

André Barreto Bruno Wilke^I

Almério de Castro Gomes^{II}

Delsio Natal^{II}

Mauro Toledo Marrelli^{II}

Controle de vetores utilizando mosquitos geneticamente modificados

Control of vector populations using genetically modified mosquitoes

RESUMO

Formas químicas de controle de mosquitos vetores são ineficazes, levando ao desenvolvimento de novas estratégias. Assim, foi realizada revisão das estratégias de controle genético de populações de mosquitos vetores baseada na técnica do inseto estéril. Uma delas consiste na liberação de machos esterilizados por radiação, a outra, na integração de um gene letal dominante associado a um promotor específico de fêmeas imaturas. Entre as vantagens sobre outras técnicas biológicas e químicas de controle de vetores estão: alta especificidade, não prejudicial ao meio ambiente, baixo custo de produção e alta eficácia. O uso desta técnica de modificação genética pode vir a ser uma importante ferramenta do manejo integrado de vetores.

DESCRITORES: Mosquitos, genética. Animais Geneticamente Modificados, parasitologia. Técnicas Genéticas, utilização. Controle de Mosquitos. Revisão.

ABSTRACT

The ineffectiveness of current strategies for chemical control of mosquito vectors raises the need for developing novel approaches. Thus, we carried out a literature review of strategies for genetic control of mosquito populations based on the sterile insect technique. One of these strategies consists of releasing radiation-sterilized males into the population; another, of integrating a dominant lethal gene under the control of a specific promoter into immature females. Advantages of these approaches over other biological and chemical control strategies include: highly species-specific, environmentally safety, low production cost, and high efficacy. The use of this genetic modification technique will constitute an important tool for integrated vector management.

DESCRIPTORS: Mosquitoes, genetics. Animals, Genetically Modified, parasitology. Genetic Techniques, utilization. Mosquito Control. Review.

^I Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública (FSP). Universidade de São Paulo (USP). São Paulo, SP, Brasil

^{II} Departamento de Epidemiologia. FSP-USP. São Paulo, SP, Brasil

Correspondência | Correspondence:
Mauro Toledo Marrelli
Departamento de Epidemiologia
Av. Dr. Arnaldo, 715 – Cerqueira Cesar
01246-904 São Paulo, SP, Brasil
E-mail: mmarelli@usp.br

Recebido: 19/8/2008
Revisado: 3/12/2008
Aprovado: 28/1/2009

INTRODUÇÃO

Foi realizado um levantamento bibliográfico de julho a agosto de 2008 referente a técnicas alternativas de controle de vetores de doenças, privilegiando mosquitos dos gêneros *Anopheles* e *Aedes*. Foi feita busca na base PubMed utilizando os seguintes descritores: Culicidae, (incluindo *Anopheles*, *Aedes*); Vectors AND Control; Mosquitoes AND Transgenic; Mosquitoes AND SIT; Mosquitoes AND RIDL; Culicidae AND Control; Culicidae AND SIT; Culicidae AND RIDL. Além disso, foram consultados livros, teses e sites governamentais.

Os mosquitos (Diptera: Culicidae) têm sido intensamente estudados desde o final século XIX quando foram pela primeira vez relacionados com a transmissão de patógenos ao homem e outros vertebrados. Os gêneros *Anopheles*, *Culex* e *Aedes* incluem os vetores dos três principais grupos de patógenos humanos: os parasitas causadores da malária do gênero *Plasmodium*, filárias dos gêneros *Wuchereria* e *Brugia* e numerosos arbovírus, incluindo os agentes da dengue e da febre amarela.²⁴

No século passado, durante as décadas de 1950 e 1960, programas de controle de vetores em muitos países utilizaram estratégias químicas sem restrição do uso de inseticidas como o DDT. Estas medidas erradicaram a malária com sucesso no sudeste da Europa e em Taiwan, reduzindo as taxas de morbidade na Índia de cerca de 75 milhões de casos anuais para cerca de 100.000 ao ano.⁷ Anteriormente, inseticidas à base de piretróides foram intensamente utilizados durante o combate ao *Anopheles gambiae* na década de 1930, quando esta espécie foi erradicada do Nordeste do Brasil. Além disso, a luta contra o *Aedes aegypti*, considerado erradicado em 1956 em todo o Brasil, foi baseada na busca por criadouros potenciais desses mosquitos.⁹

