



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Identificación de genes implicados en la
sobrevivencia y reproducción de *Haematobia*
irritans mediante bioinformática e iARN

Dra. María Lorena Torres Rodríguez



Ciencia Nueva
DOCTORADOS UNAM

Dr. Héctor Quiroz Romero
Asesor



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A Carlos, Mauricio y Karla,

Gracias por todo su apoyo y colaboración

AGRADECIMIENTOS

Dra. Consuelo Almazán, por la confianza y apoyo brindado, sin eso no podría haber llegado al final.

Dr. José de la Fuente, por brindarme sus conocimientos, observaciones y apoyo para hacer este trabajo posible.

Dr. Rodrigo Rosario Cruz y Dr. Héctor Quiroz Romero, por sus revisiones y guía en esta nueva etapa que concluye.

Dra. Delia Inés Domínguez García, Dra. Ruth C. Galindo y Biol Nieves Ayllón, por su apoyo en el trabajo de laboratorio.

Al personal del Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA), especialmente a los biólogos Gonzalo Delabra e Isabel Giles por el entrenamiento recibido en el cultivo de moscas *H. irritans*.

Al personal del Rancho “La Negra”, Cd. Victoria, Tamaulipas, por las facilidades otorgadas para la captura y mantenimiento de la colonia de moscas *H. irritans*.

Se agradece especialmente al Dr. Alejandro Guglielmone, Dr. Carlos Roberto Prudencio, Dr. Roger Iván Rodríguez-Vivas, Dr. Javier Arturo Munguía Xóchihua, Dr. Miguel Angel Alonso-Díaz y MC. Antonio Palacios, por su cooperación en la captura y envío de moscas *H. irritans* para el estudio de variabilidad génica.

La realización de esta tesis fue posible gracias a las becas: 42883 CONACYT y Promep-UAT.

El financiamiento parcial de esta tesis fue posible gracias a los proyectos: SAGARPA-CONACYT, Proyecto 12260; SEP-CONACYT, Proyecto 25772 a cargo de la Dra. Consuelo Almazán; Proyecto INIA FAU2008-00014-00-00; UCLM, España “Ayudas para acciones de cooperación al desarrollo”, a cargo del Dr. José de la Fuente; Proyecto 00030072; FOMIX-Tamaulipas a cargo de

MC. Lorena Torres y Proyecto 151779 UNAM y PAPIIT IT 230011, DGAPA,
UNAM a cargo del Dr. Hector Quiroz Romero.

RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue identificar genes implicados en la sobrevivencia y reproducción de *Haematobia irritans*, a partir del análisis bioinformático de una biblioteca de ADNc y confirmados mediante iARN. Se construyó una biblioteca de ADNc con tejidos abdominales de *H. irritans*. Se secuenciaron y ensamblaron 2,160 ESTs de alta calidad en 992 unigenes (178 contiguos, 814 individuales), con funciones moleculares de serin proteasas, metabolismo celular, función mitocondrial, transcripción y traslación, transporte, vitelogénesis, citoesqueleto, respuesta celular al estrés e infección, entre otras. El análisis funcional se realizó utilizando por primera vez la iARN en moscas *H. irritans*. Se realizó el silenciamiento génico en los grupos de serina proteasa e inhibidor de proteasas, VTG, FER, vATPasa, componentes del proteasoma, respuesta inmune y 5'-NUC. Los resultados obtenidos del silenciamiento fueron alta mortalidad de *H. irritans* (grupos funcionales de serina proteasa e inhibidor de proteasas), reducción en la oviposición (VTG, FER y vATPasa) o ambos (componentes del proteasoma, respuesta inmune y 5'-NUC); mientras que para los grupos de ubiquitinación y vATPasa no tuvo efecto en la mortalidad ni en la oviposición comparado con los testigos. Se realizó el análisis de expresión y polimorfismo de los unigenes de componentes del proteasoma y respuesta inmune, lo que permitió observar expresión diferencial en los distintos estadios evolutivos y que se trata de secuencias altamente conservadas. Adicionalmente se analizó la prevalencia de ARN de patógenos encontrados en la biblioteca de ADNc de *H. irritans*, mediante RT-PCR en tiempo real obteniendo una prevalencia del 94-80% virus Nora, 100% *Wolbachia* y 100% *Mycobacterium bovis*, en la población analizada. En conclusión, estos resultados muestran avances en la caracterización molecular y amplían el repertorio de patógenos que afectan a las moscas *H. irritans*; además sugieren candidatos a antígenos protectores a utilizarse en el desarrollo de vacunas para el control de las infestaciones por *H. irritans*.

Palabras clave: Haematobia irritans, EST, genómica, bioinformática, iARN, expresión génica, polimorfismo génico, Wolbachia, Virus Nora, M. bovis.

ABSTRACT

The aim of this thesis was to identify genes involved in the survival and reproduction of *Haematobia irritans*, from bioinformatic analysis of a cDNA library and confirmed by RNAi. A cDNA library was constructed with abdominal tissues of *H. irritans*. 2,160 high quality ESTs were sequenced and assembled into 992 unigenes (178 contigs, 814 singlets) with molecular functions of serine proteases, cell metabolism, mitochondrial function, transcription and translation, transport, vitelogenesis, cytoskeleton, cellular response to stress and infection, among others. Functional analysis was performed using RNAi for the first time in *H. irritans* flies. Gene silencing in groups of serine protease and protease inhibitor, VTG, FER, vATPase, proteasome components, immune response and 5'-NUC was performed. The results of the gene knockdown were high mortality of *H. irritans* (functional groups of serine protease and protease inhibitor), reduced oviposition (VTG, vATPase and FER) or both (proteasome components, immune response and 5'-NUC), while for groups ubiquitination and vATPase not had an effect on mortality or oviposition compared to controls. Expression analysis and polymorphism of the unigenes of proteasome components and immune response was performed, which allowed the observation of differential expression in different developmental stages and that it is highly conserved sequences. Additionally RNA prevalence pathogens found in analyzed *H. irritans* cDNA library, by real time RT-PCR obtaining a prevalence of 94-80% Nora virus, 100% Wolbachia and 100% Mycobacterium bovis in the analyzed population. In conclusion, these results show progress in the molecular characterization and expand the repertoire of pathogens affecting *H. irritans* flies; further suggest candidate protective antigens for use in the development of vaccines to control infestations *H. irritans*.

Key words: Haematobia irritans, horn fly, EST, genomics, RNAi, bioinformatics, gene polymorphism, Wolbachia, Nora virus, M. bovis.

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LA LITERATURA	3
2.1 <i>Haematobia irritans</i>	3
2.1.1 Clasificación taxonómica.....	3
2.1.2 Características morfológicas	5
2.1.3 Hábitos alimenticios	5
2.1.4 Ecología	5
2.1.5 Ciclo biológico	7
2.2 Efectos del parasitismo de <i>H. irritans</i> sobre el ganado bovino	10
2.2.1 Importancia económica de <i>H. irritans</i>	10
2.2.2 Importancia sanitaria de	11
2.3 Control de <i>H. irritans</i>	11
2.3.1 Biológico	11
2.3.2 Mecánico.....	11
2.3.3 Químico.....	12
2.4 Resistencia de <i>H. irritans</i> a los insecticidas	12
2.5 Alternativas de Control Inmunológico.....	13
2.6 Herramientas para la detección de antígenos protectores contra artrópodos.....	16
2.6.1 Las etiquetas de secuencias expresadas (Expressed Sequence Tag, EST).	16
2.6.2 Interferencia de ARN (iARN).	17
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS.....	21
5.1 Objetivo General	21
5.2 Objetivos Específicos.....	21
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
6.1 Cultivo de <i>H. irritans</i>	22

6.2 Construcción de la biblioteca de ADNc.....	22
6.2.1 Extracción de ARN.....	22
6.2.2 Obtención del ADNc.	23
6.2.3 Clonación del ADNc en el vector pBluescript II SK	23
6.2.4 Transformación de la biblioteca de ADNc.....	24
6.3 Análisis bioinformático de secuencias de ADNc	24
6.4 Caracterización funcional de ADNc de <i>H. irritans</i> mediante iARN	25
6.4.1 Generación de ARN de doble cadena (ARNdc).....	25
6.4.2 Inyección de moscas con ARNdc.....	27
6.4.3 Confirmación de la expresión de genes después de la iARN.....	28
6.5 Expresión de genes seleccionados en diferentes estadios evolutivos y tejidos	30
6.6 Polimorfismo de genes seleccionados en diferentes poblaciones de <i>H. irritans</i>	32
6.6.1 Amplificación y clonado del ADNc de los genes seleccionados.....	32
6.6.2 Análisis bioinformático de las secuencias de ADNc de los genes seleccionados.	33
6.7 Prevalencia de patógenos en <i>H. irritans</i>	33
7. RESULTADOS	36
7.1 Construcción de una biblioteca de ADNc de <i>H. irritans</i>	36
7.2 Análisis bioinformático de secuencias de ADNc	36
7.3 Caracterización funcional de ADNc (ESTs) de <i>H. irritans</i> mediante iARN	44
7.5 Polimorfismo de genes seleccionados en diferentes poblaciones de <i>H. irritans</i>	51
7.6 Prevalencia de patógenos en <i>H. irritans</i>	53
7.6 Prevalencia de patógenos en <i>H. irritans</i>	53
8. DISCUSION Y CONCLUSIONES	55
9. REFERENCIAS	67

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Selección de grupos funcionales de ADNc de la biblioteca de <i>H. irritans</i> para los ensayos de iARN.....	26
Cuadro 2. Juegos de oligonucleótidos y condiciones para RT-PCR en tiempo real utilizados para el análisis de los ESTs de <i>H. irritans</i> seleccionados...29	
Cuadro 3. Juegos de oligonucleótidos y condiciones para RT-PCR en tiempo real utilizados para el análisis de la expresión en diferentes estadios evolutivos y tejidos, así como la variabilidad genética en diferentes poblaciones de <i>H. irritans</i>	31
Cuadro 4. Juegos de oligonucleótidos y condiciones para RT-PCR en tiempo real utilizados para el análisis de los transcritos de microorganismos en <i>H. irritans</i>	35
Cuadro 5. Estadísticas del ensamblado de EST de <i>H. irritans</i>	37
Cuadro 6. Distribución de unigenes encontrados en otras especies	40
Cuadro 7. Transcritos con mayor abundancia en tejidos abdominales de moscas <i>H. irritans</i> hembras parcialmente alimentadas.	43
Cuadro 8. Expresión del silenciamiento de genes mediante RT-PCR en tiempo real, posteriormente a la iARN.....	46
Cuadro 9. Resultados de los parámetros biológicos evaluados por iARN en moscas <i>H. irritans</i> hembras.	47
Cuadro 10. Caracterización de los microorganismos identificados en moscas <i>H. irritans</i> hembras alimentadas parcialmente.	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación filogenética de <i>Haematobia irritans</i>	4
Figura 2. <i>Haematobia irritans</i> , vista dorsal y ventral. Acercamiento de la cabeza y sus partes bucales.	6
Figura 3. Moscas <i>H. irritans</i> alimentándose de un bovino, se observan sus alas en posición delta.....	6
Figura 4. Ciclo biológico de <i>H. irritans</i>	9
Figura 5. Representación esquemática del procedimiento experimental para la búsqueda de antígenos contra <i>H. irritans</i> mediante iARN.	25
Figura 6. ADNc de la biblioteca de <i>H. irritans</i>	36
Figura 7. Grupos de EST de acuerdo a la función molecular de ontología génica asignada..	41
Figura 8. Grupos de EST asignados a funciones de ontología génica, que pudieron ser asignados a conjuntos de grupos ortólogos.....	42
Figura 9. Análisis de efectos inespecíficos de la iARN en moscas <i>Haematobia irritans</i> , hembras.....	48
Figura 10. Alineamiento de secuencias pareadas (Pairwise) de las secuencias de ARNdc, mostrando regiones homólogas ≥ 11 nucleótidos..	48
Figura 11. Análisis de la expresión génica en diferentes estadios evolutivos y tejidos de moscas <i>H. irritans</i> , mediante RT-PCR en tiempo real.....	50

Figura 12. Análisis de la expresión génica en diferentes estadios evolutivos y tejidos de moscas <i>H. irritans</i> , mediante RT-PCR en tiempo real.....	50
Figura 13. Alineamiento múltiple de secuencias de los unigenes.....	52

1. INTRODUCCIÓN

La mosca *Haematobia irritans*, es un ectoparásito hematófago del ganado bovino que llegó al continente americano en 1880 con ganado proveniente de Europa (Barros *et al.*, 2002). En la actualidad esta mosca se encuentra dispersa en todo el continente (SAGAR, 1993; Guglielmone *et al.*, 1997), ha crecido en forma incontrolable y se le considera el problema mas grave en algunas zonas ganaderas, donde el ciclo de vida se encuentra establecido durante todo el año (Almazán *et al.*, 2001; Cupp *et al.*, 1998; Alonso-Díaz *et al.*, 2007). El ciclo biológico de esta mosca es muy corto, lo cual hace que las poblaciones lleguen a incrementarse a tal grado que en algunas zonas se encuentren poblaciones que van de 100 a 2500 moscas por animal provocando con ello pérdidas considerables a la ganadería bovina de explotaciones extensivas (Kunz *et al.*, 1984; Byford *et al.*, 1992; SAGAR, 1993).

H. irritans es considerada como una de las principales plagas de importancia económica en el sector pecuario (Byford *et al.*, 1992; Chiu y Chiu, 1996; Alonso-Díaz *et al.*, 2007), se calcula que ocasiona pérdidas por más de un billón de dólares anuales a la ganadería de Estados Unidos de América (EE.UU.) (Cupp *et al.*, 1998).

Los productos químicos que se han utilizado para el control de *H. irritans* son a base de piretroides, fosforados y las lactonas macrocíclicas (ivermectina). Debido al incremento generacional por año de esta mosca y a la presión de selección con estos pesticidas, a finales de 1990 se detectaron los primeros casos de resistencia a piretroides, aunque también se han detectado poblaciones de moscas resistentes tanto a piretroides como a fosforados (Kunz y Schmidt, 1985; Kunz *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2003; Almazán *et al.*, 2004; Maldonado *et al.*, 2005) por lo que el control se reduce en algunos casos a insecticidas sistémicos lo que dificulta el manejo del ganado e incrementa los costos del control de la mosca del cuerno.

El problema de resistencia a los insecticidas ha motivado el interés por el desarrollo de vacunas contra artrópodos de importancia veterinaria como una

alternativa para evitar la parasitosis y a la vez, bloquear la transmisión de enfermedades que estos artrópodos transmiten a sus hospedadores. La identificación del antígeno Bm86 y posteriormente el Bm95 en células intestinales de la garrapata *B. microplus* son el primer ejemplo de antígenos utilizados como vacunas para el control de ectoparásitos (Willadsen y Kemp, 1998; de la Fuente *et al.*, 2000; García-García *et al.*, 2000; Willadsen, 2001). Los avances en el desarrollo de vacunas contra artrópodos se reducen a garrapatas, con escasos o nulos resultados en moscas.

En el desarrollo de vacunas contra garrapatas, se han utilizado diferentes metodologías como la identificación de proteínas específicas mediante mapeo inmunológico (Wang y Nuttall, 1999) e identificación de proteínas de las glándulas salivales e intestino de garrapatas (de la Fuente y Kocan, 2003) así como la interferencia de ARN (iARN). Esta metodología es rápida y sencilla pues no se requiere tener un conocimiento previo de los antígenos a evaluar. De la Fuente *et al.* (2005, 2007b y 2010), han utilizado con éxito la iARN para la búsqueda de antígenos protectores contra garrapatas, logrando identificar algunos genes candidatos al desarrollo de vacunas contra infestaciones por garrapatas.

El objetivo de esta tesis fué identificar genes implicados en la sobrevivencia y reproducción de *H. irritans*, a partir del análisis bioinformático de una biblioteca de ADNc y confirmados mediante iARN.

2. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1 *Haematobia irritans*

La mosca *H. irritans*, es un ectoparásito hematófago obligado del ganado bovino que llegó a Norteamérica en ganado procedente de Europa. En la actualidad se encuentra dispersa a lo largo del continente americano y representa una de las plagas de mayor importancia en la ganadería de México y Latinoamérica (SAGAR, 1993; Guglielmone *et al.*, 1997). Esta mosca es mejor conocida como mosca del cuerno (Europa), por su hábito de congregarse alrededor de la base de los cuernos en los bovinos o como mosca de la paleta (América), debido a que se le localiza en la región dorsal y escapular del bovino. Sin embargo, no es raro encontrarla en las patas y cuando el calor es muy intenso o cuando llueve se le puede ver en el vientre del animal (Kunz *et al.*, 1984; Chiu y Chiu 1996; Pruet *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2003; De Rouen *et al.*, 2003). Además del ganado bovino, *H. irritans* puede parasitar también a otras especies como cabras, caballos, perros, ovinos y ocasionalmente al hombre (Quiroz, 1994). El hombre rara vez es atacado, por lo cual la importancia de *H. irritans* es principalmente veterinaria.

2.1.1 Clasificación taxonómica. De acuerdo a las características morfológicas, fisiológicas y filogenéticas, la mosca del cuerno *H. irritans* (Linnaeus) pertenece al phylum Arthropoda, a la clase Insecta; al orden Díptera; suborden Cyclorrhapha, de la familia Muscidae. Dentro de esta familia se incluye a la subfamilia Stomoxyidae, la cual agrupa a *Stomoxys calcitrans* (mosca del establo) y *H. irritans* (Figura 1). Existen dos especies de este género, *H. irritans irritans* y *H. irritans exigua* (mosca del búfalo), aunque en la literatura se le ha referido como *Siphona irritans*, *Lyperosia irritans* y *Haematobia stimulans* (Lapage, 1981; Hardwood y James, 1993; Quiroz, 1994).

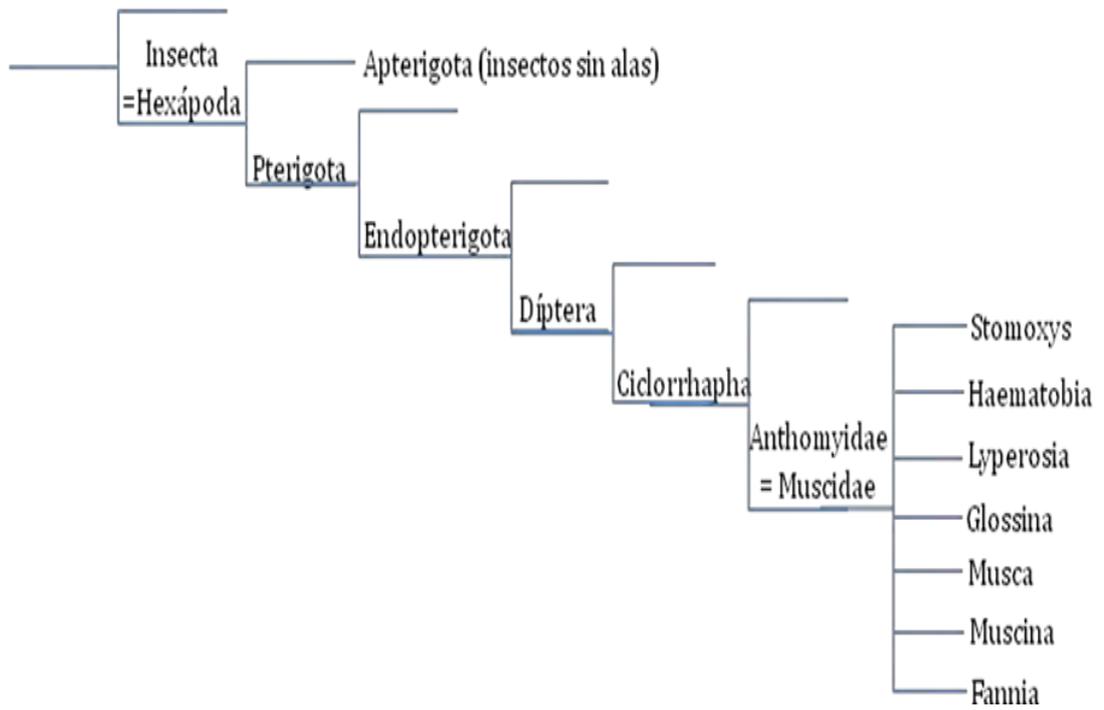


Figura 1. Clasificación filogenética de *Haematobia irritans* (Lapage, 1981).

2.1.2 Características morfológicas. *H. irritans* tiene una longitud de 4 mm, presenta una coloración gris plateada, el tórax es negro con cuatro bandas longitudinales (Figura 2). Se asemeja a la mosca doméstica y a la mosca del establo, sin embargo, tiene la mitad de su longitud, es mucho más delgada (Quiroz, 1994) y sus partes bucales poseen un labio relativamente robusto y los palpos, casi tan largos como la probosis aguda y endurecida apropiada para succionar sangre, ver Figura 3 (Harwood y James, 1987; Cicchino *et al.*, 1993; Chiu y Chiu, 1996; Cupp *et al.*, 1998).

2.1.3 Hábitos alimenticios. Tanto los machos como las hembras de *H. irritans*, son hematófagos suctopícoros, esto significa que pican y succionan la sangre del hospedador. Las moscas para alimentarse se colocan con la cabeza hacia abajo y las alas abiertas en ángulo de 45° con su cuerpo (posición delta, Figura 3). La alimentación la realizan de manera intermitente, 24 a 38 veces al día con una duración de 10 a 20 minutos cada vez. Las hembras se alimentan 1.5 veces más frecuente que los machos. La ingestión promedio de sangre es 10 µl por mosca por día o 1.71 mg, estimando la pérdida de sangre por día en 14.3 mg (Harwood y James, 1993, Cicchino *et al.*, 1993; Chiu y Chiu, 1996), por lo tanto una población de 3000 moscas pueden remover 30 ml de sangre por día por animal. Sin embargo, aun cuando son parásitos obligados pueden durar sin alimentarse entre 18 y 26 horas (Cupp *et al.*, 1998; Kuramochi, 2000). Las moscas *H. irritans* permanecen sobre el ganado y solo abandonan el hospedador para pasar a otro hospedador, cuando el ganado las espanta con su cola o cuando el ganado defeca, para depositar los huevos en el estiércol fresco.

2.1.4 Ecología. *H. irritans* se encuentra ampliamente distribuida en las zonas tropicales y subtropicales. Es abundante en las zonas costeras y en lugares con temperaturas que oscilan entre los 20 a los 30°C, con una humedad relativa del 65 al 90% (Bianchi *et al.*, 1993; Almazán *et al.*, 2001; Maldonado *et al.*, 2004; Maldonado *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2008).



Figura 2. *Haematobia irritans*, vista dorsal y ventral. Acercamiento de la cabeza y sus partes bucales.



Figura 3. Moscas *H. irritans* alimentándose de un bovino, se observa sus alas en posición delta. La repelición generalmente requiere de cuatro a diez minutos pero la alimentación puede durar veinticinco a treinta minutos.

Los estudios sobre la estacionalidad de *H. irritans* indican que la presencia de esta mosca es continua durante todo el año, con un pico poblacional a fin de la primavera y principio de verano y otro a fin de verano y mediados de otoño. Las temperaturas al inicio y al final de cada temporada, aparentan ser el factor de mayor peso para incrementar y disminuir el número de moscas (Bianchi *et al.*, 1993; Almazán *et al.*, 2001; Guglielmone *et al.*, 2001; Lima *et al.*, 2003; Maldonado *et al.*, 2006; Alonso-Díaz *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2008). En cuanto a la época de lluvias, se observó variabilidad en la correlación periodo de lluvias e incremento en la población de moscas en los diferentes estudios realizados, por lo que se observa que en el trópico mexicano y en Brasil se favorece el desarrollo de esta mosca (Bianchi *et al.*, 1993; Almazán *et al.*, 2001; Lima *et al.*, 2003; Alonso-Díaz *et al.*, 2007), mientras que en Argentina, Centro de México y Uruguay no existe esta correlación (Guglielmone *et al.*, 2001; Maldonado *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2008).

