

Capítulo XLI

Avances y perspectivas sobre diagnóstico y control estratégico de la tripanosomosis en Ganadería Doble Propósito

Rita Tamasaukas
Jazmín Florio-Luis de Pineda

El incremento demográfico, el aumento de los ingresos y de la urbanización muestran en la actualidad, un notable crecimiento de la demanda de alimentos de origen animal en los países en desarrollo: la “revolución ganadera”. No obstante, el cambio climático ha generado impacto sobre los ecosistemas y sobre el comportamiento epidemiológico de las enfermedades; por otro lado, el alto costo de los productos farmacéuticos está afectando el manejo sanitario preventivo y curativo bovino.

La biotecnología se está utilizando en diversos campos de la producción y sanidad animal. Entre sus principales aplicaciones en ganadería se encuentra la identificación y el chequeo de parentesco, la construcción de mapas genéticos y el desarrollo de nuevos tratamientos de enfermedades. Los marcadores moleculares constituyen hoy una herramienta moderna y poderosa para el viejo arte de la selección.

En Venezuela, las afecciones causadas por los agentes hemotrópicos parasitarios de los Géneros *Anaplasma* (*Anaplasma marginale*), *Babesia* (*Babesia bigemina* y *B. bovis*) y *Trypanosoma* (*Trypanosoma vivax*) están distribuidos en forma endémica, es decir, siempre se encuentran presentes en todos los estados del país con vocación ganadera, en especial coincidiendo con las variaciones estacionales (Tamasaukas, 2008). Incluso las especies citadas pueden presentarse en forma simultánea, lo que motivó el desarrollo del concepto de tetralogía hemoparasitaria (Tamasaukas *et al.*, 2000) para indicar su presencia endémica, habiéndose incluso descritos brotes agudos de enfermedad hemotrópica mixta (Tamasaukas *et al.*, 1998; Tamasaukas *et al.*, 2000; Tamasaukas, 2008; San Juan-Lions, 2010).

Los altos costos por mortalidad, pérdidas productivas, reproductivas, medidas preventivas y curativas en animales enfermos, han motivado para ofrecer una revisión sobre la situación actual, logros y desafíos en el estudio, diagnóstico y control de la tripanosomosis para un desarrollo sustentable de la ganadería doble propósito.

TRIPANOTOLERANCIA

El término tripanotolerancia viene dado por una condición genética que permite que los animales sean capaces de mantener los valores del hematocrito y controlar la tasa de crecimiento de la consecuente infección, mantener el peso de los animales infectados, así como contrarrestar los efectos negativos de la infección por el *Trypanosoma vivax* (d'Ieteren *et al.*, 1998; CIP-UPWARD, 2003; van der Waaij *et al.*, 2003; Hill *et al.*, 2005). Aunque esta condición no elimina la transmisión del parásito, disminuye considerablemente la prevalencia del mismo en zonas endémicas, permitiendo complementar la selección y programas de cruzamiento que se vienen realizando a nivel de productores e instituciones públicas y privadas (FAO, 2008; Florio *et al.*, 2011; Tamasaukas *et al.*, 2012).

En Venezuela se ha reportado, por caracterización fenotípica, la tripanotolerancia en algunos bovinos con énfasis en bovinos criollos (Agudo *et al.*, 2009), dado que los criollos en América provienen de troncos filogenéticos pertenecientes al Ibérico y al Aquitanicus del *Bos primigenius* y representantes del *Bos hamaticus* de África (Landaeta-Hernández, 2008; Mass, 2011). De igual manera, se destaca la raza bovina Senepol que posee características genéticas de la N´dama de Senegal (raza *Bos taurus* africana identificada como tripanotolerante). Los bovinos *Bos taurus* o mestizos con predominio *Bos taurus* muestran una condición de tripanotolerancia, coincidiendo con lo reportado por estudios africanos utilizando otras razas pertenecientes a la especie *Bos taurus* (Gachohi *et al.*, 2009; Stein, 2011). Este comportamiento hace suponer que hay una condición genética común entre las diversas razas *Bos taurus* involucradas (Stein, 2011).

