grupos de animales invertebrados. En relación con *Ae. aegypti*, *Discosoma*, un coral, está sólo muy poco relacionado, como *E. coli*, un procariota. *Trichoplusia ni* y *Drosophila melanogaster* son los dos insectos. *T. ni* es una palomilla, Orden Lepidóptera. Se cree que los Lepidópteros se separaron de Diptera hace alrededor de 300 millones de años. *Drosophila* son dípteros, y por lo tanto, más cercanamente relacionados con los mosquitos, que también son dípteros. Se cree que los dípteros superiores, que incluye *Drosophila*, se separaron de los mosquitos hace alrededor de 260 millones de años (Krzywinski et al, 2006).

**f. Características patogénicas véase respuesta a 7.1.2c y a continuación:**

*Trichoplusia ni* es una plaga que se alimenta de las hojas de las plantas Crucíferas y es una plaga de plantas reconocida. En los tres primeros estadios, limitan su alimentación a la superficie inferior de la hoja, dejando intacta la superficie superior. En el cuarto y quinto estadios mastican grandes agujeros, y por lo general, no se alimentan del margen de la hoja. Sin embargo, en el caso de la col, se alimentan no solamente de las hojas de envoltura, sino que también pueden perforar la cabeza en proceso de desarrollo. Las larvas consumen tres veces su peso en plantas cada día (McEwen and Hervey 1960).

*Drosophila melanogaster*, conocida como la mosca del vinagre. La mosca del vinagre es una plaga ocasional molesta que se encuentra cerca de la fruta dañada o agrietada y tiene una gama amplia de huéspedes. Se desovan los huevos en el tejido carnoso dañado o expuesto y las larvas se alimentan de las bayas. El daño principal de esta plaga en las uvas, sin embargo, son los organismos de putrefacción ácida que transmite de racimo a racimo en el viñedo. No es una plaga de importancia económica y se utiliza ampliamente como una especie modelo de insectos en investigación de laboratorio.

*Escherichia coli* es una bacteria que está muy extendida en el ambiente y en el tracto gastrointestinal (GI) humano. Algunas razas pueden causar enfermedades en humanos, a veces graves, pero también hay razas benignas de laboratorio que se utilizan en la construcción de plásmidos para la transformación genética.

El virus Herpes simple tipo 1 es un virus humano, por lo general asociado con infecciones de los labios, la boca y la cara. Es el virus de Herpes simple más común y muchas personas lo desarrollan durante la infancia. VHS-1 a menudo causa úlceras (lesiones) dentro de la boca, como fiebres (herpes labial), o infección ocular (especialmente la conjuntiva y la córnea). También puede llevar a la infección del

*Transferencia y evaluación de nueva alternativa de control de Aedes aegypti mediante el uso de mosquitos transgénicos en Panamá*

revestimiento del cerebro (meningoencefalitis). Se transmite por el contacto con saliva infectada. Antes de la edad adulta, el 30-90% de las personas desarrollan anticuerpos contra el VSH-1.

**g. Otras características nocivas**

No es aplicable

**h. Características fenotípicas y genéticas relevantes**

No es aplicable

**i. Tamaño, función y el organismo donante de cada secuencia de nucleótidos inserta**

Véase Tabla 1.

**j. Potencial natural de transferencia de los elementos genéticos dentro de la construcción, de los donantes a otros organismos.**

La transformación de la raza utiliza un sistema basado en transposón, piggyBac, de *Trichoplusia ni*. Los sistemas basados en transposones tienen el potencial para moverse entre los organismos, sin embargo el sistema de piggyBac utilizado en la transformación de la raza OX513A es un transposón no autónomo y se ha demostrado, bajo una variedad amplia de condiciones, que incluso si se suministra la transposasa exógena, el transposón de piggyBac no se movilizará en *Ae. aegypti* (Sethamuran, 2007).

**k. Información sobre supervivencia, incluidas la estacionalidad, la capacidad para fomentar estructuras de supervivencia por ejemplo: semillas, esporas o esclerocios dormancia, latencia.**

*Trichoplusia ni.*

*Trichoplusia ni* es una plaga de cultivos de Crucíferas pero también tiene huéspedes alternativos como tomate, pepino y patata. (Capinera, 2008). El tiempo de generación depende de la temperatura y puede ser de hasta 7 generaciones cada año, aunque las temperaturas altas (más de 40°C) pueden ser fatales. El umbral del menor desarrollo es alrededor de 10-12°C. La fecundidad depende de la disponibilidad de alimentos, agua y apareamiento (Landolt, 1997).

*Escherichia coli*

*Escherichia coli* es una bacteria con un tiempo de generación rápido, que se reproduce aproximadamente cada 20 minutos de forma exponencial. La reproducción es por división celular y también puede ser por el intercambio directo de contacto de célula a célula. La reproducción está muy influenciada por tanto la temperatura como la nutrición. Algunas bacterias esporulan como mecanismo de supervivencia en condiciones extremas, pero *E.coli* es una bacteria que no esporula. Las razas del laboratorio a menudo necesitan intervención humana para sobrevivir – como el almacenamiento de reservas de glicerol a 80°C.

*Transferencia y evaluación de nueva alternativa de control de Aedes aegypti mediante el uso de mosquitos transgénicos en Panamá*

### Herpes simplex virus

El Herpes simple es una enfermedad viral de los humanos con un ciclo activo de 2-21 días. Sin embargo puede quedar inactivo en el cuerpo durante toda la vida. Los brotes pueden ser recurrentes, aunque no se sabe lo que los provoca, pero normalmente disminuyen con el tiempo, dejando la infección como asintomática. El virus no puede vivir fuera del cuerpo el tiempo suficiente para causar infección, y la transmisión es por el contacto de piel a piel.

### *Drosophila melanogaster*

*Drosophila melanogaster* se ha estudiado ampliamente como un insecto modelo de laboratorio para biología del desarrollo. El tiempo de desarrollo varía dependiendo de los factores ambientales como la temperatura, el sustrato de crianza y el hacinamiento. No pueden sobrevivir en bajas temperaturas, pero a menudo buscan refugio en estructuras como sótanos o dependencias donde hay suficientes fuentes de alimentación. También pueden entrar en una diapausa reproductiva (Mitrovski and Hoofman, 2001).