El microambiente preferido por las moscas es de una temperatura en la piel del animal de 36°C y humedad relativa del 65%, este ha sido más comúnmente encontrado en el ganado Holstein, con una diferencia significativa entre el número de moscas encontradas en animales de esta raza y en novillas Guernsey o Jersey. Durante el día, las moscas prefieren las áreas de color oscuro del ganado bicoloreado; prefieren el color negro de las Holstein al color tostado de la Jersey. Cuando la temperatura ambiental es de 29.5°C, muchas moscas se encuentran también sobre la piel blanca del vientre y áreas de la ubre (Kunz *et al.*, 1984; Harwood y James, 1987; Chiu y Chiu, 1996; Pruett *et al.*, 2003; De Rouen *et al.*, 2003).

2.1.5 Ciclo biológico. El ciclo biológico de *H. irritans* tiene una duración de 10 a 14 días, con las condiciones de temperatura y humedad adecuadas (Figura 4). Sin embargo, cuando las condiciones climáticas no son favorables, se prolonga considerablemente su desarrollo, ya que se lleva a cabo en las etapas de huevo, larva y pupa un estado de diapausa, es decir inactividad y detención del desarrollo, acompañado de una gran reducción del metabolismo, cuyo potencial es originado por los efectos de la disminución del fotoperiodo

(Harwood y James, 1987; Blood *et al.*, 1993, Lysyk y Moon, 1994; Méndez y Linhares, 1999; Cruz-Vázquez *et al.*, 2003). Por lo tanto, el ciclo es más corto en verano que en invierno.

La hembra deposita los huevos en el estiércol fresco de los bovinos y a las 24 a 48 horas eclosionan y emergen las larvas. Los huevos miden 1.3 a 1.5 mm de largo, son de color pardo rojizo y embrionan en 20 hr, de 24 a 26°C, con 60 a 80% de humedad (Harwood y James, 1987; Blood *et al.*, 1993; Cicchino *et al.*, 1993; Quiroz, 1994; Chiu y Chiu, 1996). Las larvas se entierran en el estiércol y se alimentan de él, alcanzando su desarrollo completo en 5 a 8 días, de 27 a 29°C, con 60 a 80% de humedad. El desarrollo de la larva, desde la eclosión hasta la pupación, requiere de 10.5, 5.6 y 3.7 días a 18°, 24° y 30°C respectivamente. El adulto está listo para emerger de 2 a 4 días posteriores a la pupación, bajo condiciones de verano (Harwood y James, 1987; Quiroz, 1994). Las hembras inician la oviposición 9 días después de la eclosión, siempre y cuando se hayan alimentado de sangre. Las hembras solo abandonan el bovino para ovipositar en el estiércol recién defecado (Kuramochi, 2000). Las posturas se realizan en grupos de 25 a 50 moscas a la vez en el mismo estiércol, depositando un máximo de 20 a 40 huevos en promedio por mosca, pero una hembra es capaz de producir de 400 a 800 huevos durante 7 semanas, esta es la longevidad de una hembra adulta, con variaciones dependiendo de las condiciones ambientales y alimento disponible (Harwood y James, 1987; Blood *et al.*, 1993; Quiroz, 1994; Chiu y Chiu, 1996).

En condiciones ambientales favorables el huevo tiene un 85 a 90% de eclosión, la sobrevivencia de un huevo a pupa es del 42.3%. Las larvas presentan un rango de tolerancia del pH del estiércol de 5.5 a 9.58. El porcentaje de pupación es de 74.4%, mientras que la emergencia del adulto es del 93.9% (Blood *et al.*, 1993; Quiroz, 1994).

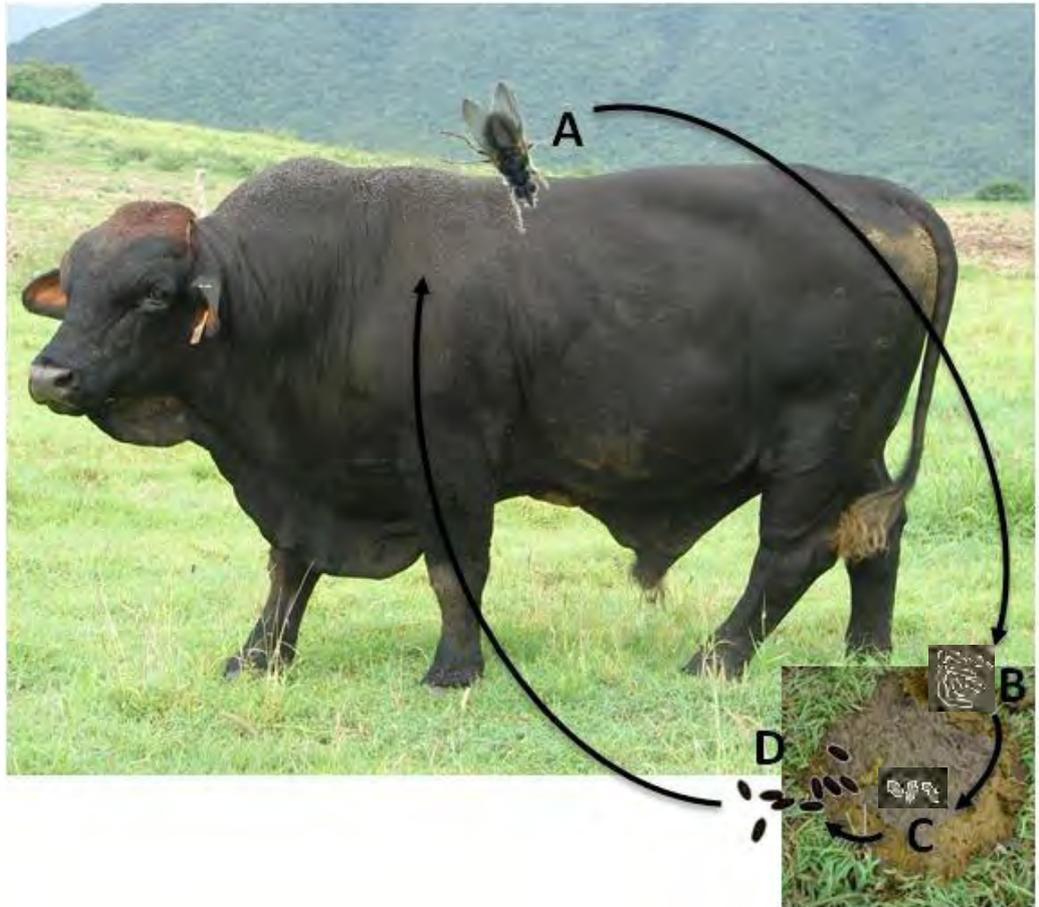


Figura 4. Ciclo biológico de *H. irritans*. A) Mosca adulta, B) Huevos en estiércol recién defecado, C) Desarrollo larvario en el estiércol, D) Desarrollo de la pupa en el suelo.

2.2 Efectos del parasitismo de *H. irritans* sobre el ganado bovino

Los efectos perjudiciales al ganado bovino se pueden clasificar en primarios como son picar la piel y succionar sangre, causando dolor y molestia constante sobre el animal sometiéndolo a un estrés intenso, interfiriendo con su alimentación, reposo y salud (Blood *et al.*, 1993; Chiu y Chiu, 1996), y secundarios que comprenden aquellas acciones por heridas autoinflingidas por los animales al rascarse, que se convierten en vías potenciales de focos de miasis e infecciones bacterianas. Adicionalmente se produce pérdida de calidad en las pieles, ocasionada por el efecto de la picadura (Mariategui *et al.*, 2004).

2.2.1 Importancia económica de *H. irritans*. Los animales parasitados interrumpen la alimentación y reducen el tiempo de pastoreo, afectando el índice de conversión alimenticia repercutiendo así en la reproducción, disminuyendo el número de becerros producidos al año (Kunz *et al.*, 1984; Chiu y Chiu, 1996; Cantú, 1999; Cupp *et al.*, 1998; Johnson y Mayer, 1999; De Rouen *et al.*, 2003). Las infestaciones del ganado en pastoreo por *H. irritans* con poblaciones de mil a cuatro mil moscas por animal, ocasionan pérdidas de 0.14 g de carne por mosca al día, lo cual puede ocasionar una reducción del 8 al 22% del peso corporal, por lo tanto, la ganancia de peso de novillos en pastoreo se reduce en un 14 % (Clymer, 1995; Chiu y Chiu, 1996; Cupp *et al.*, 1998; Johnson y Mayer, 1999; Pruet *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2003; De Rouen *et al.*, 2003). En infestaciones del ganado lechero con poblaciones de 200 moscas por animal, se ha comprobado que pierde 2.6 ml de leche por mosca al día, reduciendo la producción de leche del 10 al 20%; causando pérdidas de 520 ml de leche y 28 g de peso corporal por animal por día (Kunz *et al.*, 1984; Chiu y Chiu, 1996; Johnson y Mayer, 1999; Pruet *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2003; De Rouen *et al.*, 2003). El impacto económico de *H. irritans* en la producción ganadera ha ido en aumento, ya que para 1992, Byford *et al.*, reportaban a esta mosca como la más importante plaga del ganado en EE.UU., con un impacto económico anual estimado en 730.3 millones de dólares, mientras que para 1998 Cupp *et al.*, estimaron las pérdidas anuales en un billón de dólares.

2.2.2 Importancia sanitaria de *H. irritans*. Debido a que *H. irritans* es un parásito hematófago, se ha involucrado como vector mecánico de algunas enfermedades como anaplasmosis (Rodríguez *et al.*, 2009), tripanosomiasis (Sinshaw *et al.*, 2006) y tularemia (Abril *et al.*, 2007), así como responsable de la diseminación de las bacterias *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Spier *et al.*, 2004), *Bartonella* spp. (Chung *et al.*, 2004), *Staphylococcus aureus* (Gillespie *et al.*, 1999) y como hospedador intermediario del nematodo *Stephanofilaria stilesi* (Shaw y Sutherland, 2006). La mosca del cuerno ha sido implicada en algunos casos de dermatitis con lesiones atresicas en el tejido glandular mamario de bovinos, que cedieron al controlar la población de *H. irritans* (Edwards *et al.*, 2000).

2.3 Control de *H. irritans*

Existen diferentes métodos de control para tratar de reducir las infestaciones por *H. irritans* como el biológico, el mecánico, el químico y el cultural, el cual se basa en el uso de buenas prácticas de manejo como son la remoción y disposición adecuada de las excretas frescas de los corrales y establos, lo cual interrumpe el ciclo biológico de esta mosca y ayuda a prevenir el desarrollo de nuevas poblaciones (FAO, 2003).

2.3.1 Biológico. Se ha intentado el control biológico, sin embargo, aún no está disponible de manera masiva para los ganaderos por lo cual no ha tenido un fuerte impacto sobre las poblaciones de la mosca del cuerno (Barros *et al.*, 2002). Este tipo de control involucra la utilización de insectos como los himenópteros parasitoides (Gibson y Floate, 2001), la utilización de coleópteros depredadores de las larvas de mosca como *Staphylinidae* (Walsh y Posse, 2003; Mariategui *et al.*, 2004) o la utilización de diferentes especies de hongos entomopatógenos (*Hyphomycetes*), *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus* (Angel-Sahagun *et al.*, 2005; Lohmeyer y Miller, 2006; Maldonado-Siman *et al.*, 2007; Mochi *et al.*, 2009).

2.3.2 Mecánico. El control mecánico, se lleva a cabo mediante la implementación del uso de trampas, las cuales son colocadas en sitios por

donde pasa el ganado, donde las moscas son atraídas y posteriormente quedaran atrapadas. Estas trampas pueden ser físicas, donde entra la mosca y no puede salir por lo que muere por inanición (Tozer y Sutherst, 1996; Alves, 2006), eléctricas (Watson *et al.*, 2002).

2.3.3 Químico. Actualmente en la ganadería se tiene establecido un programa de manejo, que incluye la calendarización de baños mosquicidas, los cuales se llevan a cabo periódicamente, sin observar la reducción de moscas en el ganado. Los productos químicos que se han utilizado para el control de *H. irritans* son a base de organofosforados, piretroides sintéticos avamectinas y reguladores del crecimiento. Estos productos han sido usados en diversas formulaciones como concentrados emulsificables, aretes, polvos, aplicaciones sobre los animales, inyectables, aditivos alimenticios y bolos (Herald *et al.*, 1982; SAGAR-CANIFARMA, 1996; Steelman *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2003).

Debido a que el ciclo biológico de *H. irritans* es muy corto, se hacen necesarias las aspersiones calendarizadas a intervalos frecuentes. Lo que trae como consecuencia un efecto profundo en la composición genética de la población, por lo tanto, la frecuencia de individuos resistentes se incrementa de manera progresiva y el insecticida eventualmente pierde su efectividad biológica (Kunz y Schmidt, 1984; Barros *et al.*, 2002; Almazán *et al.*, 2004).

2.4 Resistencia de *H. irritans* a los insecticidas

La incidencia de las pérdidas ocasionadas por la mosca *H. irritans* se ve agravada por la generación de resistencia a los insecticidas de uso habitual para el control de las poblaciones de insectos. La resistencia a los insecticidas se define como la habilidad de una población de parásitos, para tolerar altas dosis que serían letales para la mayoría de los individuos de una población susceptible de la misma especie. La resistencia a los insecticidas es una respuesta genético-evolutiva de las poblaciones de *H. irritans* expuestas a un estrés ambiental continuo, como son las frecuentes aplicaciones de insecticidas en condiciones de una fuerte presión de selección, debido al incremento generacional por año, el desarrollo de resistencia es un fenómeno ineludible ya

que les permitirá evolucionar en condiciones ambientales cambiantes con el fin de sobrevivir bajo nuevas circunstancias. En el campo se sospecha la presencia de resistencia, cuando un producto que antes era útil para el control, ya no demuestra el mismo efecto, siempre y cuando se asegure que se está trabajando bajo óptimas condiciones de aplicación (FAO, 2003). A principios de 1982, surgieron los primeros conocimientos de resistencia a piretroides en mosca *H. irritans* en el estado de Florida, EE.UU., se observó que los aretes con piretroides disminuyeron el control de la mosca (Kunz y Schmidt, 1985) y debido a su uso tan extensivo surgieron las sospechas de que esta resistencia podía extenderse y así para finales de 1990 se detectaron las primeras fallas en el control de esta mosca en México, lo cual se manifestó por reducción en el periodo de protección, e incremento en las poblaciones de *H. irritans*. Aunque la resistencia a piretroides en esta mosca fue la primera en manifestarse y es la más común, se han detectado poblaciones de moscas resistentes tanto a piretroides como a fosforados (Barros *et al.*, 2001), específicamente a cipermetrina y diazinon (Kunz *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2003; Almazán *et al.*, 2004), por lo que el control se reduce en algunos casos a insecticidas sistémicos lo que dificulta el manejo del ganado e incrementa los costos de control de esta mosca.

Existen otras consecuencias del abuso de insecticidas, con impacto fuerte sobre la ganadería como es la eliminación de insectos aliados (con tasa reproductiva baja), para el control biológico (Martínez y Cruz, 2009). Sin embargo, es la resistencia a insecticidas la que ha atraído la mayor atención debido a su impacto desfavorable sobre la producción ganadera (Kunz y Kemp, 1994).

2.5 Alternativas de Control Inmunológico

El problema de resistencia a los insecticidas ha motivado el interés por el desarrollo de vacunas contra artrópodos como una alternativa para evitar la parasitosis y a la vez bloquear la transmisión de enfermedades a sus hospedadores. Para lo cual se ha trabajado con antígenos provenientes de

glándulas salivales e intestino de artrópodos para el desarrollo de vacunas con el fin de prevenir la transmisión de patógenos (Willadsen y Kemp, 1998; de la Fuente et al., 2000; García-García et al., 2000; Nakajima et al., 2003; Valenzuela, 2004; Imamura et al., 2005; Mulenga y Azad, 2005; Titus et al., 2006; Prevot et al., 2007).

Los antígenos protectores contra artrópodos como las garrapatas, se han identificado mediante la evaluación de proteínas derivadas de extractos crudos utilizadas para inmunizar animales que son sometidos a infestaciones experimentales con cierto número de garrapatas; por mapeo inmunológico de antígenos en animales infestados y al probar proteínas consideradas importantes para la función y sobrevivencia en experimentos de vacunación contra garrapatas, principalmente (Wang y Nuttall, 1999; Imamura et al., 2007).

El antígeno Bm86 y posteriormente el Bm95 fueron identificados en células intestinales de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Willadsen y Kemp, 1998; García-García et al., 2000). Actualmente, estos antígenos se utilizan en el control de infestaciones naturales por garrapatas en México y otros países de Latinoamérica. La respuesta a la vacunación con estos antígenos produce anticuerpos que al estar en contacto con la garrapata provocan lisis de las células intestinales, trayendo como consecuencia la reducción en la sobrevivencia del artrópodo, disminución de peso y de la fertilidad (Willadsen y Kemp, 1998; de la Fuente, 2000; García-García et al., 2000).

El mapeo inmunológico de antígenos a partir de glándulas salivales de garrapatas *Haemaphysalis longicornis* permitió identificar una proteína de 29 kDa (p29), la inmunización de conejos con esta proteína recombinante confirió una reducción del 40 y 56 % en la reproducción y mortalidad de larvas y ninfas respectivamente (Mulenga et al., 1999).

El antígeno p64, es una proteína de 15 kDa que fue identificada en la garrapata de tres hospedadores *R. appendiculatus*, esta proteína es del

cemento y su función es la adherencia y alimentación de garrapatas. La inmunización con esta proteína disminuyó la parasitosis en cobayos infestados con ninfas y adultos en 48 y 70 % respectivamente (revisado por de la Fuente y Kocan, 2003).

El efecto de la inmunización con la proteína Iris (serpin), expresada en las glándulas salivales de *Ixodes ricinus*; se evaluó en conejos infestados con ninfas y adultos, obteniendo una tasa de mortalidad del 30%, disminución de ganancia de peso y aumento en el tiempo de alimentación en adultos (Prevot *et al.*, 2007).

Aun cuando en los últimos años se ha enfatizado en la detección de antígenos para el control inmunológico de artrópodos, poco se ha hecho en la mosca del cuerno en este campo a pesar de que se ha demostrado la capacidad de los bovinos a generar una respuesta inmune contra antígenos salivales de la mosca *H. irritans* (Kerlin y Allingham, 1992; Baron y Lysyk, 1995; Cupp *et al.*, 2004). Como lo demostraron Baron y Lysyk (1995) quienes midieron la respuesta humoral a la infestación de *H. irritans*; observando que la infestación con 200 moscas por animal produce una débil respuesta de anticuerpos a los antígenos salivales de esta mosca, lo cual se incrementa al retirar las moscas del ganado. Lo cual fue atribuido a un posible efecto inmunomodulador de los antígenos salivales de *H. irritans*. En este sentido se han realizado algunos estudios de inmunización, como los de Bautista *et al.* (2004), utilizando antígenos intestinales de la mosca adulta, a partir de extractos crudos sin observar resultados satisfactorios (o estadísticamente significativos), lo cual fue atribuido a una baja concentración de anticuerpos ingeridos. Así tenemos también el de Cupp *et al.* (2004), utilizando una proteína recombinante (trombostatina) de la glándula salival a partir de la cual se observa la disminución de la alimentación de moscas, generando una disminución en la oviposición, cuando las moscas se alimentaron de los animales inmunizados, por lo tanto queda demostrada la posibilidad de identificar antígenos protectores en la saliva de *H. irritans*.

A pesar de los avances en el desarrollo de vacunas para el control inmunológico de garrapatas y a que se han propuesto algunas moléculas como candidatos vacunales contra *H. irritans* (Wijffels *et al.*, 1999; Oyarzún *et al.*, 2008; Guerrero *et al.*, 2008) la identificación de antígenos protectores, continúa siendo la limitante para el desarrollo de vacunas efectivas contra las infestaciones por esta mosca.

2.6 Herramientas para la detección de antígenos protectores contra artrópodos

Debido a que la identificación de antígenos es un paso determinante en el desarrollo de vacunas efectivas contra artrópodos, se requiere utilizar las nuevas tecnologías desarrolladas en biología molecular. Algunas de estas tecnologías son: la creación de etiquetas de secuencias expresadas (Expressed Sequence Tags, ESTs), el análisis bioinformático y la interferencia de ARN (iARN). La combinación de estas herramientas incrementa el poder de la técnica de silenciamiento post-transcripcional de genes que ofrece información acerca de la función del gen (de la Fuente y Kocan, 2006; Gosh *et al.*, 2007; de la Fuente *et al.*, 2007).

2.6.1 Las etiquetas de secuencias expresadas (Expressed Sequence Tag, EST). En 1991 se describió por primera vez la aplicación de la secuenciación rápida del ADN complementario (ADNc), procedimiento en el que secuenciaron de forma parcial clonas seleccionadas aleatoriamente de bibliotecas de ADNc obtenidas a partir de ARN mensajero (ARNm) del cerebro humano. Las secuencias de dichas clonas representaban los genes expresados en el tejido cerebral y se denominaron “motivos” de secuencias expresadas (EST) (Adams *et al.*, 1991). Para obtener una biblioteca de ADNc, se requiere hacer la extracción de ARN del organismo blanco. El ADNc se obtiene mediante transcripción reversa (RT-PCR), se amplifica y se clona en un vector de expresión (Kofta y Wedrychowicz, 2001). Esta tecnología brinda la posibilidad de descubrir nuevos genes y mapear sus posiciones en los cromosomas. Su aplicación permite, además, determinar el polimorfismo

génico, el perfil de expresión génica de una célula o un tejido en estudio, los cuales definen sus características biológicas básicas. Por lo tanto este procedimiento es una herramienta con aplicación en el estudio de las enfermedades genéticas (Collins, 1995), la evolución de las especies (Marra *et al.*, 1998) y el desarrollo de vacunas (Almazán *et al.*, 2003a; Almazán *et al.*, 2003b; Almazán *et al.*, 2005a; Almazán *et al.*, 2005b).

2.6.2 Interferencia de ARN (iARN). La iARN o la inducción del silenciamiento de un gen específico se realiza mediante la introducción de cadenas cortas de ARN de doble cadena (ARNdc) de genes blanco mediante diferentes vías (Sorensen *et al.*, 2003). Esta metodología fue descrita originalmente en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998; Novina y Sharp, 2004).

La respuesta biológica conservada al ARNdc, conocido como iARN o silenciamiento postranscripcional, media la capacidad de defensa hacia ácidos nucleicos endógenos parasitarios o exógenos, y regula la expresión de genes codificantes para proteínas. La iARN ha sido utilizado como una herramienta experimental de manipulación de la expresión génica y para probar la función a escala del genoma completo (Hannon, 2002, Aljamali *et al.*, 2002, Karim *et al.*, 2004a y b; Narasimhan *et al.*, 2004; Pal *et al.*, 2004; Miyoshi *et al.*, 2004; de la Fuente *et al.*, 2005; Soares *et al.*, 2005).

El silenciamiento de un gen en particular provee un medio para evaluar los efectos de la pérdida de la función de ese gen, de esta manera es posible conocer su función (de la Fuente *et al.*, 2007). Kalidas y Smith (2002), utilizaron fusiones de ADNc para formar ARNdc, silenciando la expresión de los genes *lush*, *white* y *dGqalpha* en adultos de *Drosophila melanogaster*. En cada caso la expresión del gen blanco se redujo significativamente; en el caso del gen *white* el fenotipo por iARN es indistinguible de una mutante por delección. Estos resultados demuestran una estrategia simple para silenciar la función de un gen en células específicas de *D. melanogaster* que pueden ser aplicados para definir la función biológica de cientos de genes.