Se ha señalado que los beneficios económicos de realizar una mejora genética a través del uso de marcadores moleculares para lograr la tripanotolerancia produciría ingresos de US\$ 281 millones *vs.* US\$ 32 millones de evaluación y selección en campo de animales que presenten la enfermedad. Con el uso de marcadores moleculares se prevé el poder evitar a futuro la enfermedad mediante la identificación de bovinos resistentes o los tolerantes y por ende su selección como futuros padres, logrando una disminución notable de la mortalidad por causa de la enfermedad, en costos en el manejo sanitario preventivo y curativo y pérdidas productivas y reproductivas por causa de esta enfermedad (Bishop *et al.*, 2002).

De esa forma, sería posible disminuir la aplicación de tratamientos con tripanocidas, los cuales son altamente tóxicos y costosos, produciendo un animal que en condiciones normales puede controlar tanto la parasitemia como la anemia, sin necesidad de aplicar drogas, produciendo un animal cuyo productos (leche y carne) serán de calidad, al estar libre de residuos, reduciendo el riesgo en salud pública que su presencia ocasionan en los productos y sub-productos, así como minimizar las posibilidades de aparición de resistencia a los fármacos por subdosificación (Miranda & González, 2010; Cassalet *et al.*, 2011).

Una condición para realizar la identificación de animales tripanotolerantes y tripanosusceptibles, es la valoración del reto parasitario al cual los animales están expuestos en condiciones naturales. Durante la última década, se ha venido detectando en Venezuela la prevalencia de la tripanosomosis bovina por *T. vivax*, con valores que

varían de 20,8% a 57,8% por exámenes serológicos y de 1 a 3,9% de infecciones activas mediante exámenes parasitológicos directos (Tamasaukas *et al.*, 2010). La mayor frecuencia de animales positivos a *Trypanosoma vivax* se encuentra en animales de razas importadas, principalmente Holstein, Pardo Suizo, y otras de origen *Bos indicus*. Esto puede atribuirse a que son animales altamente susceptibles y a las pérdidas de la condición de tripanotolerancia, atribuible a los cruzamientos, como ha sido evidenciado en países africanos (Tamasaukas *et al.*, 2010).

DETERMINACIÓN DE TRIPANOTOLERANCIA

La gran variabilidad observada en los animales utilizados en los sistemas de producción doble propósito en el llano venezolano, implica responder ¿Qué tipo de animal sería el más apropiado para las condiciones agroclimáticas particulares de cada región? Este hecho coincide con la política del Estado venezolano de rescatar el ganado criollo autóctono, que responde a las inclemencias del trópico. En ese caso, una selección por tripanotolerancia, aunada con un sistema de buenas prácticas ganaderas, conducirían al incremento de un rebaño nacional con mayores probabilidades de sobrevivencia en comparación con la de los animales importados, en las zonas más susceptibles. Entre los avances en la investigación para la determinación de la tripanotolerancia en animales DP se ha sugerido la evaluación de estrategias biotecnológicas de genética molecular, como los marcadores moleculares para la identificación de QTL's (Quantitative Trait Locus), para su inclusión en hembras y machos mejoradores del rebaño DP en los llanos centrales.

Estudios derivados de la caracterización de los marcadores fenotípicos (hemáticos, clínicos, parasitológicos, bioquímicos, inmunoserológicos e identificación del tipo animal por caracteres zoométricos) han mostrado resultados muy alentadores no solo para el control de la tripanosomosis, sino también para su utilización en las estrategias de manejo reproductivo y mejoramiento animal genético (Agudo *et al.*, 2009).

Con la caracterización biomolecular de las cepas de *T. vivax*, por ejemplo, utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction) favorecería la determinación de la variabilidad patogénica y la epidemiología del parásito (Tamasaukas, 1995; Reinfenberg *et al.*, 1997), el estudio del polimorfismo genético de caracteres heredables, la identificación y caracterización de marcadores moleculares para tripanotolerancia (Dirie *et al.*, 1993; Morlais *et al.*, 2001; Bissadou, 2002; van der Waaij *et al.*, 2003). De esa forma, se avanzaría técnica y científicamente para establecer los árboles filogénicos de *T. vivax* y derivar los estuches de diagnóstico con las diversas cepas activas, regionalizadas y bien definidas para cada ambiente, pues la adopción de métodos de estandarización y de control estadístico de los procesos, contribuyen a la generación de productos de calidad y estabilidad para su uso masivo.

