

Identificación del alelo B del gen de interferón gamma asociado al rechazo de la infección por *Haemonchus contortus* en corderos pelibuey

Identification of B allele from interferon gamma gene associated to *Haemonchus contortus* resistant infection in pelibuey lambs

DAVID E. REYES-GUERRERO^{1*}, MARÍA EUGENIA LÓPEZ-ARELLANO^{1*}, ROBERTO GONZÁLEZ-GARDUÑO², GABRIEL RAMÍREZ-VARGAS¹, PEDRO MENDOZA-DE GIVES¹, SARA OLAZARÁN-JENKINS³, LILIANA AGUILAR-MARCELINO³ Y AGUSTÍN OLMEDO-JUÁREZ¹

¹Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, INIFAP. Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla n° 8534, C.P. 62550. Tel. 01800-088-2222, ext. 80414. Col. Progreso, Jiutepec, Morelos, México.

²Universidad Autónoma Chapingo. Unidad Regional Universitaria Sursureste Km 7.5, Carretera Teapa-Vicente Guerrero, Teapa, Tab.; México

³Sitio Experimental "Las Margaritas", INIFAP, Hueytamalco, Pue.; México.

*Correo electrónico: mlopez.arellano@gmail.com; reyes.david@inifap.gob.mx

ENVIADO EL 01 DE JULIO DE 2015/ ACEPTADO EL 27 DE SEPTIEMBRE DE 2015

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue asociar el haplotipo B del gen de interferón gamma (*infγ*) en corderos Pelibuey en contra del nematodo hematófago, *Haemonchus contortus*. Muestras de heces y sangre, fueron tomadas de 17 corderos de cuatro meses de edad, infectados y desafiados por vía oral con 350 y 175 L3 de *H. contortus* por kg de peso y mantenidos bajo condiciones experimentales de pastoreo. El conteo de huevos por gramo de heces (HPG) y el porcentaje del volumen celular aglomerado (%VCA) fueron determinados durante la hemoncosis. Muestras de células polimorfonucleares se colectaron de sangre para la extracción y purificación de ADN genómico (ADNg). El análisis de los haplotipos A (silvestre) y B (mutante) fue realizado con sondas de hibridación por PCR en tiempo real para determinar la temperatura de fusión (Tm) de 53.4 °C y 61.1 °C, respectivamente. Se observaron diferencias de HPG y %VCA de 5044+2361 y 28+0.7 durante la primera infección y 1081+458 y 33+1 en el desafío con *H. contortus*. Se identificaron 8 corderos con fenotipo de altos (AR) y 9 bajos (BR) respondedores a la hemoncosis. La relación entre individuos AR o BR con el haplotipo B no mostraron valor significativo ($p>0.05$). Los resultados demuestran que 3 animales AR y 6 BR presentaron el haplotipo B del gen *infγ* en corderos Pelibuey. En este estudio, el haplotipo B asociado a resistencia en otras razas ovinas, no mostró relación con la raza de pelo Pelibuey en el presente estudio.

Palabras clave: Corderos Pelibuey, *Haemonchus, infγ*, sonda de hibridación, haplotipo B

INTRODUCCIÓN

La ovinocultura en regiones tropicales se ve afectada por problemas de salud causados por los hábitos alimenticios (hematófagos e histiófagos) de nematodos gastrointestinales (NGI), principalmente por los géneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Oesophagostomum* y *Cooperia* (Colditz & LeJambre, 2008). La acción mecánica de estos géneros provoca ruptura e inflamación de la mucosa gastrointestinal disminuyendo la absorción de nutrientes, hemorragias y anemia aguda en animales sus-