### *Discosoma*

Los corales viven en un ambiente marino donde la supervivencia de coral es propensa a la subida de temperatura del mar y de la acidificación. Los corales de Cnidarian, de lo que *Discosoma* es una especie, se reproduce tanto sexual como asexualmente, aunque las barreras pueden ser algo confusas. La posición en la colonia afecta a la fecundidad, con las colonias en los bordes reproduciéndose menos que las colonias centrales. Las condiciones ambientales también afectan al medio y a la velocidad de reproducción (Fautin, 2002).

## I. Bibliografía de referencia

Capinera, J.L., ed. (2008). Encyclopedia of Entomology, 2nd Edition edn (Springer).

Fautin, D.G. (2002). Reproduction of Cnidaria. Can J Zoo 80, 1735 -1754.

Landolt, P.J. (1997). Cabbage Looper (Lepidoptera: Noctuidae) Fecundity Maximized by a Combination of Access to Water and Food, and Remating. Annals of Entomological Society of America 90 (6), 783-789.

Mitrovski, P., and Hoffmann, A.A. (2001). Postponed reproduction as an adaptation to winter conditions in *Drosophila melanogaster*: evidence for clinal variation under semi-natural conditions. Proc R Soc Lond B 268 2163-2168

## 7.1.3. CARACTERÍSTICAS DEL ORGANISMO VECTOR:

### a. Identificación (ubicación taxonómica)

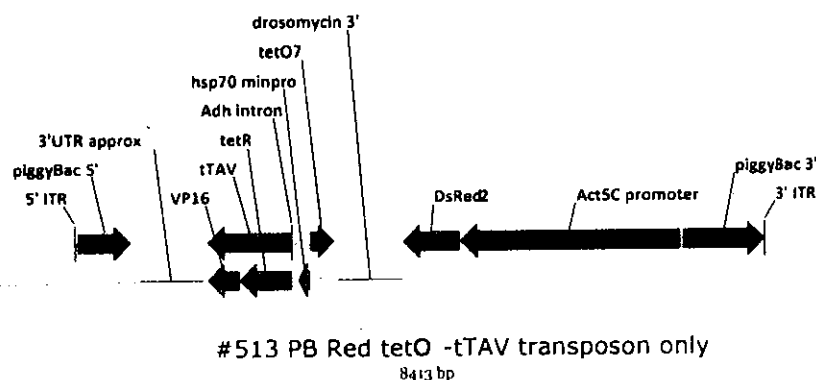
*Trichoplusia ni* (Hübner) (Gusano medidor de la col) un miembro de la Lepidoptera: Noctuidae es una plaga que se alimenta de las hojas de las plantas Crucíferas y por esto causa pérdidas económicas, pero también se alimenta de legumbres, tomates y algodón.

### b. Secuencia de transposones y demás fragmentos genéticos no codificadores

Esta información podrá ser suministrada si existe un acuerdo de confidencialidad, teniendo en consideración que todos los documentos de gobierno son de uso o dominio público, según la Ley de Transparencia. La secuencia de nucleótidos contenida en las construcciones genéticas de Oxitec es considerada como parte de la propiedad intelectual de la compañía, pues esta información podría permitir a terceras personas el replicar nuestra tecnología, lo que a su vez representaría una seria amenaza a los intereses comerciales de Oxitec. Por lo tanto, estos datos suelen proveerse únicamente bajo condiciones que aseguran confidencialidad absoluta (no solo en lo inmediato, sino también a largo plazo), como por ejemplo durante el proceso requerido para un registro de carácter comercial.

En caso de determinarse que esta información es absolutamente imprescindible para el actual proceso del análisis de riesgo, solicitamos nos indique el mecanismo que se debe seguir para garantizar la absoluta confidencialidad de esta información. Véase Tabla 1

### c. Mapa genético del plásmido. (anexar)



### d. Origen y hábitat natural

El Gusano Medidor de la Col (*Trichoplusia ni*) es un miembro de la familia de la polilla Noctuidae. Se encuentra en toda la ecozona paleártica del sur, toda la América del Norte, partes de África y la mayoría de la región Oriental e Indo-Australiana.

### e. Medidas pertinentes de seguridad en su manejo

No es aplicable

### f. Frecuencia de movilización o la capacidad para transferirse a otros organismos

El vector utilizado se deriva del elemento de piggyBac aislado del Gusano Medidor de la Col, *Trichoplusia ni*. piggyBac es un transposón de ADN de clase-II. La versión utilizada en OX513A es un elemento no autónomo que se ha desactivado por la supresión de

todo o parte del gen que codifica la transposasa y por lo tanto es incapaz de transponer sin la transposasa externa. Estos vectores tienen un uso extendido en todo el mundo y se han revisado extensamente (Handler and James, 2000; Wimmer 2003).

En el sistema de transformación utilizado para la generación de OX513A, se proporciona asistencia a través de la co-inyección de un plásmido adicional, el cual codifica el gen de la transposasa; sin embargo los elementos de inyección no incluyen los extremos del elemento transponible y por lo tanto no se pueden transponer.

**g. Factores que podrían influir en la capacidad del vector para establecerse en otros huéspedes**

*Trichoplusia ni* es una plaga de cultivos de Crucíferas pero también tiene huéspedes alternativos como tomate, pepino y patata. (Capinera, 2008). El tiempo de generación depende de la temperatura y puede ser de hasta 7 generaciones cada año, aunque las temperaturas altas (más de 40°C) pueden ser fatales. Son migratorias y durante el invierno en los climas del sur, migran hacia el norte desde julio hasta septiembre. Tienen dos o tres generaciones al año dependiendo de la temperatura. Los Gusanos Medidores de la Col son propensos a entomopatógenos numerosos incluyendo hongos, protozoos, bacterias y virus. El más común es el nucleopoliedrovirus (VPN), que bajo ciertas condiciones, puede resultar ser un regulador natural de las poblaciones de los gusanos medidores de la col.

