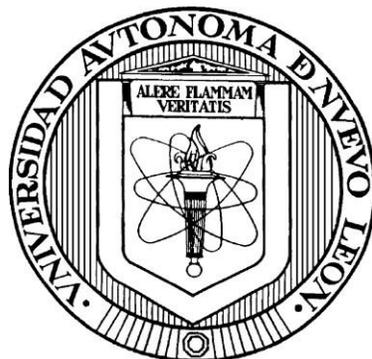


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
POSGRADO CONJUNTO



**EFICACIA DE MOSQUICIDAS Y PRESENCIA DE *Anaplasma marginale* y
Babesia spp., EN POBLACIONES DE *Haematobia irritans*.**

POR

PILAR ELIZABETH RINCÓN GONZÁLEZ

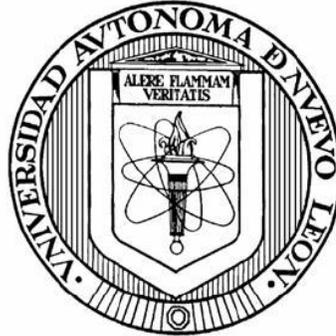
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL

ESCOBEDO, N.L.

Mayo de 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
POSGRADO CONJUNTO



EFICACIA DE MOSQUICIDAS Y PRESENCIA DE *Anaplasma marginale* y *Babesia* spp., EN POBLACIONES DE *Haematobia irritans*.

Aprobación de tesis por el comité particular de:

Pilar Elizabeth Rincón González

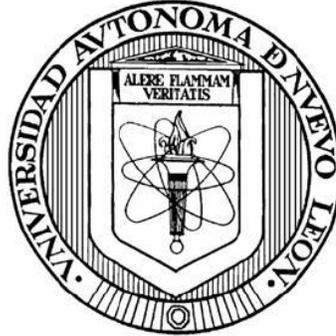
Comité de Tesis

Dr. José Pablo Villarreal Villarreal
Presidente

Dr. Jesús Jaime Hernández Escareño
Secretario

Dr. Júlío César Cruz Valdez
Vocal

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
POSGRADO CONJUNTO



EFICACIA DE MOSQUICIDAS Y PRESENCIA DE *Anaplasma marginale* y *Babesia* spp., EN POBLACIONES DE *Haematobia irritans*.

Aprobación de tesis por el comité particular de:

Pilar Elizabeth Rincón González

Comité de Tesis

Dr. José Pablo Villarreal Villarreal
Director

Dr. Gustavo Ponce García
Director Externo

Dr. Júlío César Cruz Valdez
Co-Director

Dr. Jesús Jaime Hernández Escareño
Co-Director

Dr. Ramiro Ávalos Ramírez
Co-Director

MC. Héctor Eduardo Dávila Venegas (†)
Co-Director

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico otorgado durante estos dos años de estudio.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), por abrirme nuevamente las puertas ahora como alumna de posgrado, gracias por todas las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto.

Al Dr. José Pablo Villarreal Villarreal, mi director de tesis, por apoyarme durante estos dos años de trabajo, gracias por creer en mí, por guiarme y siempre tener la disposición de enseñarme cosas nuevas.

Al Dr. Julio César Cruz Valdez, por apoyarme en la evaluación enzimática, gracias por su paciencia y siempre tener la mejor disposición para ayudarme y retroalimentarme.

Al Dr. Jesús Jaime Hernández Escareño, por apoyarme en la realización de este proyecto, desde la colecta de especímenes hasta la parte experimental.

Al Dr. Ramiro Ávalos Ramírez, por apoyarme en la realización de este trabajo de investigación, además de motivarme a siempre ir más allá.

Al Dr. Gustavo Ponce García, por colaborar en este proyecto a la distancia.

A mis amigas Lorena, Jessica y Leslee, por estar para mí durante estos dos años, apoyándome y animándome a seguir, las TQM ♥.

A mi amigo Brandon, gracias por todo tu apoyo y siempre estar al pendiente.

Al MC. Héctor Eduardo Dávila Venegas, amigo no me alcanzarían las palabras para agradecerte todo lo que hiciste por mí durante estos dos años. Gracias por enseñarme tanto, por guiarme y jalarme las orejas, me salvaste de muchas, conocerte fue una de las mejores cosas que me dejó esta etapa. Nunca te voy a olvidar †.

A mis compañeros de maestría; Francisco, Jocelyn y Armando, no me pudieron tocar mejores compañeros que ustedes tres, sin duda recorrer este camino juntos fue muchísimo más sencillo, gracias por su amistad.

Al MC. Romario García Ponce y a la MVZ. Lucía Guerrero, por colaborar en el desarrollo de este proyecto, desde el trabajo experimental hasta aconsejándome en su escritura.

Finalmente, a todas las personas involucradas en la realización de este proyecto, personal docente y administrativo de la FMVZ y Facultad Agronomía (FA). Gracias por todas las facilidades otorgadas.

DEDICATORIA

A Dios, por siempre guiar mi camino y ayudarme a llegar hasta aquí en el momento indicando, además de recordarme de una u otra manera que sus planes siempre son mejores que los míos.

A mi mamá, por siempre apoyarme en todos los sentidos.

A mi papá por recordarme que puedo con más de lo que creo.

Todo tiene su tiempo y todo lo que se quiere debajo del cielo tiene su hora

-Eclesiastés 3:1

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Generalidades de las moscas	3
2.2. <i>Haematobia irritans</i>	3
2.2.1. Taxonomía.....	3
2.2.2. Morfología.....	4
2.2.3. Ciclo Biológico.....	4
2.2.4. Prevalencia	5
2.3. Control químico	6
2.3.1. Piretroides.....	6
2.3.2. Organofosforados	7
2.4. Resistencia Metabólica de <i>H. irritans</i>	7
2.4.1. Enzimas relacionadas con la resistencia metabólica	7
2.5. Diagnóstico de resistencia a insecticidas en <i>H. irritans</i>	9
2.6. Resistencia de <i>H. irritans</i> en México.....	9
2.7. Papel de <i>H. irritans</i> como vector	10
2.8. <i>Anaplasma marginale</i>	10
2.8.1. Taxonomía.....	10
2.8.2. Morfología.....	11
2.8.3. Impacto económico y prevalencia en México.....	12
2.9. Babesia spp.	12
2.9.1. Taxonomía.....	12
2.9.2. Morfología.....	13
2.9.3. Impacto económico y prevalencia en México.....	13
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVO GENERAL	16
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
7. MATERIALES Y MÉTODOS	17
7.1. Lugar de Trabajo	17

7.2. Sitio de muestreo	17
7.3. Tamaño de muestra	17
7.3.1. Tamaño de muestra para la evaluación de la eficacia de mosquicidas y actividad enzimática.	17
7.3.2. Tamaño de muestra para la identificación molecular de <i>A. marginale</i> y <i>Babesia</i> spp.	17
7.4. Colecta de moscas	18
7.5. Identificación de las moscas	18
7.6. Evaluación de la eficacia de mosquicidas y actividad enzimática	18
7.6.1. Obtención de mosquicidas	18
7.6.2. Bioensayos <i>in vitro</i> para determinar la eficacia de mosquicidas	18
7.6.3. Evaluación de la actividad enzimática	19
7.6.4. Determinación de proteínas	20
7.7. Identificación molecular de los agentes patógenos	21
7.7.1. Extracción del ADN (Ácido Desoxirribonucleico)	21
7.7.2. Elaboración de pools.....	21
7.7.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	22
7.7.4. Electroforesis en Gel de Agarosa.....	23
7.8. Análisis Estadístico.....	24
8. RESULTADOS.....	25
8.1. Bioensayos <i>in vitro</i> para determinar la eficacia de mosquicidas.....	25
8.2. Actividad enzimática de las diferentes poblaciones.....	25
8.2.1. Acetilcolinesterasa (AChE)	25
8.2.2. Carboxilesterasa (CaE)	26
8.2.3. Fosfatasa alcalina (ALP).....	26
8.2.4. Glutación-S-Transferasa (GST).....	27
8.3. Detección Molecular (<i>Babesia</i> spp., y <i>A. marginale</i>).....	27
9. DISCUSIÓN	29
10. CONCLUSIÓN.....	35
11. BIBLIOGRAFÍA.....	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes de la reacción de PCR.....	22
Tabla 2. Primers utilizados para la amplificación.....	22
Tabla 3. Protocolos de amplificación para <i>A. marginale</i> y <i>Babesia</i> spp.....	23
Tabla 4. Resultados de los porcentajes de efectividad de los mosquicidas.....	25
Tabla 5. Resultados de PCR de <i>Babesia</i> spp. y <i>A. marginale</i>	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fase adulta de <i>H. irritans</i>	4
Figura 2. Ciclo biológico de <i>H. irritans</i>	5
Figura 3. Eritrocitos infectados con <i>A. marginale</i>	11
Figura 4. Distribución de la anaplasmosis en México.....	12
Figura 5. Eritrocitos infectados con <i>Babesia</i> spp.....	13
Figura 6. Resumen gráfico de la metodología del trabajo.....	24
Figura 7. Actividad enzimática de la AChE.....	25
Figura 8. Actividad enzimática de la CaE.....	26
Figura 9. Actividad enzimática de la ALP.....	26
Figura 10. Actividad enzimática de la GST.....	27
Figura 11. Resultados correspondientes a la PCR de <i>Babesia</i> spp., y <i>A. marginale</i>	28

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

a.C.	Antes de Cristo
AChE	Acetilcolinesterasa
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ALP	Fosfatasa Alcalina
<i>A. marginale</i>	<i>Anaplasma marginale</i>
ANOVA	Análisis de Varianza
AO	Aceite de Oliva
BSA	Albumina de Suero Bovino
CDNB	1-Cloro-2,4-Dinitrobenzeno
CaE	Carboxilesterasa
cm	Centímetro
°C	Grados Celsius
DTNB	Ácido 5,5'-Dithiobis 2-Nitrobenzoico
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
GSH	Glutación Reducido
GST	Glutación S Transferasa
<i>H. irritans</i>	<i>Haematobia irritans</i>
H₂O	Agua
JH	Hormona Juvenil
L	Litro
M	Molar
mL	Mililitro
μL	Microlitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
μm	Micra
μmol	Micromolar
mg	Miligramo
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
nm	Nanómetro
NOM	Norma Oficial Mexicana
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación <i>ahora SADER</i>
TCE	Tricloroetileno
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UV	Ultravioleta
WinEpi	Working in Epidemiology
20E	20-Hidroxiecdisona

RESUMEN

La especie de mosca *Haematobia irritans*, tiene gran importancia económica en la ganadería nacional, por los efectos negativos directos e indirectos, siendo este último la propagación de patógenos hemoparasitarios. Por otra parte, el uso indiscriminado de productos químicos a base de piretroides y organofosforados, ha generado poblaciones de moscas resistentes, lo cual puede deberse a la sobreproducción de enzimas detoxificadoras, fenómeno conocido como resistencia metabólica, lo que ocasiona un serio problema para su control. La anaplasmosis y la babesiosis bovina, presentan pérdidas a nivel mundial de hasta 10,000 billones de dólares anuales. Hoy en día, los antecedentes que se tienen de la presencia de *Anaplasma marginale* en esta mosca son escasos a nivel mundial. Además, no se tiene registro alguno de la presencia de este último, ni de *Babesia* spp., a nivel nacional. Debido a esto, el presente trabajo tuvo como objetivo, evaluar la eficacia de dos mosquicidas de uso común y medir las enzimas biomarcadoras de resistencia, además de determinar la presencia de *A. marginale* y *Babesia* spp., en diferentes poblaciones de *H. irritans* de bovinos de carne del estado de Nuevo León. Referente a los mosquicidas, el organofosforado mostró una mayor eficacia en las poblaciones estudiadas. En la actividad enzimática, se observó un incremento de las enzimas; AChE, CaE, ALP y GST, las cuales son consideradas enzimas detoxificadoras. Con respecto a la presencia de los hemoparásitos, se evidenció una mayor frecuencia de moscas infectadas con *Babesia* spp. Se concluye que, el mosquicida a base de organofosforado podría ser considerado para el control, sin embargo, es necesario un buen manejo de control integral como lo es; su rotación con otros productos para evitar poblaciones de moscas resistentes. Además, *H. irritans* puede llegar a participar mecánicamente en la propagación de patógenos hemoparasitarios, como lo son; *Babesia* spp., y *A. marginale* en el estado de Nuevo León.

Palabras clave: *Haematobia irritans*, *Anaplasma marginale*, *Babesia* spp., mosquicida y actividad enzimática.

ABSTRACT

The fly species *Haematobia irritans*, has a high economic impact in national livestock, due to its negative directly and indirectly effects, being the last one, the propagation of hemoparasites pathogens. On the other hand, the indiscriminate use of pyrethroid and organophosphate chemical products, has generated resistant flies' populations, which may be due to detoxification enzymes production, commonly named metabolic resistance, which causes a serious control problem. Bovine Anaplasmosis and Babesiosis represents worldwide losses of 10,000 billion dollars per year. Nowadays, the present studies of the presence of *Anaplasma marginale* in this fly are scarce worldwide. Also, there are no national registers of the presence of *A. marginale* and *Babesia* spp. Because of this, the main objective of this work, was to evaluate the efficacy of two mosquicides of common use and to measure the resistance biomarker enzymes, and to determinate the presence of *A. marginale* and *Babesia* spp., in different *H. irritans* populations from beef cattle of the state of Nuevo León. Results: The organophosphate showed a higher efficacy in the studied populations. In the enzymatic activity, an increase of the AChE, CaE, ALP and GST, which are considered detoxification enzymes was shown. On the other hand, the presence of hemoparasites, showed a higher frequency of infected specimens with *Babesia* spp. Conclusions: The organophosphate mosquicide, could be considered for controlling *H. irritans* populations, however a good integral control management, such as rotation with other products is necessary to avoid resistant populations. *H. irritans* could play a role in mechanical propagation of hemoparasites pathogens, such as *Babesia* spp., and *A. marginale* in the state of Nuevo León.