ABSTRACT

The main aim of the present study was to associate the haplotype B of gamma interferon (*infγ*) gene on Pelibuey lambs against the hematophagous nematode, *Haemonchus contortus*. Blood and faecal samples were collected from 17 four-month-old lambs that had been kept under experimental grazing conditions; the samples were collected orally post- experimental infection with 350 and 175 L3 *H. contortus* per kg of body weight. The amount of eggs per gram (EPG) and the percentage of the packed cell volume (% PCV) were determined during the haemonchosis infection. Polymorphonuclear cells were collected from blood samples for the extraction and purification of genomic DNA (gDNA). The analysis of haplotype A (wild) and B (mutant) was carried out with hybrid probes using a real time PCR to determine in order to determine the melt point temperature (Tm) at 53.4 °C and 61.1 °C, respectively. Significant differences of EPG and %PCV of 5044+2361 and 28+0.7 were observed through the first infection and 1081+458 y 33+1 data were observed after *H. contortus* challenge. Eight lambs were identified as having the phenotypes of high responders (HR) and 9 as low responders (LR) against *H. contortus*. The relationship between HR or LR lambs with haplotype B was not significant ($p>0.05$). The results showed 3 HR animals and 6 LR had haplotype B *infγ* gene in Pelibuey lambs. In this study, the haplotype B associated to resistance in other sheep breeds, was not related to Pelibuey lambs as resistant hair-sheep breed in the present study.

Keywords: Pelibuey lambs, *Haemonchus, infγ*, hybrid probes, haplotype B

ceptibles (Medina et al., 2014; Maderos et al., 2013). En México, la especie *H. contortus* es el nematodo de mayor prevalencia en pequeños rumiantes bajo condiciones de trópico (Nahed et al., 2003; González et al., 2008). Bajo estas condiciones climatológicas, el manejo sanitario para el control de NGI requiere de tratamientos antihelmínticos estratégicos; sin embargo, el uso inadecuado de los mismos ha generado problemas de resistencia antihelmíntica a múltiple productos. (Wang et al., 2014)

Los sistemas de producción ovina necesitan ser sustentables y mantener un equilibrio epidemiológico que involucre al hospedero, clima y patógeno disminuyendo el daño a la salud y conservando la función zootécnica (Gicheha et al., 2005). La magnitud de la infección por NGI está condicionada por la contaminación de los mismos y por las condiciones ambientales que favorecen el desarrollo a estadios infectantes o larva tres (L3). Aunque los animales tienen la capacidad responder a la infección, esta respuesta puede variar considerablemente entre los animales del rebaño con base en factores genéticos, nutricionales y ambientales (Preston et al., 2014). Entre estos, la genética del hospedero tiene un importante papel en los individuos altos respondedores a la infección por NGI, asociada a la respuesta inmune en diferentes mamíferos, como ratón, rumiantes y en el hombre (Grencis, 2001; Maizels et al., 2012). Entre los rumiantes domésticos, las razas ovinas han sido ampliamente estudiadas debido a la variabilidad inmunológica observada contra la infección por NGI (Preston et al., 2014). La inmunidad celular tipo Th2 está relacionada principalmente con individuos resistentes (ej. raza Pelibuey) a la infección por NGI y la respuesta se caracteriza por la diferenciación de IL4, IL5, IL6, IL9 e IL13, así como por el reclutamiento de eosinófilos e incremento de IgA (Pernthaner et al., 2005; Estrada-Reyes et al., 2015). Sin embargo, el reconocimiento de células de la clase Th1 han mostrado la importancia de receptores innatos como son los T-toll y alarminas en individuos susceptibles de la raza Scottish Black (Terefe et al., 2009). En contraste, la citocina del INF γ (clase Th1) está asociada a la resistencia en la raza Texel y Soay a la infección por NGI. (Coltman et al., 2000; Sayers et al., 2005)

La información citada por Sayers, Good, Hanrahan, Ryan y Sweeney (2005) sugieren la importancia del gen del inf γ para regular la infección en contra de NGI en ovinos de lana, por lo cual se le ha considerado como un candidato a marcador genético para la selección de individuos altos respondedores a las nematodosis. Interesantemente, una variación alélica en la secuencia del intrón 1 del gen de

inf γ fue caracterizada por los autores, quienes identificaron el alelo B, el cual fue asociado a resistencia en ovinos de la raza Texel.

La ovinocultura es una actividad sustentable para los productores, considerando que los programas de desparasitación estén en función. Sin embargo, las condiciones ambientales imperantes en México favorecen la persistencia y prevalencia de diversos patógenos como son los nematodos, sumado al problema de resistencia a los antihelmínticos; de esta forma, la situación para los productores es crítica en el control de las parasitosis internas. La identificación de individuos respondedores a la infección por NGI a través de marcadores genéticos podría ser una herramienta de apoyo en el mejoramiento genético en razas de pelo, ampliamente utilizadas en nuestro país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

El presente estudio se llevó a cabo en el Sitio Experimental “Las Margaritas”, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), en Hueytamalco, Puebla; México. El clima de la región es tropical A (w) con lluvias casi todo el año, humedad relativa del 80% y temperatura que oscila entre 25-35 °C.

