



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

**IDENTIFICACIÓN DE OVINOS PELIBUEY
RESISTENTES A LA INFECCIÓN POR
Haemonchus contortus EN FUNCIÓN DE
PARÁMETROS INMUNITARIOS**

ALVAR ALONZO CRUZ TAMAYO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2020

La presente tesis, intitulada: **Identificación de ovinos Pelibuey resistentes a la infección por *Haemonchus contortus* en función de parámetros inmunitarios**, realizada por el alumno: **Alvar Alonzo Cruz Tamayo**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:

DR. GLAFIRO TORRES HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ROBERTO GONZÁLEZ GARDUÑO

ASESORA:

DRA. MARÍA EUGENIA LÓPEZ ARELLANO

ASESOR:

DR. CARLOS MIGUEL BECERRIL PÉREZ

ASESOR:

DR. OMAR HERNÁNDEZ MENDO

ASESOR:

DR. JACINTO EFREN RAMÍREZ BRIBIESCA

Montecillo, Texcoco, México, 30 de marzo de 2020

IDENTIFICACIÓN DE OVINOS PELIBUEY RESISTENTES A LA INFECCIÓN POR *Haemonchus contortus* EN FUNCIÓN DE PARÁMETROS INMUNITARIOS

Alvar Alonzo Cruz Tamayo, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2020

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue analizar los rasgos fenotípicos y la expresión relativa de genes asociados a la respuesta inmune contra la infección por el nematodo hematófago *H. contortus* en corderos Pelibuey resistentes a la hemoncosis. Se compararon dos modelos de segregación para identificar a los corderos resistentes en función del conteo fecal de huevos (FEC, por sus siglas en inglés) expresado como huevos por gramo de heces (EPG, por sus siglas en inglés). El primer método considerado de referencia fue la $\bar{X} \pm 3$ EE de EPG y en el segundo método se dividió la muestra usando cuartiles. El primer método fue más sensible para identificar 22 corderas resistentes, 10 de susceptibles y ocho resilientes de un total de 40 animales. En el segundo ensayo experimental fueron segregados nueve corderos con fenotipo de resistencia, seis de susceptibles y 14 resilientes a la infección por *H. contortus*. En los corderos resistentes se observó una reducción mayor del 90% en el FEC. Posteriormente, se seleccionaron cinco corderos susceptibles y resistentes, respectivamente, para llevar a cabo los estudios de expresión relativa de genes. Las citocinas (interleucinas, *IL*) *IL-2*, *IL-4*, *IL-5*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IL-13*, *IFN- γ* , *TGF β 1* relacionados con la respuesta inmune y el receptor *FC ϵ RIA* de IgE fueron seleccionados para analizar el nivel de expresión. Los resultados mostraron incremento en el número de transcritos de RNAm de *IL-4*, *IL-5* y *FC ϵ RIA* en corderos resistentes con respecto a los susceptibles. Además, se observó correlación negativa entre el gen *IL-5* con el FEC. Los resultados obtenidos sugieren la función biológica del gen *IL-5* como marcador genético y la importancia biológica de los genes *IL-4* y del receptor *FC ϵ RIA* en ovinos Pelibuey resistentes para regular la infección por el nematodo parásito *H. contortus*.

Palabras clave: Ovino, hemoncosis, resistencia genética, citocinas, marcadores fenotípicos, *IL-5*

**IDENTIFICATION OF PELIBUEY RESISTANT SHEEP TO INFECTION BY
Haemonchus contortus IN FUNCTION IMMUNE PARAMETERS**

Alvar Alonzo Cruz Tamayo, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2020

ABSTRACT

The aim of the present study was to determine the phenotype traits and relative expression of immune genes against the blood-feeding nematode *H. contortus* in Pelibuey sheep-breed resistant to parasite. The comparison of two segregation models was used to identify resistant lambs based on the faecal egg count (FEC) indicated as the number of eggs per gram (EPG). The first method $\bar{X} \pm 3$ EE of EPG was considered as reference and the second method was divided in quartiles. The first method was more sensitive to identify 22-lambs with resistance phenotype traits, 10-lambs with susceptible traits and eight with resilient traits from a total 40-lambs. In the second experimental assay nine-lambs were segregated as resistance, six susceptible and 14 resilient to *H. contortus* infection. The resilient lambs had 90% of FEC reduction was observed. Then, five resistant and susceptible lambs were selected to performance the relative expression studies. Nine cytokines (Interleukins, IL) *IL-2*, *-4*, *-5*, *-6*, *-8*, *-10*, *-13*, *IFN- γ* , *TGF β 1* genes related with the immune-response and the *FC ϵ RIA* receptor of IgE were selected to analyse the expression level. Results showed increased expression of mRNA transcripts of *IL-4*, *IL-5* and *FC ϵ RIA* in resistant lambs compared with susceptible-lambs with decreased expression. In addition, negative correlation was observed between *IL-5* gene and FEC. These results suggest the biological role of *IL-5* gene as molecular marker and the importance of *IL-4* gene and *FC ϵ RIA* receptor in resistant Pelibuey-lambs against the main parasitic nematode, *H. contortus*.

Palabras clave: Sheep, haemonchosis, genetic resistance, cytokines, phenotypic markers, *IL-5*

DEDICATORIA

A mi hija Elisa.

A mi esposa Elda Esther.

A mis padres Mario[†] y Dalila.

Mi amor para todos ustedes.

A mis suegros Don Antonio y Doña Elda por “entrarle al quite”
con Elisa durante mi ausencia.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa para el Desarrollo Profesional Docente tipo superior (PRODEP) de la SEP por otorgarme la beca PRODEP-DSA/103.5/16/5957 UNACAM-118. A la Escuela Superior de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Campeche por otorgar la licencia correspondiente para realizar los estudios doctorales.

Al Colegio de Postgraduados campus Montecillo en especial al Programa de Recursos Genéticos y Productividad-Ganadería por la oportunidad brindada para mi desarrollo profesional.

A mi director de tesis Dr. Roberto González Garduño por los conocimientos, compromiso, empeño y amistad otorgada que fueron fundamentales en mi formación doctoral.

A mi profesor consejero Dr. Glafiro Torres Hernández por su apoyo incondicional, orientación, amistad y consejos que fueron esenciales en la culminación de esta aventura. A mi asesora Dra. María Eugenia López Arellano por su dedicación, ayuda y conocimientos transmitidos durante mi estancia en su laboratorio y más allá.

A mis asesores Dr. Carlos Miguel Becerril Pérez, Dr. Omar Hernández Mendo y Dr. Jacinto Efrén Ramírez Bribiesca por su apoyo e importantes aportaciones a mi trabajo de investigación.

A los jóvenes estudiantes de las carreras de Médico Veterinario Zootecnista de la Universidad Autónoma de Campeche e Ingeniero Agrónomo Especialista en Zonas Tropicales de la Unidad Sur-Sureste de la Universidad Autónoma Chapingo, por el apoyo en la etapa experimental de mi trabajo de investigación.

Al Biólogo Gabriel Ramírez Vargas del Laboratorio de Helmintología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad del INIFAP en Jiutepec, Morelos y a la Ingeniero en Biotecnología Valeria Beltrán Lechuga de la Universidad Politécnica de Morelos, por su invaluable apoyo en la extracción de RNA y la cuantificación de expresión génica por RT-qPCR.

CONTENIDO

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE CUADROS.....	x
LISTA DE FIGURAS	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Planteamiento del problema	1
Objetivos.....	2
Hipótesis	3
Revisión de literatura.....	4
<i>Haemonchus contortus</i>	4
Respuesta inmune	8
Desarrollo de la resistencia a <i>H. contortus</i> y otros NGI	11
Factores que influyen en la resistencia contra <i>H. contortus</i>	15
Selección de ovinos y resistencia de ovinos a <i>H. contortus</i>	18
Marcadores de resistencia contra NGI.....	19
Referencias	25
CAPITULO I. COMPARISON OF TWO PHENOTYPICAL METHODS TO SEGREGATE FEMALE PELIBUEY LAMBS INTO PARASITIC NEMATODE RESISTANT AND SUSCEPTIBLE GROUPS, BASED ON HAEMATOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL RESPONSES ¹	36
1.1. ABSTRACT	36
1.2. INTRODUCTION	37
1.3. MATERIALS AND METHODS	38
1.4. RESULTS	41
1.5. DISCUSSION.....	43
1.6. CONCLUSION	46
1.7. ACKNOWLEDGEMENTS	46
1.8. REFERENCES	47

CAPITULO II. INDUCTION OF <i>Haemonchus contortus</i> INFECTIONS AS STRATEGY TO ACTIVATE THE IMMUNE RESPONSE IN LAMBS EXPOSED TO EXPERIMENTALLY AND GRAZING CONDITIONS ²	60
2.1. ABSTRACT	60
2.2. INTRODUCTION	61
2.3. MATERIALS AND METHODS	62
2.4. RESULTS	65
2.5. DISCUSSION.....	67
2.6. CONCLUSION	70
2.7. ACKNOWLEDGEMENTS	70
2.8. REFERENCES	71
CAPITULO III. EXPRESIÓN DEL RNAm DE CITOCINAS Y RECEPTOR <i>FCεRIA</i> DE IgE EN CORDEROS PELIBUEY INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON <i>Haemonchus contortus</i> ³	81
3.1. RESUMEN	81
3.2. INTRODUCCIÓN.....	82
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	83
3.4. RESULTADOS	86
3.5. DISCUSIÓN.....	88
3.6. CONCLUSIÓN	91
3.7. AGRADECIMIENTOS.....	92
3.8. REFERENCIAS	92
DISCUSIÓN GENERAL	105
CONCLUSIÓN GENERAL.....	110

LISTA DE CUADROS

Introducción general

Cuadro 1. Modelos de segregación de ovinos contra nematodos gastrointestinales según su conteo fecal de huevos y volumen celular aglomerado.	21
--	----

Capítulo I

Table 1. Arithmetic mean of faecal egg count, packed cell volume and total plasma protein throughout study period in female Pelibuey lambs classified as resistant, intermediate and susceptible according to segregation method.	51
Table 2. Evaluation of the concordance between two segregation methods to detect resistant Pelibuey female lambs against gastrointestinal nematodes.	52
Table 3. Correlation coefficients between the studied variables in Pelibuey female lambs classified as resistant and susceptible according segregation methods.	53

Capítulo II

Table 1. Excretion of GIN eggs and percentage FEC reduction with respect to the maximum values (FECmax) exhibited during the first infection in Pelibuey lambs segregated into RES, SUS and INT groups in each infection phase.	76
Table 2. Means and standard deviations of haematological parameters in Pelibuey lambs resistant, susceptible and intermediate to GIN.	77

Capítulo III

Cuadro 1. Genes para la expresión relativa de citocinas y receptor <i>FCεRIA</i> utilizados para evaluar la respuesta inmune en corderos infectados experimentalmente con 6000 L ₃ <i>H. contortus</i>	96
Cuadro 2. Media ± desviación estándar de los valores de parámetros parasitológicos (FEC), hematológicos (VCA, ERI, Hb, LEU, LIN, EOS, NEU) e inmunológicos (IgA) en corderos resistentes y susceptibles infectados experimentalmente con 6000 L ₃ <i>H. contortus</i>	97
Cuadro 3. Valores de expresión relativa de genes de nueve citocinas y el receptor <i>FCεRIA</i> en corderos resistentes y susceptibles infectados experimentalmente con 6000 L ₃ <i>H. contortus</i>	98

LISTA DE FIGURAS

Introducción general

- Figura 1.** Ciclo biológico de *H. contortus*, mostrando las tres principales etapas, huésped, heces y pastura.5
- Figura 2.** Patogénesis de la hemoncosis.7
- Figura 3.** Respuesta inmune frente al desafío de NGI en ovinos.12

Capítulo I

- Figure 1.** Mean monthly temperature (lines) and monthly distribution of rainfall (columns) throughout the year in Villahermosa, Tabasco, México.54
- Figure 2.** Divergent behaviour of nematode eggs per gram of faeces determined in resistant lambs (n = 10 in quartile method, n = 22 in mean – 3SE method) and susceptible lambs (n = 10; both methods were similar) in Pelibuey breed by month and sampling day.55
- Figure 3.** Divergent behaviour of PCV determined in resistant lambs (n = 10 in quartile method, n = 22 in mean – 3SE method) and susceptible lambs (n = 10; both methods were similar) in Pelibuey breed by month and sampling day.56
- Figure 4.** Divergent behaviour of TPP determined in resistant lambs (n = 10 in quartile method, n = 22 in mean – 3SE method) and susceptible lambs (n = 10; both methods were similar) in Pelibuey breed by month and sampling day.57
- Figure 5.** Simple effect of peripheral eosinophil counts in contemporary female Pelibuey lambs (n = 40) by sampled day and age.58
- Figure 6.** IgA levels respect to a positive standard control using *H. contortus* somatic antigen in resistant lambs (n = 10 in quartile method, n = 22 in mean – 3SE method) and susceptible lambs (n = 10; both methods were similar) in Pelibuey breed by month and sampling day.59

Capítulo II

- Figure 1.** Deworming and sampling scheme for resistant, susceptible and intermediate Pelibuey lambs immunised with L₃ *H. contortus* and naturally challenged with GINs.78

Figure 2. Faecal egg count means and standard error per phase and experimental day in resistant, susceptible and intermediate Pelibuey lambs immunised with L ₃ <i>H. contortus</i> and naturally challenged with GINs.....	79
Figure 3. Packed cell volume means standard and error per phase and experimental day in resistant, susceptible and intermediate Pelibuey lambs immunised with L ₃ <i>H. contortus</i> and naturally challenged with GINs.....	80

Capítulo III

Figura 1. Infección, desparasitación, segregación y esquema de muestreo para corderos resistentes y susceptibles a la infección experimental con 6000 L ₃ de <i>H. contortus</i>	99
Figura 2. Medias y error estándar de parámetros fenotípicos por día experimental en corderos resistentes y susceptibles infectados experimentalmente con 6000 L ₃ de <i>H. contortus</i> . (a) Conteo fecal de huevos (FEC), (b) Volumen celular aglomerado (VCA) y (c) Eosinófilos (EOS).....	100
Figura 3. Medias y error estándar de la actividad de IgA por día experimental en corderos resistentes y susceptibles infectados experimentalmente con 6000 L ₃ de <i>H. contortus</i>	101
Figura 4. Expresión normalizada, sub-regulada y sobre-regulada de genes de nueve citocinas y el receptor de IgE en corderos resistentes (a) y susceptibles (b) infectados experimentalmente con 6000 L ₃ de <i>H. contortus</i>	102

INTRODUCCIÓN GENERAL

Planteamiento del problema

En regiones tropicales con climas cálidos y templados, las infecciones por nematodos gastrointestinales (NGI) son los principales problemas que afectan la salud y bienestar de pequeños rumiantes. El daño que causan los NGI al tejido del tracto gastrointestinal afecta en forma aguda y crónica el desarrollo animal al disminuir el crecimiento. Los signos clínicos de la afección parasitaria incluyen anemia, diarrea y emaciación, las cuales pueden causar la muerte de los animales, reflejándose en pérdidas económicas al productor (Roeber *et al.*, 2013). Entre los pequeños rumiantes, los ovinos son afectados por diferentes especies de NGI, dominando la especie *H. contortus*, caracterizado por su hábito hematófago (Ortolani *et al.*, 2013). Tradicionalmente, el control de NGI se realiza con antihelmínticos de amplio espectro de acción. Sin embargo, los problemas de resistencia a los diferentes fármacos amenazan la eficacia de los mismos (Hodgkinson *et al.*, 2019). Por ello, la integración de otras opciones de control de NGI se han evaluado de manera experimental e incluso comercial, por ejemplo, uso de hongos nematófagos (Da Silva *et al.*, 2017), desparasitación selectiva (Kenyon *et al.*, 2009), partículas de alambre de óxido de cobre (Burke y Miller, 2006), plantas medicinales con componentes bioactivos (Chagas, 2015), suplementación proteica (Torres-Acosta *et al.*, 2012), y prácticas de mejoramiento genético (Bishop, 2012b; Maqbool *et al.*, 2017).