En abejas (*Apis mellifera*) se determinó la función del gen *csp5*, por estudios de iARN. Las abejas tratadas con ARNdc presentaron una “eclosión imposible”, sin progreso en la etapa larval, lo cual llevó a revelar la función de este gen como un gen ectodermal (Maleszca *et al.*, 2007).

La inyección de ARNdc del gen Distal-less (DII) en la araña roja (*Tetranychus urticae*), gen conservado involucrado en la especificación de apéndices en metazoos, produce el truncado parcial del fenotipo y fusión de los segmentos de las patas. Estos estudios sugieren el papel de DII en la formación de apéndices en artrópodos (Khila y Grbic, 2007).

Se han realizado estudios de búsqueda de factores de patogénesis bacteriana intracelular mediante iARN en genoma completo utilizando células de *Drosophila* y la bacteria *Listeria monocytogenes*, logrando identificar 305 ARNdc con una amplia gama de funciones como componentes de ribosomas, del proteasoma, ciclo celular, muerte celular, organización del citoesqueleto, choque térmico, tráfico vesicular, transducción de señales, metabolismo y que alteraron la infección de *L. monocytogenes* (Agaisse *et al.*, 2005).

Recientemente la iARN ha sido propuesta como un método para la búsqueda de antígenos protectores vs garrapatas y otros artrópodos (de la Fuente *et al.* 2005; 2007c; Almazán *et al.*, 2010). Esta metodología ha sido satisfactoria en garrapatas ya que el descubrimiento de 4D8 o *subolesin* fue confirmado mediante el tamizado con iARN en *I. scapularis* (de la Fuente *et al.*, 2005) y la función de este gen fue confirmada por estudios de iARN en diferentes especies de garrapatas (de la Fuente *et al.* 2006). Las garrapatas inyectadas con ARN dc fueron alimentadas en ovinos y después del periodo de alimentación se observó: degeneración de intestinos, glándulas salivales, y sistema reproductor de las hembras. Estos estudios permitieron conocer el papel de *subolesin* en la modulación de la alimentación y reproducción de garrapatas de diferentes especies (de la Fuente *et al.*, 2006).

Estudios posteriores han permitido encontrar epitopos conservados de *subolesin* en el ortólogo de *Aedes albopictus*. Además se ha podido medir el

efecto de *subolesin* utilizando la iARN con ARNdc de garrapata y mosquito en *I. scapularis*, *Amblyomma americanum*, *R. sanguineus* y en mosquitos, el silenciamiento del gen disminuyó el peso y la sobrevivencia de las garrapatas hembras, mientras que en las hembras de *Anopheles atroparvus*, *A. caspius*, y *Culex pipiens* alimentadas con suero hiperinmune contra *subolesin* de *A. albopictus* se observó disminución de la sobrevivencia de $11\pm 5\%$ a $29\pm 6\%$. La alimentación de *Phlebotomus perniciosus*, con anticuerpos de la proteína ortóloga de *subolesin* inhibió la sobrevivencia de las hembras, el número de larvas ($28\pm 22\%$) y adultos ($16\pm 3\%$) obtenidos (Canales *et al.*, 2009)

La iARN se ha utilizado para estudiar la función génica en insectos y otros artrópodos (de la Fuente *et al.*, 2007c; Miyosi, *et al.*, 2004; Ciudad *et al.*, 2006; Kambris *et al.*, 2006; Araujo *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Isoe *et al.*, 2009; Krishnan *et al.*, 2009; Bellés, 2010; Huvenne y Smagghe, 2010) y para detectar candidatos a antígenos protectores en las garrapatas (de la Fuente *et al.*, 2005; de la Fuente *et al.*, 2007b; de la Fuente *et al.*, 2010; Almazán *et al.*, 2010).

3. JUSTIFICACIÓN

La mosca *H. irritans*, es una de las plagas que causan grandes pérdidas económicas a la ganadería bovina de zonas tropicales y subtropicales, tanto por el efecto hematófago y el estrés que ocasionan debido a la presencia constante sobre el hospedador, como por su papel de vectores mecánicos de enfermedades. El método de control de este artrópodo se realiza mediante el uso intensivo de insecticidas en baños de inmersión o directamente sobre el ganado por lo que las poblaciones de moscas han desarrollado resistencia a los insecticidas, manifestándose una disminución del efecto letal de estos productos; con lo cual este tipo de control químico no es costeable.

A nivel mundial se tiene conocimiento de *H. irritans* resistentes a piretroides y fosforados, lo que dificulta el tratamiento químico. Aunado a ello, la contaminación y efectos de los insecticidas sobre el medio ambiente exigen nuevas alternativas de control de esta plaga de la ganadería. Dado lo anterior, una alternativa viable es el control inmunológico mediante vacunas que eviten o disminuyan la parasitosis de esta mosca sobre el ganado. Sin embargo, a pesar de los avances en el desarrollo de vacunas para el control inmunológico de garrapatas y a que se han propuesto algunas moléculas como candidatos vacunales contra *H. irritans* (Wijffels *et al.*, 1999; Oyarzún *et al.*, 2008; Guerrero *et al.*, 2008) la identificación de antígenos protectores, continúa siendo la limitante para el desarrollo de vacunas efectivas contra las infestaciones por esta mosca.

Por lo tanto, la importancia de este trabajo radica en la identificación de genes implicados en la alimentación y reproducción de *H. irritans* mediante iARN. Una vez identificados, estos genes podrían ser expresados en proteínas para su posterior evaluación, como vacunas recombinantes contra infestaciones por esta mosca del ganado bovino.

4. HIPÓTESIS

Los genes implicados en la supervivencia y reproducción de *H. irritans*, se identifican a partir de una biblioteca de ADNc, cuyo silenciamiento confirma su efecto sobre estos parámetros.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Identificar genes implicados en la supervivencia y reproducción de *H. irritans*, a partir del análisis bioinformático de una biblioteca de ADNc y confirmados mediante iARN.

5.2 Objetivos Específicos

4.2.1 Construir una biblioteca de ADNc a partir de ARN de *H. irritans*.

4.2.2 Secuenciar y predecir la función putativa de genes obtenidos de una biblioteca de ADNc de *H. irritans*.

4.2.3 Identificar los ADNc implicados en las funciones biológicas que permiten la supervivencia y reproducción de *H. irritans* mediante iARN y evaluar el silenciamiento de estos genes mediante RT-PCR en tiempo real.

4.2.4 Determinar la expresión de los genes seleccionados en diferentes estadios evolutivos y tejidos, así como la variabilidad genética en diferentes poblaciones de *H. irritans*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cultivo de *H. irritans*

Se colectaron moscas *H. irritans* en el rancho “La Negra”, para establecer la cepa de laboratorio, en el laboratorio de parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Tamaulipas.

Las moscas fueron mantenidas bajo condiciones de laboratorio siguiendo la metodología y técnicas de Schmidt *et al.* (1967). Brevemente, las moscas se mantuvieron en jaulas de aluminio con malla de 40 x 50 cm, se alimentaron dos veces al día utilizando trozos de algodón de 15 cm impregnados con sangre fresca de bovino desfibrinada, colectada en el rastro 2 veces por semana. Las moscas alimentadas se mantuvieron bajo un fotoperiodo de 12 hr de luz y 12 hr de oscuridad, a 28-32 °C de temperatura y 70-80% de humedad (Mendes y Linhares, 1999).

6.2 Construcción de la biblioteca de ADNc

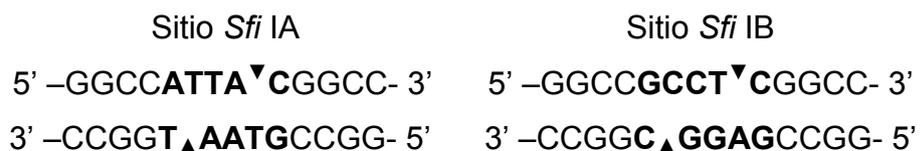
Para la construcción de la biblioteca se realizó la extracción del ARN total de aproximadamente 1,500 moscas *H. irritans* adultas cepa “La Negra”, las cuales fueron mantenidas sin alimentación durante 6 horas antes de la disección; para permitir la digestión y eliminación de sangre de bovino y evitar con ello la contaminación del ARN de *H. irritans*. Los órganos de moscas adultas se obtuvieron por disección de la siguiente manera: las moscas fueron anestesiadas a -20°C durante 5 minutos para facilitar su manipulación. Posteriormente, los insectos se colocaron sobre un portaobjetos con una gota de PBS (amortiguador salino de fosfatos) estéril y su manejo se hizo bajo un microscopio estereoscópico para realizar el aislamiento del intestino. Los órganos fueron lavados en PBS y colocados inmediatamente en tubos de microcentrifuga que contenían *ARN later* (Ambion, Austin, Tx., EE. UU.).

6.2.1 Extracción de ARN. El aislamiento del ARN se realizó utilizando *TriReagent* (Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y el precipitado final se resuspendió en 50µl de agua libre de

nucleasas (Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.). La integridad del ARN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en comparación con un marcador de peso molecular para ADN (1 Kb *DNA ladder*, Promega, Madison, Wi., EE.UU.) y la cuantificación y pureza mediante espectrofotometría (Espectrofotómetro 6405 UV/Vis, Jenway, Gransmore Green, Inglaterra).

6.2.2 Obtención del ADNc. La síntesis de la primera hebra de ADNc, la amplificación, la digestión con la enzima de restricción *Sfi* I y el fraccionado del ADNc se realizó utilizando el *kit SMART™ cDNA Library Construction* (Clontech, Palo Alto, Ca, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El programa de amplificación fue 95°C 1 min, 26 ciclos de 95°C, 15 s y 68°C, 6 min para las condiciones de desnaturalización, alineamiento y extensión respectivamente. El tamaño de los fragmentos amplificados se determinó por comparación con un marcador de peso molecular para ADN (1 Kb *DNA ladder*, Promega, Madison, Wi., EE.UU.) mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.1%. El ADNc amplificado fue purificado con fenol-cloroformo y disuelto en 79 µl de agua desionizada. El fraccionado en tamaño del ADNc se realizó en columnas *Chroma Spin 400* de acuerdo al manual del *kit SMART™*.

6.2.3 Clonación del ADNc en el vector pBluescript II SK. La clonación del ADNc se llevó a cabo en el vector pBluescript II SK (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, Ca, EE. UU.), en 10µl de reacción (1.0 µl ADNc, 500 ng/ml Vector), la mezcla fue incubada a 16°C durante la noche. El vector pBluescript II SK se reconstruyó reemplazando la secuencia entre *EcoR* I y *Not* I por la secuencia adaptadora *Sfi* I A y *Sfi* I B de esta manera el fragmento de ADNc fue insertado direccionalmente (*Sfi* I A→*Sfi* I B).



Secuencia adaptadora *Sfi* I A y *Sfi* I B.

6.2.4 Transformación de la biblioteca de ADNc. Para la transformación de la biblioteca de ADNc se utilizaron 50 μ l de células competentes (DH-5 α) a las cuales se les adicionó 1 μ l de los productos de ligación, se mezcló gentilmente y se incubó durante 50 min a 4°C. Posteriormente las células fueron sometidas a choque térmico 42°C, 90 s y 4°C por 2 min. Las células DH-5 α se transfirieron al medio líquido de Luria-Bertani (LB) con 100 μ g/ml de ampicilina, se incubaron durante 45min a 37°C con agitación (<150 rpm). Transcurridos los 45 min se tomaron 200 μ l de las células, las cuales se inocularon en placas de 15 cm con medio sólido de LB (Apr-IPTG/x-gal), continuándose la incubación a 37°C durante la noche; para inducir la expresión de los plásmidos recombinantes. Para determinar la presencia del inserto de ADNc se recolectaron 36 colonias las cuales fueron sometidas a digestión con *Sfi* I y se purificó el ADN plasmídico, el cuál fue comparado con un marcador de peso molecular para ADN (DL 2000 *Maker*, TaKara, Biotechnology Co. Ltd., China) mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.1%. La integridad del ADNc se determinó mediante la secuenciación de 24 clonas para su análisis en las bases de datos contra secuencias no redundantes BLAST *versus* NCBI.

6.3 Análisis bioinformático de secuencias de ADNc

Una vez obtenida la biblioteca de ADNc, se realizó la secuenciación 5' del ADN plasmídico de 2,462 ADNc (*Creative Biolabs*, Port Jefferson Station, NY, EE. UU.; <http://www.creativebiolabs.com>). Las secuencias fueron analizadas mediante la comparación con las secuencias de bases de datos del banco de genes y proteínas, utilizando el programa *cDNA Annotation System* (CAS; Programa de Bioinformática e Información Científica [BSIP], Oficina de Sistemas de Tecnologías de la Información [OTIS], el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas [NIAID], Bethesda, Md, EE.UU.) (<http://exon.niaid.nih.gov>). Con este programa se realizó la limpieza automatizada, ensamblado, comparación de secuencias en bases de datos de secuencias múltiples (NCBI para secuencias nucleotídicas no redundantes y bases de datos de proteínas, secuencias de ESTs de *H. irritans* [Guerrero et

al., 2008] y bases de datos de secuencias específicas de mosquitos, garrapatas y patógenos <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; <http://www.vectorbase.org/index.php>) y las asignaciones de ontología génica (OG). También se realizó la comparación con los conjuntos de grupos ortólogos de proteínas (CGO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>). El alineamiento de las secuencias nucleotídicas fue realizado con el programa *AlignX* (Vector NTI Suite V 5.5, InforMax, North Bethesda, Md, EE. UU.). Las secuencias de las ESTs fueron depositadas en el banco de genes con los siguientes números de acceso HO000420-HO001165 y HO004499-HO004744.

6.4 Caracterización funcional de ADNc de *H. irritans* mediante iARN

Para los estudios de genómica funcional se realizó la selección de unigenes de los grupos funcionales obtenidos a partir del análisis bioinformático (Cuadro 1), para ser utilizados en iARN en moscas *H. irritans* hembras. Posteriormente se evaluó el silenciamiento génico utilizando la RT-PCR en tiempo real. En la Figura 5 se muestra el procedimiento utilizado para la iARN, se generaron los ARN dc para cada uno de los grupos, se inyectaron las moscas y se alimentaron para evaluar la sobrevivencia y la oviposición.



Figura 5. Representación esquemática del procedimiento experimental para la búsqueda de antígenos contra *H. irritans* mediante iARN a partir de los grupos seleccionados de la biblioteca de ADNc de acuerdo a la función putativa.

6.4.1 Generación de ARN de doble cadena (ARNdc). Para los experimentos de iARN se requiere la obtención de ARNdc de los ESTs seleccionados. Por lo tanto el ADN plasmídico de la biblioteca se purificó y los insertos de ADNc se amplificaron mediante PCR utilizando oligonucleótidos con

secuencias específicas para ADN del vector pBluescript II SK (pBLUET5: 5'-GAGGTCGACGGTATCGAT-3' y pBLUET3: 5'-CAATTAACCCTCACTAAAGGGA-3') conteniendo el promotor de secuencia T7 (75: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGTACTTC-3' y 73: 5'-AATACGACTCACTATAGGGTACT-3') para transcripción y síntesis de ARNdc *in vitro* (de la Fuente *et al.*, 2005). Los PCRs se realizaron para las clonas de ADNc individuales o grupales (cuando más de un unigen fue incluido en el grupo funcional analizado; Cuadro 1) utilizando el *kit Access RT-PCR* (Promega, Madison, Wi., EE.UU.), en una mezcla de 50 µl de reacción conteniendo 1 µl de ADNc o 1 µl de agua en el control negativo. El programa de amplificación fue de 35 ciclos de 30s a 95°C, 30s a 62°C, 4 min a 68°C para las condiciones de desnaturalización, alineamiento y extensión respectivamente, con un paso de extensión final de 7 min a 68°C. Los amplicones obtenidos fueron purificados mediante el sistema de purificación *Wizard 96-well PCR* (Promega, Madison, Wi., EUA).

Cuadro 1. Selección de grupos funcionales de ADNc de la biblioteca de *H. irritans* para los ensayos de iARN. Se muestra la función putativa de los genes seleccionados y los unigenes que fueron utilizados para la iARN

Nº de Grupo	Grupos funcionales	Nº de unigenes ^a	Unigenes seleccionados para iARN ^b
1	Serin proteasas	100	5, 10, 14, 19, 42, 90, 224, 230
2	Inhibidor de proteasas	2	2_B12, 24_H02
3	Vitelogenina	13	7, 20, 37, 76, 89, 145, 176, 7_D07
4	Ubiquitinación	5	84, 146, 4_E04, 5_G03, 7_B08
5	Ferritina	5	26, 39, 154, 156, 10_A09
6	vATPasa	3	7_F08, 9_A08, 17_H03
7	Componentes del proteasoma	3	6_G04, 7_A04, 12_H09
8	Respuesta immune	2	6_F11, 10_G05
9	5'-nucleotidasa	1	13_D07
10 (testigo negativo)	Agentes infecciosos: -Nora virus - <i>Wolbachia endosymbionte</i>	3 3	191 2_E12

^aNúmero de unigenes agrupados en esa categoría. ^bCuando el número de unigenes en el grupo funcional fue mayor a 5, se seleccionaron unigenes para incluir todos los diferentes genes presentes en esta categoría para la iARN. Los números de acceso en el banco de genes se muestran en el Cuadro 2.

Una vez contruidos los grupos de clones y para generar los ARNdc de los grupos seleccionados y el del testigo negativo (Cuadro 1), se utilizaron 8 μ l de los amplicones purificados para la transcripción y purificación *in vitro* del ARNdc de cada grupo utilizando el *kit Megascript RNAi* (Ambion, Austin, Tx., EE.UU.). La integridad del ARNdc fue determinada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en comparación con un marcador de peso molecular para ADN (1 Kb *DNA ladder*, Promega, Madison, Wi., EE.UU.) y la cuantificación y pureza fue determinada mediante espectrofotometría (Espectrofotómetro 6405 UV/Vis, Jenway, Gransmore Green, Inglaterra).

6.4.2 Inyección de moscas con ARNdc. Se inyectaron grupos de 100 hembras de *H. irritans* parcialmente alimentadas con aproximadamente 0.1 μ l de ARNdc ($1 \times 10^9 - 1 \times 10^{11}$ moléculas por μ l). La inyección de moscas hembras se realizó de la siguiente manera: las moscas fueron anestesiadas en cámara de CO₂ para facilitar su manipulación, se seleccionaron 100 hembras y se colocaron en cámara húmeda. Posteriormente, las moscas hembras se colocaron sobre la cámara de CO₂ y se inyectó en la región inferior de la superficie ventral del segmento abdominal. Para las inyecciones se utilizaron jeringas Hamilton de 1.33 pulgadas de largo. Los grupos testigo fueron inyectados con ARNdc de un organismo no relacionado o con solución tampón de elución (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7; Cuadro 1). Las moscas fueron mantenidas en cámara húmeda durante una hora y posteriormente trasladadas a jaulas de aluminio con malla de 40 x 50 cm junto con 100 machos, se alimentaron dos veces al día utilizando trozos de algodón de 15 cm impregnados con sangre fresca de bovino desfibrinada. Se mantuvieron bajo un fotoperiodo de 12 hr de luz y 12 hr de oscuridad, a 28-32 °C de temperatura y 70-80% de humedad.

Se realizaron 2 experimentos de iARN con cada uno de los 9 grupos seleccionados de acuerdo a la función putativa, incluyendo dos grupos testigos negativos (solución tampón de elución y ARNdc no relacionado). El efecto de la iARN en *H. irritans* se evaluó determinando la mortalidad a las 12, 24 y 36 h post inyección (hpi). Las curvas de sobrevivencia (tasas temporales de

mortalidad) fueron comparadas entre tratamientos y los controles utilizando el análisis de regresión de Cox (SPSS Inc., Chicago, Il, EE. UU.). La oviposición (número de huevos por mosca sobreviviente) también se evaluó y los resultados de los grupos inyectados con ARNdc y el del testigo con solución tampón de elución se compararon con el grupo con ARNdc no relacionado mediante la prueba de *t-Student* ($P=0.05$). El silenciamiento de los genes se evaluó mediante RT-PCR en tiempo real.

6.4.3 Confirmación de la expresión de genes después de la iARN. La expresión de genes implicados en las funciones biológicas que permiten la sobrevivencia y reproducción de *H. irritans* fue evaluado en 4 moscas por cada tiempo a las 6, 12, 36 o 24 hpi mediante RT-PCR en tiempo real. El intestino de cada mosca se obtuvo individualmente por disección de la siguiente manera: la mosca fue inmovilizada a -20°C durante 5 minutos para facilitar su manipulación, se colocó sobre un portaobjetos con una gota de PBS (amortiguador salino de fosfatos) estéril y su manejo se hizo bajo un microscopio estereoscópico (Leica EZ4, Heerbrugg, Suiza). El intestino fue lavado en PBS y colocado inmediatamente en tubos de microcentrifuga que contenían ARN later (Ambion, Austin, Tx., EE. UU.).

El aislamiento de ARN se realizó con TriReagent (Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y el precipitado final fué resuspendido en $50\mu\text{l}$ de agua libre de nucleasas (Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.).

Dos oligonucleótidos fueron diseñados con base en las secuencias de los unigenes de los grupos de ADNc seleccionados utilizando el software diseñador de oligonucleótidos Primer3plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>). El ARN fue analizado por transcripción de los genes blanco mediante RT-PCR en tiempo real utilizando oligonucleótidos específicos para cada unigen de los grupos de ADNc experimentales (Cuadro 2). Para las reacciones de RT-PCR en tiempo real se utilizó el *kit iScript One-Step RT-PCR* con *SYBR Green* en un termociclador iQ5 (Bio-Rad, Hercules,

Ca, EE. UU.), de acuerdo a las especificaciones del fabricante; en una mezcla de reacción de 25 μ l.

Cuadro 2. Juegos de oligonucleótidos y condiciones para RT-PCR en tiempo real utilizados para el análisis de los ESTs de *H. irritans* seleccionados.