Historial de corderos

Veintidós corderos de la raza Pelibuey de entre 4 y 6 meses de edad fueron seleccionados de un grupo de 63 animales categorizados como altos (AR) y bajos respondedores (BR) a la hemoncosis experimental para la determinación de polimorfismos (González et al., 2008). Previo a la infección (30 y 60 días), las madres y los corderos fueron tratados con Levamisol (7 mg/kg de peso). Posteriormente se realizó la primera infección con 350 L3/kg de peso de *H. contortus* por vía oral en la semana cero y un desafío con 175 L3/kg de *H. contortus* a las seis semanas, por individuo. Los animales en pastoreo recibieron agua *ad libitum* y complemento de alimento comercial. Los estudios de laboratorio (parasitología y biología molecular) se realizaron en el Sitio “Las Margaritas” y en el Departamento de Helminología del

Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET), INIFAP.

Parasitología

Las muestras de heces fueron colectadas directamente del recto de los 22 corderos, por semana. Se determinó el número de huevos por gramo (HPG) de heces por la técnica de McMaster (Liébano et al., 2011). Se utilizaron 2 g de heces y 28 mL de Solución Salina Saturada (densidad de 1:24). La estimación del número de HPG se realizó en cámaras de McMaster y los resultados fueron posteriormente normalizados utilizando el logaritmo de HPG+1.

Volumen Celular Aglomerado

Se tomaron muestras de sangre de la vena yugular en tubos de 3 mL con EDTA (BD Bioxon®, USA). Las muestras fueron procesadas por la técnica de microhematocrito para determinar el porcentaje del Volumen Celular Aglomerado (%VCA). (González, 2007)

Categorización de corderos

La categorización de los animales se llevó a cabo en cada período de infección (primo y desafío) con base en el número de HPG y %VCA. Los corderos se clasificaron como AR o BR con base en el número de HPG menos dos errores estándar, siguiendo la información citada por Morteo-Gómez et al., (2004). Los primeros tres muestreos con valores de cero fueron excluidos del análisis de acuerdo con los criterios recomendados por Notter, Andrew y Sajac (2003). En la etapa de desafío, los corderos fueron categorizados nuevamente con base en el promedio de HPG menos dos errores estándar, donde: el valor mayor a 458 HPG fue asignado para corderos BR y valores menores a 458 HPG fueron categorizados como AR. Similar criterio de evaluación fue considerando con los valores del %VCA, los animales que presentaron valores menores y mayores del 27% se identificaron como BR y AR, respectivamente.

Obtención de ADNg

Se colectaron leucocitos de muestras de sangre de la vena yugular en tubos vacutainer y EDTA

(BD Bioxon®, USA) durante la tercera semana posterior a la infección primaria. La extracción de ADN genómico (ADNg) se realizó utilizando un kit comercial (DNeasy® Blood and Tissue, Qiagen, Hilden, Germany) siguiendo las indicaciones del fabricante. La pureza del ADN se confirmó en geles de agarosa al 1,8% y la pureza y cuantificación del ADNg de cada muestra se determinó entre 1,8 y 2,0 con base en la relación de densidad óptica de 260/280 nm utilizando un espectrofotómetro (NanoDrop-1000, Thermo Scientific, USA).