Se ha logrado evidenciar que, los parásitos responden a señales del hospedador para controlar su crecimiento y proliferación, a las cuales responde el parásito con otras señales para establecer y mantener la infección y causar la enfermedad en los animales tripanosusceptibles (Bissadou, 2002; van der Waaij *et al.*, 2003). Vincendeau & Bouteille (2006) indican que, las modificaciones en el sistema inmune son variadas,

el principal material antigénico, la gliocoproteína de superficie o VSG, está asociada a la evasión de la respuesta inmune, sea por disfunción en las redes de citocinas como en la producción de anticuerpos.

Por otra parte, el uso de antígenos heterólogos (*T. evansi*) para el diagnóstico de tripanosomiasis bovina ha sido aceptado, por lo práctico de su producción (mediante infecciones experimentales en ratas) y debido a su reactividad cruzada con anticuerpos derivados de la respuesta inmune ante una exposición a *T. vivax* (Rossi *et al.*, 2008); además, la propensión es a desarrollar técnicas con antígenos homólogos para el diagnóstico especie-específico para incrementar la eficiencia de la especificidad del diagnóstico.

Dentro de estas estrategias, sin duda alguna, las que ofrecen un futuro más promisorio en términos mediatos es el desarrollo de técnicas de inmuno-ensayo enzimático (ELISA), con apoyo de la PCR para la obtención de los antígenos puros de calidad de *T. vivax* (Tamasaukas *et al.*, 2010; Tamasaukas, 2011a). Estos estudios, aunque bien orientados por la evidencia previa de reacciones cruzadas entre *T. vivax* y *T. evansi* no han logrado el cometido de obtener resultados satisfactorios por la pérdida en la especificidad y en la confiabilidad de los valores predictivos de ELISA, al usar a *T. evansi* como fuente de antígeno para el diagnóstico de *T. vivax* en rebaños bovinos.

La identificación de los principales antígenos de trypanosomas y su producción como moléculas recombinantes o péptidos sintéticos, conduce al desarrollo y validación de nuevas pruebas basadas en el empleo de moléculas definidas. En la actualidad, se siguen trabajos para mejorar la especificidad y sensibilidad de las pruebas serológicas o indirectas para la determinación de anticuerpos (Ac-ELISA), con la producción eficiente de Ac-especie-específicos, y poder alcanzar un alto nivel de estandarización que aún no se ha logrado mediante la utilización de extractos totales de parásitos (OIE, 2004; Tamasaukas, 2011).

Tanto la inmunofluorescencia indirecta (IFI) como el Ac-ELISA son pruebas de detección de anticuerpos con altos valores de sensibilidad y especificidad, aunque variables según el tipo de antígeno utilizado. Ambas detectan respuestas inmunitarias a infecciones actuales y pasadas y pueden, en consecuencia, proporcionar solamente un diagnóstico preliminar de infección activa, al determinar los títulos de anticuerpos. El inmunodiagnóstico necesita un equipo costoso y sofisticado y experiencia, la que no está siempre disponible. Debe llevarse a cabo en laboratorios especializados, existiendo un amplio atraso entre el muestreo real y la disponibilidad de los resultados.

Sin embargo, el Ac-ELISA para anticuerpos se presta a un alto grado de automatización y estandarización. La colecta y el almacenamiento de muestras pueden realizarse con facilidad mediante el uso de papeles de filtro. Todos estos factores hacen del ELISA para anticuerpos una prueba muy útil para determinar a gran escala la distribución de tripanosomosis (OIE, 2004). El Ac-ELISA homólogo, con extractos purificados especie-específicos de *T. vivax* resulta más eficiente para el diagnóstico serológico de la tripanosomosis, tal como se ha determinado en estudios en campo con diagnósticos parasitológicos directos (frotis sanguíneo o coloreados, Quantitative Buffy Coat o QBC en tubos capilares QBC IDEXX®) e indirectos (IFI, Ac-ELISA) (Tamasaukas *et al.*, 2012).

Para el diagnóstico serológico de la tripanosomosis, en los proyectos biotecnológicos que abarcan procesos de identificación y caracterización del tipo animal tripanotolerante que precisa determinar valores de seropositividad (entre los criterios para la caracterización fenotípica), se requiere el uso de técnicas más efectivas para ello, como lo es el Ac-ELISA, con antígenos especie-específicos apoyados con PCR, a fines de la validación regional y certificación internacional de la técnica, según las normas de la Organización Internacional para la Sanidad Animal (OIE, 2005).