**h. Información sobre la supervivencia, incluidas la estacionalidad la capacidad para fomentar estructuras de supervivencia. Por ejemplo semillas, esporas o esclerocios dormancia, latencia.**

La exposición de un elemento no autónomo transponible de piggyBac a una fuente de transposasa hipotéticamente podría tener varios efectos sobre el elemento no autónomo transponible – en orden decreciente de probabilidad/frecuencia:

- La extirpación
- La transposición dentro del genoma de un individuo
- La transposición en el genoma de otro individuo de la misma especie
- La transposición en el genoma de un individuo de otra especie (transferencia horizontal de genes)

La extirpación tiene el potencial para el acontecimiento más alto de frecuencia, si esto ocurre con una frecuencia significativa, habría una pérdida del elemento de los insectos y por lo tanto no tendrían el genotipo esperado. Se ha demostrado en varios trabajos (O'Brochta et al, 2003 and Sethuraman et al, 2007) que *Ae. aegypti* transgénico que contiene el vector de piggyBac permanece estable incluso cuando se expone a la transposasa exógena en una amplia variedad de condiciones. Ninguna inestabilidad genética o fenotípica se ha observado en la raza OX513A, bajo condiciones intensivas de crianza en masa (Oxitec, datos no publicados). La transposición, ya sea dentro de un individuo o a otro individuo de la misma especie es probable que se detecte como el elemento, en una nueva posición en el genoma, y podría imponer una pena de

capacidad en el individuo. Esto se detecta durante la crianza, ya sea a la escala de laboratorio o a la escala de crianza en masa. La raza de OX513A ha mostrado una estabilidad genética y fenotípica durante más de 100 generaciones en la crianza de escala de laboratorio y también ha sido estable en las condiciones de crianza en masa. La transferencia horizontal de genes es el efecto adverso teórico más improbable, es decir, el movimiento de genes entre especies diferentes, aunque en algunas especies, la secuenciación de genes ha demostrado que los transposones autónomos, de vez en cuando (durante periodos geológicos de tiempo) han podido pasar de un linaje al otro. Los transposones autónomos llevan su propia transposasa, a diferencia de los transposones no autónomos utilizados como vectores de genes en la transformación de los insectos. Los transposones introducidos también son mucho más grandes que los transposones nativos y se sabe que las tasas de transposición disminuyen con el aumento de longitud (Lampe et al, 1998).

**i. En caso que no se utilicen vectores, describir el método utilizado**

No es aplicable

**j. Bibliografía de referencia**

- a. Handler A and James A (2000) Insect transgenis: Methods and applications ( Boca Raton: CRC Press).
- b. Wimmer (2003) Applications of insect transgénesis. Nat Rev Genet 4 225-232
- c. O'Brochta, D.A., Sethuraman, N., Wilson, R., Hice, R.H., Pinkerton, A.C., Levesque, C.S., Bideshi, D.K., Jasinskiene, N., Coates, C.J., James, A.A., et al. (2003). Gene vector and transposable element behavior in mosquitoes. J Exp Biol 206, 3823-3834.
- d. Sethuraman, N., Fraser, M.J., Eggleston, P., and O'Brochta, D. (2007). Post-integration stability of piggyBac in *Aedes aegypti*. Insect Biochem Mol Biol 37, 941-951.
- e. Lampe D, Witherspoon D, Soto-Adames F and Roberston H (2003) Recent horizontal transfer of mellifera sub-family mariner transposons into insect lineages representing four different orders shows that selection acts only during horizontal transfer. Mol. Biol. and Evol. 20 554-562.

**7.1.4 CARACTERÍSTICAS DEL ÁCIDO NUCLÉICO INSERTADO (el inserto)**

**a. Expresión del ácido nucleico insertado**

Dos rasgos se han introducido: un gen letal reprimible y un gen marcador fluorescente.

**b. Descripción completa de genes principales y acompañantes, elementos regulatorios**

Véase la sección 5.1.3c y Phuc et al, 2007.

**c. Descripción de secuencias residuales del vector empleado. Acompañar las descripciones de secuencias con mapas físicos del ADN.**

La región de acompañamiento alrededor de la inserción del producto del gen se ha secuenciado y muestra que la inserción fue mediada por piggyBac en un sitio de AAV en el genoma como se esperaba para este método de integración. El análisis molecular (PCR) para la presencia de las secuencias del plásmido base, que incluye los orígenes de duplicación y un gen de resistencia a los antibióticos, mostró que estas secuencias no estaban presentes.

**d. Descripción del mecanismo molecular por el cual se logra el fenotipo**

Se expresan dos fenotipos, el primero es un fenotipo letal reprimible y el segundo es un gen marcador fluorescente:

El fenotipo letal reprimible es resultado de la expresión de tTA. tTA es un activador transcripcional reprimible mediante tetraciclina (Baron and Bujard, 2000; Gong et al., 2005b), resultado de la fusión de tetR y el dominio de transactivación C-terminal del factor de transcripción VP16, y así tTAV se une a siete copias de tetO cuya expresión se aumenta por VP16 para causar más expresión de tTAV. Este ciclo de retroalimentación positiva se rompe, sin embargo, en la presencia de tetraciclina, que se une a tTAV, evitando la unión con tetO y así prevenir la expresión de tTAV que aumenta el potenciador a niveles tóxicos. Cuando se crían en la ausencia de tetraciclina, altos niveles de la expresión de tTAV deben dar toxicidad debido al acallamiento transcripcional, que es el mecanismo dado por Gill y Ptashé (1988a) para describir el efecto negativo de altos niveles de un factor de transcripción (GAL4) en la expresión de genes que carecían de un sitio de unión para este factor. Un nivel bajo de expresión de tTA se ha utilizado ampliamente y se cree que es inocuo; mientras que se cree que un alto nivel de expresión es perjudicial para las células, probablemente debido al acallamiento transcripcional y/o la interferencia con el proteólisis dependiente de la ubiquitina.

El gen marcador fluorescente, DsRed es visiblemente fluorescente en las larvas y las pupas a la reacción de 558nm y la emisión de 583nm con un microscopio de estereó adecuado.

**e. Bibliografía de referencia**

- Phuc, H.K., Andreasen, M.H., Burton, R.S., Vass, C., Epton, M.J., Pape, G., Fu, G., Condon, K.C., Scaife, S., Donnelly, C.A., et al. (2007). Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. *BMC Biology*, 5:, 1-11.
- Baron, U. and H. Bujard (2000). "Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances." *Methods in Enzymology* 327: 401-21.
- Gong, P., M. J. Epton, et al. (2005). "A dominant lethal genetic system for autocidal control of the Mediterranean fruitfly." *Nature Biotechnology* 23(4): 453-456.