ID Unigen (número de acceso al banco de genes)	Descripción del Gen	Secuencias de oligonucleótidos F/R (5'-3')	Condición para PCR
13_D07 (HO000820)	5'-nucleotidasa	AGTGGACAAATGTCCCGAAG AGCATTGGGGTTTGAATGAG	55°C, 30 s
6_F11 (HO000609)	Proteína inmunomoduladora de células T	CCGGTGACTTTGATGGAGAT GATAATGGCTCCCCTTTGGT	"
10_G05 (HO000738)	Inhibidor de ARNasa L	GCCGATCGTGTTATTGTCCT CCGGATCGTTTTTGTTCAGT	"
7_A04 (HO000619)	Subunidad beta del proteasoma	CAGGCGAGGTCCATTATTGT AGTGCGCGACCTCAAGTAGT	"
12_H09 (HO000808)	Proteína de maduración del proteasoma	GAGGAATCGTGAGGGTTTGA ACATGGGGTTGTCGGATAAA	"
7_F08 (HO000644)	Subunidad d de la vATPasa	TGTTTTTCCGTCACCAGTCA GGCACAAACCCCTCCAAGTAA	60°C, 30 s
9_A08 (HO000679)	Subunidad f de la vATPasa	TGTTGGATTCTTGCTTGGTG GGCACTGGTGATGTATGTGC	"
17_H03 (HO001053)	Subunidad proteolipídica de la vATPasa	GTCCAGCCAGACTGTGATGA AATCAATCGCGGACAAAAAC	"
26 (HO004524)	Cadena ligera de la ferritina	TGATCATGTTGAACCCGAGA CGGCTGGTCAATTTCTTGAT	"
154 (HO004652)	Cadena pesada de la ferritina	GTTGTTGCCCTGCTGTATT TGAAAAGTGGGCTCCCATAG	"
84 (HO004582)	Proteína ligasa de ubiquitina	TCGCATCTGTTTGGATGTGT CGGGAAAACTTTTGAGTCCA	"
146 (HO004644)	Familia de la ubiquitina (ubq-1)	CCCGACCAACAACGTTTAAAT CGACGAAGACGGTGAATTTT	"
4_E04 (HO000538)	Hidrolasa carboxyterminal de ubiquitina	AGCCAGAGATGTTGGAATGG TCGATGTAAATTGCCGCATA	"
7 (HO004505)	Vitelogenina 3	GAGCTTTTTGCGTTGTAGCC ACAAAAGTGGGAGCAACACC	"
20 (HO004518)	Vitelogenina 1	GAGCTTTTTGCGTTGTAGCC ACAAAAGTGGGAGCAACACC	"
76 (HO004574)	Vitelogenina 2	ACGGCCGGTTGTGAGATTAT AGCATCTTTTTCGGTCTTGC	"
2_B12 (HO000479)	Inhibidor de elastasa	CAAGGGTGAATGGGAAAAGA TAAAGGCCTTCACGTTCTG	"
90 (HO004588)	Serin proteasa, tripsina específica de intestino medio	TGCGTTATATTCCGTTGGTG CTTTGTCAACGGCATAAGCA	"
230 (HO004728)	Serin proteasa	TGGCTACAATGAATGCAAGC GGTTAGCACCAGGGAACGTA	"
(FJ025436)	<i>H. irritans</i> 16S ARNr	TTTAAATGGCCGCAGTATCC GATTTATAGGGTCTTCTCGTCTTTT	"

Al final de la reacción de amplificación, se corrió una curva de disociación para asegurar que solamente se formó un amplicon y fue consistentemente desnaturalizado en el mismo rango de temperatura para cada muestra (Ririe *et al.*, 1997). Los testigos negativos incluyeron reacciones sin ARN. Los niveles de ARNm se normalizaron contra ARNr 16S de *H. irritans* (Cuadro 2) utilizando el método comparativo genNorm (Método ddCT implementado por Bio-Rad iQ5 Standard edition 2.0)(Livak y Schmittgen, 2001). Se compararon los niveles de ARNm de los grupos seleccionados y la solución tampón de elución contra el testigo negativo (ARNdc no relacionado), utilizando la media de los valores y los valores normalizados Ct mediante la prueba de *t-student* ($p=0.05$).

6.5 Expresión de genes seleccionados en diferentes estadios evolutivos y tejidos

El análisis funcional de los genes seleccionados evidenció algunos genes implicados en las funciones biológicas que permiten la sobrevivencia y reproducción de *H. irritans*. La expresión de algunos de estos genes (Cuadro 3) fue evaluada en los diferentes estadios del desarrollo: huevo, larva, pupa, adulto hembra y macho; y en diferentes tejidos: glándulas salivales, intestino medio y túbulos de Malpighi.

Los grupos de huevos, larvas, pupas, adultos machos y hembras, se obtuvieron de la colonia de laboratorio. Los huevos, larvas y pupas fueron macerados en grupos de 10 en morteros a -80°C con *TriReagent* (Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.) y colocados en tubos de microcentrifuga para la extracción inmediata de ARN, de acuerdo con las instrucciones del fabricante y el precipitado final se resuspendió en $50\mu\text{l}$ de agua libre de nucleasas (Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.).

Los órganos de moscas adultas se obtuvieron por disección de la siguiente manera: las moscas fueron anestesiadas a -20°C durante 5 minutos para facilitar su manipulación. Posteriormente, los insectos se colocaron sobre un portaobjetos con una gota de PBS (amortiguador salino de fosfatos) estéril y su

manejo se hizo bajo un microscopio estereoscópico para realizar el aislamiento de los órganos internos (glándulas salivales, intestino medio y túbulos de Malpighi). Los órganos fueron colocados inmediatamente en tubos de microcentrifuga que contenían nueve volúmenes de *TriReagent* (Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.) por un volumen de tejido para la extracción inmediata de ARN, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El precipitado final se resuspendió en 50 μ l de agua libre de nucleasas (Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.).

Los niveles de expresión de los genes seleccionados en los diferentes tejidos y estadios de *H. irritans* se realizó mediante RT-PCR en tiempo real utilizando oligonucleótidos específicos para cada secuencia (Cuadro 3), el *kit iScript One-Step RT-PCR* con *SYBR Green* y el termociclador iQ5 (Bio-Rad, Hercules, Ca, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los niveles de ARNm se normalizaron contra ARNr 16S de *H. irritans* (Cuadro 2) utilizando el método comparativo genNorm (ddCT method implementado por Bio-Rad iQ5 Standard edition 2.0)(Livak y Schmittgen, 2001).

Cuadro 3. Juegos de oligonucleotidos y condiciones para RT-PCR en tiempo real utilizados para el análisis de la expresión en diferentes estadios evolutivos y tejidos, así como la variabilidad genética en diferentes poblaciones de *H. irritans*.

ID Unigen(número de acceso al banco de genes)	Descripción del Gen	Secuencias de oligonucleótidos F/R (5'-3')	Condicion para PCR
12_H09 (HO000808)	Proteína de maduración del proteasoma	CTGCGAGATTCCGAGGCTAA TCCTCCATCATGCGGCTAGA	55°C,30 s
7_A04 (HO000619)	Subunidad beta del proteasoma	GTCACTCCGGTACATACGG GTGTCGGCAGCAACCATAAC	“
10_G05 (HO000738)	Inhibidor de ARNasa L	GCCAACCTTCGGTTCAGACT TGTTGATGCGAGGCCTGAAA	“
6_F11 (HO000609)	Proteína inmunomoduladora de células T	GCTGAAAACCAAAGGGGAGC TTGTGGGTGGAATCGGGTTT	“

6.6 Polimorfismo de genes seleccionados en diferentes poblaciones de *H. irritans*

Los estudios de variabilidad génica de *H. irritans* se realizaron con especímenes colectados de poblaciones procedentes de diversas localidades de México (Tamaulipas, Veracruz, Hidalgo, Yucatán y Nayarit) así como de Sacramento, Brasil y del INTA, Rafaela, Argentina, conservadas para su transportación en alcohol al 70%. Los órganos de moscas adultas se obtuvieron por disección bajo un microscopio estereoscópico (Leica EZ4, Heerbrugg, Suiza), colocando las moscas sobre un portaobjetos. De cada mosca se extrajo el intestino y se colocó inmediatamente en tubos de microcentrifuga que contenían nueve volúmenes de *TriReagent* (Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.) por un volumen de tejido para la extracción inmediata de ARN, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El precipitado final se resuspendió en 50 μ l de agua libre de nucleasas (Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.).

6.6.1 Amplificación y clonado del ADNc de los genes seleccionados.

Para la amplificación de los genes seleccionados en las poblaciones de *H. irritans* procedentes de las diferentes localidades se utilizaron los oligonucleótidos especificados en el Cuadro 3 y el *kit Access RT-PCR* (Promega, Madison, Wi., EUA), en una mezcla de 50 μ l de reacción.

El ADNc obtenido fue clonado utilizando el kit de clonación *pGem-T easy Vector* (Promega, Madison, Wi., EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante; en 10 μ l de reacción (1.0 μ l ADNc, 500 ng/ml Vector), la mezcla fue incubada a temperatura ambiente durante la noche. Para la transformación del ADNc se utilizaron 50 μ l de células competentes (*Escherichia coli* JM109) a las cuales se les adicionó 1 μ l de los productos de ligación, se mezcló gentilmente y se incubó durante 20 min a 4°C. Posteriormente las células fueron sometidas a choque térmico 42°C, 50 s y 4°C por 2 min. Las células *E. coli* JM109 se transfirieron al medio líquido de Luria-Bertani (LB) con 100 μ g/ml de ampicilina y la mezcla se incubó durante 1.5 h a 37°C con agitación (<150 rpm). Transcurridas las 1.5 h se tomaron 100 μ l de las células, las cuales se

inocularon en placas de 15 cm con medio sólido de LB (AMP/IPTG/x-gal), continuándose la incubación durante 16-24h a 37°C; para inducir la expresión de los plásmidos recombinantes. Para determinar la presencia del inserto de ADNc, se seleccionaron las clonas transformadas y se llevó a cabo la extracción de ADN plasmídico utilizando el kit de purificación de *ADN Wizard Plus Minipreps* (Promega, Madison, Wi., EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos de los genes seleccionados fueron amplificados por PCR utilizando los oligonucleótidos específicos para cada gen (Cuadro 3), el *PCR Master Mix System* (Promega, Madison, Wi., EE.UU.), en una mezcla de 25 μ l de reacción conteniendo 1 μ l de ADNc en un termociclador (2720 Applied Biosystems, Foster City, Ca, EE. UU.). Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% para checar el tamaño de los fragmentos amplificados en comparación con un marcador de peso molecular (1 Kb *DNA ladder*, Promega, Madison, Wi., EE.UU.). La cuantificación y pureza fue determinada mediante espectrofotometría (Espectrofotómetro *NanoDrop 2000c UV/Vis*, Thermo, Wilmington, De., EE. UU.).

6.6.2 Análisis bioinformático de las secuencias de ADNc de los genes seleccionados. A partir del ADN plasmídico purificado, se secuenciaron dos clonas de cada uno de los genes en un volumen final de 16 μ l (600 ng/ μ l), en la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El alineamiento de secuencias múltiples se realizó con el programa *AlignX* (Vector NTI Suite V 5.5, InforMax, North Bethesda, Md, EE. UU.). Las secuencias de los genes seleccionados fueron comparadas entre las diferentes poblaciones y las de la colonia de laboratorio para determinar variaciones en las secuencias.

6.7 Prevalencia de patógenos en *H. irritans*

El análisis bioinformático de la biblioteca de ADNc permitió detectar ESTs de patógenos, por lo tanto, se determinó la prevalencia de ARN de patógenos en

moscas *H. irritans* provenientes de la colonia de laboratorio mediante el análisis de los niveles de ARNm del agente infeccioso. Se obtuvieron 32 moscas parcialmente alimentadas con sangre fresca desfibrinada de bovino. Adicionalmente y para comprobar la presencia de ARN de patógenos se colectaron 10 moscas *H. irritans* de un hato libre de tuberculosis en un rancho de Tamaulipas.

Los órganos de moscas hembras adultas se obtuvieron por disección de la siguiente manera: las moscas fueron inmovilizadas mediante una temperatura de -20°C durante 5 minutos para facilitar la manipulación e identificación de las hembras. Posteriormente, las moscas se colocaron sobre un portaobjetos con una gota de PBS (amortiguador salino de fosfatos) estéril y se realizó la extracción del intestino bajo un microscopio estereoscópico (Leica EZ4, Heerbrugg, Suiza). Cada intestino fue lavado en PBS y colocado inmediatamente en tubos de microcentrifuga con nueve volúmenes de *TriReagent* (Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.) por un volumen de tejido para la extracción inmediata de ARN, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El precipitado final se resuspendió en 25µl de agua libre de nucleasas (Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.) y se mantuvo a -20°C hasta su uso.

Los niveles de expresión de los ARNm del agente infeccioso en las moscas hembras *H. irritans* se realizó mediante RT-PCR en tiempo real utilizando los oligonucleótidos especificados en el Cuadro 4, el *kit iScript One-Step RT-PCR* con SYBR Green y el termociclador iQ5 (Bio-Rad, Hercules, Ca, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los niveles de ARNm se normalizaron contra ARNr 16S de *H. irritans* (Cuadro 2) utilizando el método comparativo genNorm (*ddCT method* implementado por Bio-Rad iQ5 *Standard edition 2.0*) (Livak y Schmittgen, 2001). Se seleccionaron amplicones aleatoriamente para ser clonados y secuenciados y de esta manera corroborar los resultados de la RT-PCR.

Cuadro 4. Juegos de oligonucleótidos y condiciones para RT-PCR en tiempo real utilizados para el análisis de los transcritos de microorganismos en *H. irritans*

Descripción de la secuencia	Secuencias de oligonucleótidos F/R (5'-3')	Condiciones para PCR
virus <i>Nora</i>	CTAGTCATCCCGCTTGGTGT CTACAGCTGGTGCAGCAAAA	40°C, 30 s
<i>Wolbachia endosymbionte</i>	TGTTATCGGGGTGTTCCCTA GGCAGACTGCATTTTCCAAT	60°C, 30 s
<i>M. bovis gyrB</i>	GTTGACCCCGTCTTCTTGGT CTCGAAGTCGAGATCAAACG	“
<i>M. bovis gyrB</i>	CGAAACCACGGAATACGACT AGTGAAAGGTGCGGCTCTTA	“

7. RESULTADOS

7.1 Construcción de una biblioteca de ADNc de *H. irritans*

Se construyó una biblioteca de ADNc de *H. irritans* a partir de ARN de intestino de moscas parcialmente alimentadas procedentes de la colonia implementada en el laboratorio de parasitología de la FMVZ de la UAT. La biblioteca posee 1.02×10^6 clonas independientes, el 93% de clonas recombinantes con el inserto (Figura 6A) y resistencia a ampicilina. El tamaño promedio de los ADNc es $>500\text{pb}$ (0.5 a 1Kb), (Figura 6B).

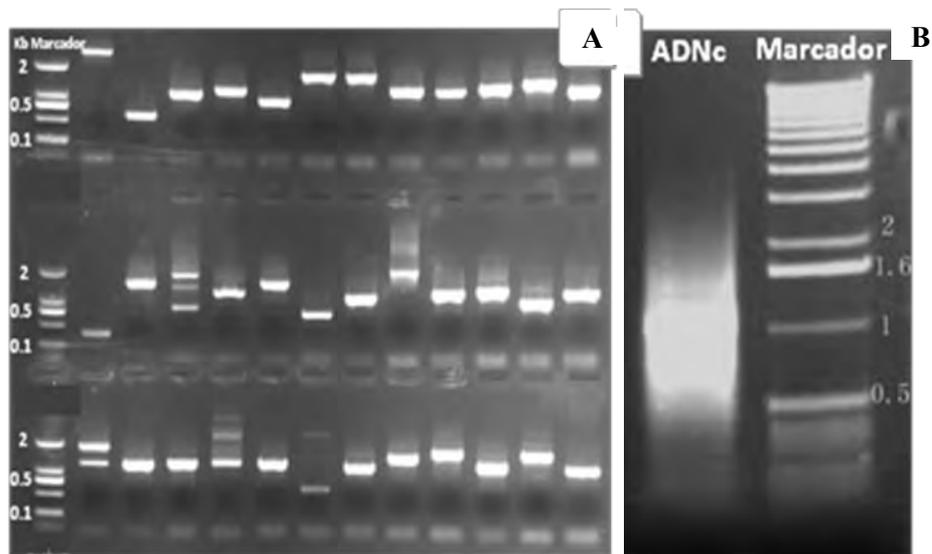


Figura 6. ADNc de la biblioteca de *H. irritans*. A) Gel de electroforesis de 5 µl de ADNc de la biblioteca; muestra que la mayor parte de los ARNm de *H. irritans* se encuentran entre 1 y 0.5 Kb. B) Gel de electroforesis de ADNc correspondiente a 36 colonias, se muestra que todas contenían el inserto.

7.2 Análisis bioinformático de secuencias de ADNc

Una vez generada la biblioteca de ADNc, se secuenció y analizó 2,462 ESTs. El análisis de las secuencias muestra 302 ESTs de baja calidad y los restantes 2,160 de alta calidad, no se tienen ESTs del vector o sin sentido (Cuadro 5). Se cuantificó la distribución de ESTs contiguos para determinar el nivel de redundancia de la base de ESTs generada. Los ESTs de alta calidad se ensamblaron en 992 unigenes (178 contiguos y 815 individuales) (Cuadro

5), lo cual representa el 46% de novedad (unigenes/ESTs ensamblados) en la base de datos generada. Los ESTs individuales (814) representan el 82% de todos los unigenes, mientras que 72 unigenes (7%) contienen solamente dos ESTs. El promedio de ESTs por unigen fué de 2.2, lo cual sugiere una baja diversidad en la base de datos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Estadísticas del ensamblado de EST de *H. irritans*.

Número de secuencias	2,462
Longitud promedio \pm D.E. antes de la extracción del vector	877 \pm 44 bp
Longitud promedio \pm D.E. después de la extracción del vector	653 \pm 32 bp
ESTs de alta calidad	2,160
ESTs ensamblados	2,160
Unigenes	992
Longitud promedio \pm D.E	758 \pm 46 bp
Unigenes con más de 20 ESTs	13
Unigenes con 5 a 20 ESTs	44
Unigenes con menos de 5 ESTs	935
ESTs contiguos	178
ESTs individuales	814
Nuevos (unigenes/ESTs ensamblados)	46%
Redundancia (1-Relevancia)	54%

La búsqueda (BLAST) de secuencias en las bases de datos de genes y proteínas (NCBI nr/nt) mostró un conjunto relativamente grande de unigenes, 449 que representan el 45% del total analizado, carentes de similitud (Blast E values $>$ 10^{-5}) con cualquier secuencia disponible en las bases de datos públicas. Los 543 unigenes con similitud con las secuencias previamente publicadas, 88,8% mostraron similitud con dípteros (*Drosophila* spp.,

Haematobia irritans, *Musca domestica*, *Lucilia cuprina*, *Glossina* spp., *Stomoxys calcitrans*, *Aedes aegypti*, *Sarcophaga* spp., *Phlebotomus papatasi*, *Chrysomyia bezziana*, *Anopheles gambiae*, *Ceratitis stricta*, *Trichopalpus fraterna*, *Automola atomaria*, *Nanna tibiella*, *Bactrocera dorsalis*, *Lutzomyia longipalpis*, *Eristalinus punctulatus* y *Ophiomyia* sp.), 1,5% tuvieron similitud con otras especies de insectos (*Spodoptera frugiperda*, *Tribolium castaneum*, *Gryllus bimaculatus*, *Lonomia obliqua*, *Nasonia vitripennis*, *Lymantria dispar*), mientras que el 5,5% tuvieron similitud con otros organismos eucariotas y 4,2% con microorganismos (Cuadro 6).

La búsqueda (BLAST) en las bases de datos de genes y proteínas (SWISS-Prot y TrEMBL) arrojó la asignación de 367 unigenes a las funciones moleculares de Ontología Génica (OG; Figura 7), destacando con la mayor cantidad de los unigenes ensamblados el grupo funcional de serin proteasas 100 unigenes, que representan el 10% del total ensamblado, el cual contiene 25% de los ESTs (535). Otras de las funciones moleculares representadas en los unigenes, incluyen las implicadas en el metabolismo celular, la función mitocondrial, la transcripción y la traducción, el transporte, la estructura de la cromatina, la vitelogénesis, el citoesqueleto, la replicación del ADN, la respuesta celular al estrés y la infección, la proliferación celular y las interacciones célula-célula, el tráfico y la secreción intracelular, y el desarrollo (Figura 7). De los 367 unigenes asignados a las funciones moleculares de OG, 184 se agruparon en Conjuntos de Grupos Ortólogos de proteínas (CGO; Figura 8), destacandose el CGO que comprende la modificación postraduccional, el recambio de proteínas y chaperonas, que contiene el 40% de las proteínas asignadas a CGO, seguido por el de la traducción, la estructura ribosomal y biogénesis (17%) y el de la producción y conversión energética (12%; Figura 8). El hecho de que trece unigenes ensamblados a partir de 505 secuencias leídas, contienen más de 20 ESTs, muy probablemente están representando las transcripciones con mayor abundancia en los tejidos abdominales de moscas *H. irritans* hembras parcialmente alimentadas.

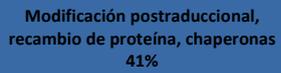
En el Cuadro 7 se representan las transcripciones con mayor abundancia en los tejidos abdominales de moscas *H. irritans* hembras parcialmente alimentadas, como era de esperarse, a partir de los resultados de la anotación de todo el conjunto de datos de ESTs, 10 (77%) de estos unigenes correspondió a las serin proteasas. El segundo grupo más grande de ESTs se deriva de las transcripciones mitocondriales. El análisis de las secuencias de los unigenes de serin proteasas mostraron que, aunque algunos de ellos pueden ser parálogos (*i.e.* unigenes 1-2 y 3-5), otros probablemente reflejan polimorfismos de la secuencia dentro de la población de moscas *H. irritans* porque tienen una identidad de secuencia de nucleótidos del 97-98% (*i.e.* unigenes 3-5).

Cuadro 6. Distribución de unigenes encontrados en otras especies

Especies	No. Total de unigenes	Proporción (%)
Todos los organismos	543	100
Insectos (Diptera)	482	88.8
<i>Drosophila</i> spp.	289	53.2
<i>Haematobia irritans</i>	89	16.4
<i>Musca domestica</i>	22	4.0
<i>Lucilia cuprina</i>	16	2.9
<i>Glossina</i> spp.	15	2.8
<i>Stomoxys calcitrans</i>	14	2.6
<i>Aedes aegypti</i>	11	2.0
<i>Sarcophaga</i> spp.	9	1.7
<i>Phlebotomus papatasi</i>	3	0.6
<i>Chrysomyia bezziana</i>	3	0.6
<i>Anopheles gambiae</i>	3	0.6
<i>Ceratitis stricta</i>	1	0.2
<i>Trichopalpus fraterna</i>	1	0.2
<i>Automola atomaria</i>	1	0.2
<i>Nanna tibiella</i>	1	0.2
<i>Bactrocera dorsalis</i>	1	0.2
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	1	0.2
<i>Eristalinus punctulatus</i>	1	0.2
<i>Ophiomyia</i> sp.	1	0.2
Insectos (Otros)	8	1.5
<i>Tribolium castaneum</i>	2	0.4
<i>Gryllus bimaculatus</i>	2	0.4
<i>Spodoptera frugiperda</i>	1	0.2
<i>Lonomia obliqua</i>	1	0.2
<i>Nasonia vitripennis</i>	1	0.2
<i>Lymantria dispar</i>	1	0.2
Otros eucariotas	30	5.5
Microorganismos	23	4.2

Más del 90% de las mejores comparaciones coinciden con insectos. Menos del 10% coinciden con otros eucariotas y microorganismos.

Figura 7. Grupos de EST de acuerdo a la función molecular de Ontología Génica asignada. Se observa la variedad de funciones y la cantidad de unigenes en cada grupo. La mayor parte de unigenes corresponden a la función de serin proteasas.



Modificación postraducciona,
recambio de proteína, chaperonas
41%

Figura 8. Grupos de EST asignados a funciones de Ontología Génica, que pudieron ser asignados a Conjuntos de Grupos Ortólogos. Se observa el porcentaje correspondiente a cada función. Existe un mayor porcentaje de ESTs asignados a la función de modificación postraducciona, recambio de proteína y chaperonas.

Cuadro 7. Transcritos con mayor abundancia en tejidos abdominales de moscas *H. irritans* hembras parcialmente alimentadas.