La variación genética en ovinos para la resistencia a la infección por NGI ha sido evidente al detectar razas que son más tolerantes que otras (Sweeney *et al.*, 2016; Zvinorova *et al.*, 2016), también existe alta variabilidad entre individuos lo que permite la selección de animales con esta característica (Zaros *et al.*, 2014). La variación genética notificada en diversos estudios sugieren la selección de individuos resistentes a los NGI (McRae *et al.*, 2015), en razas de ovinos en Nueva Zelanda (Bisset *et al.*, 2001) y Australia (Brown y Fogarty, 2017), donde se reflejan beneficios en la disminución del uso de antihelmínticos y reducción de la contaminación de praderas por larvas infectivas (L₃). La raza Pelibuey tiene alta adaptación al ambiente cálido existente en muchos estados de México, por su tolerancia al calor y porque ha sido notificada como resistente a NGI, con base en las evaluaciones de características de fenotipo específicos a NGI como es el conteo

de huevos (FEC, por sus siglas en inglés) en heces, volumen celular aglomerado (VCA) e inmunoglobulina A (IgA) (Díaz-Rivera *et al.*, 2000; Morteo-Gómez *et al.*, 2004; González *et al.*, 2008; Ojeda-Robertos *et al.*, 2017; González-Garduño *et al.*, 2018a; González-Garduño *et al.*, 2018b; Zaragoza-Vera *et al.*, 2019); así como también por su respuesta inmune relacionada a citocinas (Estrada-Reyes *et al.*, 2015; Reyes-Guerrero *et al.*, 2016) y al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Figueroa Castillo *et al.*, 2011).

Esta información, presenta al ovino Pelibuey con las características requeridas en prácticas de mejoramiento genético, resistente a NGI. En los estudios mencionados se establecen varios modelos basados en el FEC para segregar a los corderos y adultos en resistentes (altos respondedores), susceptibles (bajos respondedores) e intermedios (resilientes). También son diversos los tipos de infección (artificial o natural), las dosis de L₃ y los marcadores utilizados (fenotípicos o genéticos) para diferenciar niveles de resistencia y reforzar al FEC que es el parámetro más común utilizado para seleccionar ovinos resistentes a NGI. Por estas razones, el presente estudio analizó el efecto del desafío con infecciones continuas de *H. contortus* L₃ para regular el desarrollo de inmunidad hacia los NGI.

Objetivos

El objetivo principal fue segregar un rebaño de corderos Pelibuey e identificar a los animales resistentes a *H. contortus* mediante marcadores fenotípicos y genéticos asociados a la respuesta inmune.

Los objetivos específicos fueron:

- i) Comparar dos modelos de segregación para identificar corderos con variación en su resistencia fenotípica posterior a una infección natural con nematodos gastrointestinales.
- ii) Evaluar la resistencia fenotípica en corderos infectados experimentalmente con *H. contortus* y reinfectados naturalmente con nematodos gastrointestinales.

- iii) Caracterizar la expresión de genes de nueve citocinas asociada a la respuesta inmune y receptor *FCεRIA* de IgE, en corderos resistentes y susceptibles infectados experimentalmente con *H. contortus*.

Hipótesis

Los corderos Pelibuey infectados por *H. contortus* y otros nematodos gastrointestinales que muestran resistencia genética tienen menores conteos fecales de huevos, mayores valores hematológicos y mayor expresión de genes asociados a la respuesta inmune en comparación con los corderos susceptibles.

Las hipótesis específicas fueron:

- i. El modelo de segregación basado en la $\bar{X} \pm 3 \text{ EE}$ es preciso para identificar corderos resistentes a una infección natural con nematodos gastrointestinales.
- ii. Los corderos infectados experimentalmente con *H. contortus* y reinfectados de manera natural con NGI muestran mayor resistencia a NGI.
- iii. La expresión de genes de citocinas asociada a la respuesta inmune y el receptor *FCεRIA* de IgE, es mayor en corderos resistentes que en corderos susceptibles infectados experimentalmente con *H. contortus*.

Revisión de literatura

Haemonchus contortus

El género *Haemonchus* spp. es un helminto redondo, no segmentado, taxonómicamente perteneciente al Reino: Animalia, Phylum: Nematoda, Clase: Secernentea, Orden: Strongylida, Sub-orden: Strongylina, Superfamilia: Trichostrongyloidea, Familia: Trichostrongylidae, Sub-familia: Haemonchinae, Género: *Haemonchus*, Especie: *H. contortus* (Durette-Desset *et al.*, 1999). *H. contortus* es un parásito hematófago de distribución mundial, se localiza en el abomaso de rumiantes. Los estadios endoparásitos, presentan un estilete oral para perforar la mucosa gástrica y succionar sangre. La hembra mide de 25 a 35 mm, su aparato digestivo de color rojo (por la ingesta de sangre) se enrolla en espiral en el aparato reproductor de color blanco y por eso se le conoce con el nombre de “barber’s pole worm”. El macho mide entre 10 y 20 mm y es de color rojo uniforme (Urquhart *et al.*, 1996). La hembra tiene una solapa vulvar de tamaño variable y los machos una bolsa copulatoria desarrollada con lóbulos alargados en el extremo anterior y un pequeño lóbulo dorsal desviado hacia un lado que forman las espículas. Los huevos son de tipo estrongiloide, miden alrededor de 70 x 45 μm y son excretadas con las heces del hospedero (Durette-Desset *et al.*, 1999).

Ciclo biológico

El ciclo biológico de *H. contortus* es monoxeno (sólo requiere de una especie para desarrollar su ciclo biológico) y comprende dos fases, una fase de vida libre (exógena) con influencia directa del ambiente y una fase parasitaria dentro del hospedero (endógena) influenciada por la respuesta inmune generada por la infección (Urquhart *et al.*, 1996).

La fase libre comienza con la eliminación de huevos junto con las heces y si las condiciones ambientales son favorables (temperatura entre 10-35°C y más de 60% de humedad), los huevos embrionados eclosionan liberando la larva en estadio 1 (L₁) que muda a larva 2 (L₂) en 1-2 días. Tanto L₁ y L₂ permanecen en las heces alimentándose de materia orgánica y microorganismos presentes en ellas. La L₂ muda a L₃ (larva infectiva) conservando la cutícula (vainas) del estadio anterior que la protege del medio externo. Si las condiciones de humedad son adecuadas la L₃ migra

hacia el pasto en espera de ser ingerida por el hospedador. El tiempo transcurrido entre la eclosión de L₁ hasta la aparición de L₃ normalmente es de 5-6 días, pero puede retrasarse incluso varios meses si la temperatura y humedad no son las adecuadas (O'Connor *et al.*, 2006).

La fase parasitaria inicia con la ingestión de las L₃ con el pasto por parte del hospedero. Las L₃ llegan al rumen donde se liberan de la vaina protectora y penetran la mucosa del abomaso para continuar su desarrollo. A los 4-5 días aparecen las L₄ que tras una nueva muda se transforman en preadultos (L₅) para madurar sexualmente llegando a ser adultos que copulan y comienzan a producir huevos (>5000 huevos por día) que se eliminan en las heces (Figura 1).

El periodo de prepatencia es de 2-3 semanas mientras no se desarrolle el proceso de hipobiosis larvaria como consecuencia de una respuesta inmune del hospedero o situaciones ambientales adversas (Besier *et al.*, 2016).

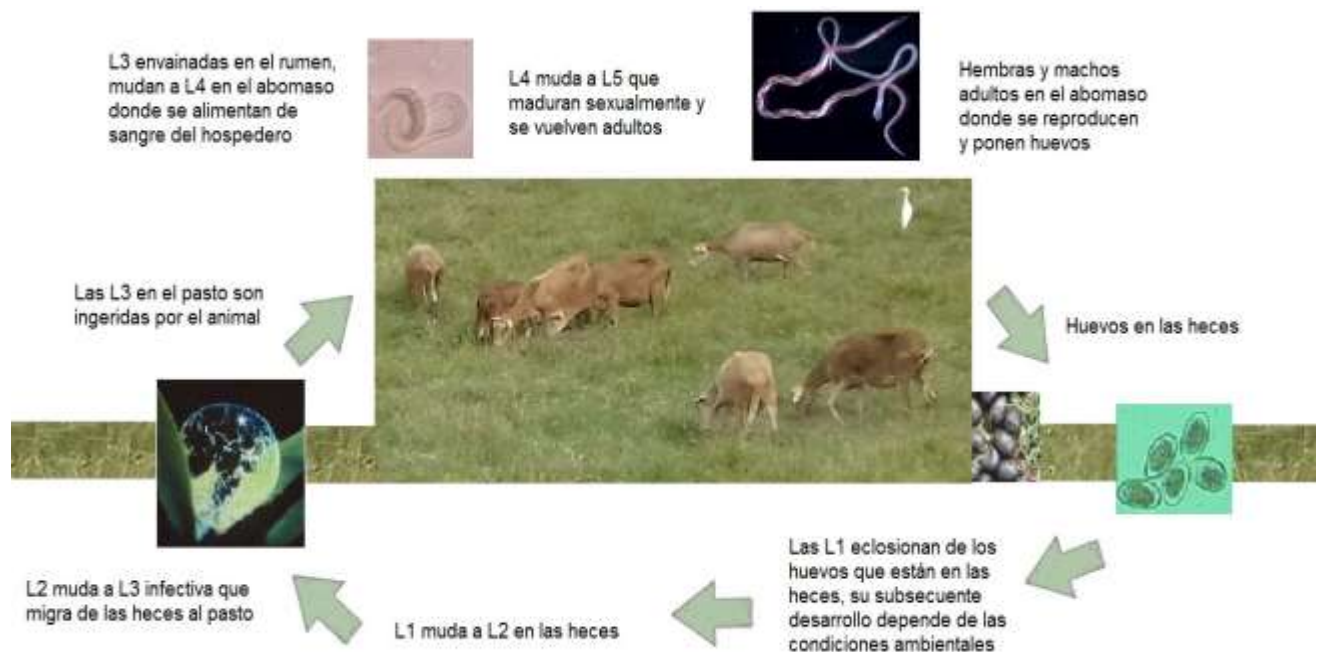


Figura 1. Ciclo biológico de *H. contortus*, mostrando las tres principales etapas, huésped, heces y pastura.

Patogénesis

Son varios los factores involucrados en la patogénesis de la hemoncosis, sin embargo, la patogenicidad del parásito y la respuesta del hospedero son los más importantes. El principal mecanismo patogénico es la lesión directa a la mucosa gástrica y la hematofagia, provocando cambios morfológicos y funcionales principalmente en el abomaso, así como alteración de parámetros hematológicos. *H. contortus* puede ingerir 0.05 ml de sangre por día causando anemia por pérdida de sangre ocasionando disminución del VCA, parámetro que ha sido utilizado como marcador del daño y de la patogenicidad del parásito (Angulo-Cubillán *et al.*, 2007).

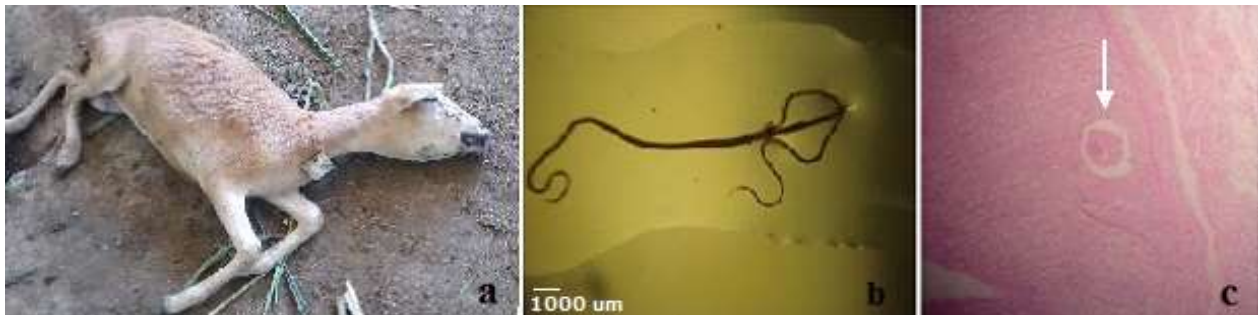
La anemia es el principal signo clínico de la hemoncosis, en un inicio (segunda semana de la infección) hay una caída brusca del VCA ya que la ingesta de sangre por parte del parásito no puede ser compensada por la eritropoyesis, cuando ésta aumenta se estabiliza el VCA a las 6-14 semanas después de la infección. Pero la pérdida de hierro complica la hematopoyesis descendiendo nuevamente el VCA, esta vez con alta probabilidad de provocar la muerte del animal. Como consecuencia de la anemia hemorrágica, el hospedero tiene una gran pérdida de proteínas plasmáticas que el hígado intenta compensar incrementando la síntesis de albumina, sin embargo, al agotarse las reservas metabólicas del animal se presenta hipoproteinemia, extravasación de líquido y consecuentemente edema submandibular (Besier *et al.*, 2016).

La alteración de la integridad de la mucosa gástrica da lugar a un aumento en la permeabilidad y a una disfunción de las glándulas gástricas. La mucosa gástrica tiene la función de limitar el tránsito de moléculas de un lado a otro y por estar dañada se pierde esa función dando lugar, al aumento del pH abomasal por incremento de iones HCO_3^- como consecuencia de la elevación de las concentraciones de Na^+ y Ca^{2+} y una disminución de Cl^- y K^+ . El aumento del pH abomasal tiene varias consecuencias fisiológicas como la dificultad para que el pepsinógeno se transforme en pepsina, alterándose la digestión de las proteínas.

El pepsinógeno también se incrementa como consecuencia de la liberación de sustancias como acetilcolina, histamina, factor de crecimiento epitelial y gastrina por estímulo de los productos de excreción/secreción del parásito (Angulo-Cubillán *et al.*, 2007; Contreras-Ochoa *et*

al., 2019). Igualmente, por el daño a la mucosa gástrica, la densidad de células parietales (secretoras de HCl) disminuye contribuyendo a la elevación del pH gástrico, que permite el mantenimiento de *H. contortus* ya que es incapaz de sobrevivir al pH de 2.8, que es el habitual en el abomaso de animales sanos (Fox, 1997).

Así mismo, la gastrina aumenta significativamente, siendo la causa principal el aumento de pH, por estímulo de productos de excreción/secreción, por mediadores de la inflamación (principalmente mastocitos celulares). La hipergastrinemia disminuye la motilidad gástrica e intestinal causando una disminución del consumo voluntario de alimento, comprometiendo la digestión y la absorción intestinal dando lugar a perturbaciones en el metabolismo proteico, energético y mineral, lo cual nos lleva a la pérdida de peso, alterando la composición corporal, la producción de leche y la respuesta inmune (Simpson, 2000; Besier *et al.*, 2016). En casos graves, la hemoncosis produce emaciación y muerte del hospedero. En la necropsia, se pueden apreciar lesiones macroscópicas como palidez de mucosas, edema, degradación de depósitos de grasa, hipertrofia de nódulos linfáticos, edema de la mucosa del abomaso con petequias, nódulos y parásitos adultos (Figura 2). Microscópicamente se observan infiltración celular, dilatación de glándulas gástricas, úlceras, hemorragia, incremento en el número de mastocitos y eosinófilos (Meeusen y Balic, 2000).



Dr. Roberto González Garduño.
UACH

Dra. María Eugenia López Arellano.
CENID-SAI-INIFAP

M.C. Alvar Alonzo Cruz Tamayo.
COLPOS

Figura 2. Patogénesis de la hemoncosis.

- a) Borrego con signos clínicos de hemoncosis, b) *H. contortus* adultos en cópula, c) *H. contortus* seccionado en corte histológico de mucosa abomasal teñido con H&E, 20x.

Respuesta inmune

La respuesta inmune que desarrollan los ovinos frente a los NGI es resultado de mecanismos de defensa que se han desarrollado durante la interacción parásito-hospedero. Células inespecíficas del sistema inmunes innata y adquirida, se localizan en diferentes tejidos hematopoyéticos para coordinar los mecanismos inmunes que permitan al hospedero identificar productos de excreción y secreción derivados del parásito, diferenciándolos de los componentes del hospedero para su regulación.