- Gill, G., and Ptashe, M. (1988). "Negative effect of the transcriptional activator GAL4." *Nature*, 334(6184), pp. 721-4.

## **8. INFORMACIÓN RELATIVA AL MANEJO DEL OVGM** (brinde información detallada de cómo se va a manejar la bioseguridad "in situ" durante la realización de los experimentos, control de acceso, control de personal, etc...)

El insectario donde se ubicaran los *Ae. aegypti* RIDL® para su mantenimiento hasta el estado adulto, cuenta con las siguientes medidas de bioseguridad: esclusas de seguridad en las puertas de entradas y cortina de aire para evitar la salida o escape de mosquitos, ventanas aseguradas con mallas para evitar la salida de mosquitos, conexión entre el insectario No. 1 donde se crían las larvas y el insectario No. 2 donde se mantienen los mosquitos adultos, manual de bioseguridad para el manejo de la colonia de mosquitos *Ae. aegypti* RIDL®, personal capacitado para cría y mantenimiento de la colonia de mosquitos y en el desarrollo de las pruebas biológicas contenidas en jaulas para determinar la competitividad del *Ae. aegypti* RIDL® macho por la hembra nativa de *Ae. aegypti* con el mosquito macho nativo. En los insectarios habrá control de acceso y del personal que laborará en los insectarios. Solo se permitirá el acceso a personal relacionado con el desarrollo de este trabajo de investigación.

El personal que estará trabajando directamente con los mosquitos *Ae. aegypti* RIDL® usará en todo momento el equipo de protección personal adecuado. Este incluye batas de laboratorio desechables de color blanco con puños y guantes de látex. Además, para la preparación de la solución a utilizar de tetraciclina para la cría de las larvas *Aedes aegypti* RIDL®, también se utilizarán gafas protectoras para evitar el salpique de dicho químico que puede causar irritación al contacto con ojos o la piel.

En cuanto a medidas de mitigación, se tiene estipulado que de registrarse cualquier fuga de los mosquitos *Ae. aegypti* RIDL® se procederá a cerrar por completo las instalaciones de crianza y se iniciará con nebulizaciones con piretroides como deltametrina u organofosforados como el fenitrotión, los cuales son insecticidas de uso cotidiano por parte de Control de Vectores del Ministerio de Salud de Panamá.

En cuanto al manejo de desechos, el descarte de los *Ae. aegypti* RIDL® se realizará mediante la colocación de todo el material biológico a -20°C durante 24 horas para garantizar la muerte de todos los especímenes. Posteriormente se descartará dicho material biológico en bolsas de bioseguridad y se eliminará mediante un horno incinerador del Ministerio de Desarrollo Agropecuario de Panamá IDA, localizado en Sanidad Animal en Tocumen. Todo el material biológico de descarte procedente de los *Ae. aegypti* RIDL® solo será manipulado por personal relacionado con el proyecto.

## **9. INTERACCIÓN DE LOS OVGM CON EL AMBIENTE EN EL PAÍS DE ORIGEN**

No aplica debido a que es para uso confinado.

## BIBLIOGRAFIA DE RESPALDO

1. Benedict M, D'Abbs P, Dobson S, Gottlieb M, Harrington L, Higgs S, James A, James S, Knols B, Lavery J, O'Neill S, Scott T, Takken W, Toure Y. 2008. Guidance for contained field trials of vector mosquitoes engineered to contain a gene drive system: recommendations of a scientific working group. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2008 Apr; 8(2):127-66.
2. Cha SJ, Mori A, Chadee DD, Severson DW. 2006. Cage trials using an endogenous meiotic drive gene in the mosquito *Aedes aegypti* to promote population replacement. *Am J Trop Med Hyg.* 2006 Jan; 74(1):62-8.
3. John Mumford, M. Megan Quinlan, Camilla Beech, Luke Alphey, Vicente Bayard, Margareth L. Capurro, Pattamaporn Kittayapong, Jonathan D. Knight, Mauro T. Marrelli, Kenneth Ombongi. 2009. MosqGuide: A project to develop best practice guidance for the deployment of innovative genetic vector control strategies for malaria and dengue. *AsPac J. Mol. Biol Biotechnol.* Vol. 17 (3): 93-95
4. Janine M. Ramsey, Rachel Reuben, Marshall JM. 2009. The effect of gene drive on containment of transgenic mosquitoes. *J Theor Biol.* 2009 May; 21; 258(2):250-65. Epub 2009 Feb 7.
5. Georghiou GP, Wirth M, Tran H, Saume F, Knudsen AB. Potential for organophosphate resistance in *Aedes aegypti* in the Caribbean area and neighbouring countries. *J. Med. Entomol.* 1987; 24: 290-294.
6. Gratz NG. Emergency control of *Aedes aegypti* as a disease vector in urban areas. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1991; 7: 353-365.
7. Marshall JM. 2009. The effect of gene drive on containment of transgenic mosquitoes. *J Theor Biol.* 2009 May 21; 258(2):250-65. Epub 2009 Feb 7.
8. Marrelli MT, Moreira CK, Kelly D, Alphey L, Jacobs-Lorena M. 2006.
9. Mosquito transgenesis: what is the fitness cost? *Trends Parasitol.* 2006 May; 22(5):197-202. Epub 2006 Mar 24
10. Rawlins SC. 1998. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. *Rev Panam Salud Publica* (4):243-51
11. Medlock J, Luz PM, Struchiner CJ, Galvani AP. 2009. The impact of transgenic mosquitoes on dengue virulence to humans and mosquitoes. *Am Nat.* 2009 Oct; 174(4): 565-77.
12. Wise de Valdez MR, Nimmo D, Betz J, Gong HF, James AA, Alphey L, Black WC 4th. Genetic elimination of dengue vector mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Mar 22; 108(12):4772-5. Epub 2011 Mar 7.
13. Zaim M, Guillet P. Strategy Development and Monitoring for Parasitic Diseases and Vector Control, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland. *Trends Parasitol.* 2002; 18: 161-163
14. Ribeiro JM, Arca B, Lombardo F, Calvo E. An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Aedes aegypti*. *BMC Genomics.* 2007; 8:6
15. Baron, U., and Bujard, H. (2000). Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances. *Methods in Enzymology* 327, 401-421.
16. Berger, S.L., Cress, W.D., Cress, A., Triezenberg, S.J., and Guarente, L. (1990). Selective inhibition of activated but not basal transcription by the acidic activation domain of VP16: evidence for transcriptional adaptors. *Cell* 61, 1199-1208.