No. de unigen [No. de acceso al banco de genes]	No. de ESTs	Registro del unigen		
		Identidad de secuencia	Conjuntos de Grupos Ortólogos de proteínas (CGO)	Función Molecular de Ontología Génica (OG)
1 [HO004732]	21	<i>L. cuprina</i> clon sbsp9 serin proteasa	Modificación postraducciona, recambio proteico, chaperonas	Tripsina Secretada similar a serin proteasa
2 [HO004733]	21	<i>L. cuprina</i> clon sbsp9 serin proteasa	Modificación postraducciona, recambio proteico, chaperonas	Tripsina Secretada similar a serin proteasa
3 [HO004734]	22	<i>H. irritans</i> serin proteasa	Modificación postraducciona, recambio proteico, chaperonas	Tripsina Secretada similar a serin proteasa
4 [HO004735]	25	<i>H. irritans</i> serin proteasa	Modificación postraducciona, recambio proteico, chaperonas	Tripsina Secretada similar a serin proteasa
5 [HO004736]	25	<i>H. irritans</i> serin proteasa	Modificación postraducciona, recambio proteico, chaperonas	Tripsina Secretada similar a serin proteasa
6 [HO004737]	26	<i>D. pseudoobscura</i> GA21163-PA (Dps\ GA21163)	Transporte de aminoácidos y metabolismo	Zinc carboxipeptidasa
7 [HO004738]	28	<i>H. irritans</i> serin proteasa ARNm	Modificación postraducciona, recambio proteico, chaperonas	Tripsina Secretada similar a serin proteasa
8 [HO004739]	30	<i>L. cuprina</i> clon sbsp9 serin proteasa	Modificación postraducciona, recambio proteico, chaperonas	Tripsina Secretada similar a serin proteasa
9 [HO004740]	33	<i>H. irritans</i> serin proteasa	Modificación postraducciona, recambio proteico, chaperonas	Tripsina Secretada similar a serin proteasa
10 [HO004741]	37	<i>H. irritans</i> mitocondria, genoma completo	Transporte de aminoácidos y metabolismo	Mitocondria
11 [HO004742]	40	<i>H. irritans</i> serin proteasa	Modificación postraducciona, recambio proteico, chaperonas	Tripsina Secretada similar a serin proteasa
12 [HO004743]	90	<i>H. irritans</i> serin proteasa	Modificación postraducciona, recambio proteico, chaperonas	Tripsina Secretada similar a serin proteasa
13 [HO004744]	107	<i>H. irritans</i> mitocondria, genoma completo		Mitocondria

7.3 Caracterización funcional de ARNdc (ESTs) de *H. irritans* mediante iARN

A partir de los resultados obtenidos del análisis bioinformático y la asignación de las funciones moleculares se seleccionaron los grupos funcionales de unigenes a caracterizar mediante iARN que se observan en el Cuadro 1. Estos grupos incluyen ESTs de serin proteasas, inhibidores de proteasas, vitelogenina (VTG), ubiquitinación, ferritina (FER), (H⁺)-ATPasa vacuolar (vATPasa), componentes del proteasoma, respuesta inmune y 5'-nucleotidasa (5'-NUC). Como ARNdc testigo se utilizaron ESTs de identidad con el virus Nora y la bacteria *Wolbachia endosymbionte*. La inyección de este ARNdc testigo, no afectó la mortalidad ($b = -0,01$, Wald Chi² = 0,01, $p = 0,91$) ni la oviposición ($P > 0,05$) en comparación con las inyectadas con solución tampón de elución, en 14 experimentos independientes de iARN en *H. irritans* (Cuadro 9), lo cual apoya su utilización como grupo testigo en estos experimentos.

En el Cuadro 8 se muestran los resultados obtenidos de la evaluación del silenciamiento génico mediante RT-PCR en tiempo real, observando que se obtuvo silenciamiento específico por lo menos para una secuencia del unigen en cada grupo funcional experimental, excepto para el grupo de las serin proteasas, donde no se obtuvo silenciamiento para cualquiera de los unigenes incluidos en el análisis (grupo 1). En algunas de las secuencias, el silenciamiento génico se observó a las 6 h después de la inyección (hpi) y con duración de por lo menos hasta las 36 hpi. Para las secuencias de los grupos 8 y 9, el silenciamiento del gen no fue detectado hasta después de las 12 hpi. En la mayoría de los casos, el silenciamiento de la expresión génica fue superior al 70% en comparación con el grupo testigo.

Además se analizó la expresión de genes a los que no estaba dirigido el ARNdc inyectado, para analizar los efectos no específicos de la iARN, a las 12 hpi en los grupos funcionales del 7 al 9. En la Figura 9 se muestran los resultados de el silenciamiento de los genes en los tres grupos analizados, lo que sugiere efectos inespecíficos de la iARN en moscas *H. irritans*. El

alineamiento de secuencias pareadas (Pairwise) permitió la identificación de regiones con homología ≥ 11 pb en algunas de las secuencias, ver Figura 10. Sin embargo, sólo una región tenía una homología de 21 pb entre las secuencias de los unigenes: 13_D07 y 7_A04 (Figura 10).

En el Cuadro 9 se puede observar el efecto biológico del silenciamiento génico mediante iARN, se demostró que: la inyección de moscas *H. irritans* hembras con ARNdc de los grupos funcionales de serin proteasas y ubiquitina no mostró efecto en la mortalidad ($b = 0.09$, Wald $\chi^2 = 2.68$, $P = 0.10$ y $b = 0.07$, Wald $\chi^2 = 3.60$, $P = 0.08$, respectivamente) o la oviposición ($P > 0,05$) en comparación con el grupo testigo, el silenciamiento del gen inhibidor de proteasas (elastasa) produjo una alta mortalidad ($b = 0,60$, Wald $\chi^2 = 13.35$, $P = 0,0002$), pero sin efecto en la oviposición ($P > 0,05$) en comparación con el grupo testigo y que el silenciamiento de los genes VTG-2 y componentes del proteasoma no mostró efecto en la mortalidad ($b = 0,03$, Wald $\chi^2 = 1,42$, $P = 0,22$ y $b = 0,13$, Wald $\chi^2 = 2,59$, $p = 0,107$, respectivamente), pero redujo significativamente ($P < 0,005$) la oviposición. Cuando la expresión de los genes de respuesta inmune y 5'-NUC fue silenciado en las moscas *H. irritans* hembras se obtuvo alta mortalidad ($b = -0,46$, Wald $\chi^2 = 7,39$, $P = 0,006$ y $b = 0,35$, Wald $\chi^2 = 4,65$, $P = 0,03$, respectivamente) y reducción de la oviposición ($P < 0,005$) cuando se comparó con el grupo testigo. Obteniendo un resultado interesante en el silenciamiento de los genes de la cadena ligera FER y de la vATPasa, los cuales mostraron una mortalidad de moscas más baja ($b = 0,21$, Wald $\chi^2 = 5,12$, $P = 0,02$ y $b = -0,16$, Wald $\chi^2 = 14.70$, $P = 0,0001$, respectivamente), y una disminución de 6 y 16 veces la oviposición ($P < 0,005$) en comparación con el grupo testigo.

Cuadro 8. Evaluación del silenciamiento de genes mediante RT-PCR en tiempo real, posterior a la iARN.

No grupo ^a	Expresión del gen silenciado (promedio%±SD) con respecto al grupo testigo ^b				ARNdc inyectado ^c
	6 hpi	12 hpi	24 hpi	36 hpi	
1 (Serin proteasa)	ND	ND	57±50 0±0	ND	90 230
2 (Inhibidor de proteasas)	ND	ND	83±3**	ND	2_B12
3 (Vitelogenina)	ND	ND	0±0 0±0 100±2*	ND	7 20 76
4 (Ubiquitinación)	ND	ND	92±6* 70±24 46±43	ND	84 146 4_E04
5 (Ferritina)	ND	ND	68±13* 86±86	ND	26 154
6 (vATPasa)	ND	ND	78±6* 100±1* 99±8*	ND	7_F08 9_A08 17_H03
7 (Componentes del protea soma)	98±2* 100±6*	100±2* 67±9*	ND ND	0±0 ND	7_A04 12_H09
8 (Respuesta inmune)	100±8* 0±0	92±5 0±0	ND ND	96±9* 98±8*	6_F11 10_G05
9 (5'-nucleotidasa)	0±0	98±9*	ND	70±7*	13_D07
10 (Testigo negativo)	---	---	---	---	191 2_E12
Solución tampón de elución	0±0	0±0	0±0	0±0	Ninguno

^aSe realizaron dos experimentos por cada uno de los grupos seleccionados 1-9. Para los grupos testigo negativo y solución tampón de elución se realizaron catorce experimentos. Se utilizaron cien moscas en cada experimento de iARN.

^bLos niveles de ARNm de los genes fueron determinados por RT-PCR en tiempo real en forma individual de 4 moscas para cada uno de los tiempos a las 6, 12 y 24 o 36 hpi. Los datos de los grupos 1-9 y los de la solución tampón de elución fueron comparados con el grupo 10 inyectado con ARNdc no relacionado mediante la prueba de t- Student (*P<0.05, **P<0.005). Abreviación: ND, no determinado.

^cLos números de acceso al banco de genes de los unigenes seleccionados para iARN se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 9. Resultados de los parámetros biológicos evaluados de la iARN en hembras de moscas *H. irritans*.

No grupo ^a	Porcentaje de mortalidad acumulado ^b			Oviposición (promedio±DS huevos/moscas sobrevivientes) ^c
	12 hpi	24 hpi	36 hpi	
1 (Serin proteasas)	57±6	69±11	78±2*	0.88±0.23
2 (Inhibidor de proteasas)	73±11*	84±7*	94±1*	2.56±1.80
3 (Vitelogenina)	55±11	67±8	74±8	0.31±0.9**
4 (Ubiquitinación)	42±12	67±11	83±16	0.64±0.63
5 (Ferritina)	24±23	39±37	47±41	0.22±0.17**
6 (vATPasa)	17±13*	24±11*	34±3*	0.08±0.05**
7 (Componentes del proteasoma)	64±3*	76±8*	84±11*	0.38±0.03**
8 (Respuesta inmune)	66±7*	ND	99±8*	0.23±0.09**
9 (5'-nucleotidasa)	50±11	ND	91±22*	0.12±0.09**
10 (Testigo negativo)	45±24	57±30	64±27	1.26±0.90
Solución tampón de elución	46±28	57±30	65±29	1.50±1.01

^aSe realizaron dos experimentos por cada grupo seleccionado. Para los grupos testigo negativo y solución tampón de elución se realizaron catorce experimentos. Se utilizaron cien moscas en cada experimento de iARN.

^bSe evaluó el porcentaje de mortalidad acumulado en hembras *H. irritans* a las 12, 24 y 36 hpi. Se compararon las curvas de sobrevivencia (tasa de mortalidad temporal) entre los diferentes tratamientos y el testigo utilizando el análisis de regresión de Cox (*P<0.05).

^cLos datos de oviposición de los grupos 1-9 y los de la solución tampón de elución fueron comparados con el grupo 10 inyectado con ARNdc no relacionado mediante la prueba de t- Student (*P<0.05, **P<0.005). Abreviación: ND, no determinado.

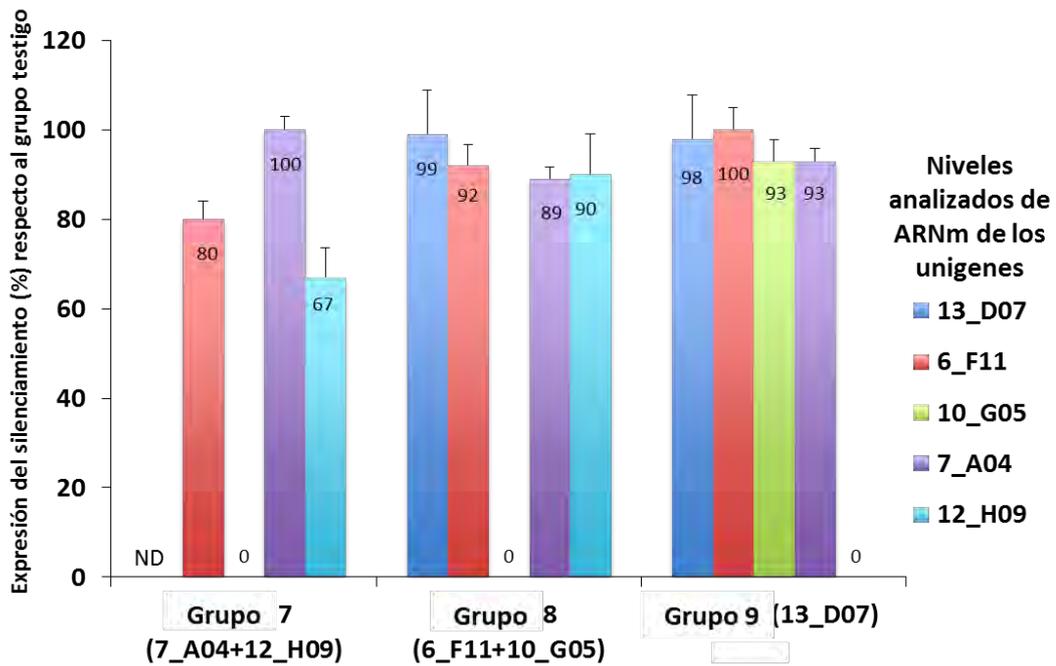


Figura 9. Análisis de efectos inespecíficos de la iARN en moscas *H. irritans* hembras. La expresión del silenciamiento génico (% promedio + DS) respecto al grupo testigo, se determinó mediante RT-PCR en tiempo real a las 12 hpi en moscas inyectadas (N=4) con diferente ARNdc en tres de los grupos funcionales caracterizados.

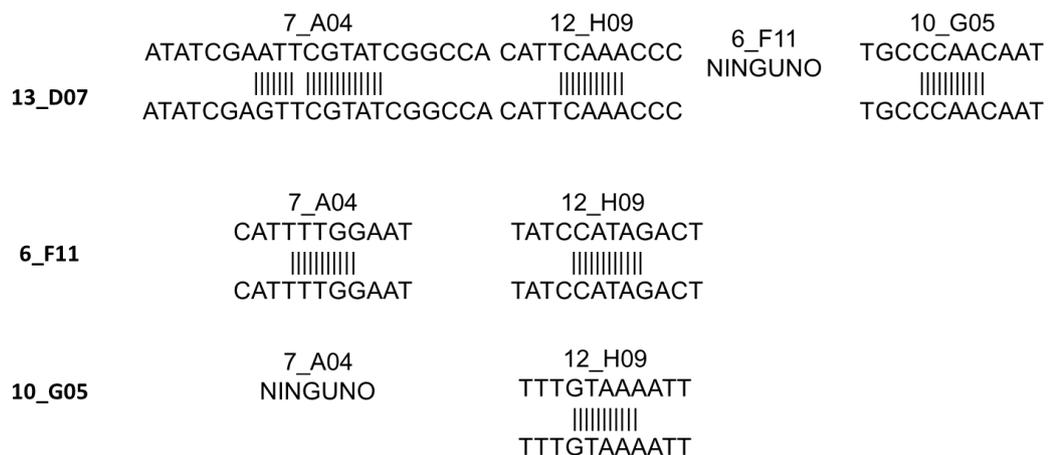


Figura 10. Alineamiento de secuencias pareadas de ARNdc, mostrando regiones homologas ≥ 11 nucleótidos. La alineación se realizó entre las secuencias utilizadas en el análisis de efectos inespecíficos descrito en la Figura 9. Abreviación ND, no determinado.

7.4 Expresión de genes seleccionados en diferentes estadios evolutivos y tejidos de *H. irritans*

Dados los resultados obtenidos de la caracterización de los grupos funcionales de unigenes mediante iARN y la evaluación del silenciamiento génico, se seleccionaron los unigenes que mostraron efecto sobre la mortalidad y oviposición de las moscas *H. irritans* hembras, para evaluar la expresión de estos en los diferentes estadios evolutivos: huevo, larva, adulto (hembra y macho); así como en diferentes tejidos: glándulas salivales, intestino medio y túbulos de Malpighi. Dentro de los grupos funcionales con efecto biológico seleccionados se encuentran los unigenes siguientes: 6_F11, proteína inmunomoduladora de células T (PIT), 10_G05, inhibidor de la ARNasa L (IAL), 7_A04, subunidad beta del proteasoma (P beta) y 12_H09, proteína de maduración del proteasoma (PMP). Se encontró que los cuatro unigenes seleccionados se expresaron en todos los estadios evolutivos y tejidos analizados (Figuras 11 y 12). Los niveles de expresión de los genes IAL y P beta en las etapas inmaduras de las moscas, disminuyeron conforme procede el desarrollo de huevos a pupas (Figura 12 B y C), mientras que para los genes PIT y PMP los niveles incrementaron de huevos a larvas (Figura 12 A y D), sin embargo los niveles de expresión de PIT mas bajos se obtuvieron en la etapa de pupas (Figura 12 A). En cuanto a los adultos, el comportamiento fué diferente; mientras que los niveles de expresión del gen IAL se mantuvo igual tanto en machos como hembras (Figura 12 B), los niveles de expresión de los genes restantes (PIT, P beta y PMP) fueron mayor en hembras que en machos (Figura 12 A, C y D). Los niveles de expresión de todos los genes analizados fueron menores en túbulos de Malpighi que en intestino medio y glándulas salivales (Figura 12), excepto para PIT donde los niveles de expresión en túbulos de Malpighi e intestino medio fueron iguales (Figura 12 A). Para los genes P beta y PMP los niveles de expresión en intestino y glándulas salivales fueron similares (Figura 12 C y D). Sin embargo, los niveles de expresión del gen PIT fueron mayores en glándulas salivales que en intestino medio (Figura 12 A), mientras que se observó lo contrario para el gen IAL (Figura 12 B).

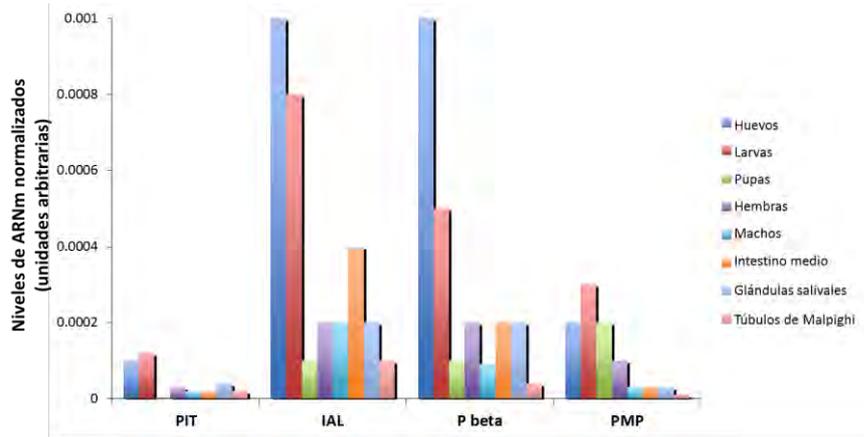


Figura 11. Análisis de la expresión de los genes proteína inmunomoduladora de células T (PIT), inhibidor de la ARNasa L (IAL), subunidad beta del proteasoma (P beta) y proteína de maduración del proteasoma (PMP) en diferentes estadios evolutivos y tejidos de moscas *H. irritans*, mediante RT-PCR en tiempo real. Se purificó y analizó el ARN total de huevos, larvas, pupas y adultos (machos y hembras); así como de glándulas salivales, intestino medio y túbulo de Malpighi. La amplificación fue normalizada utilizando el método comparativo genNorm contra ARNr 16S de *H. irritans*.

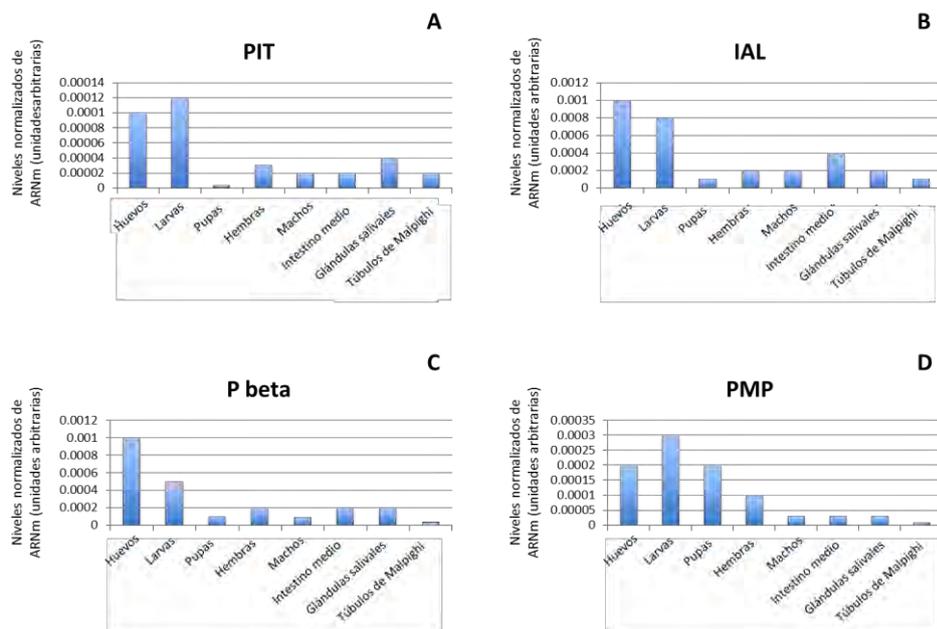


Figura 12. Análisis de la expresión de los genes proteína inmunomoduladora de células T (PIT), inhibidor de la ARNasa L (IAL), subunidad beta del proteasoma (P beta) y proteína de maduración del proteasoma (PMP) en diferentes estadios evolutivos y tejidos de moscas *H. irritans*, mediante RT-PCR en tiempo real. Se purificó y analizó el ARN total de huevos, larvas, pupas y adultos (machos y hembras); así como de glándulas salivales, intestino medio y túbulo de Malpighi. La

amplificación fue normalizada utilizando el método comparativo genNorm contra ARNr 16S de *H. irritans*.

7.5 Polimorfismo de genes seleccionados en diferentes poblaciones de *H. irritans*

El análisis de polimorfismo génico se llevó a cabo para las secuencias de los unigenes 6_F11, proteína inmunomoduladora de células T (PIT), 7_A04, subunidad beta del proteasoma (P beta) y 12_H09, proteína de maduración del proteasoma (PMP), en busca de polimorfismo génico en poblaciones de moscas *H. irritans* de México (Tamaulipas, Veracruz, Hidalgo, Yucatán y Nayarit), Sacramento, Brasil y del INTA, Rafaela, Argentina.

El análisis de polimorfismo génico demostró que los tres unigenes están conservados en las diferentes poblaciones de *H. irritans* analizadas, ya que mostraron una identidad del >97%, >96% y >92% para cada uno de los genes secuenciados PIT, P beta y PMP respectivamente. Sin embargo, el unigen de P beta, cuya secuencia fue altamente conservada, presentó la secuencia más divergente en la población procedente del INTA, Rafaela, Argentina con una inserción de tres nucleótidos y 4 cambios con respecto a las otras secuencias; mientras que para el unigen de la PMP, que presentó una secuencia conservada, la mayor divergencia se encontró en la secuencia de la población de Nayarit con 10 cambios con respecto a las otras. Además se encontró que las secuencias de las poblaciones mexicanas son muy similares a las secuencias de las moscas procedentes de Sacramento, Brasil.