Inmunidad innata

La inmunidad innata se caracteriza por mecanismos inespecíficos de acción inmediata, no genera memoria inmune, pero está asociada a la respuesta adquirida o de memoria. Las células involucradas en la respuesta innata se encargan de rechazar la infección durante su inicio. Estos mecanismos no alcanzan a regular la infección, pero diversas señales específicas son emitidas por la respuesta innata (ej. células polimorfonucleares, PMN) para atraer linfocitos especializados, T y B, para generar mecanismos efectivos para regular la infección parasitaria (Karrow *et al.*, 2014).

Así mismo, la inmunidad innata o inespecífica constituye la primera línea de defensa a patógenos, entre éstos los parásitos. Los hospederos cuentan con diversos mecanismos celulares y moleculares que pueden reconocer antígenos para controlar la infección y reparar el tejido dañado (Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2013). Los componentes de la respuesta innata pueden ser clasificados como externos (barreras físicas y químicas) o internos (moléculas solubles y células PMN, macrófagos, entre otras). Las barreras físicas como piel y mucosas impiden la entrada del parásito a través de la integridad de sus estructuras y reacciones como tos, estornudo, peristaltismo intestinal y secreción mucosa. Las barreras químicas comprenden pH, temperatura y enzimas que actúan inhibiendo el desarrollo o alterando las estructuras del parásito. Los factores o moléculas solubles comprenden el sistema de complemento, inmunoglobulinas y citocinas, que favorecen la inflamación, atracción y/o activación celular correspondiente a la inmunidad adquirida.

Las células que participan en la inmunidad inespecífica son los macrófagos, neutrófilos y linfocitos asesinos (Natural Killer, NK), que tienen la función de fagocitar, presentar antígenos,

acción efectora y activación de citocinas (Collado *et al.*, 2008). La respuesta inmune tiene dos fases bien diferenciadas, la fase de reconocimiento del patógeno y fase de efectora o de respuesta, que se describen a continuación.

Fase de reconocimiento

Las células del sistema inmune innato poseen receptores denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés) que reconocen estructuras moleculares específicas de los agentes patógenos y se denominan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés). Estos patrones activan la respuesta inmune en contra de diferentes patógenos. Los principales PRRs involucrados en la respuesta inmune contra parásitos son los receptores Toll (TLRs, por sus siglas en inglés) y los de lectinas tipo C (CLRs, C-type lectin receptors) expresados por numerosos tipos células en la superficie de mucosas, presentadoras de antígenos (APCs, por sus siglas en inglés), linfocitos T y B, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas. Ambos tipos de PRRs identifican a los PAMPs y también a los patrones moleculares asociados al daño (DAMPs, por sus siglas en inglés), que son moléculas liberadas por el daño al tejido o estrés celular (McRae *et al.*, 2015). Así mismo, inducen la respuesta inflamatoria, y los PAMPs activan la liberación de citocinas y otras moléculas que funcionan como señales intracelulares de la respuesta inmune adaptativa (Balic *et al.*, 2000; Balic *et al.*, 2002).

Fase efectora o de respuesta

Después de que el parásito es reconocido, para evitar el establecimiento y su acción patógena, se inicia la activación y la fijación del complemento, que lleva a una respuesta inflamatoria, activación de la fagocitosis por neutrófilos/macrófagos y la activación de los linfocitos B para el inicio de la respuesta humoral (McRae *et al.*, 2015).

El sistema del complemento consta de unas 30 proteínas que se encuentran en el plasma y se activan por una de las tres vías conocidas como clásica, alternativa y de la lectina. Durante la activación existen reacciones consecutivas en cascada para generar productos activos, que además tiene acciones biológicas como ensamblaje sobre la superficie del microorganismo del complejo

de ataque a la membrana (CAM) al formar un canales permeables a iones y al agua, estimulando la lisis del agente extraño, así como liberación de productos pro-inflamatorios que atraen a otras células efectoras del sistema inmune como mastocitos y basófilos (Vijayasarithi *et al.*, 2015). Sin embargo, la eficacia de estos mecanismos contra NGI podrá presentarse débil debido a los componentes celulares de los nematodos, como son lípidos, quitina, productos de superficie y de excreción y de secreción que contribuye a la evasión de la respuesta inmune.

Inmunidad adaptativa o adquirida

La inmunidad adquirida se desarrolla a partir de la señalización de células de la respuesta innata y se caracteriza por la especificidad de la respuesta y generación de memoria inmune (McRae *et al.*, 2015). Para su estudio, la respuesta inmune adaptativa se divide en tres fases: reconocimiento del antígeno, activación de los linfocitos y respuesta efectora.

Reconocimiento del antígeno

Las APCs son elemento clave en la respuesta inmune, al captar péptidos/proteínas específicas del patógeno lo que presentan a las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II (MHC II), subpoblaciones especializadas de linfocitos T (células pertenecientes al “Cluster of Differentiation 4⁺”, CD4⁺), para atraer células especializadas como son linfocitos T colaboradores (T_H) y citotóxicos (T_c) (Hein *et al.*, 2010). Las APCs, macrófagos, PMN, etc. contribuyen a la activación de citocinas que llevan a la diferenciación de linfocitos T_H en T_{H1} o T_{H2}.

Activación de linfocitos

Como células especializadas, los linfocitos se activan ante antígenos específicos a través de los receptores de los linfocitos B y T (BCR, B cell y TCR, T cell receptor). Los linfocitos B son los encargados de la respuesta inmune humoral, se localizan en sangre y órganos linfoides. Además, se caracterizan por sintetizar inmunoglobulinas (Ig) con acción sobre receptores antigénicos para enviar señales co-estimuladoras provenientes de los receptores del complemento

o por linfocitos T_H. Las Ig secretadas se unen al antígeno junto con otras células del sistema inmune para neutralización del patógeno (Balic *et al.*, 2000; McRae *et al.*, 2015)

Respuesta efectora

La respuesta T_H1 participa en infecciones causadas por bacterias, protozoarios y virus, pero en los últimos años también se asocia a los helmintos, entre éstos a nematodos gastrointestinales y pulmonares (Costa-Rodrigues *et al.*, 2017). Por esta vía se producen genes de la respuesta inmune como son las interleucinas 1, 2 y el factor de necrosis tumoral alfa (TFN α). Así mismo, se ha notificado el incremento de transcritos de RNA mensajero de genes del sistema inmune en ovinos susceptibles/resistentes a NGI (Gill *et al.*, 2000; Estrada-Reyes *et al.*, 2017). La respuesta inmune dominante en las infecciones por NGI es controlada principalmente por citocinas de la clase T_H2 como son *IL-4, 5, 9, 10 y 13* (Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2013; McRae *et al.*, 2015; Estrada-Reyes *et al.*, 2017).

Desarrollo de la resistencia a *H. contortus* y otros NGI

La resistencia a las nematodosis es la habilidad del individuo para interactuar y regular la infección por parásitos a través de la respuesta inmune (Stear *et al.*, 1999). Numerosos estudios con ovinos infectados con NGI han notificado la inmunidad contra NGI asociada a la respuesta de células T_H2 caracterizada por aumento de citocinas (*IL-4, 5, 13*, etc.), PMN, mastocitos, leucocitos globulares e IgA (Figura 3) (Shakya *et al.*, 2009; Bowdridge *et al.*, 2013). Los pequeños rumiantes presentan diversos mecanismos en el control de las nematodosis al reducir el establecimiento de larvas por daño celular y de la fecundidad de los adultos (Rowe *et al.*, 2008; Ortolani *et al.*, 2013).

Respuesta inmune contra L₃

Cuando las L₃ de *H. contortus* invaden la mucosa abomasal, hay aumento en células T CD4⁺, TCR y BCR durante la infección primaria, esto sucede aproximadamente en cinco días post-infección (Balic *et al.*, 2000). En cambio, durante las infecciones repetidas se puede observar el reclutamiento significativo en solo tres días (Balic *et al.*, 2002), indicando una respuesta inmune

tipo protectora. Como consecuencia de esto, los animales parasitados presentan cambios en la mucosa abomasal y en el tejido linfoide local por efecto de las *IL-4*, *5*, *9*, *10* y *13* por su importancia en el control de las nematodosis. La *IL-4* e *IL-13* son esenciales para mantener la respuesta T_H2 y actúan como inductoras de procesos inflamatorios. La *IL-5* promueve el desarrollo de eosinófilos e incrementa su toxicidad y en forma indirecta se involucra en la producción de IgE junto con la *IL-9* para favorecer el crecimiento de linfocitos T_H y mastocitos, además potencia los efectos de la *IL-4* en la producción de IgE. La *IL-10* tiene actividad regulatoria debido a que inhibe la síntesis de citocinas T_H1/T_H2 que participan en la inflamación. Además, la producción local y sistémica de IgA, IgE e IgG se asocia a la presencia y control de las nematodosis (Gill *et al.*, 1992). Es importante considerar que dependiendo de la invasión parasitaria, serán los elementos descritos que se expresen en el sistema inmune del animal, pudiéndose describir dos tipos de respuesta, la expulsión rápida o inmunoexclusión y la expulsión retardada (Nisbet *et al.*, 2016).

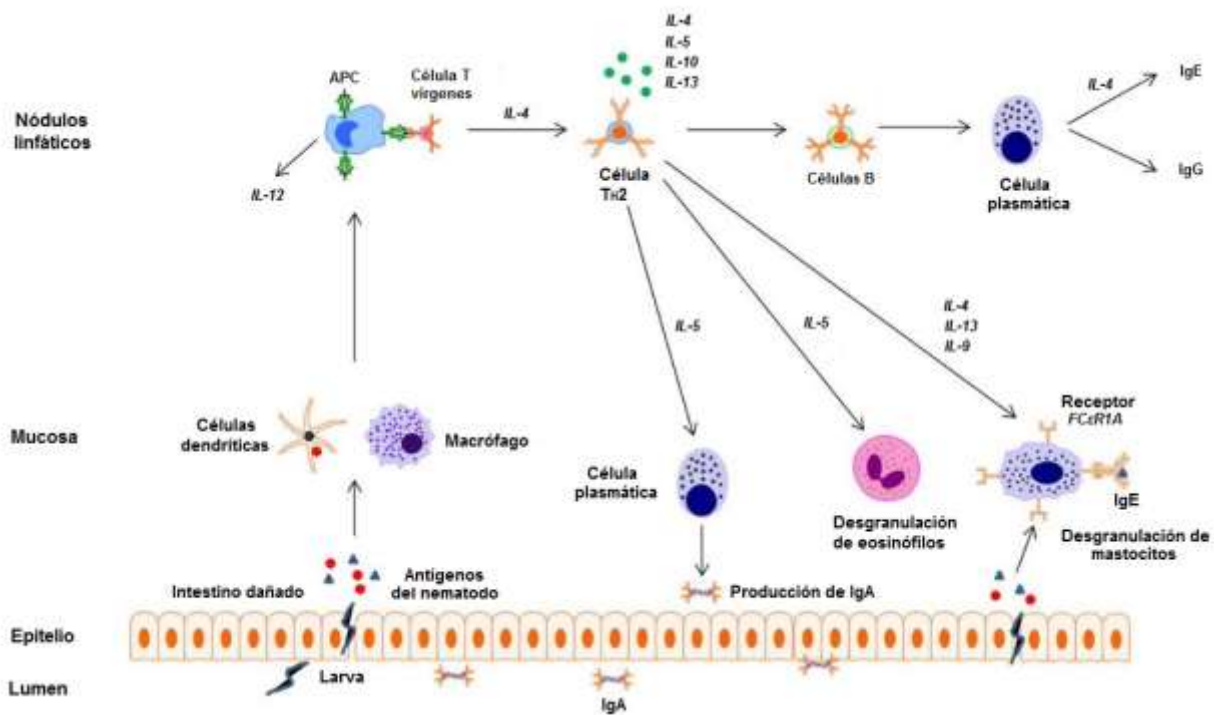


Figura 3. Respuesta inmune frente al desafío de NGI en ovinos.

La L_3 de NGI al ingresar a tejido daña la mucosa intestinal al romper células y activar los mecanismos inflamatorios a nivel local y posteriormente, sistémico. Los antígenos liberados por estadios de NGI son captados por las APCs, macrófagos y células dendríticas. Estas células migran a ganglios linfáticos para presentar antígenos a las células T vírgenes, cuya diferenciación hacia linfocitos T_H2 liberan citocinas que inducen el reclutamiento de células efectoras como eosinófilos y mastocitos al sitio de la infección. También

Expulsión rápida o inmunoeclusión

Es la respuesta que ocurre en animales hipersensibilizados por infecciones larvianas repetidas durante un periodo prolongado dando lugar a la expulsión de L₃ dentro de las 48 horas, es decir antes de que se implanten en los tejidos del abomaso (Balic *et al.*, 2000). Esta respuesta se caracteriza por una reacción de hipersensibilidad tipo 1 en la mucosa por degranulación por parte de mastocitos y leucocitos globulares de mediadores proinflamatorios (proteasas, prostaglandinas, leucotrienos, histamina y serotonina) que actúan principalmente incrementando la permeabilidad de las mucosas, aumento del peristaltismo y facilitando la llegada de factores de complemento y anticuerpos a la luz intestinal (Balic *et al.*, 2002).

También los eosinófilos tienen un papel relevante en este tipo de respuesta, se ha notificado un incremento en la excreción de galectina-14 (mediador que es liberado por los eosinófilos) en el mucus que promueve la adhesión celular y aumento en la viscosidad, que ayuda a impedir la migración larvaria contribuyendo a la rápida expulsión de las larvas infectivas (Young *et al.*, 2009).

Expulsión retardada

Esta respuesta se caracteriza por el reclutamiento de eosinófilos que destruyen las L₃ mediante citotoxicidad celular mediada por anticuerpos y ocurre luego de unos 5 días, es decir posterior al establecimiento de larvas en la mucosa abomasal. La respuesta está regulada por citocinas T_H2, IgA, IgE e IgG que participan directamente en la expulsión de las larvas disminuyendo así el número de parásitos en el abomaso (Balic *et al.*, 2006).

Respuesta inmune contra L₄

El desarrollo de la L₄ en tejido es vital para continuar el ciclo biológico de nematodos como *Haemonchus* y *Teladorsagia* debido a que el problema de hipobiosis les permite evadir los mecanismos inmunes al disminuir su metabolismo (Gibbs, 1986).

Hipobiosis

La hipobiosis conocido también como “arresto tisular” es una facultad genética regida del cuarto estadio de *Haemonchus/Teladorsagia* por quimiotactismo de factores ambientales externos e internos del hospedero para modificar el ciclo de vida. Durante la hipobiosis se presenta el periodo de latencia con metabolismo disminuido observado en las L₄ en la mucosa del abomaso donde se acumulan y cuando existen las condiciones adecuadas para su desarrollo salen de la mucosa en gran número provocando una infección muy grave. La respuesta inmunológica del hospedero y la presencia de nematodos adultos en gran cantidad que crea un hacinamiento que inhibe a las L₄ por hipobiosis (Balic *et al.*, 2000). Se ha reportado una asociación entre L₄ en hipobiosis y la IgA ya que animales inmunizados desarrollaron hipobiosis y no así los no inmunizados (Henderson y Stear, 2006).

Control de la longitud y fecundidad por IgA

En estudios realizados en *Teladorsagia circumcincta* se ha encontrado que el incremento en la secreción de IgA específica para productos de excreción/secreción de L₄ asociados a la reducción de la longitud de L₄ y por tanto, disminución de la fecundidad en la etapa adulta del parásito (Ellis *et al.*, 2014).

Galectina-11 en el control del crecimiento de L₄

Las galectinas son proteínas de tipo lectina con numerosas funciones biológicas como la regulación de la respuesta inmune como adhesión linfocitaria y producción de citocinas. Preston *et al.* (2015) en estudios *in vitro* fueron los primeros en demostrar que la galectina-11 es capaz de adherirse a la región faríngea de L₄ de *H. contortus* inhibiendo así la alimentación de la L₄, reduciendo su tamaño y viabilidad. También encontraron que galectina-11 afecta a nematodos adultos, pero no a L₃. Con estos hallazgos se desarrollan nuevas líneas de investigación para estudiar los mecanismos de acción de galectina-11 en etapas parasitarias de NGI que deriven probablemente en vacunas (Laing *et al.*, 2013).