Key words: *Haematobia irritans*, *Anaplasma marginale*, *Babesia* spp., mosquicide and enzymatic activity.

1. INTRODUCCIÓN

Las moscas son insectos que están clasificados dentro del orden de los dípteros (OMS, 1962). Dentro de la familia Muscidae, se encuentra la especie *Haematobia irritans*, también llamada comúnmente como la mosca de los cuernos, causando grandes pérdidas económicas importantes dentro de la pecuaria (Coto, 1998), alcanzando por año los 730 millones de dólares en Estados Unidos (Mancebo, 2001) y un billón de dólares en América (Fuentes et al., 2016). Presenta un alto impacto negativo sobre la salud animal, específicamente la de los bovinos. Esto se debe al estrés que causa sobre el animal, reflejado en una baja producción de leche o carne según sea su propósito (Byfort et al., 1992). Una de las estrategias más utilizadas para el control de *H. irritans*, es la aplicación de productos químicos como son; los piretroides y organofosforados, que se administran a través de baños de aspersión y/o inmersión, así como mediante el uso de collares y aretes impregnados (Almazán et al., 2004). Sin embargo, el uso indiscriminado e inadecuado de estas sustancias, ha generado poblaciones resistentes a estos químicos (INIFAP, 2009). En los años 90, se reportó resistencia a piretroides en poblaciones de *H. irritans* en el noreste de México y posteriormente se extendió a las regiones del sur del país (Santamaría et al., 1995; Li et al., 2003). Debido a esto, se ha optado por el uso de mosquicidas a base de organofosforados, aunque se ha demostrado también resistencia (Taboada et al., 2013), aun así, sigue considerándose como el mejor método de control, debido a que son escasos los estudios que demuestren resistencia ante este químico (Maldonado et al., 2006). Esta resistencia en artrópodos es de tipo metabólica y se ve estrechamente relacionada con la sobreproducción de enzimas como lo son: Glutación-S-Transferasa (GST), Acetilcolinesterasa (AChE) y Carboxilesterasa (CaE), involucradas en la detoxificación de organofosforados, inhibiendo la fosforilación enzimática (Ranson et al., 2002). En la especie *H. irritans*, se ha visto involucrada la sobreproducción de enzimas, principalmente las esterases (Salanski, 1991; Li et al., 2009; Guerrero y Barros, 2006).

Las infestaciones de *H. irritans* en México, varían de acuerdo con las condiciones climáticas, donde los ambientes húmedos y cálidos son esenciales para su sobrevivencia (Alonso et al., 2007), alcanzando infestaciones mayores a 200 especímenes por animal (Almazán et al., 2001), lo que resulta en pérdidas económicas anuales superiores a los 231 millones de dólares a nivel nacional (Rodríguez et al., 2017). Debido a su hematofagia, *H. irritans* juega un papel en la transmisión mecánica de hemoparásitos (Bautista et al., 2018). Actualmente, existen pocos estudios sobre la tasa de infección de *Anaplasma marginale* y *Babesia* spp., en esta mosca, ya que se le da más crédito a la garrapata como principal vector de ambos patógenos. La anaplasmosis bovina, tiene una prevalencia en México mayor a la del 50%, ocasionando la muerte de 50,000 a 100,000 animales por año, lo que se ve reflejado en pérdidas de 30 a 600 millones de dólares (Brayton, 2012). Por otro lado, se estima que el 75% del ganado bovino a nivel nacional, se encuentra en riesgo de contraer babesiosis desde 1980 (Esteve-Gasent et al., 2020). Es importante mencionar que tanto *A. marginale* como *Babesia* spp., son de suma importancia en el sector agropecuario, ya que ambas causan pérdidas económicas de hasta poco más de 10 billones de dólares a nivel mundial (Bautista et al., 2018; Lew-Tabor et al., 2016). Por lo que el objetivo del presente trabajo, fue evaluar la eficacia de dos mosquicidas comerciales de uso común en poblaciones de *H. irritans*, medir la actividad enzimática y determinar la presencia de *A. marginale* y *Babesia* spp en dichas moscas.

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades de las moscas

Las moscas son insectos que están clasificados dentro del orden de los dípteros (OMS, 1962), el cual se distingue del resto, ya que posee dos halterios o balancines que le ayudan a mantener su estabilidad al volar con su único par de alas, lo que le da origen a su nombre di-dos, ptera-ala (Tolrá, 2015). Dentro de este orden, se encuentra la familia Muscidae, a la cual pertenece la especie *Haematobia irritans*, que es de gran importancia en las explotaciones pecuarias (Coto, 1998).

2.2. *Haematobia irritans*

H. irritans, también conocida como la mosca de los cuernos, es un ectoparásito hematófago obligado de los bovinos, equinos y ovejas, aunque presenta mayor predisposición a los bovinos (Soulsby, 1987). Se encuentra ampliamente distribuida en: América, África, Asia y casi toda Europa (Harwood y James, 1979). Este díptero tiene un gran impacto sobre el sector agropecuario, generando grandes pérdidas económicas en la producción bovina, ya que afecta al ganado de diversas maneras, siendo la más común: el estrés sobre el animal cuando se presentan altas infestaciones, provocando una baja en la ingesta de alimento y reduciendo la ganancia de peso, que da como resultado, una baja en la producción de leche y de carne, según sea su propósito (Byfort et al., 1992).

2.2.1. Taxonomía

Clase: Insecta.

Orden: Díptera.

Suborden: Cyclorhapha.

Superfamilia: Muscoidea.

Familia: Muscidae.

Género: *Haematobia*

Especie: *H. irritans* (Romano, 1994).

2.2.2. Morfología

Su cuerpo es angosto y obscuro, mide de tres a cinco mm de largo (Harwood y James, 1987), el cual carece de marcas longitudinales en tórax (Artigas, 1994). Presenta una cabeza ocupada en su mayoría, por un par de ojos grandes y ovalados, con una gran cantidad de ocelos. Además, presenta antenas y un par de alas desarrolladas con venación recta, característica de la especie (Cicchino et al., 1994). Su aparato bucal está compuesto por un labio robusto y palpos largos aplanados, que rodean su probóscide igualmente larga y afilada, la cual le permite atravesar la piel para succionar la sangre y llevar a cabo su alimentación (Harwood y James, 1987).



Figura 1. Fase adulta de *H. irritans*.

2.2.3. Ciclo Biológico

La duración del ciclo biológico de la mosca de los cuernos depende de la temperatura ambiente y las condiciones en las cuales se haya llevado a cabo la ovoposición. Una vez realizada la fecundación en el bovino, la hembra vuela hasta las heces frescas para ovopositar, llegando a depositar de 20 a 24 huevecillos por postura, alcanzando hasta 400 huevecillos durante toda su vida (Torres et al., 1994).

Una vez en el estiércol y transcurridas 24 horas a una temperatura de entre 24 a 26 °C, los huevecillos eclosionan a larva 1, las cuales se entierran en el estiércol para seguir completando su desarrollo de larva 1 a larva 3 esto en aproximadamente de cuatro a ocho días, para después pasar a pupa. En el estadio de pupa, el adulto tarda en emerger de seis a ocho días, cabe destacar que este ciclo se presenta con más frecuencia durante el verano (Howard y James, 1987).

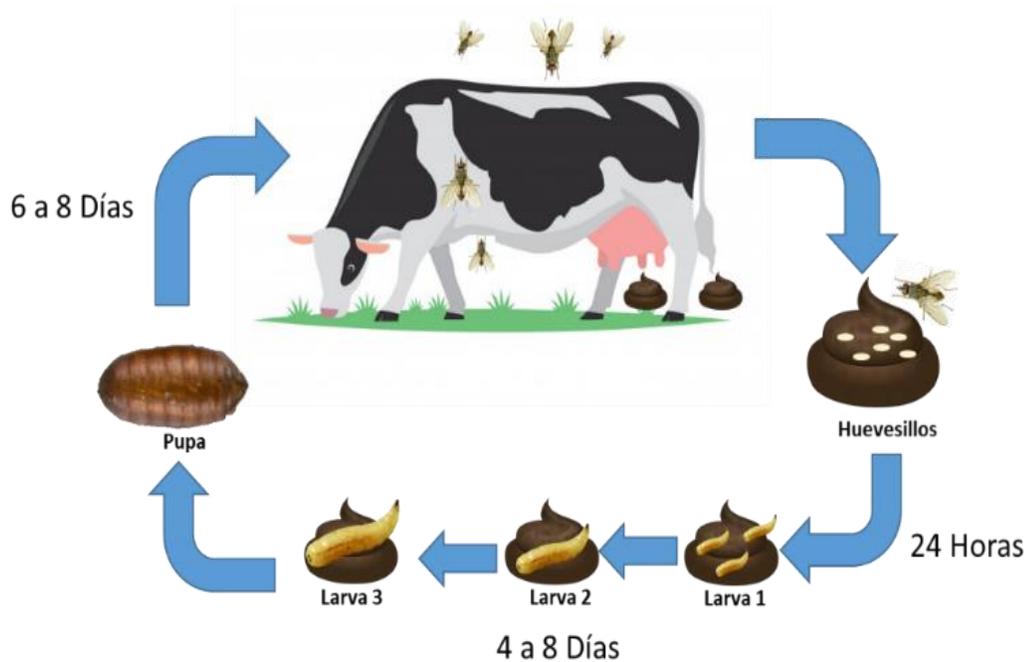


Figura 2. Ciclo biológico *H. irritans*.

2.2.4. Prevalencia

La prevalencia de *H. irritans* en México, varía de acuerdo con las condiciones climáticas, reportándose una mayor incidencia principalmente en primavera, verano y otoño (de marzo a septiembre) (Almazán et al., 2001; Alonzo-Díaz et al., 2007 y Maldonado et al., 2006). En el estado de Veracruz donde las condiciones ambientales son húmedas y cálidas, se presenta una alta tasa de infestación en los animales, siendo de hasta 121 moscas por individuo, esto principalmente en los meses de agosto a noviembre (Alonso et al., 2007), mientras que, en el estado de Colima, la tasa de infestación es mayor, rondando entre las 120 y 236 moscas por animal (Galindo et al., 2008).

En el estado de Tamaulipas, también se pueden observar altos niveles de infestación durante todo el año, alcanzando poblaciones mayores a 200 individuos por animal en los meses de abril a septiembre (Almazán et al., 2001). Infestaciones de esta mosca en México, resulta en pérdidas económicas anuales de 231,665,430 dólares (Rodríguez et al., 2017).

2.3. Control químico

Hoy en día el control de esta plaga en el sector agropecuario del noreste de México es considerado importante (INIFAP, 2009). Una de las estrategias más utilizadas es la aplicación de productos químicos como son; los insecticidas artificiales de principios activos derivados de los piretroides y organofosforados (Almazán et al., 2004). Para un adecuado control, es importante conocer la biología de la especie, tomando en cuenta su fase parasitaria, la cual se da principalmente en meses lluviosos, por lo que su frecuencia de aplicación debe realizarse de manera estacional a través de baños de inmersión, aspersión y/o mediante derrame dorsal (Rodríguez Vivas et al., 2011).

2.3.1. Piretroides

Son sustancias químicas similares a las piretrinas, utilizados como insecticidas, ya que tienden a ser tóxicos y tienen la capacidad de permanecer durante mucho tiempo en el medio ambiente (CDC, 2003). Estos compuestos, han sido fabricados a partir de la estructura química de las piretrinas naturales, las cuales se obtienen a partir de plantas como el crisantemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*), utilizado desde el año 400 a. C. como un insecticida efectivo (Villavicencio-Nieto et al., 2010). Los piretroides, actúan atacando el sistema nervioso central y periférico de los insectos, al interactuar en los canales de sodio, incitando a las células nerviosas a generar descargas, ocasionando en algunos casos parálisis y finalmente la muerte (Ponce et al., 2006). Su efecto residual dura dos semanas. La cipermetrina, deltametrina y flumetrina, son algunos ejemplos de los fármacos derivados de este principio activo (Kaneko, 2010).

2.3.2. Organofosforados

Son sustancias orgánicas procedentes del ácido fosfórico, las cuales son utilizadas hoy en día como insecticidas de contacto, fumigantes y de acción estomacal. La creación de insecticidas a base de estos compuestos se describe durante la segunda guerra mundial. En el año de 1947, se comprobó que muchos compuestos orgánicos del fósforo tenían un efecto tóxico contra insectos perjudiciales debido a sus propiedades físicas y químicas (Ponce et al., 2006). Los organofosforados actúan bloqueando enzimas denominadas colinesterasas del sistema nervioso, evitando la hidrólisis de la acetilcolina, resultando en un aumento de los estímulos nerviosos, su efecto alcanza una viabilidad de entre cuatro a siete días. El clorpirifós, coumafós y diazinón son ejemplos de estos compuestos. Su aplicación debe realizarse de manera estacional a través de baños de inmersión, aspersion o bien mediante derrame dorsal (Rodríguez Vivas et al., 2011).