Polimorfismo

La identificación de los haplotipos A (silvestre) y B (mutante) del gen de *infγ* se llevó a cabo con 100 ng de DNAg. La amplificación del templado se realizó por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR, LightCycler® versión 1.5 (Roche, Mannheim, Germany), que fue desarrollada y estandarizada en ensayos previos bajo condiciones de nuestro laboratorio. Se utilizaron sondas oligonucleotídicas de hibridación comerciales (TIB MOLBIOL, New Jersey, USA) para la detección de los haplotipos A y B con base en el análisis de polimorfismos y discriminación alélica (Wilkening et al., 2005). Los oligonucleótidos y sondas se diseñaron utilizando la secuencia nucleotídica del gen de *infγ* con número de acceso Z73273 obtenida del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las secuencias de los oligonucleótidos fueron: 5'-TGGGCTCTCATCTCTAGTCTTC-3' (sentido) de la posición 76 a la 97 y 5'-GATATATACCCATATTATGCCCATC-3' (antisentido) de la posición 252-228. Se usó la sonda marcada con fluoresceína en su extremo 3' terminal (5'-TCTCTGCTCAGTTTGTACAGAGATTTGG-3') en la posición 175-204 y el "quencher" fue marcado con el fluoróforo LC Red 640 en su extremo 5' (5'-GGGATTCATGAATCCTCC-3') en la posición 206-223. Esta última, diseñada para detectar el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la posición 213 entre los haplotipos A (tcg) y B (tca). Si la "a" (homocigoto mutante) está presente en la secuencia, la sonda sensor hibridará completamente a una temperatura de disociación (Tm) de 61,1 °C. Por otro lado, si está presente

la “g” (homocigoto silvestre), la sonda no hibridará completamente (mismatch), generando una T_m de 53,4 °C.

Condiciones de la qPCR

La mezcla de reacción para la qPCR se llevó en un volumen final de 20 μ L, la cual consistió de 25 mM de $MgCl_2$, 10 μ M para ambos oligos y 3 μ M de las dos sondas (de anclaje y sensor). Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial de 95 °C durante 10 minutos; un ciclado de 40 repeticiones con una desnaturalización a 95 °C por 10 s, un alineamiento a 60 °C por 20 s y extensión de 72 °C durante 20 s. El análisis de la curva de fusión (T_m) se realizó mediante la disociación de los productos a 95 °C por 30 s, 40 °C por 20 segundos, con una rampa de 85 °C.

Análisis estadístico

La relación entre el polimorfismo del gen *infy* y el conteo total de huevos de nematodos se analizó por regresión lineal usando el procedimiento REG del programa Statistical Analysis System (SAS, 2004). Para normalizar los datos la variable fue transformada a logaritmo ($\log_{10} \text{HPG}+1$). El modelo utilizado fue $y_{ij} = \mu + bX_i + E_{ij}$ donde $y_{ij} = \text{HPG}$, $\mu = \text{Media general}$, $X_i = (1, 0 \text{ y } -1$ para los genotipos homocigoto AA, heterocigoto AB y homocigoto BB, respectivamente). $b = \text{la pendiente o coeficiente de regresión}$ y $E_{ij} = \text{son los errores experimentales}$. Posteriormente se realizó un análisis de varianza en el que los genotipos representaron los tratamientos y la variable respuesta fue el \log_{10} de $\text{HPG}+1$ para determinar las diferencias entre los genotipos AA, AB y BB.

RESULTADOS

Fenotipo

En total, 17 corderos Pelibuey fueron clasificados con base en el criterio de categorización citado en la metodología. Ocho corderos mostraron características de AR y 9 como BR. Asimismo, 5 corderos fueron excluidos del experimento por presentar fuertes problemas de coccidias, los cuales tuvieron que ser tratados inmediatamente.

El análisis de datos crudos colectados de 17 corderos indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el número de HPG y el %VCA en los períodos de experimentación. Durante la infección primaria, el promedio (X) y dos errores estándar (EE) fueron analizados para determinar la probabilidad del número de HPG y el X y un error estándar (E) para %VCA, correspondiendo valores de $5\ 044 \pm 2\ 361$ y $28 \pm 0,7$, respectivamente. En contraste, en la etapa de desafío se observó recuperación del %VCA y disminución del número de HPG, observándose el X y EE de $1\ 081 \pm 458$ y 33 ± 1 para el HPG y %VCA, respectivamente. Los datos presentados en el presente estudio muestran la recuperación de los animales a la infección por *H. contortus* durante la etapa de desafío, situación que podría estar regulada en parte por la activación del sistema inmune durante la infección primaria. Resultados similares fueron observados en corderos Pelibuey infectados con *H. contortus* (González et al., 2008; Estrada-Reyes et al., 2015). Asimismo, Estrada-Reyes et al. (2015) sugieren que la respuesta a la infección por hemoncosis podría haber estado modulada por células Th2. Además, otros autores han observado disminución de la infección por NGI en corderos ante infecciones repetidas con el género *Haemonchus* en pequeños rumiantes (Chiejina et al., 2010; Bambou et al., 2013). Estudios anteriores han notificado la importancia de exponer a los animales a infecciones repetidas con NGI como un posible método de control integral (Colvin et al., 2011). Sin embargo, este tipo de respuesta podría variar debido a diversos factores de manejo, raza y estado nutricional de los animales (Díaz-Rivera et al., 2000). De ahí la importancia de integrar un marcador molecular en el diagnóstico de resistencia a NGI en los programas de mejoramiento genético.