Respuesta inmune contra adultos

Las manifestaciones de resistencia contra *H. contortus* adultos son principalmente la expulsión y daño celular de los adultos y la reducción de la fecundidad de las hembras.

Expulsión de los nematodos

La expulsión de los parásitos adultos generalmente sucede después de infecciones larvarias repetidas y ocurre a través de un mecanismo no específico de rechazo rápido o inmunoexclusión, o por los mecanismos de inmunidad adquirida (Vijayasarithi *et al.*, 2015).

Reducción del tamaño y de la fecundidad de las hembras

La principal manifestación de inmunidad adquirida por el hospedero contra NGI adultos es el cambio morfológico y como consecuencia reducen su fecundidad. La reducción del tamaño de los nematodos está asociado al aumento en la producción de IgA abomasal específica para L₄, que se correlaciona con la reducción de la longitud de las hembras adultas presentes y una menor fecundidad, esto demostrado por una disminución en el FEC (Sinski *et al.*, 1995; Stear *et al.*, 1999). Se estima que la longitud de las hembras esta correlacionado entre 60 y el 70% con el número de huevos presentes en el útero de hembras de *T. circumcincta* y *Trichostrongylus colubriformis* (Gruner *et al.*, 2004). El mecanismo involucra a los eosinófilos que tienen receptores para IgA e IgG y receptores de baja afinidad para IgE. La unión con IgA es lo que proporciona el estímulo más potente para la degranulación de mediadores de la inflamación y citocinas como la *IL-5* que potencializan su efecto citotóxico (Balic *et al.*, 2006).

Factores que influyen en la resistencia contra *H. contortus*

Muchos son los factores que influyen en la resistencia de los ovinos a *H. contortus*, algunos son propios del hospedero como su constitución genética, raza, edad, estatus reproductivo, sexo y nutrición.

Constitución genética

La variación genética en la resistencia a *H. contortus* y otros NGI ha sido confirmado en diversos estudios, por lo que la selección genética de individuos naturalmente resistentes representa una opción para el control de infecciones parasitarias (Woolaston *et al.*, 1996; Bishop, 2012b; Emery *et al.*, 2016).

Raza

Varias razas han desarrollado resistencia natural a infecciones por NGI, como Blackbelly, St. Croix, Florida Native, Gulf Coast Native, Thin tail, Garole, Pelibuey y Red Masai (Amarante *et al.*, 2009; Saddiqi *et al.*, 2010; Jacobs *et al.*, 2016; Zvinorova *et al.*, 2016; Estrada-Reyes *et al.*, 2017). Todas han sido estudiadas para comprender los componentes inmunológicos involucrados e identificar los genes asociados a la resistencia. Se han identificado dos *loci* de caracteres cuantitativos (QTL) que tienen genes candidatos, uno en el cromosoma 3 cerca del *locus* de interferón gamma (*INFγ*) y otro en el cromosoma 20 adyacente del MHC que codifican proteínas del MHC II involucrados en la presentación de antígenos descrito anteriormente (Miller y Horohov, 2006; Shakya *et al.*, 2009; Saddiqi *et al.*, 2012; Karrow *et al.*, 2014).

Edad

Los corderos de tres a seis meses son más susceptibles a las infecciones parasitarias que los adultos. Sin embargo, el alto porcentaje de prevalencia y el problema de resistencia a los antihelmínticos dificultan el control de las nematodosis en jóvenes y adultos. Los mecanismos de inmunosupresión que se observa en los jóvenes rumiantes se debe a la pobre respuesta de linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD8⁺ en corderos respecto a los adultos (Miller y Horohov, 2006; Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2013). Además, se ha reportado que la IgA comienza a expresarse a partir de los cinco meses de edad, lo cual confirma las deficiencias en la respuesta TH2 en animales jóvenes (Shaw *et al.*, 2013). Sin embargo, los pequeños rumiantes en general son más susceptibles que los grandes rumiantes a las nematodosis, debido al retardo en la respuesta inmune que se

observa. Por ello, la importancia de seleccionar individuos con mayor potencial genético en contra de éstos patógenos.

Estatus reproductivo

Se ha reportado la pérdida temporal de la inmunidad (disminución de la resistencia) a NGI en ovejas próximas al parto y durante la lactancia que se manifiesta con un elevado FEC que contamina las praderas exponiendo a los corderos recién nacidos a la infección. Se atribuye este comportamiento a los aumentos en las concentraciones de progesterona y glucocorticoides durante el parto, a factores nutricionales y estrés por la lactación (Saddiqi *et al.*, 2010; Emery *et al.*, 2016).

Sexo

Los machos son más susceptibles a la infección por NGI que las hembras, sin embargo, esta diferencia no sucede antes de la pubertad. La inmunidad en machos se desarrolla gradualmente desde el nacimiento hasta la edad adulta, mientras que en las hembras la resistencia aumenta considerablemente después de la pubertad. Se atribuye esta susceptibilidad de los machos a los andrógenos que modulan varios aspectos de la inmunidad del hospedero (Klein, 2000; Toscano *et al.*, 2019).

Nutrición

La nutrición es vital para el desarrollo de la inmunidad contra NGI. Sabemos que la respuesta inmune del hospedero está bajo control genético y está influida por la calidad del alimento, básicamente con contenido rico en proteínas, esencial para adquirir madurez en la respuesta inmune. Bajo esta primicia, los animales pueden cubrir sus requerimientos básicos para su mantenimiento, crecimiento, reproducción y desarrollo de inmunidad, mientras que aquellos con pobre alimentación resultará mayor número de individuos susceptibles a la infección por NGI (Coop y Kyriazakis, 2001). Numerosos estudios han comprobado que la alimentación rica en

proteína mejora la capacidad del hospedero para responder ante los efectos adversos de la infección parasitaria (Torres-Acosta *et al.*, 2012).

Selección de ovinos y resistencia de ovinos a *H. contortus*

Durante la infección rebaño infectado con NGI se presentan tres principales fenotipos con relación en el establecimiento del parásito: i) Ovinos con características de resistencia para incrementar la respuesta inmune durante la etapa aguda de la nematodosis para después disminuir estos mecanismos y no afectar la salud del hospedero. De esta forma desarrolla mecanismos de memoria para prevenir el establecimiento de posibles infecciones al rechazar la infección parasitaria (Miller y Horohov, 2006), ii) Ovinos resilientes, son individuos capaces de mantener parámetros de salud y productivos estables ante niveles de infección moderados (Sargison, 2013) y iii) Ovinos susceptibles, son aquellos individuos con dificultad para regular la infección y por tanto las consecuencias del parasitismo son severas, entre éstas la disminución de la productividad y riesgo de la muerte (Assenza *et al.*, 2014).

Diversos productores seleccionan ovinos resistentes y resilientes como estrategia de control para evitar pérdida de la unidad animal causadas por el parasitismo en especial por *H. contortus* (Bishop, 2012a). Sin embargo, al seleccionar animales resilientes se tiene un rebaño con buenos niveles de productividad aunque estén con una fuerte infección parasitaria, pero en eventos donde la nutrición sea inadecuada o en condiciones fisiopatológicas que resulten en inmunosupresión, éstos individuos pueden volverse susceptibles y sufrir las consecuencias del parasitismo, incluso la muerte (Woolaston y Baker, 1996). Además, seleccionar ovinos resilientes representa continuidad de contaminación por NGI problema que afecta a corderos y borregas durante la etapa reproductiva (Fox, 1997).

La selección de ovinos resistentes es ampliamente aceptado como opción de control a NGI, debido a que los animales resistentes no regulan infección, disminuye la contaminación de NGI en praderas y los tratamientos antihelmínticos para mantener la eficacia de los principios activos y mantener el bienestar animal (Miller y Horohov, 2006; Preston *et al.*, 2014; Zvinorova *et al.*, 2016).

La resistencia a NGI estimada por el FEC tiene una heredabilidad (h^2) entre 0.20 a 0.70 (Sréter *et al.*, 1994; Pollott *et al.*, 2004; Lôbo *et al.*, 2009; Bishop, 2012a; Brown y Fogarty, 2017), por lo tanto la selección de ovinos resistentes favorecerá la salud animal. En Australia y Nueva Zelanda los programas de crianza selectiva con borregas resistentes a NGI han estado funcionando por años con una reducción en la incidencia de infecciones parasitarias en comparación con rebaños no seleccionados (Woolaston y Baker, 1996; Gray, 1997; Brown y Fogarty, 2017). En un estudio previo se reportó que borregas raza Merino fueron seleccionadas como resistentes a NGI, observando reducción del 69% en el FEC (Eady *et al.*, 1998).

La resistencia a NGI es poligénica, diversos genes están involucrados y además es de carácter cuantitativo. La selección de animales resistentes presenta correlación entre genes, algunos estudios notifican que los animales resistentes son menos productivos que los no resistentes a NGI (Eady *et al.*, 1998; Morris *et al.*, 2000). Sin embargo, otros notifican correlación genética positiva entre la resistencia a NGI y características de producción deseables (Bishop *et al.*, 1996; Bouix *et al.*, 1998). El seleccionar ovinos resistentes a NGI requiere su identificación por medio de marcadores fenotípicos y genéticos relacionados con la infección.

Marcadores de resistencia contra NGI

La resistencia tiene base genética, esto quiere decir que dentro de un rebaño se cuenta con individuos resistentes portadores de genes específicos y otros susceptibles cuya actividad genética es diferente durante la respuesta inmune. Los animales con caracteres genéticos resistentes a NGI presentan mecanismos inmunes para inhibir el desarrollo de estadios en el hospedero, regulan la invasión a tejido por estadios endógenos, a través de células y metabolitos que se activan para dañar las células del parásito o inhibir la actividad del sistema nervioso central (Douch *et al.*, 1996). Para medir el tipo de respuesta (inmune y productiva) de resistencia se han explorado marcadores fenotípicos y genéticos.

Marcadores fenotípicos

Según Bishop (2012a), los marcadores fenotípicos considerados como indicadores de resistencia a NGI se clasifican de la siguiente forma:

- Infección parasitaria: FEC, carga parasitaria (disminución del adulto), afectación en el tamaño y fecundidad de los adultos.
- Respuesta inmune: Eosinofilia, nivel de IgA.
- Patogenia: Nivel de anemia (VCA y FAMACHA®), pepsinógeno y proteína plasmática total.
- Medidas de resiliencia: Tasa de crecimiento.

Conteo fecal de huevos

El FEC es el principal marcador fenotípico para resistencia a NGI, es fácil de medir, pero altamente variable, ya que está influido por muchos factores (Karrow *et al.*, 2014). El FEC refleja el nivel de infección con correlación entre 0.68 y 0.83 (Amarante y Amarante, 2016). Así mismo, se puede observar correlación positiva y negativa con otros marcadores de fenotipo y tiene a h^2 entre 0.2 a 0.4, que se considera moderado (Saddiqi *et al.*, 2012). Con este valor de h^2 el mejoramiento genético de la resistencia lleva tiempo y es costoso si no se cuenta con laboratorio.

La selección de animales resistentes al cuantificar el FEC requiere de desafíos del hospedero relativamente alto contra NGI para estimar de manera confiable el fenotipo (Douch *et al.*, 1996), así como el uso preferente de marcadores de fenotipo relacionados con la respuesta inmune. El Cuadro 1 muestra algunos de los modelos de segregación de ovinos según su resistencia hacia NGI, todos basados en el FEC y algunos apoyados con otros marcadores de fenotipo.

Cuadro 1. Modelos de segregación de ovinos contra nematodos gastrointestinales según su conteo fecal de huevos y volumen celular aglomerado.

Tipo de ovino	Segregación	Condiciones		Referencia
		FEC	VCA	
Borregos	Resistente	15% con valores bajos de EPG		(Gruner <i>et al.</i> , 2002)
	Susceptible	15% con valores altos de EPG		
Corderos Corderas	Resistente	Media - 2 Error estándar		(Morteo-Gómez <i>et al.</i> , 2004)
	Intermedio	Entre ambos puntos de corte		
	Susceptible	Media + 2 Error estándar		
Borregas	Alto respondedor	≤ 450 EPG	≥ 30%	(González <i>et al.</i> , 2008)
	Bajo respondedor	≥ 1500 EPG	≤ 27%	
Corderos Corderas	Bajo FEC	≤ 1000 EPG		(Idika <i>et al.</i> , 2012)
	Intermedio	Entre ambos puntos de corte		
	Alto FEC	≥ 10,000		
Borregas	Resistente	60% de S1 a S10 ≤ Q1		(Palomo-Couoh <i>et al.</i> , 2016)
	Intermedio	60% de S1 a S10 > Q1 y < Q3		
	Susceptible	60% de S1 a S10 ≥ Q3		
Borregas	Resistente	Disminución D0 a D60		(Pereira <i>et al.</i> , 2016)
	Resiliente	Incremento D0 a D60	Incremento / ≥ 28%	
	Susceptible	Incremento D0 a D60	Disminución D0 a D60	
Corderos Borregas	Resistente	20% con valores bajos de EPG		(Toscano <i>et al.</i> , 2019)
	Intermedio	Entre ambos puntos de corte		
	Susceptible	20% con valores altos de EPG		

FEC=Conteo fecal de huevos, EPG=Huevos por gramo de heces, VCA=Volumen celular aglomerado, D=Día, S=Semana, Q=Cuartil

Carga parasitaria, tamaño de los nematodos y fecundidad

Estos marcadores si bien dan un valor real de la carga parasitaria, para obtenerlos hay que sacrificar a los animales, obtener el abomaso y aplicar procedimientos tardados y costosos por el personal involucrado en la tarea. Por lo tanto, con la muerte del animal se pierde este recurso genético en caso de resultar resistente a NGI. Se utiliza en investigación y se aprovecha la matanza en rastros en estudios epidemiológicos (Stear *et al.*, 1999).

Marcadores de respuesta inmune

1. Los eosinófilos pertenecen al grupo de leucocitos PMN y se ha relacionado con resistencia a la nematodosis al incrementar el número de células (eosinofilia) en sangre y tejido. La h^2 de esta característica es de 0.48 y se considera alto y buen indicador de la resistencia en rumiantes adultos, pero no en jóvenes (Mugambi *et al.*, 1997; Gill *et al.*, 2000; Bishop, 2012a;).
2. La IgA ha sido ampliamente seleccionada como marcador de resistencia genética a NGI. Es la más abundante en las mucosas, secretada por células plasmáticas por estimulación de la respuesta inmune T_H2 . La h^2 estimada va de 0.37 a 0.56 con una correlación genética con FEC de -0.88 (Sinski *et al.*, 1995). Este marcador es usado como complemento para la selección de animales resistentes basado en el FEC.

Medidas de impacto de la infección

1. La anemia puede estimarse midiendo el VCA que es muy útil en infecciones con nematodos hematófagos. Se notifica una h^2 entre 0.18 y 0.22 (Ngere *et al.*, 2017). En las últimas décadas, el nivel de anemia puede estimarse con el método FAMACHA® que relaciona los niveles de anemia con el color de la conjuntiva del ojo de ovinos y cabras con la presunción de infecciones por nematodos hematófagos (Notter *et al.*, 2017). Tiene h^2 de 0.32 a 0.41 en la raza ovina Dorper (Ngere *et al.*, 2017).
2. El diagnóstico de la concentración del pepsinógeno indica daño a la mucosa gástrica causado por los estadios larvales de NGI en abomaso (Charlier *et al.*, 2011). La h^2 es de 0.21 (Gutiérrez-Gil *et al.*, 2010).
3. La concentración de proteína plasmática total se usa para determinar pérdida de proteína de los tejidos (hipoproteinemia), uno de los principales signos clínicos observados en animales infectados con NGI (Bordoloi *et al.*, 2012).

Medidas de resiliencia

Entre los signos clínicos más evidentes de las parasitosis por NGI en pequeños rumiantes es el cambio en el peso corporal como resultado de la alteración en el consumo de alimento, dificultando la presentación de la respuesta inmune efectiva (Louie *et al.*, 2007). La h^2 observada es de 0.31 en ovinos durante la etapa de crecimiento (Bouix *et al.*, 1998) y de 0.23 en adultos (Pollott *et al.*, 2004). Existe una correlación negativa entre la ganancia de peso y el FEC (Eady *et al.*, 1998).