2.4. Resistencia Metabólica de *H. irritans*

La resistencia, es la habilidad que tiene una población de individuos a tolerar altas concentraciones (dosis tóxicas) a la previa exposición de un plaguicida, considerándose este, un mecanismo de defensa (Díaz, 2012). En artrópodos, la resistencia se da de manera metabólica y ocurre por un incremento en la detoxificación enzimática, en el que se incluyen las enzimas: esterasas, monooxigenasas citocromo P450, y Glutación-S-Transferasas. Los insectos resistentes, pueden tener elevados niveles de una enzima en particular que metaboliza al plaguicida a un nivel más rápido, esto comúnmente se presenta debido a la aplicación inadecuada de productos químicos (FAO, 2012).

2.4.1. Enzimas relacionadas con la resistencia metabólica

Las Glutación-S-Transferasas (GST) son un grupo de enzimas en mamíferos e insectos, juegan un papel importante en el metabolismo de compuestos xenobióticos como lo son; insecticidas (organoclorados), plantas hospedadoras (umbelíferas y crucíferas) y compuestos aleloquímicos (furanocumarinas, índoles y flavonoides).

Las GST, participan en el catabolismo del glutatión reducido (GSH) con sustratos electrofílicos, lo cual le permite ser excretado con mayor facilidad (Yu, 1996). En los últimos años, las Glutatión-S-Transferasas han recibido una mayor importancia, debido al papel que realizan en el metabolismo de insecticidas y resistencia a los mismos por parte de los insectos (Yu, 1996).

Existen estudios que evidencian la resistencia de tipo metabólico en la especie *H. irritans*, expuestas a insecticidas a base de piretroides y organofosforados, en donde se ha visto un incremento en oxidasas de función mixta y enzimas GST (Li et al., 2009; Guerrero y Barros, 2009).

Las Fosfatasas Alcalinas (ALP), son glicoproteínas unidas a la membrana plasmática (Han Wen-Hao et al., 2021). En insectos, esta enzima se encuentra distribuida en tejidos con transporte de membrana como, lo son; las células epiteliales del intestino, hemolinfa y glándulas salivales. En insectos, las ALP participan en la modulación de hormonas del desarrollo, la hormona juvenil (JH) y la 20-hidroxiecdisona (20E) (Han Wen-Hao et al., 2021). Además, participan en la desfosforilación de los grupos fosfato, por lo que se les ha prestado una mayor importancia particularmente en la regulación de resistencia a insecticidas (Moss, 1992). En ecotoxicología, esta enzima puede servir como indicador de intoxicación (Mazorra et al., 2002).

Las Carboxilesterasas (CaE) o esterasas, son un grupo de enzimas que participan en la hidrólisis de distintos grupos de ésteres (Sato y Hosokawa, 2006). Estas enzimas, se encuentran presentes en todos los tejidos de los insectos, participan en la regulación de hormonas juveniles y en la movilización de grasas y energía, relacionadas al catabolismo de grasas en los músculos (Grčić et al., 2019). Son consideradas importantes en la defensa de los insectos, al participar en el desarrollo de resistencia a insecticidas, como son; compuestos de organofosforados, carbamatos y piretroides (Hemingway et al., 2004). En poblaciones de *H. irritans* expuestas a organofosforados y piretroides, se ha observado un incremento de esterasas (Li et al., 2006; Guerrero y Barros, 2009).

La Acetilcolinesterasa (AChE), forma parte de la familia de las colinesterasas especializadas en hidrolizar ésteres carboxílicos. Esta enzima, tiene la función de hidrolizar la acetilcolina, bloqueando los impulsos nerviosos, ha sido ampliamente estudiada frente a compuestos organofosforados y carbamatos, debido a que tienen gran afinidad por la AChE, causando un bloque enzimático durante la sinapsis y provocando la acumulación del neurotransmisor acetilcolina, interrumpiendo el funcionamiento del sistema nervioso (Galloway y Handy, 2003).

2.5. Diagnóstico de resistencia a insecticidas en *H. irritans*

Para diagnosticar el grado de resistencia de una determinada población, se aplica un bioensayo *in vitro* modificado, basado en la técnica original de Sheppard y Hinkle en (1987), la cual consiste en la exposición de moscas adultas a papeles filtro impregnados con distintas concentraciones de insecticidas a base de piretroides y organofosforados. La mortalidad se mide después de dos horas de exposición y en base a los resultados, se determina el índice de resistencia comparado con una cepa susceptible (Santamaría 1993; Rodríguez Vivas, 2015). Esta técnica oficial, recomendada por la FAO, es una de las más utilizadas para el diagnóstico de la resistencia (Rodríguez Vivas et al., 2011).

2.6. Resistencia de *H. irritans* en México

A partir de los años 70, fueron formulados diversos compuestos a base de organofosforados que se aplicaron en el control de moscas por medio de aretes impregnados, los cuales tenían una viabilidad de hasta dos meses (INIFAP, 2009). En el año de 1981, estos fueron reemplazados por aretes a base de piretroides sintéticos con la finalidad de incrementar su efecto residual hasta por cinco meses, utilizados de manera continua hasta el año de 1983, cuando se registraron los primeros reportes de resistencia en Canadá y Estados Unidos. En nuestro país, los primeros registros de resistencia a los piretroides surgen a finales de los años 90, en los estados de Tamaulipas, Veracruz y San Luis Potosí, lo que llevó al uso de organofosforados de manera indiscriminada, presentándose así registros de poblaciones resistentes a este compuesto activo (INIFAP, 2009; Rodríguez Vivas et al., 2011; Almazán et al., 2004).

En la zona norte de Veracruz y centro de Nuevo León, se tienen registros de resistencia a piretroides y organofosforados, con un mayor porcentaje de resistencia a piretroides (Maldonado, 2006).

2.7. Papel de *H. irritans* como vector

Dada a su alimentación hematófaga, *H. irritans*, es considerada un vector mecánico de microorganismos causales de enfermedades (Harwood y James, 1987), como: la tripanosomiasis (Zapata et al., 2017), leucemia bovina (Panei et al., 2019), anaplasmosis y babesiosis bovina (Ferreira, 2019). Sin embargo, son pocos los estudios del papel de *H. irritans* como vector de estas dos últimas, comparados con otras especies de dípteros (Zapata et al., 2017).

2.8. *Anaplasma marginale*

Todos los miembros de las familias Anaplasmataceae, son bacterias intracelulares obligadas, que llevan a cabo su multiplicación dentro de una vacuola derivada de la membrana de una célula huésped (Dumler, 2001). Hoy en día son reconocidas tres especies causales de la anaplasmosis bovina: *Anaplasma caudatum*, *Anaplasma centrale* y *Anaplasma marginale*, siendo esta última, la más patógena (Ristic & Kreir, 1984). La anaplasmosis bovina, es una enfermedad infecciosa no contagiosa, que ocasiona; anemia, ictericia, fiebre, anorexia, depresión, debilidad muscular, pérdida de peso, aborto, fallo cardiopulmonar y muerte (Corona et al., 2004).

2.8.1. Taxonomía

Filo: Proteobacteria.

Clase: Alpha-proteobacteria.

Orden: Rickettsiaceae.

Familia: Anaplasmataceae.

Género: *Anaplasma*.

Especie: *A. marginale* (Corona et al., 2004).

2.8.2. Morfología

Es un parásito obligado intraeritrocítico, el cual no posee citoplasma derivando de ahí su nombre Anaplasma (Muñoz, 2008). Mide de 0.55 a 0.85 μm de diámetro y contiene agregados granulares densos rodeados por una doble membrana de 40 a 50 μm de espesor, dando lugar a un cuerpo de inclusión (Corona et al., 2004). Se multiplica por fisión binaria, hasta completar ocho organismos individuales (Ristic y Watrach, 1963). Posteriormente, los organismos salen del eritrocito, utilizando mecanismos no líticos e infectan los eritrocitos aledaños (Erp y Fahrney, 1975).

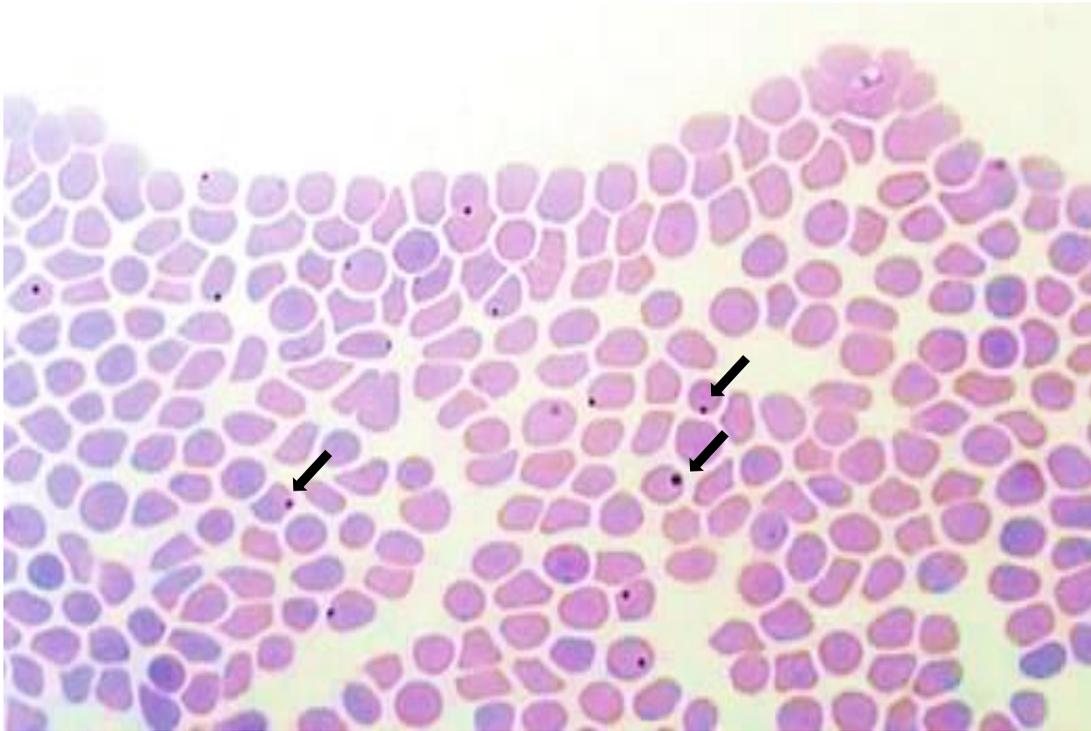


Figura 3. Eritrocitos infectados con *A. marginale* (flechas). Recuperada de: (Rodríguez Vivas R, 2015).

2.8.3. Impacto económico y prevalencia en México

A. marginale, es responsable de pérdidas económicas elevadas a nivel mundial, que van de 30 a 600 millones de dólares por año (Brayton, 2012). Su prevalencia asciende a más del 50%, causando la muerte de alrededor de 50,000 y 100,000 animales anualmente (Ocampo et al., 2006).



Figura 3. Distribución de la anaplasmosis en México. Recuperada de: (INIFAP, 2010).

2.9. Babesia spp

Es un protozooario intracelular del eritrocito (García et al, 2013), dentro de las especies que tiende a afectar al bovino con mayor frecuencia, podemos mencionar a: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Babesia divergens*, siendo *B. bovis* la que causa mayor índice de mortalidad (CFSPH, 2008). La babesiosis bovina, también denominada comúnmente como: fiebre de Texas, fiebre de la garrapata o fiebre roja (Zapata et al., 2011), se presenta en los bovinos con alta morbilidad y mortalidad (CFSPH, 2008).

2.9.1. Taxonomía

Filo: Apicomplexa.

Clase: Aconoidasida.

Orden: Piroplasmida.

Familia: Babesiidae.

Género: *Babesia* spp. (CFSPH, 2008).

2.9.2. Morfología

La morfología del protozooario tiene diferentes características de acuerdo con el estadio en el que se encuentre, observándolo comúnmente bajo microscopio, como un corpúsculo único de forma redonda u ovalada (Olguín, 2013). En *B. bigemina*, se pueden distinguir dos corpúsculos en forma de pera que miden de 4 a 5 μm unidos dentro del eritrocito, aunque también se pueden apreciar formas redondeadas que miden de 2 a 3 μm . En *B. bovis*, los trofozoitos suelen ser redondos o amiboides de 2.4 por 1.5 μm , algunos aparecen con una vacuola dando el aspecto de anillos (Quiroz, 2005).