La caracterización fenotípica de la tripanotolerancia es un paso previo para luego realizar la caracterización molecular con el fin de identificar la presencia de los genes que codifican para esa condición. Además permitirá avanzar en el conocimiento de la presión de selección de reproductores que demuestren esta carga genética, en especial, en los programas de uso sustentable y de preservación de recursos zoogenéticos autóctonos, como son las razas criollas.

Para diagnóstico de rutina, las perspectivas se orientan a la evaluación de productos antigénicos de *T. vivax* para protocolos de ELISA y el desarrollo de los estuches de ELISA para el diagnóstico certero y precoz de esta afección hemotrópica; además del inmunoensayo de capa fina (ICF) que será utilizada en el mejoramiento de las medidas de control y seguimiento epidemiológico a nivel nacional e internacional, al ser elaborados con las principales cepas regionales del parásito con su pedigré, sustituyendo técnicas diagnósticas tradicionales como la observación directa del parásito. La especificidad de las técnicas de ELISA se refuerza en gran medida por la calidad de los antígenos y reactivos que se utilicen. Para ELISA indirecto (Ac-ELISA), uno de los requerimientos críticos es la observancia del procedimiento de identificación y selección del antígeno (*T. vivax*) a usar en la sensibilización de la placa; para ello, una herramienta biotecnológica que blinda la producción de estos antígenos, es la técnica de PCR (Tamasaukas *et al.*, 2012).

Partiendo de las bases metodológicas de los trabajos antes mencionados, se evalúan tres productos antigénicos de *T. vivax*: extracto crudo total, extracto soluble purificado fraccionado y extracto antigénico desnaturalizado, todos derivados de tripanosomas procíclicos y/o metacíclicos, aislados, estabilizados o clones, usados para formatos de ELISA en tres sistemas: sangre total (sólido, en papel filtro), plasma y/o suero (líquido) (Tamasaukas *et al.*, 2012). Estos materiales son valorados según los parámetros de sensibilidad, especificidad, valor predictivo, índice de kappa (k), índice de concordancia, prueba de Mac Nemar, repetibilidad intra-ensayo, repetibilidad interensayo (Ortiz-Losada *et al.*, 2007; Tamasaukas *et al.*, 2012).

Por otra parte, la evaluación de la respuesta inmunitaria a la tripanosomosis también es una perspectiva objeto de estudio, ya que se ha indicado que las respuestas de citocinas VSG-específicas asociadas con la resistencia a la tripanosomosis africana murina son dependientes de la fase de la infección, con las respuestas de citoquinas de tipo I, críticas durante la fase temprana de la infección, mientras que las respuestas de citocinas de tipo II parecen ser más importante durante las fases tardías de la infección y crónicas de la enfermedad (Namangala *et al.*, 2009).

Debido a las similitudes notables en el curso de la infección con PLC(-/-) (phospholipase-C-deficient *Trypanosoma brucei brucei*) en ratones B6B-F1 (ratones tripanotolerantes C57BL/6 x BALB/c-F1) con la de los bovinos N'Dama tripanotoleran-

tes infectados naturalmente con *T. congolense*, representa un modelo adecuado para estudiar el curso de las respuestas inmunitarias de la infección durante la tripanosomiasis bovina (Namangala *et al.*, 2009).

En la actualidad, en España, se está desarrollando una investigación en el Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), la cual pretende la resecuenciación del receptor de la quimiocina CXC tipo 4 -XCR4- relacionado con la inmunidad y aptitud ("fitness") con dos objetivos: establecer los patrones evolutivos y los efectos de selección de este gen, comparando muestras de *Bos taurus* europeo y africano con ganado cebuino (*B. indicus*) y otros miembros de la Tribu *Bovini*, incluyendo gaur-*B. frontalis*, y establecer relaciones de asociación entre los polimorfismos encontrados con la estrongilosis y la tripanotolerancia.

Para ello, se contará con muestras obtenidas en campo, provenientes de ganado africano y fenotipadas para la presencia de tripanosomas circulantes en sangre. Se aplicarán tecnologías de captura de secuencias en arreglos de fase líquida y posterior análisis de las secuencias mediante secuenciadores de alto rendimiento. Esta tecnología, que permite una resecuenciación simultánea y económica de varios miles de pares de bases del genoma, está indicada en aplicaciones finalistas para la detección de mutaciones en regiones concretas del genoma, más que en el genoma completo (Goyache-Goñi, 2011).