En conjunto estas medidas muestran propiedades deseables al productor, como ser moderadamente a altamente heredable y correlacionadas con el FEC. Sin embargo, la interpretación de rasgos de fenotipo que se describe con la respuesta inmune y el impacto de la enfermedad se complica debido a su relación con el cambio dinámico, favoreciendo condiciones de prevalencia de patógenos en rumiantes. Sin embargo, el estudio de características fenotípicas requiere tiempo y personal especializado. La identificación de genes que asociados a la variabilidad fenotípica contribuye en forma más confiable en la selección de animales genéticamente resistentes (Miller y Horohov, 2006).

Marcadores genéticos

Los marcadores genéticos que se han utilizado para identificar QTL relacionados con la resistencia a NGI, contribuyen en la búsqueda de regiones genómicas con variaciones genéticas asociadas a las nematodosis (Emery *et al.*, 2016). Sin embargo, como la resistencia es poligénica (está bajo control de varios *locus*) es importante seleccionar individuos/poblaciones con índice (moderado y alto) de h^2 a las nematodosis, cuidando de no favorecer a otros patógenos. Se ha notificado que marcadores genéticos en algunas regiones del OVAR-MHC II son asociados a una disminución en el FEC de borregas seleccionadas para un programa de mejoramiento de la resistencia a NGI (Estrada-Reyes *et al.*, 2018).

Los estudios realizados utilizan diversas metodologías como son los Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP, por sus siglas en inglés) durante la presentación de

antígenos (Dukkipati *et al.*, 2006). Otros han explorado metodologías como Polimorfismo de Nucleótido Único (SNP, por sus siglas en inglés) al identificar 12 SNP expresados por células de la clase T_H2 y T_H17 en ovinos resistentes a NGI (Wilkie *et al.*, 2017).

Estudios recientes han identificado SNP asociadas con la variación genética relacionada con la resistencia a la infección por NGI en bovinos principalmente (García-Ruíz *et al.*, 2019). Para ovinos, existen chips (OvineSNP12K, OvineSNP50K y OvineSNP700K, Illumina) con los que se pueden detectar simultáneamente más de 50,000 SNP y usar estos marcadores para predecir el mérito genético para resistencia a NGI (Atlíja *et al.*, 2016; Berton *et al.*, 2017).

Otra herramienta de estudio es el análisis de la expresión relativa de genes, el RNA mensajero (RNAm), para identificar genes que codifican proteínas que se activan durante la infección por NGI. Numerosos estudios han identificado genes que se expresan diferencialmente entre animales resistentes y susceptibles a NGI (Ingham *et al.*, 2008; Kadarmideen *et al.*, 2011; Sallé *et al.*, 2014; Estrada-Reyes *et al.*, 2017; Maza-López *et al.*, 2020).

Lo más reciente es el uso de las herramientas ómicas (genómica, transcriptómica, metabolómica y proteómica) donde se analizan gran cantidad de datos genéticos que generan conocimiento sobre los procesos biológicos. En un estudio se analizó el transcriptoma (conjunto de moléculas del RNAm presentes en una célula o tejido en un momento dado) de nódulos linfáticos del abomaso de corderos Blackface infectados con *T. circumcincta*. Los resultados identificaron genes asociados a la respuesta inmune humoral, síntesis de proteínas, respuesta inflamatoria y el desarrollo del sistema hematológico. Los genes más importantes fueron *IL-4*, *5* y en particular *13*, lo que confirmó que la activación diferencial de las respuestas polarizadas T_H2 es crítica para el fenotipo de resistencia. Además, en los animales resistentes hubo una regulación positiva de los genes relacionados con el control y la supresión de la inflamación (Gossner *et al.*, 2013; Estrada-Reyes *et al.*, 2017; Maza-López *et al.*, 2020).

En cabras, se analizó el transcriptoma de sangre periférica de cabras resistentes y susceptibles a NGI. El análisis de RNA-seq mostró que 298 genes se encontraban altamente expresados en las cabras resistentes respecto a las susceptibles. Los genes estaban asociados a

inmunidad innata, factor de crecimiento transformante y proteína quinasa activada por mitógenos (Bhuiyan *et al.*, 2017).

Estos hallazgos proporcionan información relevante para el mejoramiento de la resistencia del hospedero a las infecciones por NGI y que permite conocer los mecanismos involucrados a la resistencia de los ovinos a las infecciones por NGI. Escoger un marcador (fenotípico o genético) para identificar a animales resistentes a *H. contortus* y otros NGI dependerá de la prevalencia en la región, así como de otros factores como son capacidades tecnológicas y presupuesto disponible. En un principio quizá sea suficiente el FEC y VCA, pero mientras más marcadores usemos en la selección, el mejoramiento genético en la resistencia a NGI será más efectiva.

Referencias

- Alba-Hurtado, F., Muñoz-Guzmán, M.A., 2013. Immune responses associated with resistance to haemonchosis in sheep. *Biomed Res. Int.* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/162158>
- Amarante, A.F.T., Susin, I., Rocha, R.A., Silva, M.B., Mendes, C.Q., Pires, A. V., 2009. Resistance of Santa Ines and crossbred ewes to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. *Vet. Parasitol.* 165, 273–280. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.009>
- Amarante, A.F.T. do, Amarante, M.R.V., 2016. Advances in the diagnosis of the gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci.* 53, 127. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v53i2p127-137>
- Angulo-Cubillán, F.J., García-Coiradas, L., Cuquerella, M., De La Fuente, C., Alunda, J.M., 2007. *Haemonchus contortus*-sheep relationship: A review. *Rev. Cient. la Fac. Ciencias Vet. la Univ. del Zulia XVII*, 577–587.
- Assenza, F., Elsen, J.M., Legarra, A., Carré, C., Sallé, G., Robert-Granié, C., Moreno, C.R., 2014. Genetic parameters for growth and faecal worm egg count following *Haemonchus contortus* experimental infestations using pedigree and molecular information. *Genet. Sel. Evol.* 46, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-46-13>
- Atlija, M., Arranz, J.J., Martínez-Valladares, M., Gutiérrez-Gil, B., 2016. Detection and replication of QTL underlying resistance to gastrointestinal nematodes in adult sheep using the ovine 50K SNP array. *Genet. Sel. Evol.* 48, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12711-016-0182-4>
- Balic, A., Bowles, V.M., Meeusen, E.N.T., 2002. Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Parasite Immunol.* 24, 39–46. <https://doi.org/10.1046/j.0141-9838.2001.00432.x>

- Balic, A. B., V.M., Meeusen, E.N.T., 2000. The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Adv. Parasitol.* 45, 181–241.
- Balic, A., Cunningham, C.P., Meeusen, E.N.T., 2006. Eosinophil interactions with *Haemonchus contortus* larvae in the ovine gastrointestinal tract. *Parasite Immunol.* 28, 107–115. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00816.x>
- Berton, M.P., Oliveira Silva, R.M., Peripolli, E., Stafuzza, N.B., Martin, J.F., Álvarez, M.S., Gavinã, B.V., Toro, M.A., Banchemo, G., Oliveira, P.S., Eler, J.P., Baldi, F., Ferraz, J.B.S., 2017. Genomic regions and pathways associated with gastrointestinal parasites resistance in Santa Inês breed adapted to tropical climate. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 8, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0190-4>
- Besier, R.B., Kahn, L.P., Sargison, N.D., Van Wyk, J.A., 2016. The Pathophysiology, Ecology and Epidemiology of *Haemonchus contortus* Infection in Small Ruminants. *Adv. Parasitol.* 93, 95–143. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.022>
- Bhuiyan, A.A., Li, J., Wu, Z., Ni, P., Adetula, A.A., Wang, H., Zhang, C., Tang, X., Bhuyan, A.A., Zhao, S., Du, X., 2017. Exploring the genetic resistance to gastrointestinal nematodes infection in goat using RNA-sequencing. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18040751>
- Bishop, S. C., 2012a. Possibilities to breed for resistance to nematode parasite infections in small ruminants in tropical production systems. *Animal* 6, 741–747. <https://doi.org/10.1017/S1751731111000681>
- Bishop, Stephen C., 2012b. A consideration of resistance and tolerance for ruminant nematode infections. *Front. Genet.* 3, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00168>
- Bishop, S.C., Bairden, K., McKellar, Q.A., Park, M., Stear, M.J., 1996. Genetic parameters for faecal egg count following mixed, natural, predominantly *Ostertagia circumcincta* infection and relationships with live weight in young lambs. *Anim. Sci.* 63, 423–428. <https://doi.org/10.1017/S1357729800015319>
- Bisset, S.A., Morris, C.A., McEwan, J.C., Vlassof, A., 2001. Breeding sheep in New Zealand that are less reliant on anthelmintics to maintain health and productivity. *N. Z. Vet. J.* 49, 236–246. <https://doi.org/10.1080/00480169.2001.36238>
- Bordoloi, G., Jas, R., Ghosh, J.D., 2012. Changes in the haemato-biochemical pattern due to experimentally induced haemonchosis in Sahabadi sheep. *J. Parasit. Dis.* 36, 101–105. <https://doi.org/10.1007/s12639-011-0079-7>
- Bouix, J., Krupinski, J., Rzepecki, R., Nowosad, B., Skrzyzala, I., Roborzynski, M., Fudalewicz-Niemczyk, W., Skalska, M., Malczewski, A., Gruner, L., 1998. Genetic resistance to gastrointestinal nematode parasites in polish long-wool sheep. *Int. J. Parasitol.* 28, 1797–1804. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00147-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00147-7)

- Bowdridge S, MacKinnon K, McCann JC, et al. 2013. Hair-type sheep generate an accelerated and longer-lived humoral immune response to *Haemonchus contortus* infection. *Vet Parasitol* 196:172–178. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.01.008>
- Brown, D.J., Fogarty, N.M., 2017. Genetic relationships between internal parasite resistance and production traits in Merino sheep. *Anim. Prod. Sci.* 57, 209–215. <https://doi.org/10.1071/AN15469>
- Burke, J.M., Miller, J.E., 2006. Evaluation of multiple low doses of copper oxide wire particles compared with levamisole for control of *Haemonchus contortus* in lambs. *Vet. Parasitol.* 139, 145–149. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.02.030>
- Chagas, A.C.S., 2015. Medicinal plant extracts and nematode control. *CAB Rev. Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Resour.* 10. <https://doi.org/10.1079/PAVSNR201510008>
- Charlier, J., Dorny, P., Levecke, B., Demeler, J., von Samson-Himmelstjerna, G., Höglund, J., Vercruyse, J., 2011. Serum pepsinogen levels to monitor gastrointestinal nematode infections in cattle revisited. *Res. Vet. Sci.* 90, 451–456. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.06.029>
- Collado, V., Porrás, R., Cutuli de Simón, M., Gómez Lucía, E., 2008. El sistema inmune innato I: sus mecanismos. *Rev. Complut. Ciencias Vet.* 2, 1–16. <https://doi.org/10.5209/RCCV.23711>
- Contreras-Ochoa, C.O., Lagunas-Martínez, A., Reyes-Guerrero, D.E., Bautista-García, G.A., Tello-López, A., González-Garduño, R., López-Arellano, M.E. 2019. Excreted and secreted products (72/60 KDa) from *Haemonchus placei* larvae induce *in vitro* peripheral blood mononuclear cell proliferation and activate the expression of cytokines and *FCεRI1* receptor. *Experimental Parasitology* 206, 107755. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107755>
- Coop, R.L., Kyriazakis, I., 2001. Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. *Trends Parasitol.* 17, 325–330. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(01\)01900-6](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(01)01900-6)
- Costa-Rodrigues, G, Costa-Vale, V.L., Costa-Silva, M., et al. 2017. Immune response against *Haemonchus contortus* and the Th1-Th2 Paradigm in Helminth Infection. *EC Microbiol* 9:152–159
- Da Silva, M.E., Uriostegui, M.A.M., Millán-Orozco, J., De Gives, P.M., Hernández, E.L., Braga, F.R., De Araújo, J.V., 2017. Predatory activity of *Butlerius* nematodes and nematophagous fungi against *Haemonchus contortus* infective larvae. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 26, 92–95. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016091>
- Díaz-Rivera, P., Torres-Hernández, G., Osorio-Arce, M.M., Pérez-Hernández, P., Pulido-Albores, Á.R., Becerril-Pérez, C.M., Herrera-Haro, J.G., 2000. Resistencia a parásitos gastrointestinales en ovinos Florida, pelibuey y sus cruza en el trópico Mexicano. *Agrocencia* 34, 13–20.
- Douch, P.G.C., Green, R.S., Morris, C.A., Mcewan, J.C., Windon, R.G., 1996. Phenotypic markers for selection of nematode-resistant sheep. *Int. J. Parasitol.* 26, 899–911.

[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(96\)80062-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(96)80062-2)

- Dukkipati, V.S.R., Blair, H.T., Garrick, D.J., Murray, A., 2006. “Ovar-Mhc” - Ovine major histocompatibility complex: Structure and gene polymorphisms. *Genet. Mol. Res.* 5, 581–608. <https://doi.org/10.1080/00480169.2006.36689>
- Durette-Desset, M.C., Hugot, J.P., Darlu, P., Chabaud, A.G., 1999. A cladistic analysis of the Trichostrongyloidea (Nematoda). *Int. J. Parasitol.* 29, 1065–1086. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00028-4](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00028-4)
- Eady, S.J., Woolaston, R.R., Lewer, R.P., Raadsma, H.W., Swan, A.A., Ponzoni, R.W., 1998. Resistance to nematode parasites in Merino sheep: Correlation with production traits. *Aust. J. Agric. Res.* 49, 1201–1211. <https://doi.org/10.1071/A98069>
- Ellis, S., Matthews, J.B., Shaw, D.J., Paterson, S., McWilliam, H.E.G., Inglis, N.F., Nisbet, A.J., 2014. Ovine IgA-reactive proteins from *Teladorsagia circumcincta* infective larvae. *Int. J. Parasitol.* 44, 743–750. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.05.007>
- Emery, D.L., Hunt, P.W., Le Jambre, L.F., 2016. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? *Int. J. Parasitol.* <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.07.001>
- Estrada-Reyes, Z.M., López-Reyes, A.G., Lagunas-Martínez, A., Ramírez- Vargas, G., Olazarán-Jenkins, S., Hernández-Romano, J., Mendoza-de-Gives, P., López-Arellano, M.E., 2015. Relative expression analysis of IL-5 and IL-6 genes in tropical sheep breed Pelibuey infected with *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol.* 37, 446–452. <https://doi.org/10.1111/pim.12211>
- Estrada-Reyes, Z.M., López-Arellano, M.E., Torres-Acosta, F., López-Reyes, A.G., Lagunas-Martínez, A., Mendoza de Gives, P., González-Garduño, R., Olazarán.Jenkeins, S., Reyes-Guerrero, D., Ramírez-Vargas, G., 2017. Cytokine and antioxidant gene profiles from peripheral blood mononuclear cells of Pelibuey lambs after *Haemonchus contortus* infection. *Parasite Immunol.* 39, 1427. <https://doi.org/10.1111/pim.12427>
- Estrada-Reyes, Z.M., Tsukahara, Y., Goetsch, A.L., Gipson, T.A., Sahlu, T., Puchala, R., Wang, Z., Hart, S.P., Mateescu, R.G., 2018. Effect of Ovar-Dra and Ovar-DRB1 genotype in small ruminants with haemonchosis. *Parasite Immunol.* 40, e12534. <https://doi.org/10.1111/pim.12534>
- Figueroa Castillo, J.A., Medina, R.D.M., Villalobos, J.M.B., Gayosso-Vázquez, A., Ulloa-Arvizu, R., Rodríguez, R.A., Ramírez, H.P., Alonso Morales, R.A., 2011. Association between major histocompatibility complex microsatellites, fecal egg count, blood packed cell volume and blood eosinophilia in Pelibuey sheep infected with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 177, 339–344. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.11.056>
- Fox, M.T., 1997. Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: Recent developments, in: *Veterinary Parasitology.* pp. 285–308. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00102-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00102-7)