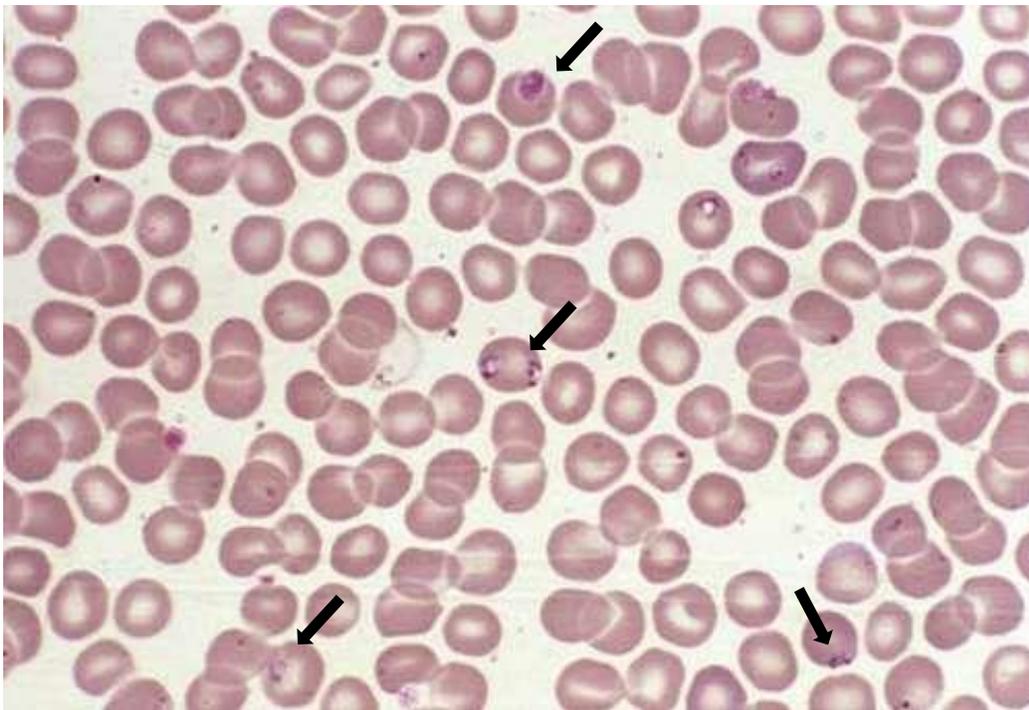


Figura 4. Eritrocitos infectados con *Babesia* spp., en forma de anillo (flechas). Recuperada de: Dra. Mae Melvin/ Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC).

2.9.3. Impacto económico y prevalencia en México

En México, se estima que el 75% del ganado bovino se encuentra en riesgo de contraer babesiosis desde 1980. Se ha establecido que esta enfermedad y otras transmitidas por vectores, llegan a tener un fuerte impacto económico dentro de la producción bovina de manera directa, al afectar la producción de leche y/o carne según sea su propósito e incrementando el número de abortos.

De manera indirecta, a través de los costos asociados al tratamiento de los animales enfermos (Esteve-Gasent et al., 2020). *B. bovis*, es considerada la más patógena con altas tasas de mortalidad en los rebaños de ganado que cursan con presencia de anemia y fiebre intensa (Rodríguez et al., 2017). Sin embargo; es difícil evaluar el impacto económico de la babesiosis y anaplasmosis en la industria ganadera de México, esto debido a la escasez de literatura científica que aporte datos epidemiológicos, tales como; descripción de regiones específicas de inestabilidad enzootica, mortalidad e incidencia de brotes, número de abortos debido a casos clínicos y la ocurrencia estacional de brotes (Rodríguez et al., 2017). Cabe destacar que tanto *A. marginale* como *Babesia* spp., causan pérdidas económicas de hasta poco más de 10 billones de dólares a nivel mundial (Lew-Tabor et al., 2016).

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la alta prevalencia de *H. irritans* principalmente en primavera, verano y otoño, con infestaciones mayores a 200 individuos por animal y al incremento de la baja eficacia de mosquicidas de uso común, por el uso inadecuado e indiscriminado de estos, ocasionando el desarrollo de resistencia, asociado a la expresión de factores intrínsecos, como es; la sobreproducción de enzimas detoxificativas, se presentan pérdidas económicas anuales superiores a los 231 millones de dólares a nivel nacional. Además, dada a su alimentación hematófaga, es considerada un vector mecánico de microorganismos causales de enfermedades como: la anaplasmosis y babesiosis bovina, ambas con pérdidas económicas de hasta poco más de 10 billones de dólares a nivel mundial. Cabe destacar, que en México es escaso el diagnóstico de susceptibilidad a mosquicidas en propiedades pecuarias y además, no hay estudios del papel de *H. irritans* como vector de las enfermedades antes mencionadas, comparado con otras especies de dípteros. Por lo anterior, en el presente trabajo, se evaluó la eficacia de dos mosquicidas de uso común, mediante bioensayos *in vitro* y se midió la actividad de cuatro enzimas biomarcadoras de exposición en diferentes poblaciones de *H. irritans* del estado de Nuevo León, además, se determinó la presencia de *A. marginale* y *Babesia* spp., en dichas poblaciones.

4. HIPÓTESIS

Los mosquicidas a base de piretroide y organofosforado de uso común en hatos de bovinos de Nuevo León presentan baja eficacia en poblaciones de *H. irritans*, reflejado en una sobreexpresión de enzimas detoxificadoras. Además, los patógenos *A. marginale* y *Babesia* spp., están presentes en dicha mosca.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficacia de dos mosquicidas comerciales de uso común a base de piretroide y organofosforado, en diferentes poblaciones de *H. irritans* del estado de Nuevo León, así como medir la actividad enzimática. Además, determinar la presencia de *A. marginale* y *Babesia* spp., en dicha mosca.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Colectar e identificar poblaciones de moscas de *H. irritans* en ranchos de bovinos productores de carne de cuatro municipios pertenecientes al estado de Nuevo León.
2. Evaluar *in vitro* la eficacia de dos mosquicidas de uso común a base de piretroide y organofosforado.
3. Determinar la actividad enzimática de la Acetilcolinesterasa (AChE), Carboxilesterasa (CaE), Glutación-S-Transferasa (GST) y Fosfatasa alcalina (ALP).
4. Realizar la extracción del material genético a partir de moscas *H. irritans* y evaluar mediante la técnica de PCR la presencia de *A. marginale* y *Babesia* spp.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Lugar de Trabajo

Esta investigación de tesis se desarrolló en los laboratorios de Microbiología, Genética, Virología, Reproducción, Producción Acuícola y Una Sola Salud de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).

7.2. Sitio de muestreo

Para la realización de esta investigación de tesis, se colectaron poblaciones de moscas *H. irritans* presentes en ranchos de bovinos de carne, ubicados en cuatro municipios del estado de Nuevo León; un rancho en Montemorelos, uno en General Bravo, uno en Linares y uno en Marín.

7.3. Tamaño de muestra

7.3.1. Tamaño de muestra para la evaluación de la eficacia de mosquicidas y actividad enzimática

Para evaluar la eficacia de los mosquicidas, se realizó una colecta total de 360 moscas adultas *H. irritans* de sexo indistinto, distribuidas en cuatro poblaciones de 90 especímenes, el tamaño de muestra se realizó en base al estudio realizado por Maldonado et al., en (2006). Cabe destacar que la eficacia se evaluó en campo. Para evaluar la actividad enzimática, se colectaron cuatro poblaciones de 24 especímenes y se transportaron a través de una hielera en frascos a una temperatura de $\pm 4^{\circ}\text{C}$ a la FMVZ-UANL.

7.3.2. Tamaño de muestra para la identificación molecular de *A. marginale* y *Babesia* spp

A distinto tiempo y en los mismos cuatro ranchos, se realizó una colecta de *H. irritans* adultas de sexo indistinto; 35 especímenes de Linares, 35 de Montemorelos, 35 de General Bravo y 25 de Marín, dando un total de 130 moscas. El tamaño de muestra se calculó mediante la plataforma WinEpi.net, considerando un nivel de confianza del 95%, en una población desconocida con una prevalencia mínima esperada del 50%.

Una vez colectadas, estas se transportaron en frascos con etanol al 70% previamente rotulados para su posterior identificación a la FMVZ-UANL.

7.4. Colecta de moscas

La colecta se realizó por la mañana y en la tarde, aprovechando los hábitos alimenticios, colectando directamente del cuerpo del animal con apoyo de una red entomológica, específicamente sobre las zonas: dorsal, ventral y en las extremidades. Cabe destacar, que se realizaron dos colectas a diferente tiempo, a) para la evaluación de la eficacia de mosquicidas y actividad enzimática y b) para la identificación molecular de *A. marginale* y *Babesia* spp.

7.5. Identificación de las moscas

Las moscas colectadas, se identificaron de acuerdo con las características morfológicas descritas por Harwood y James, (1987). Esto se realizó, mediante su observación bajo un estereoscopio Carl Zeiss™ Stemi™ DV4 en el laboratorio de Una Sola Salud de la FMVZ-U.A.N.L. y en campo.

7.6. Evaluación de la eficacia de mosquicidas y actividad enzimática

7.6.1. Obtención de mosquicidas

Se obtuvieron mediante su compra en depósitos veterinarios del área metropolitana. Se utilizaron dos productos, uno con principio activo a base de piretroide (Ticoff-Cipermetrina 20%) y otro a base de organofosforado (Asuntol-Coumafós 20%).

7.6.2. Bioensayos *in vitro* para determinar la eficacia de los mosquicidas

Para la evaluación de la eficacia de los mosquicidas comerciales, se utilizó la técnica descrita por Sheppard y Hinkle (1897), modificada. Para llevar a cabo la técnica, se utilizaron papeles filtro cortados en forma de círculo, los cuales se impregnaron con el mosquicida comercial a base de piretroide y con el mosquicida comercial a base de organofosforado. Cabe mencionar que los mosquicidas, fueron preparados utilizando la concentración recomendada por el fabricante (1mL/1L). Se utilizó tricloroetileno (TCE) como diluyente y aceite de oliva (AO) como fijador.

Una vez impregnados los mosquicidas en el papel filtro, estos se conservaron en papel aluminio hasta su uso. Ya en campo, se realizó la colecta con la red entomológica y con la ayuda de un aspirador bucal se tomaron 10 moscas *H. irritans* de la red y se colocaron en cajas Petri, conteniendo el papel filtro preparado (impregnado). Esta técnica, se realizó por triplicado para cada mosquicida, dando un total de 12 bioensayos por mosquicida y el grupo control en los cuatro ranchos analizados. Para el grupo control, se utilizó una mezcla de TCA y AO. La mortalidad de los especímenes fue evaluada posterior a la hora de exposición.

7.6.3. Evaluación de la actividad enzimática

Se realizó en el laboratorio de Virología de la FMVZ-UANL. La obtención de los extractos enzimáticos, se realizó a partir de pools de dos moscas *H. irritans*, utilizando 12 volúmenes (1:12) de agua destilada estéril, estos se maceraron y homogenizaron de forma manual, para después ser centrifugados a 2,500 rpm durante 10 min a 4°C. Posteriormente, a partir de los sobrenadantes obtenidos, se realizaron alícuotas de 0.5 mL, las cuales se almacenaron a -120°C hasta la evaluación de la Acetilcolinesterasa (AChE), Carboxilesterasa (CaE), Fosfatasa alcalina (ALP) y Glutación-S-Transferasa (GST).

La actividad enzimática, se determinó de acuerdo con el método descrito por Ellman y colaboradores (1961) y modificado por Huang y colaboradores (1997). La AChE, se evaluó utilizando 280 µL de una solución compuesta por cloruro de acetilcolina (0.24 mM) (Sigma-Aldrich) y 2'-dinitro- 5,5'-ditiodibenzoico (DTNB) (Sigma-Aldrich), preparado en buffer Tampón Fosfato Salino (PBS) (pH de 7.1), combinado con 10 µL del extracto enzimático y 10 µL de sustrato de acetilcolina. La actividad enzimática, se expresó como $\mu\text{mol}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$, utilizando un coeficiente de extinción molar de 13.6 $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La actividad de la CaE, se evaluó colocando 10 µL en cada pocillo de extracto enzimático, combinado con 200 µL de buffer tris-HCl 50 mM (pH 7.1) y 100 µL de sustrato p-nitrofenilacetato, a una concentración final de 0.0005 M para iniciar la reacción en este caso, la actividad enzimática se expresó utilizando el coeficiente de extinción molar de 18.5 $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Para la evaluación de la ALP, se colocó en cada pocillo 25 μL de extracto enzimático, combinado con 200 μL de buffer dietanolamina 1.0 M (pH 9.8) con 50 mM de MgCl_2 y para iniciar la reacción se añadieron 100 μL de sustrato 4-nitrofenil-fosfato. La expresión de la actividad enzimática se realizó utilizando el coeficiente de extinción molar 18.5 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Es importante destacar que, para cada extracto se utilizaron tres replicados (pocillos). La cinética enzimática, se midió a través de lecturas espectrofotométricas a 405 nm de longitud cada dos minutos durante 12 minutos.

La GST se analizó a partir de una mezcla de reacción compuesta por 19.8 mL de buffer de fosfato salino Dulbecco's (pH 7.2), combinado con 200 μL de L-glutación reducido (200 mM) (G4251 Sigma) y 200 μL de 1-cloro-2,4- dinitrobenzeno (CDNB) (100 mM) (S2569 Sigma). En cada pocillo, se colocaron 10 μL de extracto enzimático y 190 μL de la mezcla (buffer/sustrato) antes mencionada. Para cada extracto, se utilizaron tres replicados (pocillos), en este caso las lecturas espectrofotométricas, se realizaron a 340 nm de longitud cada dos minutos durante 12 minutos. En cada microplaca se utilizaron tres pocillos (controles), conteniendo sustrato y buffer. La actividad enzimática, fue determinada utilizando el coeficiente de extinción molar de 5.3 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

7.6.4. Determinación de las proteínas

La concentración de proteína presente en el extracto enzimático se determinó utilizando Albumina de Suero Bovino (BSA) de acuerdo con lo descrito por Bradford (1976) y los resultados obtenidos, se expresaron en miligramos de proteínas por mililitro ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). Para su realización, se utilizó una curva estándar de 0.05 a 0.5 mg de albumina de suero bovino (BSA) por mL de agua destilada. En una microplaca, se colocaron 3 repeticiones por muestra en cada pocillo, así para la determinación de la curva de calibración. Posterior a la reacción de la muestra con la solución de trabajo, se dejó reposar por dos minutos para después realizar una lectura espectrofotométrica a 620 nm de longitud.