17. Bisset JA, Rodríguez MM, Cáceres L. (2003). [Levels of resistance to insecticides and their mechanisms in 2 strains of *Aedes aegypti* from Panama] [Article in Spanish] Rev Cubana Med Trop. 55(3):191-5.
18. Cary, L., Goebel, M., Corsaro, B., Wang, H., Rosen, E., and Fraser, M.J. (1989). Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. Virology 172, 156-169.
19. Damke, H., Gossen, M., Freundlieb, S., Bujard, H., and Schmid, S. (1995). Tightly regulated and inducible expression of dominant interfering dynamin mutant in stably transformed HeLa cells. Meth Enz 257, 209-220.
20. Fautin, D.G. (2002). Reproduction of Cnidaria. Can J Zoo 80, 1735 -1754.
21. Fraser, M., Cary, L., Boonvisudhi, K., and Wang, H. (1995). Assay for movement of lepidopteran transposon IFP2 in insect cells using a baculovirus genome as a target DNA. Virology 211, 397-407.
22. Fraser, M., Ciszczon, T., Elick, T., and Bauser, C. (1996). Precise excision of TTAAspecific lepidopteran transposons piggyBac (IFP2) and tagalong (TFP3) from the baculovirus genome in cell lines from two species of Lepidoptera. Insect Molecular Biology 5, 141-151.
23. Gill, G., and Ptashne, M. (1988a). Negative effect of the transcriptional activator GAL4. Nature 334, 721-724.
24. Gill, G., and Ptashne, M. (1988b). Negative effect of the transcriptional activator GAL4. Nature 334, 721-724.
25. Gong, P., Epton, M., Fu, G., Scaife, S., Hiscox, A., Condon, K., Condon, G., Morrison, N., Kelly, D., Dafa'alla, T., et al. (2005a). A dominant lethal genetic system for autocidal control of the Mediterranean fruitfly. Nat Biotech 23, 453-456.
26. Gong, P., Epton, M.J., Fu, G., Scaife, S., Hiscox, A., Condon, K.C., Condon, G.C., Morrisson, N.I., Kelly, D.W., Dafa'alla, T., et al. (2005b). A dominant lethal genetic system for autocidal control of the Mediterranean fruitfly. Nature Biotechnology 23, 453-456.
27. Gossen, M., Bonin, A., Freundlieb, S., and Bujard, H. (1994). Inducible gene expression systems for higher eukaryotic cells. Curr Opin Biotechnol 5, 516-520.
28. Gossen, M., and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline- responsive promoters. Proc Natl Acad Sci U S A 89, 5547-5551.
29. Harris, A., Nimmo, D., McKemey, A., Kelly, N., Scaife, S., Donnelly, C., Beech, C., Petrie, D., Alphey, L. (2011) Field performance of engineered male mosquitoes. Nature Biotechnology 29(11):1034-7.
30. Nazni, W.A., Lee, H.L., Dayang, H., and Azahari, A. (2009). Cross-mating between Malaysian strains of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the laboratory. South East Asian J Trop Med Pub Health 40, 40-46.
31. Salghetti, S., Caudy, A., Chenoweth, J., and Tansey, W. (2001). Regulation of transcriptional activation domain function by ubiquitin. Science 293, 1651-1653.
32. Thomas, D.T., Donnelly, C.A., Wood, R.J. and Alphey, L.S. (2000). Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. Science, 287: 2474-2476.

# PREGUNTAS MÁS FRECUENTES

## 1. ¿Qué está matando a los mosquitos?

- El gen que ha sido introducido en el mosquito interfiere con la capacidad de las células para funcionar normalmente. Esto significa que la progenie que hereda el gen muere en la etapa larval y no se convierte en adulta.
- Este enfoque funciona a un nivel celular para que las larvas no completen el desarrollo necesario para alcanzar la etapa adulta, no es tóxico y por lo tanto no afecta a otros insectos, u otras especies tales como peces y aves que podrían comer los insectos.

## 2. ¿No desarrollarán resistencia los mosquitos?

- Siempre hay una posibilidad de que la resistencia podría desarrollarse, sin embargo esto no es algo que se haya visto todavía. (NB Hemos tenido más de 100 generaciones ya)
- El uso de estos mosquitos es también probable que sea en combinación con otros métodos de control de insectos en un sistema de control de vectores integrado. El uso de múltiples modos de acción para controlar los insectos mitigará el desarrollo de la resistencia.
- Oxitec también está desarrollando otros modos de acción que funcionan de diferentes maneras para minimizar el desarrollo de resistencia potencial.

## 3. ¿Existen leyes internacionales?

El Protocolo de Bioseguridad de Cartagena gobierna el movimiento de materiales modificados genéticamente de un país a otro, pero los gobiernos nacionales toman decisiones con respecto a sus propios requisitos regulatorios.

## 4. ¿Por qué es este enfoque mejor que los métodos actuales de control?

Nuestro enfoque tiene el potencial de reducir la población del mosquito del Dengue a un nivel por debajo del cual la enfermedad no se transmite. Eso es algo que, a pesar de los mejores esfuerzos de los gobiernos de todo el mundo, los métodos convencionales han fracasado ampliamente en lograr. El resultado es que la Fiebre del Dengue ya afecta a 50m de personas al año, y va rápidamente en aumento.

Éstas son sólo algunas de las razones por las que creemos que nuestro enfoque es mejor que cualquier otro disponible en la actualidad:

- *'La focalización natural' llega directamente a los mosquitos:* El mosquito *Aedes aegypti* está bien adaptado para vivir con los humanos en el medio ambiente urbano. Pica durante el día y pone los huevos en una amplia variedad de sitios de reproducción. Debido a esto, su control utilizando métodos convencionales tales

como insecticidas es particularmente difícil y costoso. Cualquier agua estancada - macetas , piscinas , fuentes para pájaros , etc. - es un sitio potencial para la reproducción, por lo que el gran número de sitios , así como el hecho de que se encuentran en y alrededor de la casa, hace que el tratamiento con productos químicos sea poco práctico y a menudo indeseable para los residentes. En lugar de esto, el uso de la solución OX513A aprovecha el instinto natural del mosquito macho para buscar activamente los mosquitos hembras de su propia especie. Esta " focalización natural" hace que nuestro producto sea más eficaz y menos tóxico que los aerosoles químicos o dispositivos de nebulización.