- García-Ruiz, A., Ruíz-Lopez, F., Alonso-Díaz, M. von Son de Fernex, E., Olazarán-Jenkins, S., Vega-Murillo, V., López-Arellano, M., 2019. Estudio de asociación genómica para resistencia a *Cooperia punctata* en bovinos cruzados en el trópico subhúmedo de México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 10, 482-489. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i2.4759>.
- Gibbs, H.C. 1986. Hypobiosis in parasitic nematodes - an update. *Adv. Parasitol.* 25, 129-174.
- Gill, H.S., Altmann, K., Cross, M.L., Husband, A.J., 2000. Induction of T helper 1- and T helper 2-type immune responses during *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Immunology* 99, 458–463. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2000.00974.x>
- Gill, H.S., Husband, A.J., Watson, D.L., 1992. Localization of immunoglobulin-containing cells in the abomasum of sheep following infection with *Haemonchus contortus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 31, 179–187. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(92\)90095-8](https://doi.org/10.1016/0165-2427(92)90095-8)
- González-Garduño, R., López-Arellano, M.E., Mendoza-De Gives, P., Torres-Hernández, G., Arece-García, J., 2018a. Immune response in blackbelly lambs to *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* mixed infection in a hot and humid climate. *Trop. Biomed.* 35, 696–708.
- González-Garduño, R.G., López-Arellano, M.E., Torres-Hernández, G., Oliva-Hernández, J., Hinojosa-Cuéllar, J.A., 2018b. Assessment of acquired resistance in previously infected lambs with gastrointestinal nematodes in a tropical climate. *Indian J. Anim. Res.* <https://doi.org/10.18805/ijar.b-928>
- González, J.L., López-Arellano, M.E., Olazarán-Jenkins, S., Liébano-Hernández, E., De Gives, P.M., Vázquez-Prats, V., Vega-Murillo, V., Calderon, R., 2008. Phenotype characterization of Pelibuey native lambs resistant to *Haemonchus contortus*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1149, 177–179. <https://doi.org/10.1196/annals.1428.043>
- Gossner, A., Wilkie, H., Joshi, A., Hopkins, J., 2013. Exploring the abomasal lymph node transcriptome for genes associated with resistance to the sheep nematode *Teladorsagia circumcincta*. *Vet. Res.* 44, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-68>
- Gray, G.D., 1997. The use of genetically resistant sheep to control nematode parasitism. *Vet. Parasitol.* 72, 345–366. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00105-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00105-2)
- Gruner, L., Cortet, J., Sauvé, C., Hoste, H., 2004. Regulation of *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* worm populations by grazing sheep with differing resistance status. *Vet. Res.* 35, 91–101. <https://doi.org/10.1051/vetres:2003043>
- Gruner, L., Cortet, J., Sauvé, C., Limouzin, C., Brunel, J.C., 2002. Evolution of nematode community in grazing sheep selected for resistance and susceptibility to *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*: A 4-year experiment. *Vet. Parasitol.* 109, 277–291. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00302-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00302-3)
- Gutiérrez-Gil, B., Pérez, J., De La Fuente, L.F., Meana, A., Martínez-Valladares, M., San Primitivo, F., Rojo-Vázquez, F.A., Arranz, J.J., 2010. Genetic parameters for resistance to

- trichostrongylid infection in dairy sheep. *Animal* 4, 505–512. <https://doi.org/10.1017/S1751731109991431>
- Hein, W.R., Pernthaner, A., Piedrafita, D., Meeusen, E.N., 2010. Immune mechanisms of resistance to gastrointestinal nematode infections in sheep. *Parasite Immunol.* <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2010.01213.x>
- Henderson, N.G., Stear, M.J., 2006. Eosinophil and IgA responses in sheep infected with *Teladorsagia circumcincta*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112, 62–66. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.03.012>
- Hodgkinson, J.E., Kaplan, R.M., Kenyon, F., Morgan, E.R., Park, A.W., Paterson, S., Babayan, S.A., Beesley, N.J., Britton, C., Chaudhry, U., Doyle, S.R., Ezenwa, V.O., Fenton, A., Howell, S.B., Laing, R., Mable, B.K., Matthews, L., McIntyre, J., Milne, C.E., Morrison, T.A., Prentice, J.C., Sargison, N.D., Williams, D.J.L., Wolstenholme, A.J., Devaney, E., 2019. Refugia and anthelmintic resistance: Concepts and challenges. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 10, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.05.001>
- Idika, I.K., Chiejina, S.N., Mhomga, L.I., Nnadi, P.A., Ngongeh, L.A., 2012. Correlates of resistance to gastrointestinal nematode infection in Nigerian West African dwarf sheep. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 5, 529–532. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60093-5](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60093-5)
- Ingham, A., Reverter, A., Windon, R., Hunt, P., Menzies, M., 2008. Gastrointestinal nematode challenge induces some conserved gene expression changes in the gut mucosa of genetically resistant sheep. *Int. J. Parasitol.* 38, 431–442. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.07.012>
- Jacobs, J.R., Sommers, K.N., Zajac, A.M., Notter, D.R., Bowdridge, S.A., 2016. Early IL-4 gene expression in abomasum is associated with resistance to *Haemonchus contortus* in hair and wool sheep breeds. *Parasite Immunol.* 38, 333–339. <https://doi.org/10.1111/pim.12321>
- Kadarmideen, H.N., Watson-Haigh, N.S., Andronicos, N.M., 2011. Systems biology of ovine intestinal parasite resistance: Disease gene modules and biomarkers. *Mol. Biosyst.* 7, 235–246. <https://doi.org/10.1039/c0mb00190b>
- Karrow, N.A., Goliboski, K., Stonos, N., Schenkel, F., Peregrine, A., 2014. Review: Genetics of helminth resistance in sheep. *Can. J. Anim. Sci.* 94, 1–9. <https://doi.org/10.4141/CJAS2013-036>
- Kenyon, F., Greer, A.W., Coles, G.C., Cringoli, G., Papadopoulos, E., Cabaret, J., Berrag, B., Varady, M., Van Wyk, J.A., Thomas, E., Vercruyse, J., Jackson, F., 2009. The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Vet. Parasitol.* 164, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.04.015>
- Klein, S.L., 2000. The effects of hormones on sex differences in infection: From genes to behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24, 627–638. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(00\)00027-0](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(00)00027-0)

- Laing, R., Kikuchi, T., Martinelli, A., Tsai, I.J., Beech, R.N., Redman, E., Holroyd, N., Bartley, D.J., Beasley, H., Britton, C., Curran, D., Devaney, E., Gilabert, A., Hunt, M., Jackson, F., Johnston, S.L., Kryukov, I., Li, K., Morrison, A.A., Reid, A.J., Sargison, N., Saunders, G.I., Wasmuth, J.D., Wolstenholme, A., Berriman, M., Gilleard, J.S., Cotton, J.A., 2013. The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. *Genome Biol.* 14. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-8-r88>
- Lôbo, R.N.B., Vieira, L.S., de Oliveira, A.A., Muniz, E.N., da Silva, J.M., 2009. Genetic parameters for faecal egg count, packed-cell volume and body-weight in Santa Inês lambs. *Genet. Mol. Biol.* 32, 288–294.
- Louie, K., Vlassoff, A., Mackay, A.D., 2007. Gastrointestinal nematode parasites of sheep: A dynamic model for their effect on liveweight gain. *Int. J. Parasitol.* 37, 233–241. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.09.013>
- Maqbool, I., Wani, Z.A., Shahardar, R.A., Allaie, I.M., Shah, M.M., 2017. Integrated parasite management with special reference to gastro-intestinal nematodes. *J. Parasit. Dis.* 41. <https://doi.org/10.1007/s12639-016-0765-6>
- Maza-López, J., Pacheco-Armenta, M.J., Reyes-Guerrero, D.E., Olmedo-Juárez, A. González-Garduño, R., Olarzarán-Jenkins, López-Arellano, M.E, 2020 (en prensa). Immune response related to Pelibuey sheep exposed to natural infection with gastrointestinal nematodes in a tropical region of México. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports.*
- McRae, K.M., Stear, M.J., Good, B., Keane, O.M., 2015. The host immune response to gastrointestinal nematode infection in sheep. *Parasite Immunol.* 37, 605–613. <https://doi.org/10.1111/pim.12290>
- Meeusen, E.N.T., Balic, A., 2000. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? *Parasitol. Today* 16, 95–101. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(99\)01607-5](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(99)01607-5)
- Miller, J.E., Horohov, D.W., 2006. Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. *J. Anim. Sci.* 84 Suppl, 124–132. https://doi.org/10.2527/2006.8413_supplE124x
- Morris, C.A., Vlassoff, A., Bisset, S.A., Baker, R.L., Watson, H.T.G., West, C.J., Wheeler, M., 2000. Continued selection of Romney sheep for resistance or susceptibility to nematode infection: Estimates of direct and correlated responses. *Anim. Sci.* 70, 17–27. <https://doi.org/10.1017/S1357729800051560>
- Morteo-Gómez, R., González-Garduño, R., Torres-Hernández, G., Nuncio-Ochoa, G., Becerril-Pérez, C.M., Gallegos-Sánchez, J., Aranda-Ibañez, E., 2004. Efecto de la variación fenotípica en la resistencia de corderos Pelibuey a la infestación con nematodos gastrointestinales. *Agrociencia* 395–404.
- Mugambi, J.M., Bain, R.K., Wanyangu, S.W., Ihiga, M.A., Duncan, J.L., Murray, M., Stear, M.J., 1997. Resistance of four sheep breeds to natural and subsequent artificial *Haemonchus contortus* infection. *Vet. Parasitol.* 69, 265–273. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(96\)01128-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(96)01128-4)

- Ngere, L., Burke, J.M., Herring, A.D., Sanders, J.O., Craig, T.M., van Wyk, J.A., Riley, D.G., 2017. Utilization of year-round data in the estimation of genetic parameters for internal parasite resistance traits in Dorper sheep. *Small Rumin. Res.* 151, 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.04.005>
- Nisbet, A.J., Meeusen, E.N., González, J.F., Piedrafita, D.M., 2016. Immunity to *Haemonchus contortus* and Vaccine Development. *Adv. Parasitol.* 93, 353–396. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.011>
- Notter, D.R., Burke, J.M., Miller, J.E., Morgan, J.L.M., 2017. Association between FAMACHA scores and fecal egg counts in katahdin lambs. *J. Anim. Sci.* 95, 1118–1123. <https://doi.org/10.2527/jas2016.1248>
- O'Connor, L.J., Walkden-Brown, S.W., Kahn, L.P., 2006. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Vet. Parasitol.* <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.035>
- Ojeda-Robertos, N.F., Torres-Acosta, J.F.J., González-Garduño, R., Notter, D.R., 2017. Phenotypic expression of parasite susceptibility to *Haemonchus contortus* in Pelibuey sheep. *Vet. Parasitol.* 239, 57–61. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.015>
- Ortolani, E.L., Leal, M.L. do R., Minervino, A.H.H., Aires, A.R., Coop, R.L., Jackson, F., Suttle, N.F., 2013. Effects of parasitism on cellular immune response in sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 196, 230–234. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.02.014>
- Palomo-Couoh, J.G., Aguilar-Caballero, A.J., Torres-Acosta, J.F. de J., Magaña-Monforte, J.G., 2016. Evaluation of different models to segregate Pelibuey and Katahdin ewes into resistant or susceptible to gastrointestinal nematodes. *Trop. Anim. Health Prod.* 48, 1517–1524. <https://doi.org/10.1007/s11250-016-1122-6>
- Pereira, J.F.S., Mendes, J.B., De Jong, G., Maia, D., Teixeira, V.N., Passerino, A.S., Garza, J.J., Sotomaior, C.S., 2016. FAMACHA© scores history of sheep characterized as resistant/resilient or susceptible to *H. contortus* in artificial infection challenge. *Vet. Parasitol.* 218, 102–105. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.01.011>
- Pollott, G.E., Karlsson, L.J.E., Eady, S., Greefft, J.C., 2004. Genetic parameters for indicators of host resistance to parasites from weaning to hogget age in Merino sheep. *J. Anim. Sci.* 82, 2852–2864. <https://doi.org/10.2527/2004.82102852x>
- Preston, S.J.M., Beddoe, T., Walkden-Brown, S., Meeusen, E., Piedrafita, D., 2015. Galectin-11: A novel host mediator targeting specific stages of the gastrointestinal nematode parasite, *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 45, 791–796. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.06.003>
- Preston, S.J.M., Sandeman, M., Gonzalez, J., Piedrafita, D., 2014. Current Status for Gastrointestinal Nematode Diagnosis in Small Ruminants: Where Are We and Where Are We Going? *J. Immunol. Res.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/210350>

- Reyes-Guerrero, D., Mendoza-de-Gives, P., Aguilar-Marcelino, L., 2016. Identificación del alelo B del gen de interferón gamma asociado al rechazo de la infección por *Haemonchus contortus* en corderos pelibuey. *Quehacer Científico en Chiapas* 11, 3–9.
- Roeber, F., Jex, A.R., Gasser, R.B., 2013. Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - An Australian perspective. *Parasites and Vectors* 6, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-153>
- Rowe, A., McMaster, K., Emery, D., Sangster, N., 2008. *Haemonchus contortus* infection in sheep: Parasite fecundity correlates with worm size and host lymphocyte counts. *Vet. Parasitol.* 153, 285–293. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.01.040>
- Saddiqi, H. A., Iqbal, Z., Khan, M.N., Sarwar, M., Muhammad, G., Yaseen, M., Jabbar, A., 2010. Evaluation of three Pakistani sheep breeds for their natural resistance to artificial infection of *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 168, 141–145. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.10.022>
- Saddiqi, H.A., Sarwar, M., Iqbal, Z., Nisa, M., Shahzad, M.A., 2012. Markers/parameters for the evaluation of natural resistance status of small ruminants against gastrointestinal nematodes. *Animal* 6, 994–1004. <https://doi.org/10.1017/S1751731111002357>
- Sallé, G., Moreno, C., Boitard, S., Ruesche, J., Tircazes-Secula, A., Bouvier, F., Aletru, M., Weisbecker, J.L., Prévot, F., Bergeaud, J.P., Trumel, C., Grisez, C., Liénard, E., Jacquet, P., 2014. Functional investigation of a QTL affecting resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet. Res.* 45, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-68>
- Sargison, N.D., 2013. Understanding the epidemiology of gastrointestinal parasitic infections in sheep: What does a faecal helminth egg count tell us? *Small Rumin. Res.* 110, 78–81. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.11.008>
- Shakya, K.P., Miller, J.E., Horohov, D.W., 2009. A Th2 type of immune response is associated with increased resistance to *Haemonchus contortus* in naturally infected Gulf Coast Native lambs. *Vet. Parasitol.* 163, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.052>
- Shaw, R.J., Morris, C.A., Wheeler, M., 2013. Genetic and phenotypic relationships between carbohydrate larval antigen (CarLA) IgA, parasite resistance and productivity in serial samples taken from lambs after weaning. *Int. J. Parasitol.* <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.03.003>
- Simpson, H. V., 2000. Pathophysiology of Abomasal Parasitism: Is the Host or Parasite Responsible? *Vet. J.* 160, 177–191. <https://doi.org/10.1053/tvjl.2000.0491>
- Sinski, E., Bairden, K., Duncan, J.L., Eisler, M.C., Holmes, P.H., McKellar, Q.A., Murray, M., Stear, M.J., 1995. Local and plasma antibody responses to the parasitic larval stages of the abomasal nematode *Ostertagia circumcincta*. *Vet. Parasitol.* 59, 107–118. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)00761-Z](https://doi.org/10.1016/0304-4017(94)00761-Z)