7.7. Identificación molecular de los agentes patógenos

7.7.1. Extracción del ADN (Ácido Desoxirribonucleico)

Se realizó en el laboratorio de Microbiología de la FMVZ-U.A.N.L. La extracción se llevó a cabo de manera individual por espécimen. Las muestras se maceraron en un mortero estéril, con 500 μL de buffer de lisis. El material obtenido de esta maceración, se colocó en un tubo Eppendorf y se incubó en un Termoblock (AccuBlock Labnet International Inc.) a 65°C durante una hora, homogenizando la muestra cada 15 minutos en un vortex (VX-100 Lab Vortex Mixer Labnet International Inc.), después se le añadieron 500 μL de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (49.5:49.5:1) y posteriormente se colocaron en una centrifuga (Centrifuge 5430 Eppendorf) a 14,000 rpm por 15 min. El sobrenadante resultante, se colocó en un tubo Eppendorf nuevo, se realizaron dos lavados con 500 μL de alcohol isoamílico (27:1) y se centrifugó durante 10 min a 14,000 rpm, recogiendo nuevamente el sobrenadante resultante, al cual se le agregaron 65 μL de Acetato de sodio (NaOAc) y 75 μL de Cloruro de sodio (NaCl), se agitó suavemente por inversión y posteriormente se mantuvo la muestra a -20°C durante 24 horas. Trascurrido este tiempo, se centrifugó de nuevo durante 10 min a 14,000 rpm, se recogió el sobrenadante en un tubo nuevo, al cual se le añadieron 270 μL de isopropanol y se dejó por 10 min a -20°C , finalizado este tiempo, las muestras fueron centrifugadas una vez más a 14,000 rpm, eliminando nuevamente el sobrenadante por decantación y resuspendiendo el pellet en 500 μL de etanol al 80%, se centrifugó nuevamente por 5 min a 14,000 rpm, repitiendo la decantación y finalmente se incubó a 37°C , secando completamente el etanol. Una vez seco, se agregaron 20 μL de buffer TE para la conservación del ADN a -20°C .

7.7.2. Elaboración de pools

Obtenidas las muestras de ADN, se elaboraron pools de 15 μL , cada uno a partir de cinco moscas (3 μL por mosca), dando un total de siete pools para el municipio de Linares, siete para el de Montemorelos, siete para el de General Bravo y cinco para el de Marín.

7.7.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Las muestras de ADN, se amplificaron por PCR punto final, en un volumen de reacción final de 10 μ L para *A. marginale* y *Babesia* spp (Tabla 1).

Tabla 1. Componentes de la reacción de PCR.

Componentes	Volumen
Máster Mix	5 μ L
Primer F	0.5 μ L
Primer R	0.5 μ L
H ₂ O	3 μ L
ADN	1.0 μ L
Volumen Final	10 μ L

Master Mix: Taq DNA polimerasa, Tampón de reacción, Cloruro de magnesio (MgCl₂) y dNTP. Primer F (*Anaplasma F* y/o *BB1*) y Primer R (*Anaplasma R* y/o *BB2*).

Los primers utilizados para *A. marginale*, son los reportados por Bilgic y colaboradores (2013), que amplifican el gen de la Proteína de Superficie Principal (MSP1) a 265 pb y para *Babesia* spp., se diseñaron primers para el gen 18 S ribosomal, que amplifican a 220 pb (Tabla 2).

Tabla 2. Primers utilizados para las ampliaciones.

Primers	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Diana	Fragmento
<i>A. marginale</i>			
<i>Anaplasma F</i>	GCTCTAGCAGGTTATGCGTC	Gen MSP1	265 pb
<i>Anaplasma R</i>	CTGCTTGGGAGAATGCACCT		
<i>Babesia</i> spp			
BB1	GGTAACGGGGAATTAGGGTTCGAT	Gen 18 S	220 pb
BB2	CGCTATTGGAGCTGGAATTACCG	Ribosomal	

El proceso de amplificación se llevó a cabo en un termociclador T100 (Thermal Cycler Bio-Rad), bajo el protocolo descrito en la Tabla 3 para *A. marginale*, utilizando como control positivo una cepa proporcionada por el Dr. Sergio D. Rodríguez, coordinador de la Unidad de Anaplasmosis (CENID-PAVET, INIFAP) y para *Babesia* spp., se utilizó el protocolo de amplificación descrito en la misma tabla, utilizando un control positivo de una cepa proporcionada por el Dr. Jaime Hernández Escareño del Laboratorio de Microbiología de la FMVZ-UANL.

Tabla 3. Protocolos de amplificación para *A. marginale* y *Babesia* spp.

Condiciones de PCR para <i>A. marginale</i> .			
Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	1 min	1 ciclo inicial
Desnaturalización	95°C		
Alineamiento	53°C	1 min	30 ciclos
Extensión	72°C		
Extensión final	72°C	10 min	1 ciclo final
Condiciones de PCR para <i>Babesia</i> spp.			
Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	1 min	1 ciclo inicial
Desnaturalización	94°C		
Alineamiento	58.2°C	1 min	30 ciclos
Extensión	72°C		
Extensión final	72°C	10 min	1 ciclo final

7.7.4. Electroforesis en Gel de Agarosa

Los fragmentos amplificados, se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en Tampón TBE (Tris-Borato EDTA) (0.09 M Tris, 0:09 M ácido Bórico y 2 MM de EDTA, pH 8.3) a 90 voltios, usando “*GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain*”, en agua, bajo irradiación de UV en el Axygen® Gel Documentation Systems.

7.8. Análisis Estadístico

Los datos de presencia/ausencia de microorganismos, fueron presentados mediante porcentajes de frecuencia. Los análisis estadísticos de los bioensayos de mortalidad y actividad enzimática se realizaron en base a los modelos de normalidad y homogeneidad de la varianza. Los bioensayos de mortalidad posterior a la exposición a mosquicidas, se analizaron mediante una t de student para comparación de dos tratamientos. El análisis de actividad enzimática se realizó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y un test de comparaciones múltiples de Dunnet. En todos los análisis, los valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

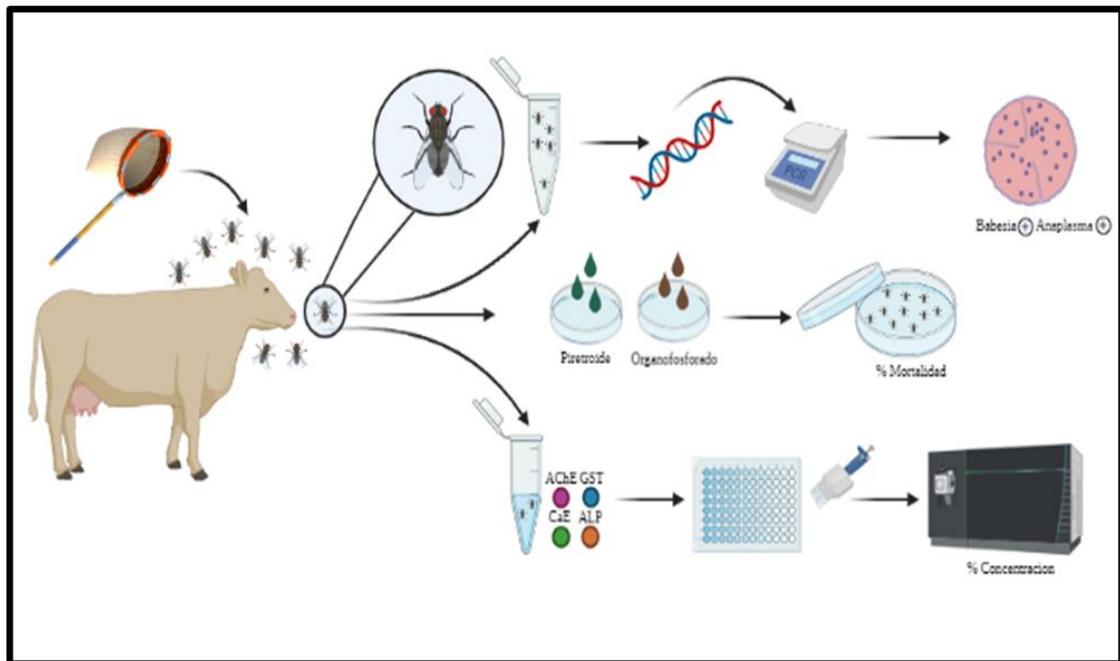


Figura 5. Resumen gráfico de la metodología del trabajo.

8. RESULTADOS

8.1. Bioensayos *in vitro* para determinar la eficacia de los mosquicidas

Los resultados de la eficacia de los mosquicidas comerciales y la comparación de estos en las diferentes poblaciones analizadas, se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultados de los porcentajes de la efectividad de los mosquicidas.

Tratamiento	Linares	Montemorelos	General Bravo	Marín
Piretroide	30 (10.0) ^b	54.24 (16.8) ^b	69.48 (11.1) ^b	29.98 (5.8)
Organofosforado	70 (10) ^a	96.67 (5.77) ^a	91.63 (0.7) ^a	37.04 (54.81)
Valor de P	0.008	0.002	0.026	0.083

Las letras ^{a-b} corresponden a diferencias estadísticamente significativas entre los mosquicidas.

8.2. Actividad enzimática de las diferentes poblaciones

8.2.1. Acetilcolinesterasa (AChE)

La figura 7, muestra la actividad enzimática de la AChE en las diferentes poblaciones analizadas.

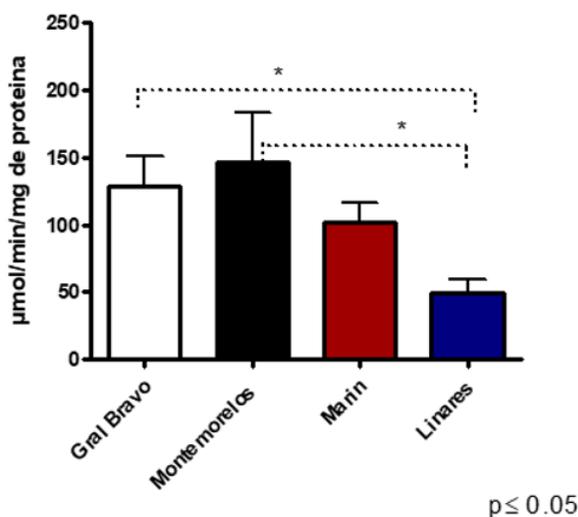


Figura 7. Actividad enzimática de la AChE entre las poblaciones de General Bravo, Montemorelos, Marín y Linares.

8.2.2. Carboxilesterasa (CaE)

La figura 8, muestra la actividad enzimática de la CaE en las diferentes poblaciones analizadas.

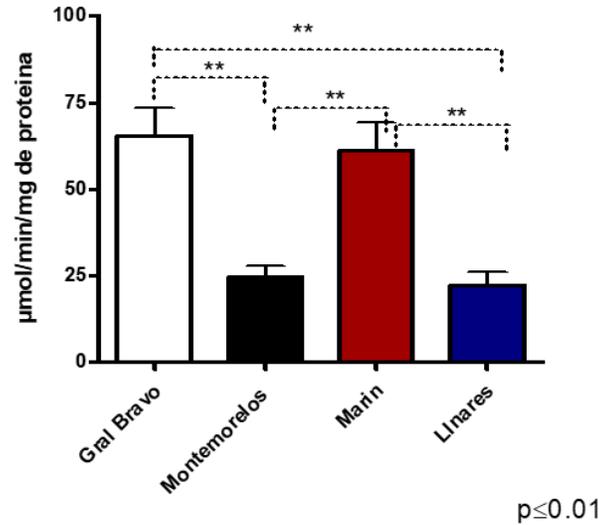


Figura 8. Actividad enzimática de la CaE entre las poblaciones de General Bravo, Montemorelos, Marín y Linares.

8.2.3. Fosfatasa alcalina (ALP)

La figura 9, muestra la actividad enzimática de la ALP en las diferentes poblaciones analizadas.

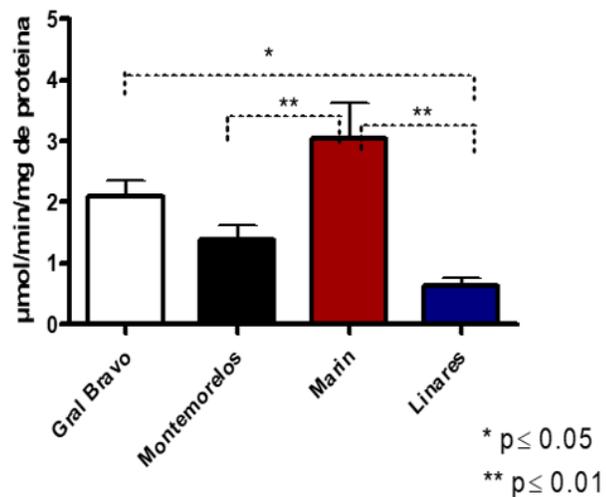


Figura 9. Actividad enzimática de la ALP, entre las poblaciones de General Bravo, Montemorelos, Marín y Linares.

8.2.4. Glutación-S-Transferasa (GST)

La figura 10, muestra la actividad enzimática de la GST en las diferentes poblaciones analizadas.