Epidemias de dengue a partir da década de 1980 no Brasil mostraram re-infestação do *Aedes aegypti* por todo o País e as mesmas medidas de controle estão sendo menos eficientes do que quando utilizadas na década de 1950. Entre sucessos e fracassos, o uso de estratégias químicas no controle do vetor tem sido intensamente criticado, principalmente devido à contaminação ambiental, ao efeito em organismos não-alvo e aos problemas decorrentes da seleção de populações de mosquitos resistentes aos inseticidas.⁹

Para obter maior eficiência e preservar o ambiente de contaminações, as bases das estratégias do manejo integrado de pragas foram fundamentadas,³ recomendando o emprego de inseticidas sintéticos apenas em

situações de emergência e estimulando o controle biológico e o ordenamento ambiental como prioridades. A consciência ecológica entre os aplicadores e cientistas resultou na busca por alternativas não prejudiciais ao meio ambiente. Campanhas contra a dengue no final do século passado já priorizavam o processo educativo e o saneamento e a utilização de combate químico ficou restrita aos momentos de epidemias. Entomopatógenos do gênero *Bacillus* passaram a ter papel importante no controle biológico de vetores em muitos programas.^a

No entanto, as medidas de controle de mosquitos não têm surtido efeito devido principalmente a sua grande capacidade de reprodução e flexibilidade genômica,²³ que pode ser mostrada por dois aspectos. Primeiro, pela rápida seleção de linhagens resistentes a inseticidas químicos e biológicos utilizados no controle ou ainda a resistência a diversas condições ambientais. E segundo, pela existência de variedade de espécies intimamente relacionadas, formando complexos de espécies crípticas, algumas das quais parecem estar sofrendo especiação no processo de adaptação ao ambiente modificado pelo homem.⁴ A resistência aos inseticidas tem levado a sérios problemas de saúde pública, contribuindo para o ressurgimento de parasitoses e arboviroses transmitidas por mosquitos.

Resultados recentes com o uso de DDT não tiveram sucesso na Índia, devido à evolução da resistência de alguns vetores a este tipo de inseticida. No sul da África, a resistência a piretróides levou ao retorno do uso de DDT em domicílios, seguido de um aumento do número de casos de malária.¹⁰ Devido a este tipo de problema, outras estratégias de controle devem ser consideradas, como o controle genético (utilização de mosquitos estéreis e técnicas relacionadas). A técnica do inseto estéril tem sido amplamente utilizada, propiciando resultados positivos no controle de pragas agrícolas⁶ e, em alguns casos particulares, no controle de mosquitos vetores de patógenos.

O objetivo do presente artigo foi revisar estratégias de controle genético de populações de mosquitos vetores.

TÉCNICA DO INSETO ESTÉRIL (STERILE INSECT TECHNIQUE)

Em 1955 Knipling¹² propôs o conceito de liberação de insetos estéreis para controlar populações de pragas de importância agrícola. Segundo Robinson (2002),²⁰ a *sterile insect technique* (SIT) se baseia na criação

^a Cuba LM. Situação atual do controle biológico no manejo integrado de mosquitos (Diptera: Culicidae). [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2005.

em massa, esterilização por radiação e liberação de grandes números de insetos machos em uma área-alvo. Os machos liberados cruzarão com fêmeas selvagens, reduzindo o potencial reprodutivo da população selvagem, causando a redução da população nas gerações subsequentes. Se um número suficiente de machos estéreis forem liberados por tempo suficiente, a população-alvo entrará em colapso, levando a sua supressão ou até mesmo eliminação total na área-alvo. Esta técnica é, portanto, espécie-específica e não agride o meio ambiente.

O controle genético busca a cobertura universal por se aproveitar do comportamento altamente eficiente do macho em localizar fêmeas da mesma espécie para acasalar.²⁷ A presença de resistência a inseticidas na população-alvo é irrelevante ao sucesso desse tipo de método. Fêmeas selvagens evitam acasalar com machos criados artificialmente ou estéreis, fato que deve ser levado em consideração. No entanto, existe a real possibilidade de que a liberação de mosquitos estéreis possa erradicar populações-alvo isoladas, pois se a densidade da população selvagem diminui, aumenta-se a taxa de mosquitos estéreis na população, facilitando o cruzamento entre machos estéreis e fêmeas selvagens.