- Sréter, T., Kassai, T., Takács, E., 1994. The heritability and specificity of responsiveness to infection with *Haemonchus contortus* in sheep. *Int. J. Parasitol.* 24, 871–876. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(94\)90013-2](https://doi.org/10.1016/0020-7519(94)90013-2)
- Stear, M.J., Strain, S., Bishop, S.C., 1999. Mechanisms underlying resistance to nematode infection. *Int. J. Parasitol.* 29, 51–56. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00179-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00179-9)
- Sweeney, T., Hanrahan, J.P., Ryan, M.T., Good, B., 2016. Immunogenomics of gastrointestinal nematode infection in ruminants – breeding for resistance to produce food sustainably and safely. *Parasite Immunol.* 38, 569–586.
- Torres-Acosta, J. F.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Aguilar-Caballero, A.J., Cámara-Sarmiento, R., Alonso-Díaz, M.A., 2012. Nutritional manipulation of sheep and goats for the control of gastrointestinal nematodes under hot humid and subhumid tropical conditions. *Small Rumin. Res.* 103, 28–40. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.10.016>
- Toscano, J.H.B., dos Santos, I.B., von Haehling, M.B., Giraldelo, L.A., Lopes, L.G., da Silva, M.H., Figueiredo, A., Esteves, S.N., Chagas, A.C. de S., 2019. Morada Nova sheep breed: Resistant or resilient to *Haemonchus contortus* infection? *Vet. Parasitol.* X 2, 100019. <https://doi.org/10.1016/j.vpoa.2019.100019>
- Urquhart, G. M., Armour, J., Duncan, J. L., Dunn, A. M., Jennings, F. W. 1996. Veterinary helminthology. *Veterinary Parasitology*, 2, 35-38.
- Vijayasarithi, M., Sheeba, A., Manikkavasagan, Sreekumar, C., Dhama, K., 2015. Immune Responses to *Haemonchus Contortus* in Sheep . *J. Immunol. Immunopathol.* 17, 79. <https://doi.org/10.5958/0973-9149.2015.00011.8>
- Wilkie, H., Riggio, V., Matika, O., Nicol, L., Watt, K.A., Sinclair, R., Sparks, A.M., Nussey, D.H., Pemberton, J.M., Houston, R.D., Hopkins, J., 2017. A candidate gene approach to study nematode resistance traits in naturally infected sheep. *Vet. Parasitol.* 243, 71–74. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.06.010>
- Woolaston, R.R., Baker, R.L., 1996. Prospects of breeding small ruminants for resistance to internal parasites. *Int. J. Parasitol.* 26, 845–855. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(96\)80054-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(96)80054-3)
- Woolaston, R.R., Manuelli, P., Eady, S.J., Barger, I.A., Le Jambre, L.F., Banks, D.J.D., Windon, R.G., 1996. The value of circulating eosinophil count as a selection criterion for resistance of sheep to trichostrongyle parasites. *Int. J. Parasitol.* 26, 123–126. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(95\)00105-0](https://doi.org/10.1016/0020-7519(95)00105-0)
- Young, A.R., Barcham, G.J., Kemp, J.M., Dunphy, J.L., Nash, A., Meeusen, E.N., 2009. Functional characterization of an eosinophil-specific galectin, ovine galectin-14. *Glycoconj. J.* 26, 423–432. <https://doi.org/10.1007/s10719-008-9190-0>
- Zaragoza-Vera, C. V., Aguilar-Caballero, A.J., González-Garduño, R., Arjona-Jiménez, G., Zaragoza-Vera, M., Torres-Acosta, J.F.J., Medina-Reynés, J.U., Berumen-Alatorre, A.C.,

2019. Variation in phenotypic resistance to gastrointestinal nematodes in hair sheep in the humid tropics of Mexico. *Parasitol. Res.* 118, 567–573. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-06201-w>

Zaros, L.G., Neves, M.R.M., Benvenuti, C.L., Navarro, A.M.C., Sider, L.H., Coutinho, L.L., Vieira, L.S., 2014. Response of resistant and susceptible Brazilian Somalis crossbreed sheep naturally infected by *Haemonchus contortus*. *Parasitol. Res.* 113, 1155–1161. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3753-8>

Zvinorova, P.I., Halimani, T.E., Muchadeyi, F.C., Matika, O., Riggio, V., Dzama, K., 2016. Breeding for resistance to gastrointestinal nematodes - the potential in low-input/output small ruminant production systems. *Vet. Parasitol.* 225, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.05.015>

CAPITULO I. COMPARISON OF TWO PHENOTYPICAL METHODS TO SEGREGATE FEMALE PELIBUEY LAMBS INTO PARASITIC NEMATODE RESISTANT AND SUSCEPTIBLE GROUPS, BASED ON HAEMATOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL RESPONSES ¹

1.1. ABSTRACT

The objective was to compare two segregation methods to select resistant and susceptible female Pelibuey lambs infected naturally with gastrointestinal nematodes (GINs) in relation to their haematological and immunological response. For 6 months, faeces and blood samples were taken fortnightly from 40 grazing 5-month-old female lambs. The lambs were classified according two methods using faecal egg count (FEC) as a phenotypical trait. In the first (reference) method (M3SE, n = 22), resistant (RES) lambs had FEC lower than the mean – 3 standard errors, the susceptible (SUS) lambs levels higher than + 3 standard errors (n = 10) and the intermediate (INT) lambs (n = 8) were categorised by having FECs between the two values. The second method (QUM) divided the population using quartiles into resistant (RES; 25%), intermediate (INT; 50%) and susceptible (SUS; 25%) lambs. The agreement between both methods was estimated using the Kappa index. The packed cell volume (PCV), total plasma protein (TPP) and peripheral eosinophils (EOS) were determined for each group. Serum was used to evaluate the IgA levels. PCV and TPP values were higher ($P < 0.01$) in the RES lambs (31.5 ± 3.4 and 6.16 ± 0.5 g/dL by QUM, respectively, and 31.5 ± 3.9 and 6.24 ± 0.49 g/dL by M3SE, respectively) than the SUS lambs (28.1 ± 4.7 and 5.94 ± 0.5 g/d, respectively, by both methods). The EOS and IgA values increased with age. M3SE and QUM were in moderate agreement (Kappa = 0.43). We concluded that the two segregation methods allowed for the identification of the same female SUS lambs, but by the M3SE method a greater number of animals were categorised phenotypically as resistant. PCV and TPP can help to identify phenotypically resistant animals.

Key words: Eosinophils, Selection, IgA, Plasma protein

¹ Artículo publicado en la revista Austral Journal of Veterinary Sciences. Vol. 52, 9-18 (2020).

1.2. INTRODUCTION

Gastrointestinal nematodes (GINs) are responsible for the deterioration in sheep health, especially in tropical areas, where climatic conditions favour their development and propagation throughout the year. GINs infections limit the productivity of sheep, causing economic losses due to low weight gain and increased mortality in the most susceptible animals. Among parasitic nematode infections, the most important is that caused by *Haemonchus contortus* because, in addition to its high prevalence and pathogenicity, it is a hematophagous species, making it a risk for animal health (Mavrot *et al* 2015).

Nematode infections have been mainly controlled using anthelmintics. The use of these products has helped to control the effects of parasitism, but their frequent use to eliminate susceptible nematodes has led to the selection of populations with anthelmintic resistance (AR). For this reason, these drugs have lost their effectiveness against several GIN species (Rose *et al* 2015). Alternative methods to control the effects of GINs, and combinations of these methods, have been widely used to avoid AR problems (McMahon *et al* 2013).

The host resistance is the ability to control the infection of endo-parasitic stages, contrary to susceptible ones that allow the infection with acute clinical signs. Parasitic infections with GINs consider the faecal egg count (FEC) as the main indicator to identify phenotypically resistant hosts. Selecting for increased resistance leads to decreased FEC resulting from ever-decreasing pasture contamination and hence decreased infectious challenge (Bishop 2012). The search for natural genetic resistance in sheep as a main objective implies the selection of several generations of sheep because genetic resistance against GINs is a moderately heritable characteristic ($h^2 = 0.11$ to 0.40 , Gauly and Erhardt 2001). To demonstrate this genetic resistance, phenotypic, histological, immunological and molecular indicators have been studied (Sweeney *et al* 2016). Despite its limitations, FEC is the phenotypic indicator that is most frequently used to assess the level of parasitic infection because is an estimator of parasitic burden (Morris *et al* 2000). However, identifying the most heavily infected individuals requires several samples due to variability in FEC. For this reason, several pathophysiological indicators have since been developed to indicate the presence and intensity of a GIN infection, such as the packed cell volume (PCV) to indicate

anaemia. Similarly, the dag score and body condition has also been used to evaluate the health deterioration caused by nematode infection (Bentounsi *et al* 2012).

To detect animals with resistance, several segregation methods have been used. One of these is the arithmetic mean of FEC along with the standard error (Morteo-Gómez *et al* 2004). The other method uses practical rules and categorises animals as resistant when they have a FEC <1000 eggs per gram of faeces (EPG), intermediate when the FEC is between 1000 and 2500 EPG and susceptible if it is >2500 EPG (Fakae *et al* 2004). In recent years, hair sheep have been segregated using the quartile method (Palomo-Couoh *et al* 2016, Zaragoza-Vera *et al* 2019). Others studied indicators include PCV, total plasma protein (TPP), pepsinogen, blood cell count and immunoglobulin, mainly IgA and IgE. These have been explored for the effective identification of natural resistance to GINs in sheep (Preston *et al* 2014, Zaros *et al* 2014).

The main host defence mechanism against GINs is acquired immunity, which develops over time in response to reinfection and depends on age, nutritional status and genotype (McRae *et al* 2015). A current challenge for sheep breeders is allowing sufficient GIN exposure to develop immunity without impairing growth, and hence herd productivity, and maintaining anthelmintic efficacy on farms (McMahon *et al* 2013). Due to this situation, the proposed hypothesis was that the lambs will express acquired resistance against GINs according to their segregation, which implies that resistant female lambs will have more eosinophils and better haematological values than susceptible sheep. The objective of this study was to compare two segregation methods to select resistant and susceptible female Pelibuey lambs naturally infected with GINs in relation with their haematological and immunological response.

1.3. MATERIALS AND METHODS

Study area location

The study was conducted at the Centre for Training and Reproduction of Small Species (CECAREM) in Tabasco, México, located in Villahermosa (17°92' N, 93°00' W). The climate of the region is hot humid with rain throughout the year (SMN 2019). The mean temperature is 27.1 °C and annual rainfall is 1958 mm (Figure 1).

Animal management

From a group of 300 contemporary Pelibuey lambs born in a controlled mating, 40 5-month-old lambs with age differences not exceeding 15 days were selected. Additionally, all selected lambs showed similar body condition and were kept in a group that received similar food and sanitary handling. During the trial, all the lambs grazed on the same paddocks of Star grass pasture (*Cynodon nlemfuensis*) and were naturally infected with GINs for 6 months from May to October.

The lambs were protected in galleys. They were supplemented with 200 g of food (14% crude protein) and received water *ad libitum*. The procedures were performed in accordance with the Mexican Official Standard guideline 051-ZOO-1995 and the Mexican Official Standard of technical specifications for production, care and use of experimental animals.

Parasitological and immunological methods

The group of female lambs remained in-house from birth to 5 months old, at which time the natural infection began during grazing. Blood and faecal samples were collected every 14 days over the 6 months from April to October. The faecal samples were collected directly from the rectum and the FEC was determined according to the McMaster method (Cringoli *et al* 2004) with a sensitivity of 50 EPG. In addition, faecal cultures were processed to collect infective larvae (L3) at the beginning, middle and end of the study period and morphological identification was made using the practical laboratory guide of van Wyk and Mayhew (2013). Blood samples were obtained from the jugular vein into EDTA tubes and other samples were collected in tubes with a coagulation accelerator (Vacutainer, Becton Dickinson, New York, USA). PCV was determined by the microhaematocrit technique, and peripheral eosinophils (EOS) were counted in a Neubauer chamber after staining the cells with Carpentier solution (Dawkins *et al* 1989). TPP was quantified in a refractometer (Atago, Japan). Serum samples were centrifuged at 2000g, then stored at -20 °C until use. An indirect ELISA was used to determine the IgA level (% OD with respect to positive control), using *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* crude extract antigen, according to the technique of González-Garduño *et al* (2017).

Criteria for the selection of resistant and susceptible infected hosts

The arithmetic mean FEC of the whole trial, which consisted of 11 biweekly samples, was used to classify the host response against GIN as resistant (RES), susceptible (SUS) or intermediate (INT), using two methods. In the first, the lambs were classified using the mean \pm 3 standard errors (M3SE) as follows: RES female lambs were chosen as those with FECs less than the mean $-$ 3SE; SUS lambs were those with FECs greater than the mean $+$ 3SE; and the INT group was defined by FECs between the two ranges (Morteo-Gómez *et al* 2004).

In the second method, the quartile method (QUM), as previously described by Palomo-Couoh *et al* (2016), was used. Briefly, the lambs were divided as follows: the first quartile (Q1) of infected lambs with low FEC were identified as RES hosts (25%); the lambs in the highest FEC and third quartile (Q3) were identified as SUS (25%); and a third group, considered INT, had a FEC between Q1 and Q3 and represented 50% of the total population.

Statistical analysis

To compare the two methods, the Kappa index (Landis and Koch 1977) was calculated with the formula $P_o - P_e / (1 - P_e)$. Where P_o = total proportion of concordance observed and P_e = expected random proportion. In addition, the concordance value (Youden's J), sensitivity, specificity, predicted positive and negative values, the proportion of false positives and false negatives, and the accuracy were calculated according to Palomo-Couoh *et al.* (2016) relative to an assumed reference method (M3SE). To perform the validity test, the data were grouped in 2×2 contingency tables, considering as reference the method of M3SE, because the mean values together with the standard deviation are part of the theory of the selection of animals used to calculate the genetic progress of phenotypic characteristics (Morris *et al* 2000; McRae *et al* 2014).

To compare the response of each segregated group (RES, INT and SUS) a multivariate linear mixed-effect regression model was used under a design of repeated measures over time, by which different covariance structures were tested for each study variable. The autoregressive structure (AR1) was selected and adjusted to each model by presenting lower AIC and BIC values. The analysis was performed with the MIXED procedure of SAS software (SAS, 2004). Two segregation methods were considered (M3SE and QUM) and one statistical analysis was performed

per variable in each method (10 runs in total). Untransformed FEC data and other response variables (PCV, TPP, EOS and IgA) were analysed (Peña-Espinoza *et al* 2016) following the statistical model:

$$Y_{ijkl} = \mu + \rho_i + \tau_j + \rho * \tau_{ij} + \zeta(\rho)_{ik} + \varepsilon_{ijkl}$$

where Y_{ijkl} = response variable (FEC, PCV, TPP, EOS, IgA); μ = general mean; ρ_i = fixed effect of the treatment (i = RES, INT, SUS); τ_j = fixed effect of time (j = 1, 2, 3...11 samplings); $\rho * \tau_{ij}$ = joint effect of treatment and time; $\zeta(\rho)_{ik}$ = random effect of the animal nested in each treatment; and ε_{ijkl} = experimental error. Comparisons of RES, INT and SUS and differences in time of sampling were observed with Tukey's tests (SAS 2004). Pearson correlations were calculated to determine the relationship between the response variables (FEC, PCV, TPP, IgA) in each of segregated groups (RES and SUS) per method. For age and countable variables, Spearman correlations was made. For the interaction between time and treatment (dynamics), the study focused only on the divergent performance of RES and SUS groups.

1.4. RESULTS

Classification of lambs according to nematode infection

Table 1 shows the parameters FEC, TPP, TCV and EOS according to the classification of the female Pelibuey lambs. In the first parasitic classification method (M3SE), 22 infected lambs were identified as RES (55%), 8 as INT (20%) and 10 as SUS (25%). Using the second method (QUM), 10 infected lambs (25%) were identified as RES, 20 (50%) as INT and 10 as SUS (25%). The SUS lambs corresponded to the same animals under the two methods, so the study variables were similar. The arithmetic mean of FEC during the study period for the SUS group was higher (672 EPG) than that of the RES (171 EPG and 288 EPG) and INT groups (39 EPG and 67 EPG) from QUM and M3SE methods, respectively ($P < 0.05$). The mean FEC in the RES group was similar in the two methods. For TPP and PCV analysis, there was an increased response in the resistant group, and the lowest TPP and PCV values were obtained for the susceptible group ($P < 0.05$) in both methods.

The Kappa index between the two methods was moderate (0.43). When comparing the QUM with the M3SE as a standard method, it was observed that QUM showed low sensitivity and a low percentage of negative predictive values, where only 10 of the 22 resistant lambs were detected, so the accuracy was 70% and the Youden index 0.5 (Table 2).