La raza etíope Sheko fue reportada como tripanotolerante (Stein *et al.*, 2011) y habiéndose señalada la relación de los locus Tir1, Tir2 y Tir3 con la tripanotolerancia (Nganga *et al.*, 2010). En ganado Criollo Limonero (*Bos taurus*), las evidencias de campo sugieren la presencia de resistencia natural a hemoparásitos (Esquivel-Villalobos, 2012). La caracterización fenotípica de razas locales (o razas candidato) y su comparación con otras razas susceptibles presentes en el mismo ámbito geográfico, es el reto ideal.

Se han identificado cambios temporales en la expresión génica de las células mononucleares en sangre periférica de hospedadores infectados por tripanosoma durante la progresión de la enfermedad. Estas diferencias en mayor grado existen entre bovinos de razas tripanotolerantes y las tripanosusceptibles. Utilizando un ensayo de microarreglos con un oligonucleótido largo y su validación por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR: quantitative Real Time-Polimerase Chain Reaction) fueron analizados los genes de expresión de aquellas células en bovinos infectados por *T. congolense* a lo largo de 34 días del curso de la infección (O'Gorman *et al.*, 2009).

Los modelos de ratón para estudios de tripanosomosis han proporcionado ideas fundamentales en los mecanismos de variación antigénica, como la interacción de los tripanosomas con el compartimiento de células B-adaptativas, el impacto de la inmunidad innata en complicaciones asociadas de la enfermedad y la influencia de la saliva de la mosca tsetse en el inicio de la infección. Hasta la fecha, la mayoría de estos datos obtenidos de infecciones experimentales aún no se han validado en infecciones naturales. Sin embargo, los patrones de citoquinas que regulan la interacción hospedador-parásito ya han mostrado pruebas relevantes. Por ejemplo, fueron validados en ganado, la relación entre la VSG (Variant Surface Glycoprotein: glicoproteína variable de superficie) y la inducción de TNF (Trypanolytic factors: factores tripanolíticos) y el rol posterior del TNF en el inicio de la anemia asociada con la inflamación.

Por otra parte, la implicación del equilibrio IFN- γ (Interferón- γ)/IL-10 (Interleukina 10) en el control de las cargas parasitarias y su patogenicidad, han sido reportadas en la tripanosomosis africana humana (HAT). Por el contrario, las observaciones experimentales relacionadas con la disfunción de las células B y la ineficacia de la vacuna podría ser muy relevante para las infecciones naturales, pero aún no se han explorado en condiciones de campo (Magez & Caljon, 2011).

INMUNIDAD A LOS TRIPANOSOMAS, UN DESAFÍO EN EL CAMPO TERAPÉUTICO

Teniendo en cuenta las recientes herramientas en el campo de la inmunología innata, que incluye el uso de eliminación de genes o modelos de animales transgénicos, los anticuerpos monoclonales dirigidos a moléculas específicas de interés y al uso de agonistas/antagonistas específicos, en un futuro cercano podría ser interesante abordar una serie de preguntas como una prueba directa de la contribución de los diversos componentes de la inmunidad innata hacia la tripanosomosis. En el campo terapéutico de la tripanosomosis, Namangala (2012) formula unas preguntas relacionadas con componentes de la inmunidad a tripanosomas. Las interrogantes que se señalan a continuación tienen un potencial terapéutico y constituyen un desafío para mejorar el control de la tripanosomosis humana, así como las interrelaciones con las infecciones por especies de *Trypanosoma* en animales.

1. ¿Cómo interactúa la *T. brucei gambiense* con la inmunidad innata de los primates para resistir la actividad lítica de la Apolipoproteína L1 (APOL-1) y las toxinas relacionadas y cómo hace que el mecanismo difiera de la evasión inmune SRA (SRA: trypanosome lysosomal protein)-mediada por *T. brucei rhodesiense*?
2. ¿Cuál es el mecanismo de la absorción por los tripanosomas del TLF2 (*Trypanosome* Lytic Factor 2: factor tripanolítico tipo 2)?
3. ¿Cuál es el papel directo del sistema del Complemento, en particular la vía de la unión m, anano-lectina de la activación del complemento, durante la tripanosomosis?
4. Dado que los Tip-DCs han sido reportados como patogénicos durante la tripanosomosis. ¿Cómo los Tip-DCs difieren de las DCs convencionales en términos de su función durante la tripanosomosis? ¿Cuál (es) tipo (s) celular (es) está (n) involucrada (s) en la producción de mediadores pro y anti-inflamatorios asociados con tripanotolerancia; cuáles están involucrados en la hiperproducción de estos mediadores que conducen a tripanosusceptibilidad? ¿Qué conduce a la activación de tales células patogénicas durante la tripanosomosis?
5. ¿La tripanotolerancia parece requerir un cambio secuencial de la producción de M1 (monocytic cell 1: célula monocítica tipo 1) a M2 (monocytic cell 2: célula monocítica tipo 2). ¿Qué factores median este cambio? ¿Se produce M2 durante las infecciones naturales con tripanosomas?
6. Hace poco se reportó (Courtin *et al.*, 2006) la existencia de polimorfismo en los genes TNF- α (Tumour Necrosis Factor alfa: factor alfa de necrosis tumoral) y IL-10 (Interleukina 10) los cuales juegan un papel crucial en la determinación de la resistencia a la HAT (Human African Trypanosomosis). Interesa conocer: ¿Hay