H0000609: Proteína inmunomoduladora de células T (PIT)

Villa de Casas, Tamaulipas	TCCGGG TG AC TTTG ATG GAGATGCTTTAA TG GATG TTTTGG TTTC TCTTA 50
Yucatán	TCCGGG TG AC TTTG ATG GAGATGCTTTAA TG GATG TTTTGG TTTC TCTTA 50
Veracruz	TCCGGG TG AC TTTG ATG GAGATGCTTTAA TG GATG TTTTGG TTTC TCTTA 50
Nayarit	TCCGGG TG AC TTTG ATG GAGATGCTTTAA TG GATG TTTTGG TTTC TCTTA 50
Ciudad Victoria	TCCGGG TG AC TTTG ATG GAGATGCTTTAA TG GATG TTTTGG TTTC TCTTA 50
Hidalgo	TCCGGG TG AC TTTG ATG GAGATGCTTTAA TG GATG TTTTGG TTTC TCTTA 50

Villa de Casas, Tamaulipas	AGCCTAA TGG AAG CACAGACAATATATATAG TATTAC ATTAATTGGGGT 100
Yucatán	AGCCTAA TGG AAG CACAGACAATATATATAG TATTAC ATTAATTGGGGT 100
Veracruz	AGCCTAA TGG AAG CACAGACAATATATATAG TATTAC ATTAATTGGGGT 100
Nayarit	AGCCTAA TGG AAG CACAGACAATATATATAG TATTAC ATTAATTGGGGT 100
Cd. Victoria, Tamaulipas	AGCCTAA TGG AAG CACAGACAATATATATAG TATTAC ATTAATTGGGGT 100
Hidalgo	AGCCTAA TGG AAG CACAGACAATATATATAG TATTAC ATTAATTGGGGT 100

Villa de Casas, Tamaulipas	GGACCTGATGG TCAATTGTTCAAATGT TAAAGAGGAAACCTTTGCTGAA 150
Yucatán	GGACCTGATGG TCAATTGTTCAAATGT TAAAGAGGAAACCTTTGCTGAA 150
Veracruz	GGACCTGATGG TCAATTGTTCAAATGT TAAAGAGGAAACCTTTGCTGAA 150
Nayarit	GGACCTGATGG TCAATTGTTCAAATGT TAAAGAGGAAACCTTTGCTGAA 150
Cd. Victoria, Tamaulipas	GGACCTGATGG TCAATTGTTCAAATGT TAAAGAGGAAACCTTTGCTGAA 150
Hidalgo	GGACCTGATGG TCAATTGTTCAAATGT TAAAGAGGAAACCTTTGCTGAA 150

Villa de Casas, Tamaulipas	AACCAAAGGGGAGCCATTATCAATCACTAGTGAATTCGCG 190
Yucatán	AACCAAAGGGGAGCCATTATCAATCACTAGTGAATTCGCG 190
Veracruz	AACCAAAGGGGAGCCATTATCAATCACTAGTGAATTCGCG 190
Nayarit	AACCAAAGGGGAGCCATTATCAATCACTAGTGAATTCGCG 190
Cd. Victoria, Tamaulipas	AACCAAAGGGGAGCCATTATCAATCACTAGTGAATTCGCG 190
Hidalgo	AACCAAAGGGGAGCCATTATCAATCACTAGTGAATTCGCG 190

H0000808: Proteína de maduración del proteasoma (PMP)

Villa de Casas	GAGGAATC GTGAGG GTTTGAATG CTCTTTAAA AATGGCATGG AATTGC 50
Yucatán	GAGGAATC GTGAGG GTTTGAATG CTCTTTAAA AATGGCATGG AATTGC 50
Hidalgo	GAGGAATC GTGAGG GTTTGAATG CTCTTTAAA AATGGCATGG AATTGC 50
Brasil	GAGGAATC GTGAGG GTTTGAATG CTCTTTAAA AATGGCATGG AATTGC 50
Veracruz	GAGGAATC GTGAGG GTTTGAATG CTCTTTAAA AATGGCATGG AATTGC 50
Nayarit	GAGGAATC GTGAGG GTTTGAATG GTGGTTGGG ATGG CATGG AATTGC 50

Villa de Casas	ATGCTG CTAGACAAATTG GAGGTTTGGC ATTTTGGCAG TTAGCCG CATG 100
Yucatán	ATGCTG CTAGACAAATTG GAGGTTTGGC ATTTTGGCAG TTAGCCG CATG 100
Hidalgo	ATGCTG CTAGACAAATTG GAGGTTTGGC ATTTTGGCAG TTAGCCG CATG 100
Brasil	ATGCTG CTAGACAAATTG GAGGTTTGGC ATTTTGGCAG TTAGCCG CATG 100
Veracruz	ATGCTG CTAGACAAATTG GAGGTTTGGC ATTTTGGCAG TTAGCCG CATG 100
Nayarit	ATGCTG CTAGACAAATTG GAGGTTTGGC ATTTTGGCAG TTAGCCG CATG 100

H0000619: Subunidad beta del proteasoma (P beta)

Nayarit	CAGCGG AGGTCC ATTAATTGTCATGAAG GAAGATGAAAACAAAATAACAA 49
Brasil	CAGCGG AGGTCC ATTAATTGTCATGAAG GAAGATGAAAACAAAATAACAA 49
Villa de Casas	CAGCGG AGGTCC ATTAATTGTCATGAAG GAAGATGAAAACAAAATAACAA 49
Argentina	CAGCGG AGGTCC ATTAATTGTCATGAAG GAAGATGAAAACAAAATAACAA 49
Yucatán	CAGCGG GGCC CAATTAATTGTCACGCCAAATTTTGG AAAACAAAATAACAA 49

Nayarit	AGATTGC CGATAAC TTAATGTTTGCCTGTTATTGGC GAATC CGGCGATAC 98
Brasil	AGATTGC CGATAAC TTAATGTTTGCCTGTTATTGGC GAATC CGGCGATAC 98
Villa de Casas	AGATTGC CGATAAC TTAATGTTTGCCTGTTATTGGC GAATC CGGCGATAC 98
Argentina	AGATTGC CGATAAC TTAATGTTTGCCTGTTATTGGC GAATC CGGCGATAC 98
Yucatán	AGATTGC CGATAAC TTAATGTTTGCCTGTTATTGGC GAATC CGGCGATAC 98

Nayarit	AGTACAAATTTACGGAGTACATTTGCC AAAAATA TAGCCCTGTATAAAAAT 145
Brasil	AGTACAAATTTACGGAGTACATTTGCC AAAAATA TAGCCCTGTATAAAAAT 145
Villa de Casas	AGTACAAATTTACGGAGTACATTTGCC AAAAATA TAGCCCTGTATAAAAAT 145
Argentina	AGTACAAATTTACGGAGTACATTTGCC AAAAATA TAGCCCTGTATAAAAAT 145
Yucatán	AGTACAAATTTACGGAGTACATTTGCC AAAAATA TAGCCCTGTATAAAAAT 145

Nayarit	GCGCAATGGGTATG ATTTGAGTCTCAA—ATGTG CTGCGC CACTTCA 190
Brasil	GCGCAATGGGTATG ATTTGAGTCTCAA—ATGTG CTGCGC CACTTCA 190
Villa de Casas	GCGCAATGGGTATG ATTTGAGTCTCAA—ATGTG CTGCGC CACTTCA 190
Argentina	GCGCAATGGGTATG ATTTGAGTCTCAA—ATGTG CTGCGC CACTTCA 190
Yucatán	GCGCAATGGGTATG ATTTGAGTCTCAA—ATGTG CTGCGC CACTTCA 190

Nayarit	CTCGCAAAAATTTGG CTGACTACTTGAAGTCTGGC CACTA 229
Brasil	CTCGCAAAAATTTGG CTGACTACTTGAAGTCTGGC CACTA 229
Villa de Casas	CTCGCAAAAATTTGG CTGACTACTTGAAGTCTGGC CACTA 229
Argentina	CTCGCAAAAATTTGG CTGACTACTTGAAGTCTGGC CACTA 229
Yucatán	CTCGCAAAAATTTGG CTGACTACTTGAAGTCTGGC CACTA 229

Figura 13. Alineamiento múltiple de secuencias de los unigenes del grupo de proteína inmunomoduladora de células T, subunidad beta del proteasoma y proteína de maduración del proteasoma en poblaciones de moscas *H. irritans* de México, Brasil y Argentina. Las secuencias fueron alineadas con el programa AlignX.

7.6 Prevalencia de patógenos en *H. irritans*

A partir del análisis bioinformático, se reveló de manera interesante que el 4.2% de los 543 unigenes con similitud a las secuencias previamente publicadas en las bases de datos, presentaron similitud con algunos microorganismos (Cuadro 6). Estos microorganismos identificados en *H. irritans* incluyen al virus Nora (3 unigenes con 8 ESTs), *Wolbachia endosymbionte* (3 unigenes con 3 ESTs) y *Mycobacterium bovis* (1 unigen con 13 ESTs). El virus Nora presentó 69 (nucleótidos 8686-9219 y 9464-11370) y 85% (nucleótidos 11726-11824) de identidad con el virus Nora de *Drosophila melanogaster* (número de acceso al banco de genes: DQ321720; Habayeb *et al.*, 2006), *Wolbachia endosymbionte* presentó > 97% de identidad (en 665 nucleótidos entre los tres unigenes) con *W. endosymbionte* de *D. melanogaster* (número del banco de genes: AE017196) y otras especies de *Wolbachia*, y *Mycobacterium bovis* presentó el 98% (136/138 nucleótidos) de identidad con el gen *gyrB* de *M. bovis* que codifica para la subunidad B de la ADN girasa (número de acceso del banco de genes AB014193; Kasai *et al.*, 2000) (Cuadro 10).

La prevalencia de estos patógenos en las moscas *H. irritans* de la colonia del laboratorio se corroboró individualmente mediante RT-PCR en tiempo real, demostrando que la secuencia del virus Nora se encontró en el 94 (30/32) y 80% (8/10) de las moscas analizadas, las secuencias de unigenes de *Wolbachia* se encontró en el 100% (32/32 y 10/10) de las moscas analizadas y la presencia de transcritos del gen *gyrB* de *M. bovis* se corroboró en los 32 especímenes de la colonia de laboratorio pero en ninguno de los 10 especímenes recolectados en un hato libre de tuberculosis, cuando se analizaron con dos conjuntos diferentes de oligonucleótidos los cuales amplifican fragmentos de 107 y 197 pb (dentro y fuera de la secuencia de EST respectivamente).

Cuadro 10. Caracterización de los microorganismos identificados en moscas *H. irritans* hembras parcialmente alimentadas.

Microorganismos	Unigen número de acceso al banco de genes	ESTs/unigen	Identidad de secuencia número de acceso al banco de genes	Descripción (E value)
Virus Nora	HO004689	6	GQ257737	Aislado Umea 2007 genoma completo (7e-145)
	HO000459	1	GQ257737	Aislado Umea 2007, genoma completo (9e-57)
	HO000794	1	DQ321720	virus Nora genoma completo (9e-50)
<i>Wolbachia endosymbionte</i>	HO000491	1	AE017196	Mosca de la fruta <i>W. endosymbionte</i> (3e-11)
	HO000492	1	AE017196	Mosca de la fruta <i>W. endosymbionte</i> (3e-64)
	HO000558	1	AE017196	Mosca de la fruta <i>W. endosymbionte</i> (0.0)
<i>Micobacterium bovis gyrB</i>	HO004720	13	AB014193	<i>M. bovis</i> cepa T 702 gyrB gen de ADN girasa subunidad B (2e-62)

8. DISCUSION Y CONCLUSIONES

El control efectivo de las infestaciones por *H. irritans* requiere del diseño de nuevas estrategias. Los estudios de genómica y genómica funcional son muy importantes para entender cuestiones biológicas básicas e identificar nuevos blancos para mejorar las estrategias de control (Almazán *et al.*, 2003; de la Fuente *et al.*, 2010). Anteriormente se reportó el análisis de la expresión génica en embriones, larvas y hembras de *H. irritans* (Guerrero *et al.*, 2008 y Guerrero *et al.*, 2009); sin embargo este es el primer trabajo de genómica funcional realizado en *H. irritans*.

En el presente trabajo se secuenciaron y ensamblaron 2,160 ESTs de alta calidad que incrementaron el número de secuencias disponibles para *H. irritans*, en las bases de datos públicas. El ensamblado de unigenes sin similitud de secuencia con las secuencias en las bases de datos públicas probablemente representen transcripciones únicas para la mosca *H. irritans* o corresponden a proteínas que aún no han sido identificadas en organismos relacionados debido a la incompleta información genómica. Sin embargo, no se puede descartar que los ESTs identificados representen partes de proteínas conocidas cuyas similitudes se encuentran en regiones de las secuencias que no estén cubiertas por los ESTs analizados.

El número de ESTs ensamblados en ciertos unigenes refleja la abundancia relativa de los ARNm correspondientes. Se encontró que 100 unigenes contienen el 25% de los ESTs y pertenecen al grupo de serin proteasas, lo que parece indicar que este grupo es el más abundantemente expresado en tejidos abdominales de moscas *H. irritans* parcialmente alimentadas. El hecho que los unigenes con el mayor número de ESTs representados sean miembros de la familia de las serin proteasas, sugiere que las modificaciones postraduccionales y la rotación de proteínas son más activas en las moscas *H. irritans* parcialmente alimentadas o que estas proteasas están involucradas en el proceso de digestión.

La alta proporción de ESTs representadas como secuencias individuales *versus* secuencias contiguas y el promedio de ESTs por unigen (2.2) reflejan

una baja diversidad en la base de datos de ESTs generada, debido probablemente a la presencia de parálogos y polimorfismos en la secuencia de algunos unigenes. De hecho, el análisis de secuencias de los unigenes de serin proteasas dificulta la discriminación entre parálogos y polimorfismos dentro de la población de moscas *H. irritans* en este momento.

En este estudio se utilizó la iARN para caracterizar funcionalmente los genes seleccionados del análisis bioinformático en moscas *H. irritans* hembras. De acuerdo a lo encontrado en la literatura, este es el primer trabajo de iARN en *H. irritans*, ya que hasta el momento, solamente se ha reportado el análisis de la expresión génica en embriones, larvas y hembras adultas de *H. irritans* (Guerrero *et al.*, 2008; Guerrero *et al.*, 2009). La iARN se ha utilizado para estudiar la función génica en insectos y otros artrópodos (de la Fuente *et al.*, 2007c; Miyosi, *et al.*, 2004; Ciudad *et al.*, 2006; Kambris *et al.*, 2006; Araujo *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Isoe *et al.*, 2009; Krishnan *et al.*, 2009; Bellés, 2010; Huvenne y Smagghe, 2010), así como, para detectar candidatos a antígenos protectores en las garrapatas (de la Fuente *et al.*, 2005; de la Fuente *et al.*, 2007b; de la Fuente *et al.*, 2010; Almazán *et al.*, 2010). La mortalidad de las moscas probablemente se incrementó debido a la inyección con la jeringa Hamilton, sin embargo el método de iARN utilizado en esta investigación genera resultados reproducibles en moscas *H. irritans* hembras.

La incapacidad para demostrar el silenciamiento en algunas de las secuencias de las serin proteasas y otros de los grupos funcionales estudiados podría deberse a factores desconocidos que afectan la iARN en moscas *H. irritans*, ya que el silenciamiento de la expresión génica no se produjo hasta después de las 24 a 36 hpi en estos genes, o tal vez por la existencia de parálogos de estos grupos que afecten la eficacia del silenciamiento. El silenciamiento mediado por iARN, depende del ARN interferente corto (ARNic) y del micro ARN (miARN). Estos ARNs tienen características únicas, es decir, un tamaño definido de 19 a 21 pb y con dos nucleótidos monocatenarios característicos en cada extremo (-OH) 3' y (fosfato) 5'. Aunque se observaron efectos inespecíficos de la iARN en *H. irritans*, la mayoría de los alineamientos

de secuencias resultaron con regiones de homología de 11 pb y en algunos casos no se encontró homología ≥ 11 pb. Estos resultados sugieren diferencias en la especificidad y la sensibilidad de la iARN, un hecho que debe ser totalmente caracterizado para entender y utilizar eficientemente la iARN en *H. irritans* y otros organismos (de la Fuente *et al.*, 2007b; de la Fuente *et al.*, 2008; Bellés, 2010).

Las serin proteasas son un grupo de endopeptidasas implicadas en diversos procesos tales como digestión, respuesta inmune, coagulación sanguínea y la inflamación. En moscas *H. irritans* el 10% de los unigenes ensamblados contienen más de 500 ESTs, identificados como serin proteasas. De acuerdo con Guerrero *et al.* (2009), quienes demostraron que las serin proteasas se expresan diferencialmente en la etapa adulta en comparación con la etapa larval. No se obtuvo silenciamiento significativo para cualquiera de los genes blanco del ARNdc inyectado en este grupo, por lo tanto, la iARN no afectó la mortalidad o la oviposición de las moscas *H. irritans* hembras. En otros artrópodos, el silenciamiento de la expresión de las serin proteasas por iARN demostró que estas proteínas están involucradas en la digestión de sangre, maduración de los ovocitos, el desarrollo y la respuesta inmune (Miyosi, *et al.*, 2004; Kambris *et al.*, 2006; Araujo *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2007; Isoe *et al.*, 2009; Brackney *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2008; Marshall *et al.*, 2009; Amparyup *et al.*, 2010).

Los genes inhibidores de proteasas identificados en moscas *H. irritans* corresponden a serpinas, los inhibidores de serin proteasas y, por lo tanto implicados en los mismos procesos biológicos discutidos antes para las serin proteasas. Anteriormente, fue clonado y caracterizado un gen inhibidor de serin proteasa de *H. irritans*, lo que sugiere que estos genes pueden estar implicados en el control de proteasas endógenas y patógenas de la mosca (Azzolini *et al.*, 2004; Azzolini *et al.*, 2005). En mosquitos, la iARN de serpinas afecta la respuesta inmune de los insectos (Michel *et al.*, 2006). El silenciamiento del gen inhibidor de la elastasa produce un incremento significativo de la mortalidad a las 12, 24 y 36 hpi y nulo efecto en la oviposición de moscas *H.*

irritans hembras. El efecto de la iARN en el gen inhibidor de la elastasa descrito aquí puede ser resultado del deterioro en el control de la proteasa y/o el efecto de una mayor susceptibilidad a las infecciones de patógenos persistentes que resultan por la disminución de la respuesta inmune en las moscas *H. irritans* hembras.

Las vitelogeninas (VTGs) constituyen una superfamilia multigénica que codifica para precursores de las proteínas de yema de huevo expresadas en las hembras de los artrópodos y otros organismos ovíparos (Byrne *et al.*, 1989). En cucarachas, hormigas y garrapatas, el silenciamiento de los receptores de VTG (VTG-R), esencial para la absorción de VTG en oocitos en desarrollo, afecta la formación del huevo (Ciudad *et al.*, 2006; Mitchell *et al.*, 2007; Boldbaatar *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2009). En las abejas, el silenciamiento de la expresión de VTG por iARN afecta el comportamiento del desarrollo de las abejas trabajadoras (Amdam *et al.*, 2006; Marco Antonio, *et al.*, 2008). Al igual que los resultados del silenciamiento de VTG-R en otros artrópodos, el silenciamiento de VTG-2 en moscas *H. irritans* hembras produjo la reducción de la oviposición cuatro veces en comparación con el testigo.

La ubiquitinación es una modificación post-traducciona llevada a cabo por un conjunto de enzimas que afectan la degradación de la proteína proteasoma, la estabilidad, la función y localización intracelular (Sorokin *et al.*, 2009). Este grupo funcional, incluye genes de *H. irritans* involucrados en la vía de la ubiquitinación como ubiquitina-1 (UBQ-1), UBQ-ligasa (UBQ-L) y UBQ-hidrolasa (UBQ-H). Después de la iARN, solamente se silenció significativamente la expresión de UBQ-L. A pesar de que se ha demostrado que UBQ-L regula la apoptosis en *Drosophila* (Steller, 2008), el silenciamiento de este gen en moscas *H. irritans* hembras no afectó la mortalidad ni la oviposición. Por lo tanto, puede ser posible que el fenotipo resultante de silenciar la expresión de UBQ-L en *H. irritans* hembras, no fuera evidente en las condiciones experimentales. Además, puede que sea necesario el silenciamiento conjunto de otros genes de la ubiquitinación con la finalidad de tener un efecto significativo sobre la mortalidad y la oviposición de *H. irritans*.

Por ejemplo, el silenciamiento de UBQ en las garrapatas causa mortalidad, reducción en la oviposición y reducción de la multiplicación de *Anaplasma marginale* en los intestinos (de la Fuente *et al.*, 2007c, Almazán *et al.*, 2010).

La ferritina (FER) es la principal proteína de almacenamiento de hierro intracelular y se compone de 2 subunidades, cadena pesada (sitios ferroxidasa; 2 unigenes que contienen 4 ESTs) y cadena ligera (sitios de nucleación; 3 unigenes que contienen 5 ESTs) (Hajdusek *et al.*, 2009). Estos ESTs no se encontraron entre los más abundantes identificados en moscas *H. irritans* hembras, sin embargo, Guerrero *et al.* (2008) encontraron a la cadena ligera de FER como una de las transcripciones más abundantes en larvas de *H. irritans*. Estos resultados sugieren expresión diferencial de la FER entre larvas y hembras adultas de *H. irritans*. El silenciamiento de la cadena ligera de FER reduce significativamente la oviposición (6 veces con respecto a los testigos), pero sorprendentemente la mortalidad también se reduce en comparación con los testigos. En las garrapatas, el silenciamiento de FER redujo (sin acento) no sólo la oviposición, sino también la alimentación y los niveles de infección *A. marginale* en células IDE8 (de la Fuente *et al.*, 2007c; Hajdusek *et al.*, 2009).

La vATPasa es una enzima de multisubunidades que actúa en la acidificación de los organelos intracelulares y se ha demostrado que se requiere para la función normal del complejo de Golgi, el retículo endoplásmico, vacuolas y vesículas endocíticas y exocíticas (Beyenbach y Wieczorek, 2006). La vATPasa también se ha implicado como mediador de la inmunidad (de Vito, 2006). Guerrero *et al.* (2008) identificó a la vATPasa como una de las transcripciones más abundantes en larvas de *H. irritans*. Sin embargo, en hembras adultas, solamente se ensamblaron tres unigenes de vATPasa con un EST cada uno, lo que sugiere, como para FER, una expresión diferencial de vATPasa entre larvas y hembras adultas de *H. irritans*. El silenciamiento génico de las subunidades de vATPasa dio lugar a fenotipos letales en *D. melanogaster*, *Tribolium castaneum*, *Pisum Acyrthosiphon* y *Manduca sexta* (Beyenbach y Wieczorek, 2006; Whyard *et al.*, 2009) y redujo la replicación del virus de la influenza en células de *Drosophila* (Hao, 2008). El silenciamiento de la expresión

de vATPasa en las garrapatas produjo degeneración de la glándula salival y los testículos, sugiriendo un papel primordial de esta molécula en el funcionamiento de estos órganos (Kocan *et al.*, 2009), así como la reducción de la infección por *A. marginale* en intestinos de garrapatas *Dermacentor variabilis*, pero no en la multiplicación de patógenos en células IDE8 de garrapatas (de la Fuente *et al.*, 2007c). El silenciamiento de la vATPasa en moscas *H. irritans* hembras redujo la oviposición 16 veces, al igual que la cadena ligera de la FER, la mortalidad de moscas se redujo en comparación con los testigos. Estos resultados sugieren que a pesar de la importante función de vATPasa en todos los artrópodos, pueden existir diferencias específicas de especie y fase del desarrollo, que podrían explicar estos resultados de iARN en *H. irritans*.

Los componentes del proteasoma son grandes complejos proteínicos que participan en la proteólisis, están funcionalmente relacionados a la ubiquitinación y son esenciales para las células eucariotas (Lundgren *et al.*, 2003). Los experimentos en *D. melanogaster* mostraron que el silenciamiento de las subunidades del proteasoma conduce a mayores niveles de conjugados de ubiquitina, defectos del ciclo celular, sobreduplicación del ADN y la apoptosis (Wójcik y DeMartino, 2002; Lundgren *et al.*, 2003). En las células de garrapatas, el silenciamiento del proteasoma 26S se tradujo en menores niveles de infección por *A. marginale* en comparación con el testigo, pero no afectó la supervivencia, la alimentación ni la reproducción de la garrapata (de la Fuente *et al.*, 2007c). Sin embargo, sobre la base de la función esencial del proteasoma en células eucariotas, no fue sorprendente observar una disminución en la oviposición de moscas *H. irritans* inyectadas con ARNdc de componentes del proteasoma dirigidos contra la subunidad beta del proteasoma (dos unigenes) y proteína de maduración del proteasoma (un unigene). Como ya se ha demostrado en *D. melanogaster* (Wójcik y DeMartino, 2002; Lundgren *et al.*, 2003), el silenciamiento de las subunidades del proteasoma en *H. irritans* puede afectar el ciclo celular y la replicación del ADN, lo que resulta en disminución de la oviposición.