- *Respetuoso con el medio ambiente:* No se utilizan productos químicos tóxicos en nuestro enfoque. Los mosquitos estériles liberados sólo se aparearán con su propia especie, por lo que, a diferencia del uso de insecticidas en general, ninguna otra especie se ve afectada.

- *Seguro:* No utilizamos productos químicos nocivos, y los mosquitos Oxitec que se liberan son machos y por lo tanto no pican ni propagan la enfermedad.

- *Mejor protección:* Como nos enfocamos en los mosquitos, nuestro sistema también reduce la amenaza de otras enfermedades transmitidas por los mosquitos *Aedes aegypti*, como Chikungunya o la Fiebre Amarilla.

## 5. ¿Alguien más ha realizado pruebas con estos mosquitos?

Las pruebas de campo se han llevado a cabo en Brasil desde hace varios años en colaboración con la Dra. Margareth Capurro de la Universidad de Sao Paulo y Moscamed, la empresa brasileña líder en el desarrollo de estrategias de insectos estériles, con la ayuda y el apoyo de los científicos de Oxitec. Estas pruebas han demostrado que se puede lograr y sostener en áreas aisladas hasta un 96 % de supresión de la población *Ae. aegypti*, mientras que en las zonas urbanas se puede mantener una supresión del 80 %. Este resultado es similar al resultado obtenido en Gran Caimán, donde la Unidad de Investigación y Control de Mosquitos que llevó a cabo una prueba de campo abierto logro el 80 % de supresión de la población de mosquitos. Liberaciones abiertas más pequeñas se han llevado a cabo en Malasia, por el Instituto de Investigación Médica. Otros países, entre ellos EE.UU., los países del Caribe y la India que se ven afectados por el dengue están examinando el uso del mosquito OX513A de Oxitec.

## 6. ¿Qué sucede con los mosquitos liberados?

Una vez que los machos liberados se han apareado con una hembra silvestre, no van a sobrevivir más allá de su corta vida útil de unos 10 días. Las hembras apareadas ponen los huevos que eclosionan en larvas, pero las larvas no se desarrollan en adultos debido a nuestra modificación genética. Sabemos que, en el laboratorio, un pequeño número de larvas (hasta 3 %) puede sobrevivir hasta la edad adulta. Esto se ha sabido desde que se hizo la cepa. Pero en el medio natural, las hembras que sobreviven son propensas a estar muy enfermas, por lo que no van a vivir lo suficiente para transmitir la enfermedad. Por supuesto, vale la pena recordar que si un macho silvestre se había apareado con la hembra en lugar de un

macho OX513A, entonces toda la descendencia sobreviviría para transmitir la enfermedad.

**7. Estos ensayos se han considerado polémicos, ¿por qué se están apresurando?**

El mosquito OX513A fue desarrollado en 2002 y ha sido investigado y probado por más de 10 años, en una variedad de condiciones; de laboratorio, semi- campo y campo. Se han observado más de 100 generaciones de mosquitos (en equivalentes humanos, ¡eso nos remontaría a los Vikingos!) así que no pensamos que nos estamos apresurando. Pero en cualquier caso la decisión final recae en los reguladores locales: ellos toman las decisiones, y nosotros trabajamos a la velocidad con la que ellos están contentos.

**8. ¿Va a verse uno obligado a comprar los mosquitos? Una vez que la prueba ha comenzado ¿no podremos dejar de comprarlos?**

Los lanzamientos son para una prueba a pequeña escala que va a durar cerca de 6 meses con posibilidad de prórroga por otros 6 meses. Se prevé que el mosquito OX513A ofrecerá un método mejorado de control de insectos, pero la evaluación del nivel de control que ejercen los mosquitos sobre la población silvestre de *Ae. aegypti* es el propósito de la prueba. Nadie se ha comprometido a comprar mosquitos tras el período de prueba.

**9. ¿No podrían estos mosquitos tener consecuencias imprevistas para la salud humana y el medio ambiente?**

Creemos que tiene el potencial de beneficiar a millones de vidas. Estamos convencidos de que es seguro y mejor para el medio ambiente que los métodos de control existentes.

La introducción de cualquier nueva tecnología podría tener consecuencias imprevistas - incluso algo tan ampliamente aceptado como el uso de teléfonos móviles podría tener consecuencias imprevistas con el tiempo. Pero el potencial de consecuencias imprevistas tiene que equilibrarse con los beneficios que una tecnología puede aportar; en el caso de nuestro mosquito OX513A, el beneficio es la supresión de una dolorosa enfermedad debilitante y cada vez más extendida.

Tenemos confianza en la seguridad del mosquito OX513A, ya que sólo afecta a los mosquitos que heredan el gen OX513A de sus padres, y éstos no sobreviven en la naturaleza. No afecta a otras especies, por lo que tendrá un impacto ambiental mínimo. Pero seguimos actuando con mucha cautela. El sistema OX513A ha tenido muchos años de pruebas en una variedad de condiciones; laboratorio, semi - campo y campo. Los mosquitos que utilizamos han sido cuidadosamente monitorizados por más de 100 generaciones (en términos humanos, ¡esto nos remontaría a los vikingos!). El proceso de prueba paso a paso que hemos seguido está bien reconocido, y es similar al proceso que se usa para un medicamento o vacuna antes de que pueda ser utilizado. Toda la información relativa al insecto se somete a continuación a los reguladores para su evaluación, antes de llevar a cabo cualquier prueba.

**10. Se ha informado de que el 3 % de los mosquitos RIDL sobrevive, y algunos estudios han informado que el 15 % - ¿es esto cierto?**

Sabemos que, en el laboratorio, un pequeño número de larvas OX513A (alrededor del 3%) puede sobrevivir hasta la edad adulta. Esto se ha sabido desde que la cepa se hizo en 2002. Pero en el entorno abierto, esperaríamos muy pocos supervivientes, si los hubiera, - y de hecho la prueba en Caimán no encontró ninguno. Cualquier hembra que sobreviviera estaría enferma, ya que éstas llevan una copia del gen letal, por lo que es extremadamente improbable que vivan lo suficiente para transmitir la enfermedad.