polimorfismo en dichos genes de interés como el TNF- α , NO (Nitric oxide: óxido nítrico), IL- 10, IFN-c (Interferón c) durante modelos experimentales y naturales de la tripanosomosis?

7. ¿Cuál es el papel preciso de las células NK (Natural Killer) en la tripanosomosis?

CONCLUSIONES

La tripanosomosis bovina es una afección hemotrópica de importancia económica en los sistemas de producción con rumiantes, caracterizada como una enfermedad endémica y de distribución espacial en todo el territorio venezolano con valores variables de prevalencia y seroprevalencia según la zona agroecológica y la época del año. La tripanotolerancia es una condición de base genética que posibilita la identificación y la caracterización fenotípica y molecular de animales portadores de los genes que la codifican. Es de gran utilidad para establecer estrategias de mejoramiento genético de las razas doble propósito en Venezuela y para derivar en programas de reproducción y selección sustentables con énfasis en los llanos venezolanos, donde la tripanosomosis sigue siendo una enfermedad de importancia económica.

La importancia en la identificación de animales tripanotolerantes radica principalmente en: a) la tripanosomosis es un enfermedad endémica en Venezuela; b) se presenta en distintas zonas agroecológicas del país; c) no hay vacuna disponible para su prevención; d) las drogas utilizadas para su profilaxis son altamente tóxicas, costosas y en algunos casos susceptibles de fraude; e) las drogas dejan residuos en la leche, carne y al ambiente; f) la aparición de resistencia a las drogas disponibles en el mercado, sobre todo por subdosificación; g) es posible lograr disminuir los costos de producción, en especial en pequeños sistemas de producción ganaderos; h) la selección por tolerancia es factible aplicarla porque la tripanosomosis no es una zoonosis; i) la necesidad de preservación y uso sustentable de recursos zoogenéticos autóctonos.

Las técnicas de genética molecular están disponibles para su ejecución en los rebaños ganaderos doble propósito, con la finalidad de identificar genes deseables en la población bovina y mitigar los efectos del cambio climático, sobre las razas establecidas (no autóctonas), con menos posibilidades de soportar las inclemencias de las condiciones climáticas actuales y futuras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agudo L, Tamasaukas R, Silva A, Sánchez J, Ron J, Fernández M, Florio J, Vintimilla M, Colmenares O, Rivera S. 2009. Tipo bovino trypanotolerante y trypanosusceptible doble propósito en la región de los llanos Centrales de Venezuela. I: Identificación y caracterización fenotípica. REDVET. Rev. Electrón. Vet.
- Barbosa L, Restrepo P. La Raza Senepol. Zoociencia. UDCA. Colombia. Revista Virtual Zootecnia.
- Bissadou K. 2002. Contribution à l'étude de la diversité génétique de populations bovines au Bénin. Mémoire présenté pour obtenir le diplôme d'ingénieur agronome zootechnicien. Ecole Supérieure d'Agronomie. Université de Lomé. CIRDES. Burkina-Faso, África. 110 pp.