O paradigma deste novo método foi a eliminação bem sucedida do *Cochliomyia hominivorax* (agente de miíases) do sul dos EUA, México e América Central. Esta área está atualmente protegida de uma re-invasão pela América do Sul por meio de barreira no Panamá de relativamente poucas moscas estéreis. Moscas estéreis também foram utilizadas para eliminar a potencialmente devastadora entrada desta espécie no norte da África.⁶

Existem outros exemplos de erradicação e controle de pragas agrícolas e até mesmo de vetores de patógenos utilizando-se a SIT, como a erradicação da mosca tsé-tsé, vetor dos agentes da tripanosomíase do gado (doença do sono) em Zanzibar.²⁶

Separação dos machos e o efeito da radiação

Uma das dificuldades de se implementar o programa de liberação de insetos estéreis é a necessidade da liberação apenas de indivíduos machos. A separação manual, além de ser extremamente laboriosa, apresenta níveis impróprios de contaminação de fêmeas entre os machos estéreis em algumas espécies.^{2,8} Desse modo, sistemas que causam a morte de fêmeas em algum estágio de sua vida têm sido desenvolvidos, separando automaticamente os machos das fêmeas, eliminando o trabalho da separação e diminuindo a níveis muito baixos a presença de fêmeas entre machos liberados.²²

A mosca da fruta possui determinação por sexo muito influenciada pelo sistema de cromossomos sexuais XX/XY. Uma linhagem genética de separação sexual

pode ser concebida para espécies localizando-se uma mutação recessiva autossomal letal em situações específicas. Por exemplo, a sensibilidade a altas temperaturas é ligada ao alelo selvagem ao cromossomo Y usando a translocação. A linhagem mutante para separação sexual deve possuir fêmeas homozigotas para sensibilidade a temperatura e os machos fenotipicamente normais para esta característica.¹⁴ Sistemas que causam a morte de fêmeas têm a vantagem de poderem ser aplicados à população como um todo, já que a manipulação individual de pupas pode causar um efeito negativo na qualidade final do lote a ser liberado.²¹

O sucesso da técnica de separação genética em moscas é diretamente atribuído ao fato de que embriões podem ser facilmente tratados com altas temperaturas. Uma mutação sensível à temperatura que só é expressa tardiamente no desenvolvimento apresentará problemas operacionais, uma vez que não é fácil regular a temperatura dos volumes de ração em salas grandes.¹⁵

Adaptação do *sterile insect technique* para mosquitos vetores de patógenos

No final da década 1960 e início da década de 1970 havia grande otimismo no uso do SIT como estratégia alternativa no controle de mosquitos vetores de doenças. Entretanto, o SIT tem sido usado somente contra poucas espécies de mosquitos, devido em grande parte a problemas fundamentais do sistema.

Os insetos machos geneticamente modificados devem competir por acasalamento com os tipos selvagens. O processo de produção, principalmente a esterilização dos machos por radiação, pode causar uma perda drástica na capacidade de acasalamento destes insetos se comparados aos machos selvagens. Os machos irradiados podem ser menos competitivos e também apresentar um tempo de vida reduzido.¹ Por exemplo, o método de esterilização da mosca da fruta (*Ceratitidis capitata*) levou à redução de quatro a dez vezes nos parâmetros de competitividade, prejudicando o programa de erradicação dessa espécie.^{5,19}

Em um estudo feito em 1981 na Califórnia (EUA), aproximadamente 85 mil machos de *Culex tarsalis* irradiados foram marcados com pó fluorescente e liberados em um cânion semi-isolado para monitoramento de abundância e esterilidade. Os machos esterilizados se dispersaram de maneira satisfatória e representaram 30% dos machos capturados. Porém, a população apresentou apenas 11% de esterilidade, resultado insuficiente para suprimir ou mesmo causar algum decréscimo na população de fêmeas. Em sua maioria os machos irradiados não eram competitivos em relação aos selvagens quanto à cópula com fêmeas locais selvagens.¹⁶

As instalações de irradiação são caras e potencialmente perigosas.¹ Há possibilidade de liberação de indivíduos

irradiados, porém ainda férteis, o que pode ser potencialmente perigoso. A logística é prejudicada pela necessidade de soltura em estágios de vida pré-estabelecidos e pela distância das instalações das áreas-alvo.