Siempre animamos estudios independientes de nuestras cepas y tecnología – lo que es parte de nuestro enfoque transparente y de nuestro compromiso con el desarrollo de productos seguros y eficaces. Uno de estos estudios, realizado en el Instituto Pasteur, encontró un alto nivel de supervivencia (15 %) de nuestros mosquitos en la aparente ausencia de tetraciclina. Este era de hecho un resultado extraño. Sin embargo, tras la investigación los científicos encontraron que los alimentos que utilizaron para los mosquitos estaban contaminados con tetraciclina (la sustancia química que reprime nuestro gen OX513A). El Profesor Paul Reiter, del Instituto Pasteur ha escrito en el sitio web Oxitec para explicar lo que ocurrió, y su carta está disponible aquí: <http://www.oxitec.com/2012/01/a-letter-to-oxitec-from-paul-reiter-mphil-dphil-fres/>.

Aunque se trataba de un claro caso de contaminación accidental, hemos, por supuesto, llevado a cabo estudios para determinar si es probable que los niveles de tetraciclina que se pueden encontrar en el medio ambiente conduzcan a la supervivencia de nuestros mosquitos. Aunque la tetraciclina se puede encontrar en el medio ambiente en zonas aisladas, no está presente en cantidad suficiente para asegurar la supervivencia de los mosquitos. Esto ha sido corroborado por las observaciones del estudio de campo realizado en las islas Caimán, y fue relatado recientemente por el Dr. Bill Petrie, director de la Unidad de Investigación y Control de Mosquitos en Gran Caimán <http://www.caymannewsservice.com/science-and-nature/2012/01/13/gm-mozzies-didn%E2%80%99t-linger-says-cayman-control-unit>.

**11. ¿Cuáles son los riesgos si un mosquito hembra Genéticamente Modificado pica a alguien?**

Los mosquitos que liberamos son machos y los mosquitos machos no pican, sólo el mosquito hembra pica a los humanos ya que necesita alimentarse de sangre para desarrollar sus huevos. Oxitec propone liberar mosquitos machos que se aparearán con los mosquitos hembras locales y sus descendientes no sobrevivirán hasta la edad adulta, por lo que habrá muy pocas, si es que hay, hembras adultas que lleven los genes nuevos.

Hemos encontrado que efectivamente nuestros mosquitos OX513A tienen una tasa de supervivencia de 3-5 % en el laboratorio. Es probable que la supervivencia en un entorno de no - laboratorio sea mucho menor, pero es posible que un número muy pequeño de hembras podría sobrevivir en el medio ambiente y tener el potencial

para picar a los seres humanos. Sin embargo, hay poco o ningún riesgo de efectos perjudiciales en tal caso, por las siguientes razones:

- *Pocas hembras genéticamente modificadas son propensas a sobrevivir el tiempo suficiente para transmitir la enfermedad:* las hembras genéticamente modificadas son esencialmente las mismas que las hembras silvestres, a excepción de que es probable que tengan una vida mucho más corta. Debido a que el virus del dengue tarda mucho tiempo para desarrollarse en un mosquito hasta el punto en que se puede transmitir, las hembras de menor duración tienen menos probabilidades de transmitir la enfermedad. Así que cualquier hembra OX513A sobreviviente tiende a ser mucho menos peligrosa que las hembras silvestres.
- *Nuestros estudios muestran que las proteínas que hemos introducido no serían perjudiciales para los seres humanos:* Hemos encargado investigación con sofisticados programas de ordenador (conocida como investigación bioinformática), para ver si las nuevas proteínas tienen alguna similitud con alérgenos o toxinas conocidos que puedan ser perjudiciales. No encontramos similitud con ninguna sustancia que pueda suponer un riesgo de alergia o toxicidad, por lo que estamos seguros de que las nuevas proteínas no serían perjudiciales para las personas.

## **12. ¿Qué efectos potenciales podría tener la liberación de los mosquitos OX513A sobre los ecosistemas involucrados?**

Es muy poco probable que el mosquito OX513A pudiera tener efectos importantes sobre el ecosistema. El mosquito del dengue (*Aedes aegypti*) es una especie invasora, y con frecuencia es un recién llegado a un hábitat. La población de mosquitos del dengue es pequeña en comparación con la mayoría de los otros insectos, en especial en zonas donde ya es el enfoque de métodos convencionales de control, y debido a que viven principalmente en y alrededor de los asentamientos humanos, la mayoría de los expertos creen que van a formar una parte muy pequeña y sin importancia de las dietas de los depredadores.

También es importante recordar que nuestro enfoque reduce la dependencia de los métodos de control químico, que sin duda pueden tener efectos nocivos sobre el medio ambiente. Por ejemplo, muchos aerosoles de uso común se consideran extremadamente tóxicos para los organismos acuáticos.

## **13. ¿Qué le puede ocurrir a un organismo que ingiere adultos o larvas del mosquito Genéticamente Modificado?**

Si un organismo ingiere un mosquito GM/ Genéticamente Modificado es probable que esto no fuera diferente a la ingestión de un mosquito silvestre. Los mosquitos Genéticamente Modificados no contienen compuestos tóxicos conocidos, y se componen de minerales y nutrientes naturales, como cualquier otro mosquito. Se han realizado numerosos estudios en laboratorios independientes con los genes marcadores fluorescentes que no muestran efectos dañinos. Otros estudios están en marcha y suponemos que confirmarán estos hallazgos.



## **8) Oxitec violó el Protocolo de Cartagena al llevar sus mosquitos a las Islas Caimán**

El Protocolo de Cartagena sobre Seguridad Biológica es un tratado internacional, firmado por más de 160 países que busca prevenir el movimiento transfronterizo de organismos modificados genéticamente para su inserción en ambientes extranjeros sin el consentimiento previo del país al que se importan. Oxitec es una empresa con sede en el Reino Unido, quien es participe en el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad Biológica. Como tal, existen una legislación en la Unión Europea (Reglamento 1946/2003) y una implementación en el Reino Unido de esa ley. Aunque el Reino Unido es participe del Protocolo de Cartagena, el instrumento de ratificación del Reino Unido no se ha extendido a las Islas Caimán, y por lo tanto ellos no son partícipes de este acuerdo, y pueden tomar decisiones autónomas.