La respuesta inmune es esencial para la supervivencia del insecto. En esta categoría sólo dos unigenes se ensamblaron y silenciaron en moscas *H. irritans* hembras, los cuales, codifican para la proteína inmunomoduladora de las células T y el inhibidor de ARNasa L. El silenciamiento de estos genes produjo mayor mortalidad y menor oviposición, en comparación con el testigo, probablemente debido a una mayor susceptibilidad a infecciones persistentes por patógenos resultante de la alteración en la respuesta inmune en moscas *H. irritans* hembras. El silenciamiento de los genes de respuesta inmune puede afectar los mecanismos que intervienen en el control de las infecciones persistentes, como las causadas por el virus Nora y *Wolbachia* spp. (Habayeb *et al.*, 2006; Hornok *et al.*, 2008; Zang *et al.*, 2009), lo que podría afectar la mortalidad y oviposición *H. irritans*. El silenciamiento por iARN de genes de respuesta inmune en otros artrópodos resultaron en mayor mortalidad y mayores niveles de infección por patógenos (Ayres *et al.*, 2008; Eleftherianos *et al.*, 2009; Han-Ching *et al.*, 2010).

La 5'-nucleotidasa (5'-NUC) y otras ectonucleotidasas controlan los niveles de nucleótidos y nucleósidos extracelulares que actúan como moléculas de señalización y participan en un amplio espectro de efectos biológicos (Schetinger *et al.*, 2007). La 5'-NUC se expresa comúnmente en las glándulas salivales de ectoparásitos hematófagos (Liyou *et al.*, 2000; Francischetti *et al.*, 2002; Faudry *et al.*, 2004; Valenzuela *et al.*, 2004; Van Den Abbeele *et al.*, 2007; Francischetti *et al.*, 2008). En este trabajo y como se ha demostrado en las garrapatas (de la Fuente *et al.*, 2005), el silenciamiento de 5'-NUC genera alta mortalidad y menor oviposición en comparación con el testigo. Al igual que en otros organismos, estos resultados sugieren una función esencial para 5'-NUC, en moscas *H. irritans*.

Después de la iARN algunos unigenes han probado tener efecto sobre la sobrevivencia y reproducción de *H. irritans*. Por lo tanto, se puede vislumbrar algunos unigenes con potencial a ser considerados como candidatos a antígenos para experimentos de vacunación contra moscas *H. irritans* en bovinos. Estos incluyen aquellos dentro de los grupos funcionales de VTG,

componentes del proteasoma, respuesta inmune y 5'-NUC. Con esta finalidad se seleccionaron las secuencias de los unigenes de proteína inmunomoduladora de células T (PIT), inhibidor de la ARNasa L (IAL), subunidad beta del proteasoma (P beta) y proteína de maduración del proteasoma (PMP) para analizar mediante RT-PCR en tiempo real su expresión en los diferentes estadios evolutivos y tejidos de *H. irritans* así como el polimorfismo en distintas poblaciones de México (Tamaulipas, Veracruz, Hidalgo, Yucatán y Nayarit), Sacramento, Brasil y del INTA, Rafaela, Argentina.

Los niveles de expresión de los genes PIT, PMP y P beta fueron mayores en hembras que en machos mientras que el gen IAL mantuvo una expresión igual en ambos sexos, lo cual concuerda con el estudio realizado por Ranz *et al.* (2003) donde encontraron que 60% de los genes en *D. melanogaster* fueron expresados diferencialmente de manera específica al sexo y es consistente con lo reportado por Guerrero *et al.* (2009), respecto a la expresión diferencial mayor en hembras que machos de *H. irritans*. La mayor expresión en hembras de los genes de subunidades del proteasoma y los resultados obtenidos del silenciamiento de estos genes que fue disminución de la oviposición, implicaría que estos genes son importantes para la reproducción de *H. irritans*; así como para los genes de respuesta inmune cuyo silenciamiento afectó la mortalidad y oviposición de *H. irritans*. Lo anterior puede indicar que las hembras son más susceptibles a las infecciones persistentes, como las causadas por el virus Nora y *Wolbachia* spp. (Habayeb *et al.*, 2006; Hornok *et al.*, 2008; Zang *et al.*, 2009).

Se encontró que las secuencias de PIT, PMP y P beta están conservadas en las diferentes poblaciones analizadas con las mayores divergencias en las poblaciones de Nayarit y Argentina. Además se encontró que las secuencias de las poblaciones mexicanas son muy similares a las secuencias de las moscas procedentes de Sacramento, Brasil. En 2005 Castiglioni y de Campos, reportaron similitud entre la población de E.E.U.U. y la del Centro Sur de Brasil. El significado de la divergencia en la función o antigenicidad requiere de mayor investigación en la comparación de péptidos recombinantes *in vitro*. Esta información puede ser útil para el desarrollo de estrategias de inmunización ya

que todas las proteínas identificadas con potencial de ser protectoras contra infestaciones por *H. irritans*, son intracelulares y altamente conservadas. Esto puede significar un problema para su utilización en el desarrollo de vacunas para el control de *H. irritans*, debido a que pueden surgir problemas de seguridad cuando se utilizan secuencias de proteínas ortólogas para la vacunación, ya que pueden tener el potencial de inducir respuestas autoinmunes que sean perjudiciales para el hospedero (Canales, *et al.*, 2009). Sin embargo, se espera que la respuesta inmune se instaure principalmente contra epitopos no seguros, lo cual reduciría los efectos en detrimento del hospedador cuando las proteínas ortólogas son altamente conservadas entre los artrópodos y el hospedero. Además, se ha demostrado la inmunización efectiva con proteínas intracelulares en garrapatas y otros artrópodos, lo cual sugiere un bajo riesgo de inducir autoinmunidad en los hospederos y así mismo se puede dirigir la respuesta inmune del ganado contra antígenos vacunales o con reactividad cruzada (Trimnell *et al.*, 2005).

Los ESTs de patógenos que se encontraron en el análisis bioinformático fueron el virus Nora, Wolbachia y *M. bovis*. El virus Nora es un picornavirus, de descubrimiento reciente, que establece infecciones persistentes en *D. melanogaster*, *D. simulans* (Habayeb *et al.*, 2006) y en avispa *Nasonia* (Oliveira *et al.*, 2010). El genoma de este virus es ARN con extremo 3' de poli A, lo que facilita la clonación de los ADNc. Los resultados obtenidos muestran que este virus tiene una secuencia diferente a la de los virus de *Drosophila* y *Nasonia*, lo cual representa un nuevo genotipo para este virus. Además se observa una alta prevalencia de la infección, lo cual, sugiere que el virus Nora podría estar estableciendo infecciones persistentes con la posible transmisión vertical en *H. irritans*. Sin embargo, poco se sabe sobre el efecto de este virus en la biología de los insectos.

Wolbachia es una α -proteobacteria intracelular que se transmite verticalmente e infecta a una amplia gama de artrópodos y nematodos filariales. Esta proteobacteria altera profundamente la biología reproductiva de sus hospedadores y se cree que incrementa el éxito de la transmisión de

bacterias a través de la línea germinal femenina. Sin embargo, en algunos casos, su asociación es mutualista ya que es esencial para la supervivencia de sus hospedadores (Teixeira *et al.*, 2008). En Europa y América del Norte se ha descrito a *W. endosymbionte* en *H. irritans*, pero en Australia la mosca del búfalo (*Haematobia irritans exigua*) fue negativa a esta bacteria (Zhang *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos amplían el hallazgo de *W. endosymbionte* en moscas *H. irritans* mexicanas. Así mismo, como se demuestra en *D. melanogaster* (Teixeira *et al.*, 2008), es posible que Wolbachia confiera resistencia al virus Nora identificado en estas moscas y a otros ARN virus, lo que explicaría su prevalencia en poblaciones naturales de *H. irritans* a través de las interacciones Wolbachia-hospedador. De hecho, mientras Wolbachia estuvo presente en todas las moscas analizadas (prevalencia del 100%), las infecciones con el virus Nora coexistieron en 30/32 y 8/10 moscas analizadas, respectivamente.

La tuberculosis bovina (TB) es una enfermedad causada por *M. bovis* y especies emparentadas del complejo *M. tuberculosis*. TB es un importante problema mundial de salud, que afecta a los animales domésticos, silvestres y a los humanos (Naranjo *et al.*, 2008). Esta enfermedad del ganado es muy difícil de erradicar debido a la existencia de reservorios de vida silvestre en algunas regiones (Gortázar *et al.*, 2008). En el estado de Tamaulipas, al igual que en otros estados de la República, la TB está bajo vigilancia y sometido a las campañas de erradicación, pero sigue siendo una importante enfermedad zoonótica (Díaz-Otero *et al.*, 2003). Las moscas de campo fueron recolectadas de un hato libre de tuberculosis, pero la sangre para alimentar parcialmente a las moscas en el laboratorio se obtuvo de animales positivos a TB, por lo que *M. bovis* podría haber sido adquirida de la sangre ingerida. Estos resultados sugieren, como se indica anteriormente para *M. avium* subsp. paratuberculosis y otras micobacterias (Fischer *et al.*, 2001, 2005), que las moscas *H. irritans* podrían servir como vectores mecánicos para la difusión de *M. bovis* entre los hatos de ganado en Tamaulipas. Generalmente la transmisión mecánica se produce por la transferencia de sangre infectada, retenida en las piezas bucales del insecto, de un animal a otro. Sin embargo, en este estudio, se

eliminaron las cabezas de los insectos, y el ARN fue extraído únicamente de los tejidos abdominales. Por lo tanto, estos resultados sugieren que *M. bovis* se ingiere con la sangre durante la alimentación de la mosca y que el ARN del patógeno todavía estaba presente en células sanguíneas en el intestino del insecto. Además, estos resultados sugieren la posibilidad de utilizar gen *gyrB* de *M. bovis* para monitorear la infección por *M. bovis* en *H. irritans* para estudios epidemiológicos de TB en esta región (Fyfe *et al.* 2007).

En conclusión, se construyó una biblioteca de ADNc a partir de tejidos abdominales completos *H. irritans* hembras adultas parcialmente alimentadas y se secuenciaron 2,160 ESTs de alta calidad, los cuales fueron ensamblados en 992 unigenes (178 contigs y 814 simples) que representan funciones moleculares tales como serin proteasas, metabolismo celular, función mitocondrial, transcripción y traducción, transporte, estructura de la cromatina, vitelogénesis, citoesqueleto, replicación del ADN, respuesta celular al estrés y la infección, proliferación celular e interacciones célula-célula, el tráfico intracelular, la secreción y el desarrollo.

Se desarrolló un método para iARN que produjo resultados reproducibles en *H. irritans*. El análisis funcional por iARN demostró el efecto de algunos genes en *H. irritans* sobre la mortalidad y la oviposición. Estos resultados son un avance para la caracterización molecular de este importante ectoparásito y proponen candidatos a antígenos protectores para el desarrollo de vacunas para el control de las infestaciones de *H. irritans*. Basándose en los resultados de iARN, algunos de los antígenos candidatos a ser considerado para experimentos de vacunación en el ganado contra moscas del cuerno incluyen aquellos dentro de los grupos funcionales de VTG, respuesta inmune y 5'-NUC.

Los resultados aquí presentados proporcionan evidencias de la presencia de virus Nora, Wolbachia, y *M. bovis* en moscas *H. irritans* mexicanas. Lo cual incrementa el repertorio de agentes infecciosos que podrían causar infecciones persistentes en moscas *H. irritans* y sugieren que *M. bovis* podría ser transmitido mecánicamente por moscas *H. irritans*. Sin embargo, se requieren posteriores experimentos para caracterizar el efecto del virus Nora y Wolbachia

en la biología de estas moscas, así como para demostrar el papel de las moscas *H. irritans* como vector mecánico de *M. bovis*.

9. REFERENCIAS

1. Abril C, Nimmervoll H, Pilo P, Brodard I, Korczak B, Markus S. Rapid diagnosis and quantification of *Francisella tularensis* in organs of naturally infected common squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Vet Microbiol* 2007, 127:203-208.
2. Agaisse H, Burrack LS, Philips JA, Rubin EJ, Perrimon N, Higgins DE. Genome-Wide RNAi Screen for Host Factors Required for Intracellular Bacterial Infection. DOI: 10.1126/science.111600. *Science* 2005, 309:1248-1251.
3. Aljamali MN, Sauer JR, Essenberg RC. RNA interference: applicability in tick research. *Exp Appl Acarol* 2002, 28:89-96.
4. Almazán C, Blas-Machado U, Kocan KM, Yoshioka JH, Blouin EF, de la Fuente J. Vaccination with recombinant tick antigens for the control of *Ixodes scapularis* adult infestations. *Vaccine* 2005b, 23:5294-5298.
5. Almazán C, Blas-Machado U, Kocan KM, Yoshioka JH, Blouin EF, Mangold AJ, *et al.* Characterization of three *Ixodes scapularis* cDNAs protective against tick infestations. *Vaccine* 2005a, 23:4403-4416.
6. Almazán C, Castillo S, Loredo J, García-Vázquez Z. Population dynamics of horn fly *Haematobia irritans* in a bovine herd from Soto la Marina, Tam., México. *Vet Mex* 2001, 32:149-152.
7. Almazán C, Kocan KM, Bergman DK, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, de la Fuente J. Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. *Vaccine* 2003^a, 21:1492–1501.
8. Almazán C, Kocan KM, Bergman DK, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, de la Fuente J. Characterization of genes transcribed in an *Ixodes scapularis* cell line that were identified by expression library immunization and analysis of expressed sequence tags. *Gene Ther Mol Biol* 2003b, 7:43-59.
9. Almazán C, Lagunes R, Villar M, Canales M, Rosario-Cruz R, Jongejan F, de la Fuente J. Identification and characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. *Parasitol Res* 2010, 106:471-479.

10. Almazán GC, Cantú CA, Vega FA, García VZ, Kunz S, Medellín L. Horn fly (*Haematobia irritans*) resistance to cypermethrin and diazinon in the state of Tamaulipas, Mexico: current situation. *Vet Mex* 2004, 35:237-244.
11. Alonso-Díaz MA, Acosta-Rodríguez R, Maldonado-Siman E, Ramírez-Valverde R, Bermúdez-Villanueva L. Population dynamic of *Haematobia irritans* on cattle in the Mexican tropic. *Rev Cient FCV-LUZ* 2007, XVII: 330-334.
12. Alves LJ, inventor. Physical trap for capturing and extermination of flies of horn, has tunnel totally prohibited to light, which has movable stocking-curtain in entry and exit of trap formed by dark cloth and flexible strips of different height. Patente BR200602331-A. 2006.
13. Amdam GV, Norberg K, Page RE Jr, Erber J, Scheiner R. Downregulation of vitellogenin gene activity increases the gustatory responsiveness of honey bee workers (*Apis mellifera*). *Behav Brain Res* 2006, 169:201-5.
14. Amparyup P, Wiriyaukaradecha K, Charoensapsri W, Tassanakajon A: A clip domain serine proteinase plays a role in antibacterial defense but is not required for prophenoloxidase activation in shrimp. *Dev Comp Immunol* 2010, 34:168-76.
15. Angel-Sahagun CA, Lezama-Gutierrez R, Molina-Ochoa J, Galindo-Velasco E, Lopez-Edwards M, Rebolledo-Dominguez O. Susceptibility of biological stages of the horn fly, *Haematobia irritans*, to entomopathogenic fungi (Hyphomycetes). *J Ins Sci* 2005, 50:1536-2442.
16. Araujo RN, Campos IT, Tanaka AS, Santos A, Gontijo NF, Lehane MJ, Pereira MH. Brasiliensin: A novel intestinal thrombin inhibitor from *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) with an important role in blood intake. *Int J Parasitol* 2007, 37:1351-8.
17. Ayres JS, Freitag N, Schneider DS. Identification of *Drosophila* mutants altering defense of and endurance to *Listeria monocytogenes* infection. *Genetics* 2008, 178:1807-15.
18. Azzolini SS, Santos JM, Souza AF, Torquato RJ, Hirata IY, Andreotti R, Tanaka AS. Purification, characterization, and cloning of a serine proteinase

- inhibitor from the ectoparasite *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae). *Exp Parasitol* 2004, 106:103-109.
19. Azzolini SS, Sasaki SD, Campos IT, S Torquato RJ, Juliano MA, Tanaka AS. The role of HiTI, a serine protease inhibitor from *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae) in the control of fly and bacterial proteases. *Exp Parasitol* 2005, 111:30-36.
 20. Baron RW, Lysyk TJ. Antibody-Responses in cattle infested with *Haematobia irritans irritans* (Diptera, Muscidae). *J Med Entomol* 1995, 32:630-635.
 21. Barros AT, Guglielmone AA, Martins JR. Mosca de los cuernos: Control sustentable y Resistencia a los insecticidas. *Red Ectopar* 2002, 1-10.
 22. Barros AT, Ottea J, Sanson D, Foil LD. Horn fly (Diptera: Muscidae) resistance to organophosphate insecticides. *Vet Parasitol* 2001, 96:243-256.
 23. Bautista CR, Giles I, Montenegro N, Figueroa JV. Immunization of bovines with concealed antigens from *Haematobia irritans*. *Ann New York Acad Sci* 2004, 1026:284-288.
 24. Bellés X. Beyond *Drosophila*: RNAi in vivo and functional genomics in insects. *Annu Rev Entomol* 2010, 55:111-28.
 25. Beyenbach KW, Wieczorek H. The v-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J Exp Biol* 2006, 209:577-589.
 26. Bianchin I, Honer MR, Koller WW, Gomes A, Schenk JAP. Dinâmica populacional e efeito da mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans irritans*) sobre vacas e bezerros Nellore An. 8º Sem. Londrina, Brasil. *Vet Parasitol* 1993, 47:12-16.
 27. Blood DC, Henderson JA, Radostits OM, Arundel JH, Gay CC. *Medicina Veterinaria*. 6º edición. México, D.F. Ed. Interamericana. 1993.
 28. Boldbaatar D, Battsetseg B, Matsuo T, Hatta T, Umemiya-Shirafuji R, Xuan X, Fujisaki K. Tick vitellogenin receptor reveals critical role in oocyte development and transovarial transmission of *Babesia* parasite. *Biochem Cell Biol* 2008, 86:331-44.

29. Brackney DE, Foy BD, Olson KE. The effects of midgut serine proteases on dengue virus type 2 infectivity of *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* 2008, 79:267-74.
30. Burg JG, Cilek JE, Knapp FW. Variability of glass and filter paper insecticide-treated surfaces used to determine horn fly (Diptera: Muscidae) insecticide resistance. *J Econ Entomol* 1995, 88:654-658.
31. Byford RL, Craig ME, Crosby BL. Review of ectoparasites and their effect on cattle production. *J Anim Sci* 1992, 70:597-602.
32. Byrne BM, Gruber M, Ab G. The evolution of egg yolk proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 1989, 53:33-69.
33. Canales M, Almazán C, Naranjo V, Jongejan F, de la Fuente J. Vaccination with recombinant *Boophilus annulatus* Bm86 ortholog protein, Ba86, protects cattle against *B. annulatus* and *B. microplus* infestation. *BMC Biotechnol* 2009b, 9:29. Recuperado de: <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/9/29>
34. Canales M, Naranjo V, Almazán C, Molina R, Tsuruta SA, Szabó MPJ, Manzano-Roman R, Pérez LJM, Kocan KM, Jiménez MI, Lucientes J, Villar M, de la Fuente J. Conservation and immunogenicity of the mosquito ortholog of the tick-protective antigen, subolesin. *Parasitol Res* 2009^a, 105:97-111.
35. Canales M, Pérez LJM, Naranjo V, Nijhof M, Hope M, Jongejan F, de la Fuente J. Expression of recombinant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *R. annulatus* and *R. decoloratus* Bm86 orthologs as secreted proteins in *Pichia pastoris*. *Biotechnol* 2008, 8:14. Recuperado de: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1472-6750-8-14.pdf>
36. Castiglioni L, de Campos BHEM. Molecular characterization and relatedness of *Haematobia irritans* (horn fly) populations, by RAPD-PCR. *Genetica* 2005, 124:11-21.
37. Castro E, Gil A, Piaggio J, Chifflet L, Farias NA, Solari MA, Moon RD. Population dynamics of horn fly, *Haematobia irritans irritans* (L.) (Diptera: Muscidae) on Hereford cattle in Uruguay. *Vet Parasitol* 2008, 151:286-299.

38. Chen XG, Mathur G, James AA. Gene expression studies in mosquitoes. *Adv Genet* 2008, 64:19-50.
39. Chiu AD, Chiu AL. Biología y comportamiento de las moscas *Haematobia irritans* y *Stomoxys calcitrans*. *Tópico de Parasitol Anim* 1996, 3:98-114.
40. Chung CY, Kasten RW, Paff SM, Van Horn BA, Vayssier-Taussat M, Boulouis HJ, Chomel BB. *Bartonella* spp DNA associated with biting flies from California. *Emerg Infect Dis* [serial on line] 2004 July, 10:1311-1313. Recuperado de: URL: <http://www.cdc.gov/eid/ncidod/EID/eid.htm>.
41. Cicchino AC, Abrahamovich AH, Torres AH, Nuñez JL, Prieto OH. Mosca de los cuernos, *Hematobia irritans* (Linnaeus, 1758), (Diptera: Muscidae). Contribuciones para su conocimiento en la Argentina I: Aspectos morfológicos básicos. *Med Vet* 1993, 75:170-186.
42. Ciudad L, Piulachs MD, Bellés X. Systemic RNAi of the cockroach vitellogenin receptor results in a phenotype similar to that of the *Drosophila* *yolkless* mutant. *FEBS J* 2006, 273:325-35, Erratum in: *FEBS J.* 2006, 273:671.
43. Clymer BC. *Haematobia irritans* control in the United States and Australia. *Memorias del Seminario Internacional de Parasitología Animal, Acapulco (Guerrero) México. SAGAR-CANIFARMA-FAO-IICA-INIFAP.* 1995, 124-128.
44. Cruz-Vázquez C, Bautista HJ, Vitela MI, Ramos PM, Quintero MMT, García VZ. Distribución anual de *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae) en tres establos lecheros de Aguascalientes, México. *Vet Mex* 2003, 1:195-199.
45. Cupp EW, Cupp MS, Ribeiro JM, Kunz SE. Blood-feeding strategy of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *J Med Entomol* 1998, 35:591-595.
46. Cupp MS, Cupp EW, Navarrete C, Wisnewski N, Brandt KS, Silver GM, Zhang D, Panangala V. Evaluation of recombinant salivary gland protein (thrombostasin) as a vaccine candidate to disrupt blood-feeding by horn flies. *Vaccine* 2004, 22:2285-2297.
47. de la Fuente J, Rodríguez M, García-García JC. Immunological control of ticks through vaccination with *Boophilus microplus* gut antigens. *Ann NY Acad Sci* 2000, 916:617-621.