Outro problema do uso do SIT em mosquitos vetores de patógenos é que, do ponto de vista ético e de segurança, a liberação de mosquitos machos estéreis é somente aceitável se não houver liberação de fêmeas com lotes de machos estéreis.²² Somente os machos não realizam repasto sanguíneo e, portanto, não transmitem patógenos e não são fator de incômodo. Em mosquitos dos gêneros *Culex* e *Aedes* a separação pode ser feita com base no tamanho das pupas.² Este sistema foi utilizado na Índia e apenas 0,2% de fêmeas eram liberadas entre os machos. Porém, centenas de milhares de mosquitos eram produzidos diariamente e liberavam grandes quantidades de fêmeas entre os machos, inviabilizando sua eficácia.²¹

A liberação de fêmeas entre os machos irradiados resulta em aumento de fêmeas no ambiente. Isso causa não apenas incômodo e transmissão de doenças, mas interfere na cópula com machos irradiados, ao competir com fêmeas selvagens.¹⁴

Para mosquitos *Anopheles*, o método mecânico de separação por tamanho de pupa não se mostra eficiente. Nesses casos, uma alternativa para produzir somente machos seria induzir o dimorfismo sexual utilizando-se de estratégias da genética. Tais métodos são conhecidos como mecanismos de sexismo genético, citados anteriormente. Os métodos mais usados são baseados na translocação do cromossomo Y induzida por radiação como marcador seletivo dominante, complementar a um gene ligado ao X ou autossomo, tal como a cor da pupa, a letalidade sensível à temperatura ou a resistência a inseticida.¹⁹ Porém, como discutido anteriormente, haveria ainda a necessidade de radiação, que causa a perda na capacidade de acasalamento destes insetos, comparada à de machos selvagens. Sistemas baseados em aberrações cromossômicas tendem a ser instáveis e a reversão pode ser um problema na produção e liberação de insetos em larga escala, além de reduzir o *fitness* dos insetos tornando-os menos efetivos em relação ao SIT.²⁵

INSETOS TRANSGÊNICOS COM GENE LETAL DOMINANTE

Baseada na técnica SIT, a “liberação de insetos carregando um gene letal dominante” (*release of insect carrying a dominant lethal gene – RIDL*)²⁵ é uma estratégia que consiste na supressão da reprodução dos insetos-alvos que, cruzados com os mosquitos transgênicos, leva ao declínio da população.¹³

O sistema RIDL proposto por Thomas et al²⁵ (2000) consiste em um mecanismo em que um gene letal dominante é associado a um promotor específico de

fêmeas, como por exemplo, o promotor de vitelogenina. Assim, a expressão do gene letal dominante pode ser desativada na presença de tetraciclina, possibilitando manter a colônia. Quando for necessário separar machos e fêmeas, a tetraciclina é removida do sistema, causando a morte de todas as fêmeas.

O centro do sistema é a expressão de tTA, uma proteína de fusão que combina as propriedades de ligação de seqüências-específicas de um repressor de tetraciclina ao tRe, elemento de resposta a tetraciclina. Na ausência de tetraciclina, esta proteína se ligará à seqüência tRe e ativará a transcrição de um promotor mínimo adjacente.¹ Uma forma de se tornar o sistema específico de fêmeas é se colocar a proteína tTA sob o controle de um promotor específico feminino (Figura). A proteína de tTA é então expressa apenas em fêmeas – que perecem em sua ausência –, permitindo a sobrevivência de machos independentemente da tetraciclina.

Na preparação de mosquitos para liberação, o repressor é retirado e o gene letal dominante é ativado, causando a morte de todas as fêmeas. Ao copular com as fêmeas selvagens, os machos homozigotos para o gene letal produzem progênes heterozigotas, condição na qual somente os machos sobreviveriam.