Se puede encontrar información adicional sobre el estado de las Islas Caimán con respecto a estas exportaciones en la dirección:

<http://www.publications.parliament.uk/pa/cm201011/cmhansrd/cm101129/text/101129w0004.htm>  
#10112939000166

Oxitec ha cumplido plenamente con las normativas pertinentes y los envíos de mosquitos solamente se hacen cuando se tiene el permiso adecuado del país importador. De este modo se demuestra que el país dio previamente su consentimiento informado y se cumple con el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad Biológica.

## **9) Oxitec condujo ensayos en las Islas Caimán porque tiene leyes permisivas en seguridad biológica.**

Fuimos invitados a llevar a cabo el ensayo por las autoridades de las Islas Caimán, quienes estuvieron al tanto de la amenaza que plantea el Dengue y del potencial de nuestra solución. El ensayo mismo se llevó a cabo en total cumplimiento con todas las normas pertinentes de las Islas Caimán, las cuales se establecieron tras celebrar sesiones informativas con varios ministerios de gobierno.

Es el derecho soberano de los gobiernos decidir sobre su propia normativa para cualquier nueva tecnología. Nuestro objetivo no es evadir las normas, sino llevar nuestra solución a países que tienen un problema real, trabajando siempre a la par de los deseos y necesidades de los habitantes locales y dentro del marco de la ley.

**10) La evaluación del riesgo en las Islas Caimán no tuvo importancia científica**

El gobierno de las Islas Caimán utilizó la evaluación de riesgo como parte del proceso por el que decidieron que era conveniente importar los mosquitos y utilizarlos para los propósitos del ensayo que se llevó a cabo en Gran Caimán. Esto claramente demuestra que el gobierno de Gran Caimán considero que la evaluación de riesgo proporcionó la información que ellos requerían.

**11) ¿Quién resultaría responsable en caso de que surgiesen daños por el uso de la tecnología?**

Oxitec y otros investigadores independientes han demostrado que los mosquitos transgénicos son similares a los mosquitos silvestres, excepto por la introducción de nuevos genes (el efecto que estos genes tienen sobre los mosquitos). Tenemos confianza en la seguridad de esta tecnología, pero reconocemos que hay quienes pueden tener dudas al respecto.

Oxitec está comprometido para trabajar con las autoridades reguladoras a fin de implementar una administración rigurosa, así como una evaluación y administración de riesgo para prevenir cualquier posible daño a la diversidad biológica. El principio general de responsabilidad, consagrado en varios textos, incluyendo el protocolo de Nagoya-Kuala Lumpur complementario al Protocolo de Cartagena sobre Seguridad Biológica, establece que en caso de daño comprobado o daño a la biodiversidad por la liberación de un organismo modificado genéticamente, el responsable de la contaminación resarcirá el daño en la medida que sea causalmente responsable.

**12) Se necesitan más estudios antes de utilizar esta tecnología**

Oxitec y sus colaboradores independientes en todo el mundo han conducido pruebas exhaustivas en nuestros mosquitos modificados durante un periodo de diez años.

Los mosquitos también han sido probados por laboratorios alrededor del mundo, incluyendo el Instituto Pasteur en París, el Instituto de Investigaciones Médicas en Malasia, la Universidad de Colorado, en EE.UU y la UHHS, también en EE.UU. El Centro de Entomología Veterinaria y Médica en Gainesville (EE.UU.) ha probado los mosquitos en ensayos en jaulas al aire libre. El Centro de Ciencia y Tecnología Fitosanitaria del Servicio de Inspección de Sanidad Agropecuaria del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA APHIS CPHST por sus siglas en inglés) también probó la misma tecnología en otras especies de insectos y condujo una evaluación exhaustiva de los riesgos y beneficios dentro de la Ley de Protección Ambiental de los Estados Unidos (NEPA por sus siglas en inglés) y concluyó que, en términos ambientales, esta tecnología era preferible al resto de estrategias evaluadas en el mismo contexto.

Oxitec y sus colaboradores han llevado a cabo liberaciones en campo abierto de *Aedes aegypti* transgénico en varios países, incluyendo las Islas Caimán, Malasia y Brasil. Todos los ensayos han avanzado exitosamente hasta la fecha y contaron con la aprobación pertinente de las entidades reguladoras. Los resultados en las Islas Caimán mostraron que nuestra tecnología redujo en un 80% la población en campo de *Aedes aegypti*.

En todos los casos, la última palabra sobre el uso de nuestra tecnología la tienen las entidades reguladoras locales: ellos tomaron sus decisiones y nosotros nos esforzamos para abastecerlos con los materiales y la información que nos solicitan.

### **13) 'El flujo de información' se detuvo en Brasil**

Hemos llevado a cabo una amplia labor de participación pública en Brasil para asegurar que la información sobre nuestro trabajo se difunda lo más ampliamente posible. Como se mencionó previamente, el socio de Oxitec en Brasil, Moscamed, ha trabajado con estaciones de radio y televisión locales, organizado reuniones con la comunidad y programas escolares, así como un amplio programa de pláticas frente a frente con los habitantes del área afectada. La gran respuesta positiva recibida hasta el momento desde el programa es tal vez el testimonio del impacto que los esfuerzos proactivos por parte de los desarrolladores de la tecnología pueden tener sobre el proceso de participación pública.

### **14) No permitir rociar insecticida en las áreas pobladas donde se llevó a cabo el ensayo no fue ético**

Este comentario está basado en una aseveración falsa. El uso de la tecnología de Oxitec nunca ha requerido suspender los programas existentes de aspersión de insecticidas en las áreas donde hemos trabajado. Nuestra tecnología es compatible con la mayoría de los métodos comúnmente utilizados en todo el mundo y nosotros planeamos nuestros ensayos para que no interfieran con las prácticas de control habituales. De hecho, se llevaron a cabo algunas aspersiones aéreas de insecticida durante nuestros ensayos en las Islas Caimán.

Los ensayos solo pueden iniciar una vez que se han obtenido todas las aprobaciones reglamentarias y éticas de las agencias reguladoras pertinentes, con base en los resultados de una revisión científica independiente y rigurosa.

Además, como se describió en las preguntas previas, estamos comprometidos para lograr la participación pública y de los medios, y para garantizar que los habitantes locales estén informados sobre nuestro trabajo y puedan participar en el proceso de toma de decisiones.