Polimorfismo

La identificación de los haplotipos A o silvestre (*tcg*) y B o mutante (*tca*) se realizó en 17 corderos bajo estudio. El resultado obtenido del análisis de regresión se muestra en el Cuadro 1 y Gráficas 1a-b. Los datos muestran que la pendiente y la ordenada de origen no

Cuadro 1. Regresión lineal de la infección y desafío inducidos con el nematodo hematófago *H. contortus* en corderos Pelibuey. El cuadro muestra la relación entre el número de huevos por gramo de heces (HPG) y el tipo de haplotipo. 1 = haplotipo B, 0 = haplotipos AB, -1 = haplotipo A.

Valores observados		Individuo	Infección primaria		Desafío	
Log(HPG)	Genotipo		Pronóstico para Y	Residuos	Pronóstico para Y	Residuos
3.8087	0	1	3.1699	0.6388	2.6617	0.1363
3.1797	0	2	3.1699	0.0098	2.6617	-0.4508
2.7202	0	3	3.1699	-0.4498	2.6617	0.0263
3.9548	0	4	3.1699	0.7849	2.6617	0.1363
1.3979	0	5	3.1699	-1.7720	2.6617	-0.3745
3.1422	0	6	3.1699	-0.0277	2.6617	-0.2584
1.3979	0	7	3.1699	-1.7720	2.6617	-1.4679
4.0176	1	8	3.0298	0.9877	2.8062	0.8928
4.3075	1	9	3.0298	1.2777	2.8062	-0.2506
3.5394	1	10	3.0298	0.5096	2.8062	0.5869
1.0969	1	11	3.0298	-1.9329	2.8062	0.5863
2.5883	1	12	3.0298	-0.4415	2.8062	-1.0809
2.3010	1	13	3.0298	-0.7288	2.8062	-0.2431
3.8053	1	14	3.0298	0.7755	2.8062	0.1673
3.8765	1	15	3.0298	0.8467	2.8062	0.4676
3.9351	-1	16	3.3100	0.6251	2.5172	0.4576
3.9789	-1	17	3.3100	0.6688	2.5172	0.6687

tienen diferencias significativas ($p > 0,05$), lo que indica que no hubo tendencia alguna en la presencia del genotipo mutante y silvestre del gen de *infy* respecto al número de HPG. La actividad biológica del gen de *infy* parece ser relevante en ovinos AR y BR a las nematodosis. Por ejemplo, nuestros resultados son similares a los observados en la raza de ovinos de lana Suffolk y Aragonesa infectados con NGI (Sayers et al., 2005; Dervishi et al., 2011). En

contraste, nuestra información difiere de la resistencia a NGI observada en las razas de ovinos de lana Soay y Texel. (Coltman et al., 2001; Sayers et al., 2005)

En resumen, el número de corderos con fenotipo AR y BR a la hemoncosis asociado al haplotipo correspondiente (A o B) del gen de *infy* es, que 3 y 6 de los corderos AR y BR mostraron únicamente el polimorfismo del haplotipo B, respectivamente. Asimismo, ningún

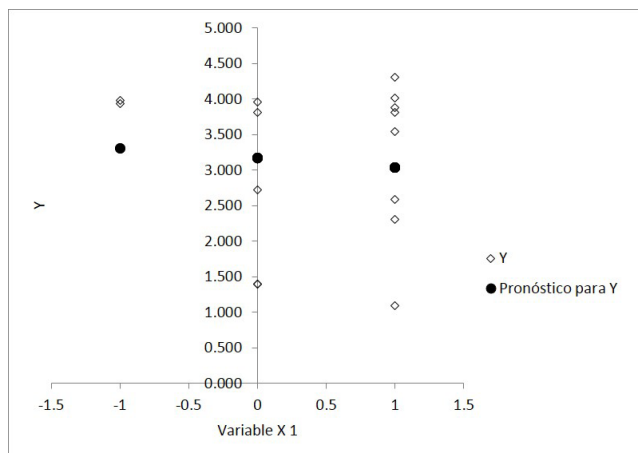


Figura 1a. Regresión de la infección primaria de *H. contortus* y de los haplotipos A y B del gen de *infy*.