Thomas et al²⁵ (2000) construíram um sistema RIDL em *Drosophila melanogaster* usando elementos de controle transcripcionais para direcionar a expressão de tTa. A tTa foi primeiramente expresso sob controle do ativador de corpo gorduroso *Yp3* que leva a expressão em larvas fêmeas e adultas, porém não em machos.²⁵ É esperada então, a expressão do gene citotóxico no padrão do *Yp3* para ser letal a fêmeas e desta forma apenas machos sobreviveriam para ser liberados na natureza criando um sistema genético de separação sexual hereditário.²⁵

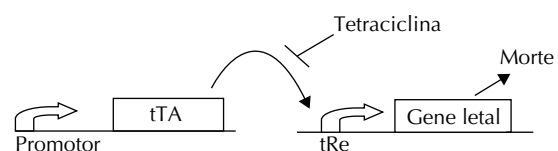


Figura. Sistema tetraciclina-repressível. A proteína ativadora de transcrição tetraciclina-repressível (tTA) é controlada por um promotor de escolha. A seleção deste promotor controla a especificidade sexo-desenvolvimento do sistema. Quando expressa, a proteína tTA se liga a uma seqüência de DNA específica, tRe, que dirige a expressão de um promotor mínimo adjacente. Este então leva à expressão de alguma seqüência (o gene efetor: letal) que está sob controle deste promotor. Este gene é expresso de acordo com o padrão do promotor que dirige tTA. Entretanto, na presença de baixas concentrações de tetraciclina, a proteína tTA não se liga ao DNA e a expressão do gene letal é prevenida. Adaptado de Alphey (2002).¹

O RIDL possui algumas vantagens sobre o SIT: insetos mais sexualmente competitivos na natureza; não existe risco de radiação e nem soltura de animais não-irradiados; pode ser aplicado em insetos que não toleram radiação; os insetos podem ser liberados em qualquer estágio de desenvolvimento; não é associada a altos custos ou danos ambientais. O gene letal é expresso de acordo com o padrão do promotor que dirige tTA. Na presença de baixas concentrações de tetraciclina, a proteína tTA não se liga ao DNA e a expressão do gene letal é prevenida (Figura).

PERSPECTIVAS

O sistema RIDL pode ser funcional em outras espécies de mosquitos. Tem sido usado com sucesso em *Drosophila melanogaster*,^{11,25} indicando que pode ser adaptado para mosquitos e outros vetores de patógenos humanos. Este sistema foi recentemente adaptado para

o mosquito *Aedes aegypti*, utilizando construções não-específicas de fêmeas (construção LA513),¹⁸ produzindo mosquitos que morrem na fase larval na ausência de tetraciclina, mas que podem se desenvolver normalmente quando criados na presença desse repressor. Além disso, novas construções genéticas têm sido propostas utilizando um promotor específico de fêmeas imaturas de *Aedes aegypti*, denominado *Act4*,¹⁷ com resultados promissores em laboratório, e probabilidade de testes em campo brevemente na Malásia.

O sistema RIDL apresenta inúmeras vantagens sobre outras técnicas de controle de vetores, como facilidade de manutenção da colônia, separação entre machos e fêmeas, baixo custo de produção e alta eficácia. Embora o real potencial do sistema RIDL para controle de mosquitos ainda seja desconhecido, estes fatores poderão credenciá-lo futuramente como importante ferramenta do manejo integrado para controle de insetos de interesse médico e pragas agrícolas.