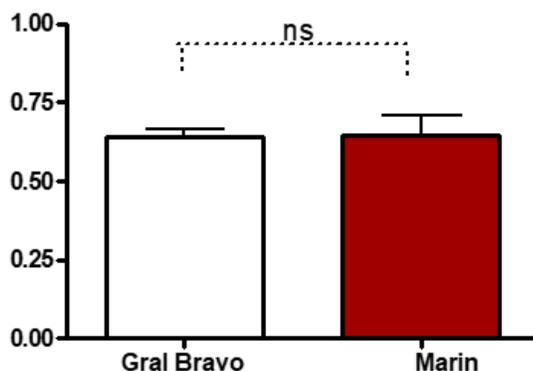


Figura 10. Actividad enzimática de la GST entre las poblaciones de General Bravo y Marín.

8.3. Detección Molecular (*Babesia* spp y *A. marginale*)

Los resultados de la PCR para la detección de *Babesia* spp y *A. marginale*, se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados de las frecuencias de *Babesia* spp., y *A. marginale*.

Población	<i>A. marginale</i>		Babesia	
	Positivos %	TM	Positivo %	TM
Linares	0	(0/7)	29	(2/7)
Montemorelos	0	(0/7)	14	(1/7)
Gral. Bravo	0	(0/7)	100	(7/7)
Marín	40	(2/5)	100	(5/5)

TM: Tamaño de muestra

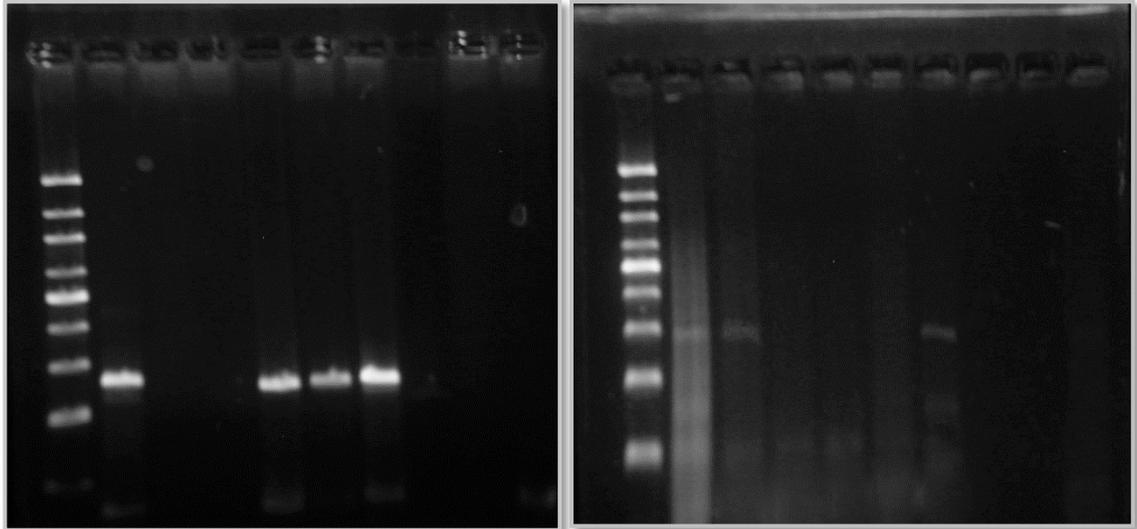
A**B**

Figura 11. Resultados correspondientes a las PCR de *Babesia* spp., y *A. marginale*. La imagen A, corresponde al municipio de Linares para la detección de *Babesia* spp., el primer carril concierne al marcador de peso molecular, el carril 2 al control positivo y los carriles 5, 6 y 7 a tres muestras positivas, siendo estas la 3,4 y 5. La imagen B corresponde al municipio de Marín, para la detección de *A. marginale*, el primer carril pertenece al marcador del peso molecular, el carril 2 al control positivo y los carriles 3 y 7 a dos muestras positivas, siendo estas la 1 y 5. En ambos casos el carril 10 corresponde al control negativo.

9. DISCUSIÓN

Los principales compuestos químicos utilizados para el control de moscas hematófagas como *H. irritans*, debido a su fácil adquisición y manejo, son los piretroides y organofosforados (Li et al., 2006). Sin embargo, diversos estudios han reportado una resistencia a estos compuestos, debido a su uso errado e indiscriminado (Barros et al., 2007; Maldonado et al., 2006; Taboada et al., 2013).

En cuanto a los resultados de los porcentajes de efectividad en la evaluación del piretroide y el organofosforado mostrados en la tabla 5, se observó que en la población de Montemorelos y General Bravo hubo una mayor eficacia del organofosforado ($P < 0.05$) en comparación al piretroide, alcanzando porcentajes mayores al 90%, lo cual indica una eficacia según lo establecido por la Norma Oficial Mexicana; “Requisitos de efectividad biológica para los ixodicidas de uso en bovinos y método de prueba” (NOM-006-ZOO-1993), que menciona que los mosquicidas comerciales, deberán evaluarse al menos mediante una prueba de campo por un laboratorio de pruebas aprobado y demostrar efectividad mínima del 80%. Cabe destacar, que el piretroide no mostró eficacia en ninguna población, siendo la más alta del 69.48%.

Estos resultados son similares al estudio realizado por Maldonado et al., en 2006, donde se presenta una mortalidad del 93.3% con el uso de organofosforados y un 5.7% con el de piretroides, en siete poblaciones de diferentes municipios del estado de Nuevo León y Veracruz. Otros resultados similares a lo obtenido en este trabajo demuestran que, en explotaciones ganaderas de Tamaulipas, el organofosforado presenta una mayor eficacia con un 80-100% de mortalidad, contrario a la cipermetrina con una susceptibilidad por debajo del 80%, indicando una baja eficacia a este último (Almazán et al., 2004).

Es importante mencionar que, en la población de Linares, el organofosforado no alcanzó una efectividad por encima de lo establecido por la norma antes mencionada, esto a pesar de mostrar significancia estadística con respecto al piretroide ($P < 0.05$).

En el caso de la población de Marín, no se observó diferencia significativa en los dos mosquicidas, indicando una baja eficacia de ambos compuestos. Estos resultados indican, que ya se observa una baja eficacia del organofosforado en poblaciones de Nuevo León, similar al estudio de Taboada et al., en 2013 en el estado de Guerrero, donde se presenta una baja eficiencia a este principio activo, con mortalidades de 0-10% en la mosca de los cuernos.

La baja eficacia a los piretroides, puede deberse a que este ectoparásito tiene un ciclo reproductivo corto, presente casi todo el año, lo que conlleva a la aplicación indiscriminada de productos derivados de este principio activo por parte de los ganaderos, productores o trabajadores, además, no se lleva un programa adecuado para su control, se realizan aplicaciones de concentraciones menores que las recomendadas, con un mal asperjado y combinación de productos de forma inapropiada (Taboada et al., 2013; Maldonado et al., 2006; Steelman et al., 2003), es importante mencionar que se cuestionó a los ganaderos sobre el tratamiento que utilizaban para la garrapata, coincidiendo con el uso o haber usado en algún momento compuestos a base del principio activo piretroide, lo que favorece al desarrollo de la resistencia a este principio activo (Maldonado et al., 2006), generando una baja eficacia, al no llevar a cabo una rotación de tratamientos para el control, explicando así los resultados obtenidos en las poblaciones de este estudio.

La resistencia es la habilidad que tiene una población de individuos a tolerar dosis tóxicas a diversos compuestos, considerándose este, un mecanismo de defensa. En artrópodos, la resistencia metabólica ocurre por un incremento en la detoxificación enzimática e insensibilización del sitio blanco, debido a la aplicación inadecuada de productos químicos (Díaz, 2012).

Existen evidencias sobre a la actividad enzimática en diferentes insectos (Wang, et al., 2017; Cuamba et al., 2010; Low et al., 2013; Denlinger et al., 2015; Santo-Orihuela et al., 2017). En base a los resultados obtenidos de la actividad de las distintas enzimas en este estudio, la mayoría muestra actividad en las diferentes poblaciones, siendo la Glutación-S-Transferasa, la única que no mostró actividad en las poblaciones de Montemorelos y Linares.

En la actividad de la acetilcolinesterasa, las poblaciones de General Bravo, Montemorelos y Marín muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con la de Linares (Figura 7).

En cuanto a la actividad de la carboxilesterasa, las poblaciones de General Bravo y Marín muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con las poblaciones de Montemorelos y Linares (Figura 8), mientras que la actividad de la fosfatasa alcalina en las poblaciones de General Bravo y Marín, muestran diferencia significativa en comparación a la población de Montemorelos y Linares, y a su vez la población de Montemorelos con esta última (Figura 9). Por último, la enzima GST, sólo mostró actividad en las poblaciones de General Bravo y Marín, sin mostrar diferencia significativa entre estas (Figura 10).

En 1991, Szalansky y colaboradores, evaluaron la actividad de esterasas en poblaciones de *H. irritans* resistentes a piretroides, sin embargo, sus resultados determinaron que estas enzimas, no debían ser consideradas como fuentes de resistencia. Con el paso del tiempo, se ha demostrado lo contrario en diversos estudios, debido a mutaciones genéticas (Kdr) y a la resistencia enzimática (Li et al., 2009).

Un estudio realizado por Li et al., en 2006, demostró que el aumento de la actividad de la esterasa, se asoció con la capacidad de supervivencia de las moscas de los cuernos expuestas a un organofosforado. En otro estudio realizado por el mismo autor en 2009, se observó un incremento enzimático de las Oxidasas de Función Mixta (MFO) y GST, al comparar una población tratada con piretroide y organofosforado, por lo que también podría considerarse un mecanismo de resistencia metabólica. Cabe destacar que, en insectos, la GST se encarga del metabolismo de compuestos xenobióticos electrofílicos como son los; organotiocianatos, organofosforados y óxidos, por lo que se ha implicado en la resistencia a insecticidas (Yu, 1996). El canal de sodio insensible, como actividad mejorada de las enzimas metabólicas, particularmente las MFO y las esterasas, es el mecanismo de resistencia a los piretroides (Li et al., 2006). Otro estudio realizado por Guerrero et al., en 2006, muestra la ausencia de niveles significativos de resistencia del sitio diana mediada por el alelo kdr, por lo que los mecanismos de resistencia metabólica pueden ser una de las primeras líneas de defensa, disponibles por la mosca para responder

a la exposición al insecticida, haciendo uso de enzimas con son las MFO, esterasas y las GST.

Los resultados en este estudio, son similares a lo observado en otras especies de dípteros como; la mosca doméstica (*Musca domestica*) (Zhang et al., 2010), diversas especies de mosquitos (Cuamba et al., 2010; Low et al., 2013; Denlinger et al., 2015) y en insectos, como lo reportado por Santo-Orihuela et al., en 2017 en Bolivia, donde se ha visto un incremento en la producción de esterasas posterior a la exposición a piretroides en poblaciones de *Triatoma infestans*, incrementando la actividad de monooxigenasas y esterasas, lo que podría indicar su participación en la resistencia.

Por otro lado, la fosfatasa es una enzima digestiva que participa en la desfosforilación de los grupos fosfato (Moss, 1992). En ecotoxicología, esta enzima puede servir como indicador de intoxicación (Mazorra et al., 2002). En los insectos expuestos a pesticidas, se puede observar un incremento en la actividad de esta enzima, ya que participa en la detoxificación de estos compuestos (Aguilera et al., 2015). Hoy en día no hay estudios en la especie *H. irritans* en el que se utilice a la fosfatasa alcalina, como un biomarcador. Bounias et al., en 1996, reportó la actividad de fosfatasa alcalina en una población de la abeja (*Apis mellifera*), expuesta a un tratamiento de cobre y Badiou-Bénétau et al., en 2012, evaluó también en la abeja, la actividad de esta enzima posterior a la exposición a pesticidas de la familia neonicotinoide, observando modificación en la actividad enzimática en las expuestas. Por lo que es importante el aporte de los resultados de este estudio, como registro del uso de esta enzima como biomarcador en *H. irritans*.

A pesar de que se sabe que la anaplasmosis y la babesiosis bovina, son transmitidas por artrópodos y que en países endémicos tienen un impacto económico importante en la pecuaria (Ola-Fadunsin et al., 2018; Ozubek et al., 2018), pocos estudios han evidenciado la presencia de estos hemoparásitos en dípteros, como son; en algunas especies de tábanos, en *Stomoxys calcitrans* (SaeTieo et al., 2020; Hornok et al., 2008) y en *Haematobia irritans* (Ferreira et al., 2019,), estas dos últimas pertenecientes a la familia muscidae (Torres et al., 2012). En México, se estima que aproximadamente el 75% del ganado bovino se encuentra en riesgo de contraer babesiosis, especialmente en regiones tropicales y subtropicales (Esteve-Gasent et al., 2020).

Además, se tiene una tasa de seropositividad que va del 20% al 96% en distintas regiones ganaderas de Nayarit y Veracruz (Fernández et al., 1995; Santamaría, 2012).

De acuerdo con los resultados mostrados en este estudio (Tabla 4), se puede observar la presencia de *Babesia* spp. en las poblaciones de mosca estudiadas de Linares y Montemorelos con un 29% y 14% respectivamente, similares a los encontrados en el estudio realizado por Ferreira et al., en 2019, donde demostraron la presencia de *Babesia bovis* en dos poblaciones de moscas *H. irritans* en la región de la amazona oriental en Brazil, con un 9.3% (22/366) de muestras positivas.