Los rombos indican los valores observados y el círculo indica los valores esperados. HPG = huevos por gramo, *infy* = interferón gamma.

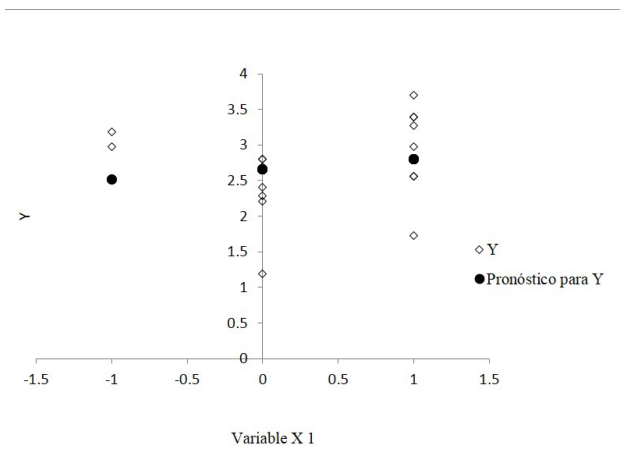


Figura 1b. Regresión entre el desafío de la infección por *H. contortus* y los haplotipos A y B del gen de *infy*.

cordero con fenotipo AR mostró el haplotipo A, en contraste un cordero BR presentó el alelo silvestre o haplotipo A. También se observó que 5 y 2 de los individuos AR y BR, respectivamente, mostraron ambos haplotipos, A y B.

La relación entre fenotipo y haplotipos, asignados como B = 1, AB = 0 y A = -1, durante la primo infección y el desafío con *H. contortus* para llevar a cabo la regresión lineal se observa en el Cuadro 1. El número de individuos con base en el haplotipo fue el siguiente: 0 = 7, 1 = 8 y -1 = 2. La información obtenida de la regresión entre el HPG durante la primera infección y el polimorfismo no mostró asociación ($p > 0,05$) en ninguno de los corderos con fenotipo AR o BR. En forma similar, se observó durante la etapa de desafío ($p > 0,05$). En este caso la inferencia no fue posible en los 17 corderos bajo estudio para HPG y para ninguno de los alelos (A o B) en cuestión. Durante la primera infección y el desafío, el ajuste de regresión no presentó pendiente significativa y se puede observar en las figuras 1a-b. Los 17 corderos mostraron un coeficiente de correlación ajustado de -0,05 y -0,03 durante la infección primaria y el desafío con *H. contortus*, respectivamente.

En el análisis de varianza tampoco se observaron diferencias en el HPG por efecto del genotipo, los promedios fueron: 2,8 para AA, 3,19 para AB y 3,96 para BB. A pesar de las diferencias numéricas los resultados no fueron diferentes estadísticamente ($p > 0,05$).

El haplotipo B es uno de los pocos alelos que han mostrado regular la respuesta a la infección en NGI. Sin embargo, la variación de la respuesta en ovinos AR o BR podría tener influencia del medio e incluso, la actividad de otras citocinas. El gen de *infy* podría no ser relevante en la respuesta a NGI, pero estudios realizados con pequeños rumiantes e incluso con bovinos, sugieren la importancia de este gen durante la infección por NGI como *Haemonchus*, *Teladorsagia* y *Cooperia*, pero donde también se involucran citocinas clase Th1 y Th2, sugiriendo que la respuesta a nematodos es dicotómica. (Charon, 2004; Sayers et al., 2005; Bricarello et al., 2008; Zaros et al., 2010)

Debido a que en el presente se determinó la presencia de los haplotipos A y B del gen de *infy* en 17 corderos de la raza Pelibuey y no se observó relación alguna con animales AR y BR ($p > 0,05$) como se ha observado en otros estudios, se considera necesario incrementar el número de animales en estudio con objeto de definir la función de los haplotipos anteriormente citados, así como determinar la heredabilidad del mismo. Futuros trabajos se continuarán realizando para poder evaluar el posible potencial del haplotipo B del gen de *infy* como posible marcador genético y contribuir de esta forma en los programas de mejoramiento genético.