- Bishop S, Jong M, Gray D. 2002. Opportunities for incorporating genetic elements into the management of farm animal disease: Policy Issues. FAO. Background Study. N° 18. 39 pp.
- Cassalett E, Parra A, Baldrich R. 2011. Diagnóstico y caracterización molecular de infecciones naturales por *Trypanosoma* spp. en bovinos de la Orinoquía Colombiana Corpoica. *Cienc Tecnol Agropecu* 12 (1): 86-91.
- CIP-UPWARD. 2003. Conservación y uso sostenible de la biodiversidad agrícola. Libro de Consulta. Entendiendo la diversidad agrícola. Tomo I. Centro Internacional de la Papa. Perspectivas de los Usuarios con la Investigación y el Desarrollo Agrícola. Los Baños, Laguna, Filipinas. 3 Tomos: 136.
- d'Ieteren G, Authie E, Wissocq N, Murray M. 1998. Trypanotolerance, and option for sustainable livestock production in areas at risk from trypanosomiasis. *Rev Sci Tech* 17 (1): 154-175.
- Dirie M, Otte M, Thatthi R, Gardiner P. 1993. Comparative studies of *Trypanosoma Duttonella vivax*. *Parasitol*. 106: 21-29.
- Esquivel-Villalobos C. 2012. La raza, el pelo y la piel en función del bienestar animal. *Mundo Pecuario*, VIII (1): 73-85.
- FAO. 2008. Informe Pecuario. FAO (Ed.). Roma, Italia. 92 pp.
- González J, Meléndez R. 2007. Seroprevalencia de la tripanosomosis y anaplasmosis bovina en el Municipio Juan José Mora del estado Carabobo, Venezuela, mediante la técnica de ELISA. *Rev Cient FCV-LUZ* 17 (5): 1-7.
- Florio-Luis J, Tamasaukas R, Agudo L. 2011. La Trypanotolerancia en Ganadería Bovina en la República Bolivariana de Venezuela: Énfasis Bovinos Criollos. *Actas Iberoam Conserv Anim*. Vol 1. ISSN (ON LINE) 2253-9727.
- Gachohi J, Bett B, Murilla G. 2009. Factors influencing the prevalence of trypanosomosis in Orma Boran (trypanotolerant) and Teso zebu (trypanosusceptible) cattle crosses in Teso District, western Kenya. *Livest Res Rural Dev* 21 (12).
- Goyache-Goñi F. 2011. Caracterización del gen CXCR4 bovino y su promotor: filogenia en la tribu bovini, detección de selección y asociación con la tripanotolerancia. *Proyectos SERIDA*.
- Hill E, O'Gorman G, Agaba M, Gibson J, Hanotte O, Kemp S, Naessens J, Coussens P, MacHugh D. 2005. Understanding bovine trypanosomiasis and trypanotolerance: the promise of functional genomics. *Vet Immunol Immunopath* 105: 247-258.
- Landaeta-Hernández A. 2008. Ganado Criollo. Evolución y Perspectivas. Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias, Unidad de Investigaciones Zootécnicas, Maracaibo. Venezuela. Rancho Carora Blogspot.
- Magez S, Caljon G. 2011. Mouse models for pathogenic African trypanosomes: unravelling the immunology of host-parasite-vector interactions. *Parasite Immunology* 33 (8): 423-442.
- Maas P. 2011. Aurochs - *Bos primigenius*. In: TSEW (2014). The Sixth Extinction Website.
- Miranda M, Gonzales JL. 2010. Evaluación epidemiológica de la tripanosomiasis bovina en el Pantanal de San Matías. Tesis Médico Veterinario Zootecnista. Bolivia. 68pp.
- Morlais I, Ravel S, Grébaud P, Dumas V, Cuny G. 2001. New molecular marker for *Trypanosoma (Duttonella) vivax* identification. *Acta Tropical* 80 (3): 207-213.

Namangala B, De Baetselier P, Beschin A. 2009. Both Type-I and Type-II Responses Contribute to Murine Trypanotolerance. *J Vet Med Sci* 71 (3): 313-318.

Nganga J, Soller M, Iraqi F. 2010. High resolution mapping of trypanosomosis resistance loci Tir2 and Tir3 using F12 advanced intercross lines with major locus Tir1 fixed for the susceptible allele. *BMC Genomics*. 11: 394. doi: 10.1186/1471-2164-11-394.

OIE. 2004. Organización Internacional para la Sanidad Animal. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2004.

OIE. 2005. Oficina Internacional de Epizootias (OIE). Validación y certificación de pruebas de diagnóstico.

O'Gorman G, Park S, Hill W, Meade K, Coussens P, Agaba M, Naessens J, Kemp J, MacHugh D. 2009. Transcriptional profiling of cattle infected with *Trypanosoma congolense* highlights gene expression signatures underlying trypanotolerance and trypanosusceptibility. *BMC Genomics*. 1 (10): 207.