Por otro lado, las poblaciones de General Bravo y Marín presentaron un 100% de positividad. Se sabe que el principal vector de la babesiosis en el ganado bovino es la garrapata del género *Rhipicephalus* subgénero (*Boophilus*) (Vanazzi et al., 2020; Rojas et al., 2011; Figueroa et al., 2015; Ferreira et al., 2019). Debido a esto, es importante mencionar que, al momento de la colecta de las diferentes poblaciones, el rancho de Montemorelos contaba con muy poca infestación de garrapata, mientras que los ranchos de Linares, Marín y General Bravo, presentaban altas infestaciones, además de que contaban con un historial de presencia de Tristeza Parasitaria Bovina, lo que puede indicar una relación en la presencia de *Babesia* spp., en la mosca, debido a su hematofagia en bovinos infestados por garrapata y poder actuar como vector mecánico de dicho patógeno, sin embargo, no existen estudios de la detección de *Babesia* spp., en moscas *H. irritans* en México, siendo este el primer estudio en determinar la presencia de este hemoparásito en esta mosca a nivel nacional. Por otro lado, en México la anaplasmosis asciende a más del 50%, causando la muerte de alrededor de 50,000 y 100,000 animales por año (Brayton, 2012), en la detección de *Anaplasma marginale* (Tabla 4), solo la población del municipio de Marín resultó positiva con un 40% (2/5).

En el mismo estudio realizado por Ferreira et al., en 2019, se reportó un 11.4% (27/236) de moscas positivas a *A. marginale*. En México, solo existe un reporte de *A. marginale* en moscas hematófagas, específicamente en la especie *S. calcitrans* (mosca de los establos) siendo este en Aguascalientes, donde se reporta un 16.66% de moscas positivas (Bautista et al., 2018).

La diferencia de la presencia de los dos diferentes patógenos en las diferentes poblaciones colectadas de *H. irritans*, puede estar influenciada por la aplicación de tratamientos contra la anaplasmosis en los animales, ya que los ganaderos en todos los ranchos llevan a cabo la aplicación de tratamientos con antibióticos, en especial con tetraciclinas al ver la aparición de signos clínicos, sin saber diferenciar entre babesiosis y anaplasmosis. Cabe destacar que estudios en Tamaulipas, demuestran en los bovinos una prevalencia del 80% para babesiosis y 10 % para anaplasmosis (SAGARPA, 2013).

10. CONCLUSIÓN

En todas las poblaciones, se presentó una menor de eficacia de los piretroides en comparación con los organofosforados, sin embargo, en solo General Bravo y Montemorelos, cumplieron con lo establecido en la NOM 006-ZOO 1993. En todas las poblaciones de moscas, se presentó actividad enzimática. En todas las poblaciones analizadas de *H. irritans*, se ve una mayor tasa de infección en la frecuencia con *Babesia* spp., en comparación con *A. marginale*. En base a lo anterior, es importante llevar a cabo una adecuada aplicación de tratamientos para el control de *H. irritans*. El organofosforado aún presenta efecto, sin embargo, este debe rotarse con otros métodos de control, con el fin de evitar poblaciones resistentes que pudieran participar mecánicamente en la propagación de hemoparásitos como *A. marginale* y *Babesia* spp.

11. BIBLIOGRAFÍA

Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (2003). Piretrinas y piretroides (Pyrethrins and Pyrethroids). https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs155.pdf.

Aguilera C., Cruz J., Mendoza, R. (2015). Physiological response of alligator gar juveniles (*Atractosteus spatula*) exposed to sub-lethal doses of pollutants. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41, 1015–1027. doi: 10.1007/s10695-015-0066-5.

Almazán García C., Castillo Salas S., Loredó Osti J., García Vázquez Z., Ramírez Valverde R., Bermúdez Villanueva L. (2001). Dinámica poblacional de *Haematobia irritans* en un hato de bovinos de Soto la Marina, Tamaulipas. *Veterinaria México*; 32 (2): 149-152.

Almazán, C., Cantú, A., Vega, A., García, Z., Kunz, S. y Medellín, A. (2004). Situación de la resistencia a la cipermetrina y diazinon en mosca del cuerno (*Haematobia irritans*) en Tamaulipas, México. *Veterinaria México*, 35 (3), 237-244. <https://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-2004/vm043g.pdf>.

Alonso Díaz M. A., Acosta Rodríguez R., Maldonado Siman E., Ramírez Valverde R., Bermúdez Villanueva L. (2007). Dinámica poblacional de *Haematobia irritans* en bovinos del trópico mexicano. *Revista Científica FCV-LUZ*; 17 (4): 330-334.

Artigas J. (1994). Entomología económica, insectos de interés agrícola, forestal, médico y veterinario (nativos, introducidos y susceptibles de ser introducidos). Ediciones Universidad de Concepción. 277-279.

Badiou, A., Carvalho, S., Brunet, J., Carvalho, G., Bulete, A., Giroud, A., Belzunces, L. (2012). Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honeybee *Apis mellifera*: Application to the systemic insecticide thiamethoxam. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 82, 22–31. doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.05.005.

Barros, A. T., Gomes, A. y Koller, W. W. (2007). Insecticide susceptibility of horn flies, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae), in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitología Veterinaria*, 16(3), 145-151. doi: 10.1590/s1984-29612007000300006.

Bautista, C. R., Rodríguez, T., Rojas, C., Lira, J. J., Álvarez, J. A. y Polanco, D. (2018). Molecular detection of *Anaplasma marginale* in stable flies *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) feeding on a tick-free bovine herd. *Veterinaria México*, 5(1), 1-7. <http://dx.doi.org/10.21753/vmoa.5.1.436>.

Bilgiç, H. B., Karagenç, T., Simuunza, M., Shiels, B., Tait, A., Eren, H. y Weir, W. (2013). Development of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Theileria annulata*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* in cattle. *Experimental Parasitology*, 133, 222–229. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2012.11.005>.

Bounias, M., Kruk, I., Nectoux, M., Popeskovic, D., (1996). Toxicology of cupric salts on honeybees. V. gluconate and sulfate action on gut alkaline and acid phosphatases. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 35, 67–76. doi: 10.1006/eesa.1996.0082.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

Brayton, K. A. (2012). Tick Transmission of *Anaplasma marginale*. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 3(1), 41-50. https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/Bovinos_garrapatas_tristeza/34-transmision_transovarica.pdf.

Byford, R. L. y Craig M. E. (1992). A review of ectoparasites and their effect on cattle production. *Journal of Animal Science*, 70 (2) 597-602. <https://doi.org/10.2527/1992.702597x>.

Cicchino A, Abrahamovich A, Torres P, Nuñez J. Prieto, O. (1994^a). Mosca de los cuernos, *Haematobia irritans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae). Contribuciones para

su conocimiento en la Argentina. I: Aspectos morfológicos básicos del estado adulto. *Revista Médica Veterinaria*, 75, 170-186.

Corona, B., Rodríguez, M. y Martínez, S. (2004). Anaplasmosis bovina. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 6(4), 1-27.

Coto, D. (1998). Estados inmaduros de insectos de las órdenes Ocoleoptera, Diptera y Lepidóptera: Manual de reconocimiento. (No 27). pp. 89. <https://repositorio.biblioteca.org>.

Cuamba, N., Morgan, J. C., Irving, H., Steven, A., Wondji, C. S. (2010). High Level of Pyrethroid Resistance in an Anopheles funestus Population of the Chokwe District in Mozambique. *PLoS ONE*, 5(6), 1-7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011010>.

Delinger, D. S., Lozano, S., Lawyer, P. G., Black, W. C. y Bernhardt, S. A. (2015). Assessing Insecticide Susceptibility of Laboratory *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* Sand Flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Journal of Medical Entomology*, 52(5), 1004-1012. doi: 10.1093/jme/tjv091.

Díaz, E. (2012). Mecanismos moleculares y bioquímicos de resistencia a acaricidas en la garrapata común de los bovinos *Rhipicephalus microplus*. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 5(1), 72-81. <http://revistas.ut.edu.co/index.php/ciencianimal/article/view/128/127>.

Dumler, J. S., Barbet A. F., Bekker, C. P. J., Dash, G. A., Palmer, G. H., Ray, S. C., Rikihisa, Y. y Rurangirwa, F. R. (2001). Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 2145-2165. https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145E@/revista_63.pdf.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid calorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.

Erp, E. y Fahrney, D. (1975). Exit of *Anaplasma marginale* from bovine red blood cells. *American Journal of Veterinary Research*, 36, 707-709.

Esteve, M. D., Rodriguez, R. I., Meina, R. F., Ellis, D., Schwartz, A., Cortes, B., Hunt, C., Tietjen, M., Bonilla, D., Thomas, D., Logan, L. L., Hasel, H., Alvarez, J. A., Hernandez, J. J., Mosqueda, J., Alonso, M. A., Rosario, R., Soberanes, N., Merino, O., Howard, T., Chavez, V. M. y Perez, A. A. (2020). Research on Integrated Management for Cattle Fever Ticks and Bovine Babesiosis in the United States and Mexico: Current Status and Opportunities for Binational Coordination. *Pathogens*, 9(871), 1-23. doi:10.3390/pathogens9110871.

Fernández, R. M. , Cantó, A. G. J. y Aboytes, T. R. (1995). Prevalencia de anticuerpos séricos en contra de *Babesia* spp. y *Anaplasma marginale* en el municipio de Santiago Escuintla, Nayarit. *Veterinaria México*, 26(4), 407-409.

Ferreira Tássia, A. A. (2019). Diagnóstico molecular e taxas de infeccao de *Anaplasma marginale* e *Babesia bovis* em rebanhos bovídios e artrópodes parasitas na Amazonia [Tesis de Maestría]. Universidad de Federal Rural da Amazônia.

Figueroa, J. V., Lira, J. J., Polanco, D. J., Álvarez, J. A., Rojas, C., Bautista, C. R. (2015). Diferenciación de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* mediante el uso de una prueba molecular en ADN extraído de garrapatas repletas. *Revista de Entomología Mexicana*, 2, 706-713.

Fuentes, A., Hernández, Y., Quintana, D., Rodriguez, R. y Méndez, L. (2016). Dinamica poblacional de la mosca *Haematobia irritans* (Linnaeus 1758) (Díptera: Muscidae) en Cuba. *Revista Salud Animal*. (Vol 38 No 3) 137-141.

Galindo, E., Cruz, C., Lezama, R., Reyes, W., Aguilar, S. y Pescador, A. (2008). Fluctuación poblacional de *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) en un hato bovino en Tecomán, Colima, México. *Veterinaria México*, 39(2), 181-186.

Galloway, T. S. y Handy, R. (2003). Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. *Ecotoxicology*, 12, 345-63. doi: 10.1023/a:1022579416322.

García, J. A., Calandra, P. M., Fiorani, F., Fernández, J. A., Aráoz, V., Spath, E., Thompson, C., Mejía, M. y Mangold, A. J. (2013). Reporte de un brote de Babesiosis (*Babesia bovis*) en vaquillonas en zona libre de garrapata. *Revista Veterinaria Argentina*, 3(307), 1-14.

Grčić, A., Ilijin, L., Mrdakovic, M., Vlahović, M., Filipović, A., Đurašević, S., y Perić, V. (2019). Benzo[a]pyrene-induced changes in carboxylesterase, acetylcholinesterase and heat shock protein 70 of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) from unpolluted and polluted forests. *Archives of Biological Science*, 71(4), 735-745. <https://doi.org/10.2298/ABS190620056G>.

Guerrero, F. D. y Barros, T. M. (2006). Role of kdr and Esterase-Mediated Metabolism in Pyrethroid-Resistant Populations of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) in Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 43(5), 896-901. doi: 10.1603/0022-2585(2006)43[896:rokaem]2.0.co;2.

Han, W. H., Zou, C., Qian, L. X., Wang, C., Wang, X. W., Liu, Y. Q. y Wang, X. R. (2021). Functional Analysis of Alkaline Phosphatase in Whitefly *Bemisia tabaci* (Middle East Asia Minor 1 and Mediterranean) on Different Host Plants. *Genes*, 12, 1-13. <https://doi.org/10.3390/genes12040497>.

Harwood, R. F. y James, M. T. (1987). *Entomología Médica y Veterinaria*. (1er ed.). Limusa.

Hemingway, J., Hawkes, N., McCarroll, L. y Ranson, H. (2004). The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 34(7), 653-65. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.03.018>.

Hornok, S., Földvári, G., Elek, V., Naranjo, V., Farkas, R., y de la Fuente, J. (2008). Molecular identification of *Anaplasma marginale* and rickettsial endosymbionts in blood-sucking flies (Diptera: Tabanidae, Muscidae) and hard ticks (Acari: Ixodidae). *Veterinary parasitology*, 154(3-4), 354-359. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.03.019>.

Huang, T. L., Obih, P. O., Jaiswal, R., Hartley, W. R., Thiyagarajah, A. (1997). Evaluation of liver and brain esterases in the spotted gar fish (*Lepisosteus oculatus*) as biomarkers of effect in the lower Mississippi river basin. *The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 58, 688-695.

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. (2009). Mosca del cuerno *Haematobia irritans* un factor negativo en la producción de bovinos de carne (No. 12). <http://www.inifapcarne.gob.mx/Biblioteca/Publicaciones/837.pdf>.

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. (2010). Cómo evitar las pérdidas por la Anaplasmosis bovina (No. 9). <https://bmeditores.mx/wp-content/uploads/2019/10/20180823103304-956214.pdf>.

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (2013). ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL INTEGRADO DE GARRAPATA (*Boophilus* spp.) EN LA PRODUCCIÓN DE BOVINOS DE CARNE EN PASTOREO EN TAMAULIPAS [Folleto técnico]. CIR-NORESTE.