CONCLUSIONES

Con base en la información analizada en el presente estudio, se observaron individuos con fenotipo AR (n = 8) y BR (n = 9) en un número similar. Asimismo, no se detectaron diferencias importantes entre la relación fenotipo y genotipo entre ambos alelos, A y B, ante una infección por *H. contortus* en corderos de la raza Pelibuey.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Proyecto 11555219663.

REFERENCIAS

- Bambou, J.C.; Cei, W.; Camous, H.; Archimede, H.; Decherf, A.; Philibert, L. et al. (2013). Effects of single or trickle *Haemonchus contortus* experimental infection. *Veterinary Parasitology*. 191, 284-292.
- Bricarello, P.A.; Zaros, L.G.; Coutinho, L.L.; Rocha, R.A.; Silva, M.B.; Kooyman, F.N.J. et al. (2008). Immunological responses and cytokine gene expression analysis to *Cooperia* infections in resistant and susceptible Nelore cattle. *Veterinary Parasitology*. 155, 95-103.
- Chiejina, S.N.; Behnke, J.M.; Musongong, G.A.; Nnadi, P.A. & Ngongeh, L.A. (2010). Resistance and resilience of West African Dwarf goats of the Nigerian savanna zone exposed to experimental escalating primary and challenge infections with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 171, 81-90.
- Colditz, I.G. & Le Jambre, L.F. (2008). Development of a faecal occult blood test to determine the severity of *Haemonchus contortus* infections in sheep. *Veterinary Parasitology*. 153, 93-99.
- Coltman, D.W.; Wilson, K.; Pilkington, J.G.; Stear, M.J. & Pemberton, J.M. (2001). A microsatellite polymorphism in the gamma interferon gene is associated with resistance to gastrointestinal nematodes in a naturally parasitized population of Soay sheep. *Parasitology*. 122, 571-582.