Ortiz-Losada E, Silva-Cabrera E, Izquierdo-Marqu ez M. 2007. Normalizaci n y evaluación del inmunoensayo ABICAP-BRU para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina. *REDVET Rev. electr n. Vet VIII* (4). Abril.

Reifenberg J, Solano P, Cuisance D, Duvallet G. 1997. Contribution of the PCR technique for a better understanding of the epidemiology of animal trypanosomosis in West Africa. In: Proc first intern Conf on Salivarian trypanosomes (FAO animal production and health paper 136). Tryplink-L discussion list 9-14 December 1996.

Rossi M, Sigales S, Zapata D. 2008. Inmunoensayo de capa fina (ICF) en el serodiagnóstico de la tripanosomiasis bovina causada por el *Trypanosoma vivax*. *Rev Cienc Vet* 49 (2): 81-89.

San Juan-Lions CF. 2010. Enfermedades causadas por hemoparásitos en ganado bovino. Revisión. *Fac Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de Córdoba. Berástegui. España*. 43 pp.

Stein J. 2011. Trypanotolerance and phenotypic characteristics of four Ethiopian cattle breeds. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, Sweden. 63pp.

Stein J, Ayalew W, Rege E, Mulatu W, Lemecha H, Tadesse Y, Tekle T, Philipsson J. 2011. Trypanosomosis and phenotypic features of four indigenous cattle breeds in an Ethiopian field study. *Vet Parasitol* 31:40-47.

Tamasaukas R. 1995. Estudio General de la Trypanosomiasis Bovina. Univ Nac Exp Rómulo Gallegos, San Juan de los Morros, Estado Guárico, Venezuela. Trabajo de Ascenso a la Categoría Titular. 342 pp.

Tamasaukas R. 2008. Tetralogía hemoparasitaria en ganadería doble propósito venezolana. En: Desarrollo Sostenible de Ganadería Doble Propósito. 2008. C González-Stagnaro, N Madrid Bury, E Soto Beloso (eds). Ediciones Astro Data, Maracaibo. XXVII: 314-325.

Tamasaukas R, Roa N, Ruiz H, Rodríguez I, Baldizón A, Aso P. 1998. Valores hematológicos en infecciones naturales con *Trypanosoma vivax* en fincas bovinas del Estado Guárico, Venezuela. *Act Cient Ven*. 49 (Supl. 2): 336.

Tamasaukas R, Aguirre A, Ron J, Roa N, Cobo M. 2000. Tetralogía hemoparasitaria en algunas fincas bovinas del municipio Santa Rita, estado Guárico, Venezuela. *Rev Fac Ciencias Veterinarias. UCV*. 41 (4): 101-108.

Tamasaukas R, Agudo-Castellanos L, Silva-Ravelo A, Florio-Luis J, Vintimilla-Tamasaukas M, Rivera-Pirela S. 2010. Hemoparasitosis en ganadería doble propósito venezolana, diagnóstico y control: una revisión. *Agron Mesoamerica* 21 (1): 367-381.

Tamasaukas R. 2011a. Evaluación de productos antigénicos especie-específicos de *Trypanosoma vivax* para su aplicación en el diagnóstico por ELISA de la trypanosomosis bovina. Proyecto Tesis Doctorado en Ciencias, Postgrado Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Aragua, Venezuela. 78 pp.

Tamasaukas R. 2011b. Hemoparasitosis en ganadería doble propósito de Venezuela. Seminario I Doctorado en Ciencia, Postgrado en Medicina Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Aragua, Venezuela. 32 pp.

Tamasaukas R, Florio F, Cobo M, Rivera S. 2012. Evaluación de un extracto antigénico especie-específico de *Trypanosoma vivax* en el diagnóstico por ELISA de la trypanosomosis bovina. I Parte. Valores hematológicos, de prevalencia y de seroprevalencia. Jornadas de Investigación. FCV, UCV. Universidad Central de Venezuela. Maracay. 28-30 Junio 2012.

Van der Waaij E, Hanotte O, Van Arendonk J, Kemp S, Kennedy D, Gibson J, Teale A. 2003. Population parameters for traits defining trypanotolerance in an F2 cross of N´Dama and Boran Cattle. *Live Prod Sci* 84 (3): 219-230.

Vincendeau P, Bouteille B. 2006. Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis. *An Acad Bras Cienc* 78 (4): 645-665.