Kaneko, H. (2010). Pyrethroid Chemistry and Metabolism. En Kreiger R. Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology. (3ª ed., pp. 1635-1662). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2009-1-03818-0>.

Lew-Tabor A. E., Rodríguez Valle M. (2016). A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick-borne diseases. *Ticks Tick Borne Dis*; (7): 573–585.

Li, A. Y., Guerrero, F. D. y Pruett, J. H. (2006). Involvement of esterases in diazinon resistance and biphasic effects of piperonyl butoxide on diazinon toxicity to *Haematobia*

irritans irritans (Diptera: Muscidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 87, 147-155. doi:10.1016/j.pestbp.2006.07.004.

Li, A. Y., Lohmeyer, K. H. y Miller, J. A. (2009). Dynamics and mechanisms of permethrin resistance in a field population of the horn fly, *Haematobia irritans irritans*. *Insect Science*, 16, 175-184. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2009.00269.x>.

Li, A.Y., Guerrero, F.D, Almazán, G.C., George, J.E. (2003) 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* (L.). *J Med Entomol*; 40: 942-949.

Low, V. L., Chen, C. D., Lee, H. L., Tan, T. K., Chen, C. F., Leong, C. S., Lim, Y. A., Lim, P. E., Norma, Y. y Sofian, M. (2013). Enzymatic Characterization of Insecticide Resistance Mechanisms in Field Populations of Malaysian *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *PLoS ONE*, 8(11), 1-8.

Maldonado, E., Améndola, R., Cadena, J. A., Bermúdez, L., Kunz, S. E. (2006). Observaciones preliminares de la fluctuación estacional de *Haematobia irritans* en el centro de México. *Revista Científica*, 16(1), 31 - 38.

Maldonado, E., Apodaca, C., Sumano, H., Bermúdez, L., García, Z. y Gutiérrez, E. (2005). Susceptibilidad de *Haematobia irritans* de las zonas norte de Veracruz y centro de Nuevo León, México, a permetrina y diazinón. *Veterinaria México*, 36(2), 218-227.

Mancebo, O.A., Monzón, C. M., Bulman, G. M. (2001). *Haematobia irritans*; una actualización a diez años de su introducción en Argentina. *Veterinaria Argentina*. 18, (171), 34-46 18, (172), 119-135. <http://www.produccion-animal.com.ar/>.

Mazorra, M. T., Rubio, J. A. y Blasco, J. (2002). Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Scrobicularia plana*: kinetic characteristics and effects of heavy metals. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 131, 241-249. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00502-4](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00502-4).

Moss, D. W. (1992). Perspectives in alkaline phosphatase research. *Clinical Chemistry*, 38, 2486– 2492.

Muñoz Benitez, A. L. (2008). Anaplasmosis [Tesis de Licenciatura]. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”.
<http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/2891/ALFONSO%20LONGINOS%20MU%C3%91OZ%20BENITEZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Ocampo E., Durán A. M., García O. M. A., Cantó, A. G. J. y Rodríguez, S. D. (2006). *Anaplasma marginale*: Lack of cross-protection between strains that share MSP1a variable region and MSP4. *Veterinary Microbiology*, 114, 34-40. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.11.058.

Ola-Fadunsin, S. D., Gimba, F. I., Abdullah, D. A., Sharma, R. S. K., Abdullah, F. J. F. y Sani, R. A. (2018). Epidemiology and risk factors associated with *Anaplasma marginale* infection of cattle in Peninsular Malaysia. *Parasitology International*, 67 (6), 659–665: doi.org/10.1016/j.parint.2018.06.013.

Olguín, A. (2013). Piroplasmosis. Clínica de los bovinos. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
<http://www.ammveb.net/clinica/piroplasmosis.pdf>.

Organización de la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas. (2012). Directrices sobre la Prevención y Manejo de la Resistencia a los Plaguicidas. <https://www.fao.org/publications/card/es/c/b24dbc26-fd30-4794-b011-61ba7b207f5a/>.

Organización Mundial de la Salud. (1962). Moscas de importancia para la salud pública y su control (No 61). <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/1344/42163.pdf?se>.

Ozubek, S. y Aktas, M. (2018). Molecular Evidence for a Novel Species of Babesia in Unfed *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae). *Revista de Entomología Médica*. <https://doi.org/10.1093/jme/tjy061>.

Panei, C. J., Larsen, A. E., Fuentealba, N. A., Metz, G. E., Echeverría, M. G., Galosi, C. M. y Valera, A. R. (2019). Study of horn flies as vectors of bovine leukemia virus. *Open Veterinary Journal*, 9(1), 33-37. doi: 10.4314/ovj.v9i1.6.

Ponce, G., Cantú, P. C., Flores, A., Badii, M., Zapata., R., López, B. y Fernández, I. (2006). Modo de acción de los insecticidas. *Revista Salud Publica y Nutrición*, 7(4), 1-18. <https://respyn.uanl.mx/index.php/respyn/article/download/178/160/319quence=1&isAllowed=y>.

Quiroz, H. (2005). Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. México D.F. Editorial LIMUSA. pp. 179-199.

Ranson, H., Claudianos, C., Ortelli, F., Abgrall, C., Hemingway, J., Sharakhova, M.V., Unger, M.F., Collins, F.H., Feyereisen, R. 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science*. 298: 179-181.

Ristic, M. y Kreir, J. P. (1984). Anaplasma. p. 719-722. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Kreig, N. R., Holt, J. B. (eds.) Vol. 1, Baltimore Willians and Wilkins.

Ristic, M. y Watrach, A. M. (1963). Anaplasmosis. VI. Studies and hypothesis concerning the cycle of development of the causative agent. *American Journal of Veterinary Research*, 24, 267-277.

Rodríguez Vivas, R.I. (2015). Técnicas para el diagnóstico de parásitos con importancia en salud pública y veterinaria. (1er ed.) AMPAVE-CONASA.

Rodríguez, R. I., Grisi, L., Pérez, A. A., Silva, H., Torres, J. F. J., Fragoso, H., Romero, D., Rosario, R., Saldiema, F. y García, D. (2017). Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8(1), 61-74. <http://dx.doi.org/10.22319/rmcp.v8i1.4305>.

Rodríguez, R. I., Torres, J. F., Ramírez, G., Rosado, J. A., Aguilar, A. J., Ojeda, M. M., y Bolio, M. E. (2011). Manual técnico: Control de parásitos internos y externos que afectan al ganado bovino en Yucatán, México. https://www.researchgate.net/publication/268223768_RodriguezVivas_RI_Torres_AJF_Ramirez_CGT_Aguilar_RJA_Aguilar_CAJ_Ojeda_CMM_Bolio_GME_2011_Manual_tecnico_Control_de_parasitos_internos_y_externos_que_afectan_al_ganado_bovino_en_Yucatan_Mexico_UADY-C.

Rojas, E., Mosqueda, J.J., Álvarez J. A., Hernández, R., Ramos J. A., Rojas, C., Cantó G. J., Vega, C. A. y Figueroa, J. V. (2011). Transmisión de cepas atenuadas de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* por garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 2(3), 267-281.

Romano, A. (1994). Mosca de los cuernos. Imprenta Pluda. Buenos Aires. Argentina.

Sae-Tiao, N., Stich, R. y Jittapalpong, S. (2018). Biodiversidad de moscas hematófagas en relación con la prevalencia de *Anaplasma marginale* en granjas lecheras, provincia de Ratchaburi. *Medicina veterinaria de Mahanakhon San*, 13 (2), 171-184.

Santamaria, E. R. M. (2012). Estimación de la prevalencia e incidencia de babesiosis en el hato bovino del sitio experimental La posta, Paso del toro, Ver. [Tesis Maestría]. Universidad Autónoma del Estado de México.

Santamaría, V. M., (1993). Informes de resultados de la obtención de la CL50, 90 y 99 de la cepa “susceptible” de la mosca del cuerno *H. irritans*. Reporte técnico Departamento de Entomología Veterinaria. CENAPA-SAGAR.

Santamaría, V.M., Ortiz, E.M., Franco, B.R., Fragoso, S.H., Osorio, M.J. Evaluación biológica de mosquicidas para el testigo de *Haematobia irritans* en México y situación actual de la resistencia. (1995) III Seminario Internacional de Parasitología Animal. Resistencia y Control en Garrapatas y Moscas de Importancia Veterinaria; octubre 11-13; Acapulco (Guerrero) México. Acapulco, Gro. México. SAGAR-CANIFARMA-FAO/ICA- INIFAP. 1995:119-122.

Santo, P. L., Vassena, C. V., Carvajal, G. y Clark, E., Menacho, S., Bozo, R., Gilman, R. H., Bern, C. y Marcet, P. L. (2016). Toxicological, Enzymatic, and Molecular Assessment of the Insecticide Susceptibility Profile of *Triatoma infestans* (Hemiptera: *Reduviidae*, *Triatominae*) Populations From Rural Communities of Santa Cruz, Bolivia. *Journal of Medical Entomology*, 1–9. doi: 10.1093/jme/tjw163.

Satoh, T. y Hosokawa, M. (2006). Structure, function and regulation of carboxylesterases. *Chemico-Biological Interactions*, 162(3), 195-211. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.07.001>.

Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. (septiembre 21, 1994) NORMA Oficial Mexicana NOM-006-ZOO-1993, Requisitos de efectividad biológica para los ixodicidas de uso en bovinos y método de prueba. DO. 21/09/1994. <https://www.gob.mx/senasica/documentos/nom-006-zoo-1993>.

Sheppard, C. D., Hinkle, C. N., 1987. A field procedure using disposable materials to evaluate horn fly, *Haematobia irritans* (L.) insecticide resistance. *Journal of Agricultural and Urban Entomology*, 4, 87-89.

Soulsby, E. J. (1987). *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos* (7ª ed.) Interamericana, México.

Steelman, C. D., McNew, R. W., Simpson, R. B., Rorie, R. W., Phillips, J. M. y Rosenkrans, C. F. (2003). Evaluation of alternative tactics for management of insecticide-resistant horn flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, 96, 892-901. doi: 10.1093/jee/96.3.892.

Szalanski, A. L. (1991). Esterase activity in pyrethroid-resistant horn fly, *Haematobia irritans*, populations. [Tesis de Maestría]. Kansas State University.

Taboada, L. Y., Olivares, J., Gutiérrez, I., Valencia, M. T., Rojas, S. y Córdova, A. (2013). Diagnóstico de la resistencia de *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) a cipermetrina y coumafos en ranchos bovinos de tierra caliente, Guerrero, México. *Revista Científica FCV-LUZ*, 23(4), 283 - 286.

The Center for Security and Public Health (2008). Babesiosis bovina. https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/babesiosis_bovina.pdf.

Tolrá M C. (2015). Clase Insecta: Orden Diptera (No 63). <http://seaentomologia.org/ID>.

Torres, L., Almazán, C., Ayllón, N., Galindo, R. C., Rosario, R., Quiroz, H., Gortazar, C., de la Fuen, J. (2012). Identification of microorganisms in partially fed female horn flies, *Haematobia irritans*. *Parasitology Research*, 11, 1391–1395. DOI: 10.1007/s00436-012-2877-y.

Torres, P. R., Cicchino, A. C., Abramovich, A. H., Nuñez, J. J., Prieto, O. H. (1994). Los enemigos naturales de *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) en dos áreas ganaderas del Argentina. *Revista Médica Veterinaria*, 75(1), 6-16.

Vanazzi, D. L., Rigo, T. C., Baldasso, N. D., Collet, S. G., Prestes, A. M., Biondo, N., Savaris, T., y Camillo, G. (2020). Occurrence of *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* in clinically affected cattle in western Santa Catarina, Brazil. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal. Brazilian Journal of Animal Health and Production*, 21(4), 1-10. <https://doi.org/10.1590/S1519-99402121182020>.

Villavicencio, M. A. y Pérez, B. E. (2010). Plantas tradicionalmente usadas como plaguicidas en el estado de Hidalgo, México. *Polibotanica*, 30, 193-238.

Wang, L. L., Lua, X. P., Smagheha, G., Menga, L. W. y Wang, J. J. (2017). Functional characterization of BdB1, a well-conserved carboxylesterase among tephritid fruit flies associated with malathion resistance in *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 200, 1–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.07.001>.

Yu, S. J. (1996). Insect Glutathione S-Transferases. *Zoological Studies*, 35(1), 9-19. <https://zoolstud.sinica.edu.tw/Journals/35.1/9.pdf>.

Zapata, R., Cardona, E., Reyes, J., Triana, O., Peña, V., Ríos, L., Barahona, R., Polanco, D. (2017). Tripanosomiasis bovina en ganadería lechera de trópico alto: primer informe de *Haematobia irritans* como principal vector de *T. vivax* y *T. evansi* en Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, 33, 21-24. <https://doi.org/10.19052/mv.4048>.

Zapata, R., Lara, N., Baena, A., Reyes, J., Ríos, L. A. (2011). Seroprevalencia de babesiosis bovina en la hacienda Vegas de la Clara, Gómez Plata (Antoquia). 2008. *Revista Médica Veterinaria*, 21, 63-71. <https://doi.org/10.19052/mv.577>.

Zhang, L., Liu, X., Wang, Ch., Liu, X., Cheng, G. y Wu Y. Expression, purification, and direct electrochemistry of cytochrome P450 6A1 from the house fly, *Musca domestica*. *Protein Expression and Purification*, 71 (1), 74-78. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2009.12.008>.