- Colvin, A.F.; Walkden-Brown, S.W. & Knox, M.R. (2012). Role of host and environment in mediating reduced gastrointestinal nematode infections in sheep due to intensive rotational grazing. *Veterinary Parasitology*. 184, 180-192.
- Díaz-Rivera, P.; Torres-Hernández, G.; Osorio-Arce, M.M.; Pérez-Hernández, P.; Pulido-Albores, A.R.; Becerril-Pérez, C. et al. (2000). Resistencia a parásitos gastrointestinales en ovinos Florida, Pelibuey y sus cruza en el trópico mexicano. *Agrociencia*. 34, 13-20.
- Dervishi, E.; Uriarte, J.; Valderrábano, J. & Calvo, J. (2011). Structural and functional characterisation of the ovine interferon gamma (IFNG) gene: Its role in nematode resistance in Rasa Aragonesa ewes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 141, 100-108.
- Estrada-Reyes, Z.M.; López-Reyes, A.G.; Lagunas-Martínez, A.; Ramírez-Vargas, G.; Olazarán-Jenkins, S.; Hernández-Romano, J. et al. (2015). Relative expression analysis of IL-5 and IL-6 genes in tropical sheep breed Pelibuey infected with *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunology*. 37, 446-452.
- Gicheha, M.G.; Kosgey, I.S.; Bebe, B.O. & Kahi, A.K. (2005). Economic values for resistance to gastrointestinal helminths in meat sheep in Kenya. *Journal Animal Breed Genetics*. 122, 165-171.
- Grencis, R.K. (2001). Cytokine regulation of resistance and susceptibility to intestinal nematode infection- from host to parasite. *Veterinary Parasitology*. 100, 45-50.
- González, R. J. L. Licenciatura. Enero 2007. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-Benemérita Universidad Autónoma del Estado de Puebla. Caracterización fenotípica de corderos Pelibuey resistentes y susceptibles a *Haemonchus contortus* bajo condiciones naturales.
- González, R.J.L.; López-Arellano, M.E.; Olazarán-Jenkins, S.; Liébano-Hernández, E.; Mendoza-de Gives, P.; Vázquez-Prats, V. et al. 2008. Phenotype characterization of Pelibuey native lambs to *Haemonchus contortus* infection. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases*. 1149:177-179.
- Liébano, H.E.; López-Arellano, M.E.; Mendoza-de Gives, P. & Aguilar-Marcelino, L. (2011). Manual de diagnóstico para la identificación de larvas de nematodos gastrointestinales en rumiantes. INIFAP. Jiutepec, Mor.; México. Editorial INIFAP.
- Maderos, A. & Manchero, G. (2013). Parasitosis gastrointestinales de ovinos y bovinos: situación actual y avances en la investigación. *INEA Producción Animal*. 34, 1-6.
- Maizels, R.M.; Hewitson, J.P. & Smith, K.A. (2012). Susceptibility and immunity to helminth parasites. *Current Opinion in Immunology*. 24, 459-466.
- Medina, P.; Guevara, F.; La O, M.; Ojeda, N. & Reyes, E. (2014). Resistencia antihelmíntica en ovinos: una revisión de informes del sureste de México y alternativas disponibles para el control de nemátodos gastrointestinales. *Pastos y Forrajes*. 37, 257-263.
- Morteo-Gómez, R.; González-Garduño, R.; Torres-Hernández, G.; Nuncio-Ochoa, G.; Becerril-Pérez, C.M.; Gallegos-Sánchez, J. et al. (2004). Efecto de la variación fenotípica en la resistencia de corderos Pelibuey a la infestación con nematodos gastrointestinales. *Agrociencia*. 38(4): 395-404.
- Nahed-Toral, J.; López-Tirado, Q.; Mendoza-Martínez, G.; Aluja-Schunemann, A. & Trigo-Tavera, F.J. (2003). Epidemiology of parasitosis in the Tzotzil sheep production system. *Small Ruminant Research*. 49, 199-206.
- Notter, D.R.; Andrew, S.A. & Zajac, A.M. (2003). Responses of hair and wool sheep to a single fixed dose of infective larvae of *Haemonchus contortus*. *Small Ruminant Research*. 47: 221-225.
- Pernthaner, A.; Cole, S.A.; Morrison, L. & Wayne, R.H. (2005). Increased expression of interleukin-5, IL-13, and Tumor Necrosis Factor Alpha Genes in Intestinal Lymph Cells of Sheep Selected for Enhanced Resistance to Nematodes during infection with *Trichostrongylus colubriformis*. *Infection and Immunity*. 74, 2175-2183.
- Preston, S.; Sandeman, M.; Gonzalez, J. & Piedrafita, D. (2014). Current Status for Gastrointestinal Nematode Diagnosis in Small Ruminants: Where Are We and Where Are We Going? *Journal of Immunology Research*. 2014, 1-12.
- Sayers, G.; Good, B.; Hanrahan, J.P.; Ryan, M. & Sweeney, T. (2005). Intron 1 of the interferon γ gene: Its role in nematode resistance in Suffolk and Texel sheep breeds. *Research Veterinary Science*. 79, 191-196.
- Terefe, G.; Lacroux, C.; Prévot, F.; Grisez, C.; Bergeaud, J.P.; Bleuart, C. et al. (2009). Eosinophils in *Haemonchus contortus*-infected resistant and susceptible breeds of sheep: Abomasal tissue recruitment and in vitro functional state. *Veterinary Parasitology*. 165, 161-164.
- Wilkening, S.; Hemminki, K.; Thirumaran, R.; Bermejo, J.; Bonn, S.; Forsti, A. et al. (2005). Determination of allele frequency in pooled DNA: comparison of three PCR-based methods. *BioTechniques*. 39, 853-858.
- Zaros, L.G.; Bricarello, P.A.; Amarante, A.F.T.; Rocha, R.A.; Kooyman, F.N.J.; DeVries, E. et al. (2010). Cytokine gene expression in response to *Haemonchus placei* infections in Nelore cattle. *Veterinary Parasitology*. 171, 68-73.