48. de la Fuente J, Kocan KM. Advances in the identification and characterization of protective antigens for recombinant vaccines against tick infestations. *Expert Rev. Vaccines* 2003, 2:583-593.
49. de la Fuente J, Almazán C, Blouin EF, Naranjo V, Kocan KM. RNA interference screening in ticks for identification of protective antigens. *Parasitol Res* 2005, 96:137-141.
50. de la Fuente J, Kocan KM. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasit Immunol* 2006a, 28:275-283.
51. de la Fuente J, Almazán C, Blas-Machado U, Naranjo V, Mangold AJ, Blouin EF, Gortazar C, Kocan KM. The tick protective antigen, 4D8, is a conserved protein involved in modulation of tick blood ingestion and reproduction. *Vaccine* 2006b, 24:4082–4095.
52. de la Fuente J, Almazán C, Canales M, Pérez LJM, Kocan KM, Willadsen P. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Anim Health Res Rev* 2007a, 8:23-28.
53. de la Fuente J, Kocan KM, Almazán C, Blouin EF. RNA interference for the study and genetic manipulation of ticks. *Trends Parasitol* 2007b, 23:427-433.
54. de la Fuente J, Blouin EF, Manzano-Roman R, Naranjo V, Almazán C, Perez LJM, Zivkovic Z, Jongejan F, Kocan KM. Functional genomic studies of tick cells in response to infection with the cattle pathogen, *Anaplasma marginale*. *Genomics* 2007c, 90:712-722.
55. de la Fuente J, Manzano-Roman R, Naranjo V, Kocan KM, Zivkovic Z, Blouin EF, Canales M, Almazán C, Galindo RC, Step DL, Villar M: Identification of protective antigens by RNA interference for control of the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Vaccine* 2010, 28:1786-1795.
56. de Rouen SM, Foil LD, MacKay AJ. Effect of horn fly (*Haematobia irritans*) control on growth and reproduction of beef heifers. *J Econ Entomol* 2003, 96:1612-1616.
57. de Vito P. The sodium/hydrogen exchanger: A possible mediator of immunity. *Cell Immunol* 2006, 240:69-85.

58. Edwards JF, Wikse SE, Field RW, Hoelscher CC, Herd DB. Bovine test atresia associated with horn fly (*Haematobia irritans irritans* (L))-induced dermatitis. *Vet Pathol* 2000, 37:360-364.
59. Eleftherianos I, Millichap PJ, French-Constant RH, Reynolds SE. RNAi suppression of recognition protein mediated immune responses in the tobacco hornworm *Manduca sexta* causes increased susceptibility to the insect pathogen *Photobacterium*. *Dev Comp Immunol* 2006, 30:1099-107.
60. FAO. Resistencia a los antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina. Estudio FAO Producción y Sanidad Animal 157. Dirección de Producción y Sanidad Animal. Organización de Las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO. Roma 2003. <http://www.fao.org/DOCREP/006/Y4813S/y4813s03.htm>
61. FAO. Salud Animal. 2003. Resistencia a los Antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina. Producción y Sanidad Animal 157. Dirección de Producción y Salud Animal. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO. Roma, Italia. 52pp.
62. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998, 391:744-5.
63. Foil LD, Hogsette JA. Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. *Rev Sci Tech* 1994, 13:1125-1158.
64. García-García JC, Montero C, Redondo M, Vargas M, Canales M, Boue O, Rodriguez M, Joglar M, Machado H, Gonzalez IL, Valdes M, Mendez L, de la Fuente, J. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine* 2000, 18:2275-2287.
65. Ghosh S, Azhahianambika P, Yadav MP. Upcoming and future strategies of tick control: a review. *J Vect Borne Dis* 2007, 44:79-89.
66. Gibson GAP, Floate K. Species of *Trichomalopsis* (Hymenoptera: Pteromalidae) associated with filth flies (Diptera: Muscidae) in North America. *Can Entomol* 2001, 133:49-85.

67. Gillespie BE, Owens WE, Nickerson SC, Oliver SP. Deoxyribonucleic acid fingerprinting of *Staphylococcus aureus* from heifer mammary secretions from horn flies. J Dairy Sci 1999, 82:1581-1585.
68. Guerrero FD, Dowd SE, Nene VM, Foil LD. Expressed cDNAs from embryonic and larval stages of the horn fly (Diptera: Muscidae). J Med Entomol 2008, 45: 686-692.
69. Guerrero FD, Dowd SE, Sun Y, Saldivar L, Wiley GB, Macmil SL, Najar F, Roe BA, Foil LD: Microarray analysis of female- and larval-specific gene expression in the horn fly (Diptera: Muscidae). J Med Entomol 2009, 46:257-270.
70. Guglielmone AA, Anziani OS, Mangol AJ, Giorgi RE, Volpogni MM, Flores SG. Seasonal variation of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) in a recently infested region of central Argentina. Bull Entomol Res 1997, 87:55-59.
71. Guglielmone AA, Volpogni MM, Quaino QR, Anziani OS, Mangold AJ. Long-term study of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) seasonal distribution in central Argentina with focus on winter fly abundance. Parasite 2001, 8:369-373.
72. Habayeb MS, Ekengren SK, Hultmark D. Nora virus, a persistent virus in *Drosophila*, defines a new picorna-like virus family. J Gen Virol 2006, 87:3045-3051.
73. Hajdusek O, Sojka D, Kopacek P, Buresova V, Franta Z, Sauman I, Winzerling J, Grubhoffer L. Knockdown of proteins involved in iron metabolism limits tick reproduction and development. Proc Natl Acad Sci USA 2009, 106:1033-8.
74. Han-Ching Wang K, Tseng CW, Lin HY, Chen IT, Chen YH, Chen YM, Chen TY, Yang HL. RNAi knock-down of the *Litopenaeus vannamei* Toll gene (LvToll) significantly increases mortality and reduces bacterial clearance after challenge with *Vibrio harveyi*. Dev Comp Immunol 2010, 34:49-58.
75. Hannon GJ. RNA interference. Nature 2002, 418:244-251.

76. Hao L, Sakurai A, Watanabe T, Sorensen E, Nidom CA, Newton MA, Ahlquist P, Kawaoka Y. *Drosophila* RNAi screen identifies host genes important for influenza virus replication. *Nature* 2008, 454:890-893.
77. Harwood RF, James MT. *Entomología Médica Veterinaria*. Ed Limusa. México, D.F. 1987.
78. Herarld F, Knapp FW, Brown S, Bradley NW. Efficacy of monensin as a cattle feed additive against the face fly and horn fly. *J Anim Sci* 1982, 54:1128-1131.
79. Hornok S, Földvári G, Elek V, Naranjo V, Farkas R, de la Fuente J. Molecular identification of *Anaplasma marginale* and rickettsial endosymbionts in blood-sucking flies (Diptera: Tabanidae, Muscidae) and hard ticks (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol* 2008, 154:354-9.
80. Huvenne H, Smagghe. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *J Insect Physiol* 2010, 56:227-35.
81. Imamura S, Vaz ID, Sugino M, Ohashi K, Onuma M. A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine. *Vaccine* 2005, 23:1301-1311.
82. Imamura S, Conai S, Ohashi K, Onuma M. Recent topics of candidate antigens for immunological control of ixodid ticks. *Acta Sci Vet* 2007, 35:1-16.
83. Isole J, Rascón AA Jr, Kunz S, Miesfeld RL. Molecular genetic analysis of midgut serine proteases in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* 2009, 39:903-12.
84. Johnson NN, Mayer DG. Estimation of the effects of buffalo fly (*Haematobia irritans exigua*) on the estimation of dairy cattle based on a meta-analysis of literature data. *Med Vet Entomol* 1999, 13:372-376.
85. Kalidas S, Smith DP. Novel genomic cDNA hybrids produce effective RNA interference in adult *Drosophila*. *Neuron* 2002, 33:177-184.
86. Kambris Z, Brun S, Jang IH, Nam HJ, Romeo Y, Takahashi K, Lee WJ, Ueda R, Lemaitre B. *Drosophila* immunity: a large-scale in vivo RNAi screen identifies five serine proteases required for Toll activation. *Curr Biol* 2006, 16:808-13.

87. Karim S, Ramakrishnan VG, Tucker JS, Essenberg RC, Sauer JR. *Amblyomma americanum* salivary glands: double-stranded RNA-mediated gene silencing of synaptobrevin homologue and inhibition of PGE2 stimulated protein secretion. *Insect Biochem Mol Biol* 2004a, 34:407-413.
88. Karim S, Ramakrishnan VG, Tucker JS, Essenberg RC, Sauer JR. *Amblyomma americanum* salivary gland homolog of nSec1 is essential for saliva protein secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 2004b, 324:1256-1263.
89. Kerlin RL, Allingham PG. Acquired immune response of cattle exposed to buffalo fly (*Haematobia irritans exigua*). *Vet Parasitol* 1992, 43:115-129.
90. Khila A, Grbic M. Gene silencing in the spider mite *Tetranychus urticae*: dsRNA and siRNA parental silencing of the Distal-less gene. *Develop Genes and Evol* 2007, 217:241-251.
91. Kocan KM, Zivkovic Z, Blouin EF, Naranjo V, Almazán C, Mitra R, de la Fuente J. Silencing of genes involved in *Anaplasma marginale*-tick interactions affects the pathogen developmental cycle in *Dermacentor variabilis*. *BMC Development Biol* 2009, 9:42.
92. Kofta W, Wedrychowicz H. c-DNA vaccination against parasitic infections: advantages and disadvantages. *Vet Parasitol* 2001, 100:3-12.
93. Krishnan P, Gireesh-Babu P, Rajendran KV, Chaudhari A. RNA interference based therapeutics for shrimp viral diseases. *Dis Aquat Organ* 2009, 86:263-72.
94. Kunz SE, Kemp DH. Insecticides and acaricides: Resistance and environmental impact. *Rev Sci Tech* 1994, 13:1249-1286.
95. Kunz SE, Miller A, Phillip LS, Meyerhoeffler DC. Economics of controlling horn flies (Diptera: Muscidae) in range cattle Management. *J Econ Entomol* 1984, 77:657-660.
96. Kunz SE, Ortiz EM, Fragoso SH. Status of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) Insecticide resistance in Northeastern Mexico. *J Med Entomol* 1995, 32:726-729.
97. Kunz SE, Schmidt CD. The pyrethroid resistance problem in the horn fly. *J Agric Entomol* 1985; 2: 358-363.

98. Kuramochi K. Ovipositional behavior of the horn fly (Diptera: Muscidae) in the field. *J Med Entomol* 2000, 37:461-466.
99. Lapage G. *Parasitología Veterinaria*. Ed C.E.C.S.A. México, D.F. 1981, 319-477.
100. Li AY, Guerrero FD, Almazán GC, George JE. Survey of resistance to permethrin and diazinon and the use of a Multiplex polymerase Chain Reaction Assay to detect resistance alleles in the Horn Fly, *Haematobia irritans irritans* (L.). *J Med Entomol* 2003, 40:942-949.
101. Lima LGF, Perri SHV, Prado AP. Variation in population density of horn flies (*Haematobia irritans irritans*) (L.) (Diptera: Muscidae) in Nellore cattle (*Bos indicus*). *Vet Parasitol* 2003, 117:309-314.
102. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta CT) Method. *Methods* 2001, 25:402-408.
103. Liyou N, Hamilton S, McKenna R, Elvin C, Willadsen P. Localisation and functional studies on the 5'-nucleotidase of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Exp Appl Acarol* 2000, 24:235-46.
104. Lomeyer KH, Miller JA. Pathogenicity of three formulations of entomopathogenic fungi for control of adult *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *J Econ Entomol* 2006, 99:1943-1947.
105. Lu HL, Vinson SB, Pietrantonio PV. Oocyte membrane localization of vitellogenin receptor coincides with queen flying age, and receptor silencing by RNAi disrupts egg formation in fire ant virgin queens. *FEBS J* 2009, 276:3110-23.
106. Lundgren J, Masson P, Realini CA, Young P. Use of RNA interference and complementation to study the function of the Drosophila and human 26S proteasome subunit S13. *Mol Cell Biol* 2003, 23:5320-30.
107. Lysyk TJ, Moon RD. Diapause induction in the horn fly (Diptera: Muscidae). *Environ Entomol* 1994, 28:387-397.
108. Maldonado SE, Apodaca SC, Sumano LH, Bermúdez-Villanueva L, García VZ, Gutiérrez OE. Susceptibilidad de *Haematobia irritans* de las zonas norte

- de Veracruz y centro de Nuevo León, México, a permetrina y diazinón. *Vet Mex* 2005, 36:217-227.
109. Maldonado SE, Massiotti RA, Meneses JAC, Villanueva LB, Kunz SE. Preliminary observations on the seasonal fluctuation of *Haematobia irritans* in Central Mexico. *Rev Cient FCV-LUZ* 2006, XVI: 31-38.
 110. Maldonado-Siman E, Amendola-Massiotti, RD; Galindo-Velasco E, Angel-Sahagun CA, Bermudez-Villanueva L, Lezama-Gutierrez R. Impact of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* on cattle naturally infested by adult *Haematobia irritans* in temperate Mexico. *J Anim Sci* 2007, 85:473-473.
 111. Maldonado-Siman E, Bermúdez-Villanueva L, Cadena-Meneses J. Seasonal fluctuation of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) on beef cattle in Tuxpan, Veracruz, México. *Afric Entomol* 2004, 12:125-129.
 112. Maleszka J, Foret S, Saint R, Maleszka R. RNAi-induced phenotypes suggest a novel role for a chemosensory protein CSP5 in the development of embryonic integument in the honeybee (*Apis mellifera*). *Develop Gen Evol* 2007, 217:189-196.
 113. Marco Antonio DS, Guidugli-Lazzarini KR, do Nascimento AM, Simões ZL, Hartfelder K. RNAi-mediated silencing of vitellogenin gene function turns honeybee (*Apis mellifera*) workers into extremely precocious foragers. *Naturwissenschaften* 2008, 95:953-61.
 114. Mariategui PG, Speicys C, Urretabizcaya N. Evaluación de la dinámica poblacional de *Philonthus flavolimbatus* (Erichson 1753) (Coleoptera, Staphylinidae), en materia fecal bovina: su análisis como potencial biocontrolador de *Haematobia irritans* (Linnaeus 1758) (Diptera, Muscidae) en campos de la cuenca del Río Salado, Buenos Aires, República Argentina *Bol. S.E.A.*, 2004, Abril; 34: 233-236. Recuperado de: URL: <http://www.sea-entomologia.org/aracnet/12/04EA1.pdf>
 115. Marshall JL, Huestis DL, Hiromasa Y, Wheeler S, Oppert C, Marshall SA, Tomich JM, Oppert B. Identification, RNAi knockdown, and functional analysis of an ejaculate protein that mediates a postmating, prezygotic phenotype in a cricket. *PLoS One* 2009, 4:e7537.

116. Martínez MI, Cruz RM. El uso de químicos veterinarios y agrícolas en la zona ganadera de Xico, Centro de Veracruz, México y el posible impacto ambiental. *Act Zool Mex*, 2009, 25: 673-681.
117. Melby PC, Ogden GB, Flores HA, Zhao W, Geldmacher C, Biediger NM, Ahuja SK, Uranga J, Melendez M. Identification of Vaccine Candidates for Experimental Visceral Leishmaniasis by Immunization with Sequential Fractions of a cDNA Expression Library. *Infect Immunol* 2000, 68:5595-602.
118. Mendez J, Linhares AX. Diapause, pupation, sites and parasitism of the horn fly, *Haematobia irritans*, in south-eastern Brazil. *Med Vet Entomol* 1999, 13:185-190.
119. Michel K, Suwanchaichinda C, Morlais I, Lambrechts L, Cohuet A, Awono- Ambene PH, Simard F, Fontenille D, Kanost MR, Kafatos FC. Increased melanizing activity in *Anopheles gambiae* does not affect development of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 103:16858-63.
120. Miller JA, Davey RB, Oehler DD, Pound JM, George JE. Efficacy of the ivomec SR bolus for control of horn flies (Diptera: Muscidae) on cattle in South Texas. *J Econ Entomol* 2003, 96:1608-1611.
121. Mitchell RD, Ross E, Osgood C, Sonenshine DE, Donohue KV, Khalil SM, Thompson DM, Michael Roe R. Molecular characterization, tissue-specific expression and RNAi knockdown of the first vitellogenin receptor from a tick. *Insect Biochem Mol Biol* 2007, 37:375-88.
122. Miyoshi T, Tsuji N, Islam M.K, Kamio T, Fujisaki K. Gene silencing of a cubilin-related serine proteinase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis* by RNA interference. *J Vet Med Sci* 2004, 66:1471-1473.
123. Mochi DA, Monteiro AC, Ribeiro JM, Machado AC, Yoshida L. Efficiency of entomopathogenic fungi in the control of eggs and larvae of the horn fly *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *Vet Parasitol* 2009, 167:62-66.
124. Moore RJ, Lenghaus C, Sheedy SA, Doran TJ. Improved vectors for expression library immunization-application to *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. *Vaccine* 2002, 20:115-120.

125. Mulenga A, Azad AF. The molecular and biological analysis of ixodid ticks histamine release factors. *Exp App Acarol* 2005, 37:215-229.
126. Mulenga A, Sugimoto C, Sako Y, Ohashi K, Musoke A, Shubash M, Onuma M. Molecular Characterization of a *Haemaphysalis longicornis* Tick Salivary Gland-Associated 29-Kilodalton Protein and Its Effect as a Vaccine against Tick Infestation in Rabbits. *Infect Immunol* 1999, 67:1652-1658.
127. Nakajima M, Kodama M, Yanase H, Iwanaga T, Mulenga A, Ohashi K, Onuma M. Production and characterization of monoclonal antibodies against midgut of ixodid tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Vet Parasitol* 2003, 115:355-363.
128. Narasimhan S, Montgomery RR, De Ponte K, Tschudi C, Marcantonio N, Anderson JF, Sauer JR, Capello M, Kantor FS, Fikrig E. Disruption of *Ixodes scapularis* anticoagulation by using RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101:1141-1146.
129. Novina C D, Sharp PA. The RNAi revolution. *Nature* 2004, 430:161-164.
130. Oyarzún MP, Quiroz A, Birkett MA. Insecticide resistance in the horn fly: alternative control strategies. *Med Vet Entomol* 2008, 22:188-202.
131. Pal U, Li X, Wang T, Montgomery RR, Ramamoorthi N, Desilva AM, Bao F, Yang X, Pypaert M, Pradhan D, Kantor FS, Telford S, Anderson JF, Fikrig E. TROSPA, an *Ixodes scapularis* receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell* 2004, 119:457-468.
132. Prevot PP, Couvreur B, Denis V, Brossard A, Vanhamme L, Godfroid E. Protective immunity against *Ixodes ricinus* induced by a salivary serpin. *Vaccine* 2007, 25:3284-3292.
133. Pruett JH, Steelman CD, Miller JA. Distribution of horn flies on individual cows as a percentage of the total horn fly population. *Vet Parasitol* 2003, 116:251-258.
134. Quiroz, RH. *Parasitología y Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos*. 3ª edición. México, D.F. Ed. Limusa. 2005.
135. Ranz JM, Castillo-Davis CI, Meiklejohn CD, Hartl DL. Sex-dependent gene expression and evolution of the *Drosophila* transcriptome. *Science* 2003, 300:1742-1744.

136. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997, 245:154-160.
137. Rodríguez SD, García Ortiz MA, Jiménez Ocampo R, Vega y Murguía C. Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis with a particular focus in Mexico. *Infect Genet Evol* 2009, 9:1092-1101.
138. SAGAR. Importancia Zoonosaria y Económica de la mosca del cuerno *Haematobia irritans* en México. Memoria de la 2da. Reunión Anual del consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal. México, D.F. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos 1993, 71-75:367-378.
139. SAGAR-CANIFARMA. Moscas y garrapatas. Boletín informativo No. 2. 1996.
140. Schetinger MR, Morsch VM, Bonan CD, Wyse AT. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. *Biofactors* 2007, 31:77-98.
141. Schmidt CD, Harris RL, Hoffman RA. Mass rearing of the horn fly, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae), in the laboratory. *Ann Entomol Soc Am* 1967, 60:508-510.
142. Shah PK, Tripathi LP, Jensen LJ, Gahnim M, Mason C, Furlong EE, Rodrigues V, White KP, Bork P, Sowdhamini R. Enhanced function annotations for Drosophila serine proteases: a case study for systematic annotation of multi-member gene families. *Gene* 2008, 407:199-215.
143. Shaw SA, Sutherland IA. The prevalence of *Stephanofilaria sp* in buffalo fly, *Haematobia irritans exigua*, in Central Queensland. *Aust J Entomol* 2006, 45:198-201.
144. Sheppard DC, Hinkle NC. A procedure for evaluation of horn fly, *Haematobia irritans* (L) pyrethroid resistance by exposure to pyrethroid residues on glass. *J Agric Entomol* 1986, 3: 100-103.
145. Sinshaw A, Abebe G, Desquesnes M, Yoni W. Biting flies and *Tripanosoma vivax* infection in three highland districts bordering lake Tana, Ethiopia. *Vet Parasitol* 2006, 142:35-46.

146. Soares CA, Lima CM, Dolan MC, Piesman J, Beard CB, Zeidner NS. Capillary feeding of specific dsRNA induces silencing of the isac gene in nymphal *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Mol Biol* 2005, 14:443-452.
147. Sorensen DR, Leirdal M, Sioud M. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *J Mol Biol* 2003, 327:761-6.
148. Sorokin AV, Kim ER, Ovchinnikov LP. Proteasome system of protein degradation and processing. *Biochem (Mosc)* 2009, 74:1411-42.
149. Spier SJ, Leutenegger CM, Carroll SP, Loye JE, Pusteria JB, Carpenter TE, Mihalyi JE, Madigan JE. Use of real-time polymerase chain reaction-based fluorogenic 5' nuclease assay to evaluate insect vectors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in horses. *Amer J Vet Res* 2004, 65:829-834.
150. Steelman CD, McNew RW, Simpson RB, Rorie RW, Phillips JM, Rosenkrans CF. Evaluation of alternative tactics for management of insecticide-resistant horn flies (Diptera: Muscidae). *J Econ Entomol* 2003, 96:892-901
151. Steller H. Regulation of apoptosis in *Drosophila*. *Cell Death Differ* 2008, 15:1132-1138.
152. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acid Res* 1994, 22:4673-4680.
153. Titus RG, Bishop JV, Mejia JS. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunol* 2006, 28:131-141.
154. Tozer RS, Sutherst RW. Control of horn fly (Diptera: Muscidae) in Florida with Australian trap. *J Econ Entomol* 1996, 89:415-420.
155. Trimnell AR, Davies GM, Lissina O, Hails RS, Nuttall PA. A Cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. *Vaccine* 2005, 23:4329-4341.

156. Valenzuela JG. Exploring tick saliva: from biochemistry to 'sialomes' and functional genomics. *Parasitology* 2004, 129:S83-S94.
157. Walsh GC, Posse MC. Abundance and seasonal distribution of predatory Coprophilous Argentine rove beetles (Coleoptera: Staphylinidae), and their effects on dung breeding flies. *Coleopter Bull* 2003, 57:43-50.
158. Wang H, Nuttall PA. Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. *Cell Mol Life Sci* 1999, 56:286-295.
159. Watson DW, Stringham SM, Denning SS, Washburn SP, Poore MH, Meier A. Managing the horn fly (Diptera: Muscidae) using an electric walk-through fly trap. *J Econ Entomol* 2002, 95:1113-1118.
160. Wei Z, Yin Y, Zhang B, Wang Z, Peng G, Cao Y, Xia Y. Cloning of a novel protease required for the molting of *Locusta migratoria manilensis*. *Dev Growth Differ* 2007, 49:611-21.
161. Whyard S, Singh AD, Wong S. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 2009, 39:824-32.
162. Willadsen P, Kemp DH. Vaccination with concealed antigens for tick control. *Parasitol Today* 1998, 4:196-198.
163. Willadsen P. The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites. *Vet Parasitol* 2001, 101:353-367.
164. Wójcik C, DeMartino GN. Analysis of Drosophila 26S proteasome using RNA interference. *J Biol Chem* 2002, 277:6188-97.
165. Zhang B, McGraw E, Floate KD, James P, Jorgensen W, Rothwell J: Wolbachia infection in Australasian and North American populations of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *Vet Parasitol* 2009, 162:350-3