REFERÊNCIAS

1. Alphey L. Re-engineering the sterile insect technique. *Insect Biochem Mol Biol.* 2002;32(10):1243-7. DOI: 10.1016/S0965-1748(02)00087-5
2. Ansari MA, Singh KR, Brooks GD, Malhotra PR. A device for separation of pupae from larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 1977;14(2):241-3.
3. Axtell RC, Arends JJ. Ecology and management of arthropod pests of poultry. *Annu Rev Entomol.* 1990;35:101-26. DOI: 10.1146/annurev.en.35.010190.000533
4. Besansky NJ, Collins FH. The mosquito genome: organization, evolution and manipulation. *Parasitol Today.* 1992;8(6):186-92. DOI: 10.1016/0169-4758(92)90262-Z
5. Boake CR, Shelly TE, Kaneshiro KY. Sexual selection in relation to pest-management strategies. *Annu Rev Entomol.* 1996;41:211-29.
6. Bushland RC, Lindquist AW, Knipling EF. Eradication of screw-worms through release of sterilized males. *Science.* 1955;122(3163):287-8. DOI: 10.1126/science.122.3163.287
7. Curtis CF, Lines JD. Should DDT be banned by international treaty? *Parasitol Today.* 2000;16(3):119-21 DOI: 10.1016/S0169-4758(99)01605-1
8. Delprat MA, Stolar CE, Manso FC, Cladera JL. Genetic stability of sexing strains based on the locus sw of *Ceratitis capitata*. *Genetica.* 2002;116(1):85-95. DOI: 10.1023/A:1020963709795
9. Dorta DM, Vasuki V, Rajavel A. Evaluation of organophosphorus and synthetic pyrethroid insecticides against six vector mosquito species. *Rev Saude Publica.* 1993;27(6):391-7. DOI: 10.1590/S0034-89101993000600001
10. Hargreaves K, Koekemoer LL, Brooke BD, Hunt RH, Mthembu J, Coetzee M. *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. *Med Vet Entomol.* 2000;14(2):181-9. DOI: 10.1046/j.1365-2915.2000.00234.x
11. Heinrich JC, Scott MJ. A repressible female-specific lethal genetic system for making transgenic insect suitable for a sterile-release program. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(15):8229-32. DOI: 10.1073/pnas.140142697
12. Knipling EF. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *J Eco Entomol.* 1955;48(4):459-62.
13. Kokoza V, Ahmed A, Wimmer EA, Raikhel AS. Efficient transformation of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* using the piggyBac transposable element vector pBac[3xP3-EGFP afm]. *Insect Biochem Mol Biol.* 2001;31(12):1137-43. DOI: 10.1016/S0965-1748(01)00120-5
14. Mayer DG, Atzeni MG, Stuart MA, Anaman KA, Butler DG. Mating competitiveness of irradiated flies for screwworm fly eradication campaigns. *Prev Vet Med.* 1998;36(1):1-9. DOI: 10.1016/S0167-5877(98)00078-6
15. Meats A, Maheswaran P, Frommer M, Sved J. Towards a male-only release system for SIT with the Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni*, using a genetic sexing strain with a temperature-sensitive lethal mutation. *Genetica.* 2002;116(1):97-106. DOI: 10.1023/A:1020915826633
16. Milby MM, Reisen WK, Reeves WC. Intercanyon movement of marked *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 1983;20(2):193-8.
17. Muñoz D, Jimenez A, Marinotti O, James AA. The AeAct-4 gene is expressed in the developing flight muscles of female *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol.* 2004;13(5):563-8. DOI: 10.1111/j.0962-1075.2004.00519.x
18. Phuc HK, Andreassen MH, Burton RS, Vass C, Epton MJ, Pape G, et al. Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. *BMC Biol.* 2007;5:11. DOI: 10.1186/1741-7007-5-11
19. Rendón P, McInnis D, Lance D, Stewart J. Medfly (Diptera: Tephritidae) genetic sexing: large-scale field comparison of males-only and bisexual sterile fly releases in Guatemala. *J Econ Entomol.* 2004;97(5):1547-53.
20. Robinson AS, Franz G, Atkinson PW. Insect transgenesis and its potential role in agriculture and human health. *Insect Biochem Mol Biol.* 2004;34(2):113-20. DOI: 10.1016/j.ibmb.2003.10.004
21. Robinson AS. Genetic sexing strains in medfly, *Ceratitis capitata*, sterile insect technique programmes. *Genetica.* 2002;116(1):5-13. DOI: 10.1023/A:1020951407069
22. Sharma VP, Patterson RS, Ford HR. A device for the rapid separation of male and female mosquito pupae. *Bull World Health Organ.* 1972;47(3):429-32.
23. Shearman DC. The evolution of sex determination systems in dipteran insects other than *Drosophila*. *Genetica.* 2002;116(1):25-43. DOI: 10.1023/A:1020955507978
24. Taipe-Lagos CB, Natal D. Abundância de culicídeos em área metropolitana Preservada e suas Implicações Epidemiológicas. *Rev Saude Publica.* 2003;37(3):275-9. DOI: 10.1590/S0034-89102003000300002
25. Thomas DD, Donnelly CA, Wood RJ, Alphey L. Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science.* 2000;287(5462):2474-6. DOI: 10.1126/science.287.5462.2474
26. Vreysen MJ, Saleh KM, Ali MY, Abdulla AM, Zhu ZR, Juma KG, et al. *Glossina austeni* (Diptera: Glossinidae) eradicated on the island of Unguja, Zanzibar, using the sterile insect technique. *J Econ Entomol.* 2000;93(1):123-35.
27. Wyss JH. Screwworm eradication in the Americas. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;916:186-93.