Dynamics of faecal egg count

The same lambs were categorised as SUS lambs by both QUM and M3SE methods, so the performance was similar. However, for RES lambs, there were a greater number of animals categorised by M3SE ($n = 22$), while only 10 lambs were selected by QUM. An increase in FEC was shown from August to October, especially in SUS female lambs (Figure 2), which was attributable to the increase in rainfall during the months of August to October (Figure 1). The nematode species recovered from the faecal cultures at the beginning of the experiment were *Haemonchus* spp. (77%), *Trichostrongylus* spp. (16%) and *Oesophagostomum* spp. (7%). These species remained in similar proportions until the end of the study (65.64%, 25.04% and 9.32%, respectively).

Dynamics of packed cell volume and total plasma protein

The PCV percentage in RES lambs showed significant differences ($P < 0.01$) with respect to SUS lambs (Table 1). From April to June, the PCV value remained normal. However, after the rainy season at the end of July, the FEC increased and the PCV percentage decreased (Figure 3) due to the presence of blood-feeding nematodes such as *H. contortus*. In August, the PCV increased when the FEC decreased slightly, as suggested by the correlation coefficient (CORR; $r = -0.23$). The lowest PCV value (26%) was observed between days 83 and 97 in SUS lambs.

For the TPP analysis, there was a significant reduction ($P < 0.01$) between days 28 and 42 and a tendency towards a reduction in the last three samplings for RES lambs. The SUS lambs had values below 6 g/dL, the physiological threshold, in 54% of the samples (Figure 4). In addition, TPP values decreased when the FEC increased, which was shown by the CORR (Table 3).

Peripheral eosinophil dynamics

In this analysis, there were no differences in EOS counts between the RES and SUS lambs segregated according to either method. In addition, there was a progressively increased number of

eosinophils as female lambs grew older. Figure 5 shows the change in EOS count with time. The CORR between age and the number of eosinophils was high ($\rho = 0.43$), and remained similar in both RES and SUS animals regardless of the segregation method.

Dynamics of immunoglobulin A

The female lambs showed low levels of serum IgA (2% with respect to the control) from initial sampling (day 0), increasing gradually with age ($P < 0.05$). Lambs showed increased levels of IgA after 7 months of age (50% with respect to the positive control); these results show that IgA tended to increase with animal age, in association with FEC (Figure 6); this was also seen in the CORR values, which were high ($\rho = 0.44$ to 0.47). The IgA response in RES lambs was similar to that in SUS lambs. In addition, the immune response with IgA was similar between the two species of nematodes used (*H. contortus* and *T. colubriformis*).

Correlation coefficients

The FEC, PCV, number of eosinophils and IgA levels increased with age ($P < 0.05$). TPP had a negative coefficient; therefore, as age increased, the TPP values decreased ($\rho = -0.14$, $P < 0.01$). In the RES lambs, the FEC had no significant correlation ($P > 0.05$) with PCV or TPP, whereas in the SUS lambs there was no relationship of PCV with TPP, eosinophils or IgA levels (Table 3). Other important correlations occurred between FEC and TPP, with negative values ($r = -0.23$) in SUS lambs. The correlation coefficients between the crude worm antigen of *H. contortus* and *T. colubriformis* were very high ($r = 0.90$).

1.5. DISCUSSION

Faecal egg count

In the lambs in grazing the ingestion of infective larvae will tend to homogenize over longer periods of time (Stear *et al* 2007). Under this scenario, the RES, SUS and INT lambs would have the same chance of becoming infected and the difference between the methods would be the choice of resistant animals. The use of the QUM and M3SE allowed for the classification of the same SUS lambs. However, in RES lambs, M3SE allowed for the selection of 22 individuals, whereas with QUM only 10 were categorised as RES. In our study, in 70% of samplings (7 of 11 samplings),

more than 25% of lambs showed 0 EPG, and the complication of QUM was to detect RES lambs when more than 25% showed resistance, as occurred in the flock. The objective of any segregation method is to select lambs for phenotypical resistance or tolerance to GIN infection that will result in a reduced reliance on anthelmintics to control parasitic nematodes, with the associated economic advantages (Cloete *et al* 2007). This is especially important when there are many animals that exhibit resistance in at least at some of their physiological stages, as is the case during female lamb growth. This situation requires either many samples to detect differences between the RES animals, or the inclusion of another variable to select lambs with GIN resistance. For this reason, M3SE was considered the method of reference. Because with the M3SE method it was possible to select at least all lambs with 0 EPG, the lambs not selected by the QUM method were considered as false negatives. For this reason, QUM showed low sensitivity.

When selecting for resistance to GINs, it is important to consider that FEC has a very small heritability (0.16 to 0.22; Morris *et al* 2005). In addition to this reason, environmental conditions (feeding, facilities, pasture management), together with animal variables (such as age, development of immunity and physiological stage; González-Garduño *et al* 2014) and parasite variables (species of nematode, length of survival of parasite in the host, arrested development of infections, etc), lead to differences in the faecal egg output per month, as indicated in other studies (Amarante *et al* 2009). The classified groups showed significant differences ($P < 0.05$) between RES and SUS lambs in both the FEC and PCV. The RES lambs showed lower FEC and higher PCV than SUS lambs, as indicated in another study with Pelibuey ewes during lactation (Palomo-Couoh *et al* 2016).

Packed cell volume and total plasma protein

PCV and TPP are used to evaluate the degree of resistance or resilience to GIN infections, mainly when *H. contortus* is the most prevalent GIN. In this study, the values of both parameters remained within the physiological threshold for sheep (PCV from 27 to 45% and TPP from 6 to 7.5 g/dL; Byers and Kramer, 2010). The PCV values were lower than the physiological threshold during the rainy months (July and August), in response to an increase in the FEC associated with the high prevalence of *H. contortus*. This situation has been widely reported, and several studies indicate a very high negative correlation coefficient between FEC and PCV ($r = -0.7$) when this

nematode is present (Amarante *et al* 2009, Emery *et al* 2016). However, the correlation coefficient found in our study was only -0.23 . TPP also had a similar magnitude of correlation with FEC ($r = -0.20$), so both variables can be used as indicators of resistance to GIN, since the values were higher in resistant lambs. As indicated in another study, TPP can be effective in selecting animals with greater resistance to GIN (Zaros *et al* 2014). The slightly diminished TPP values in susceptible lambs could be an important indication of the reduction in ghrelin gene expression associated with the suppression of intake and malnutrition in animals infected with GINs and a decreased inflammatory response in susceptible lambs (Alba-Hurtado and Muñoz 2012).

Peripheral eosinophils

Eosinophils are an important element in the inflammatory response against GINs. The association of eosinophils with helminths shows significant correlations between the susceptibility or resistance to infection and the magnitude of the EOS response, which suggests that eosinophils have a role in resistance to helminth infection (Balic *et al* 2000, Yacob *et al* 2009). However, in this study, there were no differences between RES and SUS lambs regardless of the method of segregation, which suggests that the immune system is immature at this age; therefore, this parameter cannot be used for the selection of resistance to GINs in young animals (Preston *et al* 2014). There was also no relationship between FEC and EOS, probably due to the age of the animals. Similar to other studies (Amarante *et al* 2009), in this study, there was a high Spearman correlation between the age of the lambs and EOS. In both RES and SUS lambs, the correlation was between 0.44 and 0.47 ($P < 0.01$). This indicates the maturation of the animals' immune system over the first 10 months of life, unlike another study that indicate that EOS increased from birth to 5 months of age, associated with a subsequent ability to reduce parasite fecundity (Greer and Hamie 2016).

Immunoglobulin A

Secretory IgA is the main immunoglobulin secreted actively through the epithelium of the mucosa of the abomasum (Macpherson *et al* 2008). IgA response is associated with protective immunity to nematode infections in sheep. However, in our study the low association between the IgA level and the FEC at the beginning was due to the IgA level being dependent on age: after 6 months the FEC fluctuations were related to environmental conditions. For this reason, from July

to October (characterised by high humidity), there was an increased FEC, but the IgA levels were relatively low in growing lambs.

The low immunological response to GINs in the young sheep in this study has also been reported in other studies and has been attributed to the low proportion of CD4+ and CD8+ lymphocytes in young sheep compared to adults. Salivary IgA levels in grazing lambs, determined with a larval antigen (CarLA), indicated that the development of immunity occurs in most animals after 6 months of age (Shaw *et al* 2013). In addition, Smith *et al* (1985) reported that 4-month-old lambs had a lower response in terms of IgA levels than their 10-month-old counterparts after a challenge with GINs. The negative correlation between IgA levels and infection parameters such as FEC and the number of adult nematodes (Beraldi *et al* 2008) suggests that it can be used as a marker for resistance selection (Shaw *et al* 2013). However, in the present study IgA showed no differences between RES and SUS in all samples. The differences occurred only as a result of age.

Female Pelibuey lambs show high variability in their FEC. The two evaluated methods of segregation allow for the identification of susceptible lambs to a similar extent, but a large number of lambs showed a high degree of infection resistance, as was detected by the M3SE method of segregation, while the method of segregation by QUM selected only 25% of resistant ewe lambs; for this reason the QUM resulted in low sensitivity and low accuracy. The high PCV and high TPP in resistant Pelibuey lambs can be considered in the phenotypic selection of individuals resistant to GIN, particularly to infections with the hematophagous *H. contortus*.

1.6. CONCLUSION

It can also be concluded that the eosinophil count reveals the immaturity of the immune system of 6-month-old in primo-infected lambs and is not an important element in the selection of resistant animals of this age.

1.7. ACKNOWLEDGEMENTS

The study was funded by the programme to support the strengthening of academic bodies PRODEP-DSA/103.5/15/14473. Alvar Cruz Tamayo is student of Productivity Genetic Resources

of Postgraduate College (RGP-COLPOS) and was supported by a doctoral fellowship from the PRODEP-DSA/103.5/16/5957 UNACAM-118.

1.8. REFERENCES

- Alba-Hurtado F, Muñoz-Guzmán MA. 2012. Immune responses associated with resistance to haemonchosis in sheep. *BioMed Res Intern* 2013, article ID 162158.
- Amarante AFTD, Susin I, Rocha RA, Silva MB, Mendes CQ, et al. 2009. Resistance of Santa Ines and crossbred ewes to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. *Vet Parasitol* 165(3-4), 273-280.
- Balic A, Bowles VM, Meeusen EN. 2000. The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Adv Parasitol* 45, 181–241.
- Beraldi D, Craig BH, Bishop SC, Hopkins J, Pemberton JM. 2008. Phenotypic analysis of host–parasite interactions in lambs infected with *Teladorsagia circumcincta*. *Int J Parasitol* 38(13), 1567-1577.
- Bishop S. 2012. A consideration of resistance and tolerance for ruminant nematode infections. *Frontiers in Genetics* 3, 168.
- Bentounsi B, Meradi S, Cabaret J. 2012. Towards finding effective indicators (diarrhoea and anaemia scores and weight gains) for the implementation of targeted selective treatment against the gastro-intestinal nematodes in lambs in a steppic environment. *Vet Parasitol* 187(1-2), 275-279.
- Byers SR, Kramer JW. 2010. Normal Hematology of Sheep and Goats. *Schalm's Veterinary Hematology*. Sixth ed. Ames, IA, USA: Blackwell.
- Cloete SWP, Olivier JJ, Du Toit E, Dreyer FH. 2007. Genetic analysis of faecal worm egg count in South African Merinos under natural challenge. *South African J Animal Sci* 37(4), 237-247.
- Cringoli G, Rinaldi L, Veneziano V, Capelli G, Scala A. 2004. The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of the McMaster technique in estimating the faecal egg count of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dentriticum* in sheep. *Vet Parasitol* 123, 121–131.
- Dawkins HJS, Windon RG, Eagleson GK. 1989. Eosinophil responses in sheep selected for high and low responsiveness to *Trichostrongylus colubriformis*. *Intern J Parasitol* 19(2), 199-205.
- Emery DL, Hunt PW, Le Jambre LF. 2016. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? *Intern J Parasitol* 46(12), 755-769.

- Fakae BB, Musongong GA, Chiejina SN, Behnke JM, Ngongeh LA, et al. 2004. Variability in the resistance of the Nigerian West African Dwarf goat to abbreviated escalating trickle and challenge infections with *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 122(1), 51-65.
- Gauly M, Erhardt G. 2001. Genetic resistance to gastrointestinal nematode parasites in Rhön sheep following natural infection. *Vet Parasitol* 102(3), 253-9.
- González-Garduño R, Torres-Acosta JFJ, Chay-Canul AJ. 2014. Susceptibility of hair sheep ewes to nematode parasitism during pregnancy and lactation in a selective anthelmintic treatment scheme under tropical conditions. *Res Vet Sci* 96(3), 487-492.
- González-Garduño R, López-Arellano ME, Conde-Felipe MM, Mendoza-de Gives P, Aguilar-Marcelino L, et al. 2017. Immune and haematological parameters of Blackbelly ewes infected with gastrointestinal nematodes. *Rev Colomb Cienc Pecu* 30(3), 219-230.
- Greer AW, Hamie JC. 2016. Relative maturity and the development of immunity to gastrointestinal nematodes in sheep: an overlooked paradigm? *Parasite Immunol* 38(5), 263-272.
- Landis JR, Koch GG. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33(1),159-174.
- Macpherson AJ, McCoy KD, Johansen FE, Brandtzaeg P. 2008. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol* 1(1), 11.
- Mavrot F, Hertzberg H, Torgerson P. 2015. Effect of gastro-intestinal nematode infection on sheep performance: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors* 8(1), 557-568.
- McMahon C, McCoy M, Ellison SE, Barley JP, Edgar HWJ, et al. 2013. Anthelmintic resistance in Northern Ireland (III): Uptake of ‘SCOPS’ (Sustainable Control of Parasites in Sheep) recommendations by sheep farmers. *Vet Parasitol* 193(1-3), 179-184.
- McRae KM, McEwan JC, Dodds KG, Gemmell NJ. 2014. Signatures of selection in sheep bred for resistance or susceptibility to gastrointestinal nematodes. *BMC genomics* 15(1), 637.
- McRae KM, Stear MJ, Good B, Keane OM. 2015. The host immune response to gastrointestinal nematode infection in sheep. *Parasite Immunol* 37(12), 605-613.
- Morris CA, Vlassoff A, Bisset SA, Baker RL, Watson TG, et al. 2000. Continued selection of Romney sheep for resistance or susceptibility to nematode infection: estimates of direct and correlated responses. *Animal Sci* 70(1), 17-27.
- Morris CA, Wheeler M, Watson TG, Hosking BC, Leathwick DM. 2005. Direct and correlated responses to selection for high or low faecal nematode egg count in Perendale sheep. *New Zealand J Agricul Res* 48(1), 1-10.
- Morteo-Gómez R, González-Garduño R, Torres-Hernández G, Nuncio-Ochoa G, Becerril-Pérez C, et al. 2004. Efecto de la variación fenotípica en la resistencia de corderos Pelibuey a la infestación con nematodos gastrointestinales. *Agrociencia* 38, 395-404.

- Palomo-Couoh JG, Aguilar-Caballero AJ, Torres-Acosta JF, Magaña-Monforte JG. 2016. Evaluation of different models to segregate Pelibuey and Katahdin ewes into resistant or susceptible to gastrointestinal nematodes. *Trop Animal Health Prod* 48(8), 1517-1524.
- Peña-Espinoza M, Thamsborg SM, Desrues O, Hansen TV, Enemark HL. 2016. Anthelmintic effects of forage chicory (*Cichorium intybus*) against gastrointestinal nematode parasites in experimentally infected cattle. *Parasitology* 143(10), 1279-1293.
- Preston SJM, Sandeman M, González J, Piedrafita D. 2014. Current status for gastrointestinal nematode diagnosis in small ruminants: where are we and where are we going? *J Immunol Res* 1-12.
- Rose H, Rinaldi L, Bosco A, Mavrot F, De Waal T, et al. 2015. Widespread anthelmintic resistance in European farmed ruminants: a systematic review. *Vet Record* 176(21), 546-546.
- SAS, Statistical Analysis System. 2004. SAS Version 9.2. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Shaw RJ, Morris CA, Wheeler M. 2013. Genetic and phenotypic relationships between carbohydrate larval antigen (CarLA) IgA, parasite resistance and productivity in serial samples taken from lambs after weaning. *Intern J Parasitol* 43(8), 661–667.
- Smith WD, Jackson F, Jackson E, Williams J. 1985. Age immunity to *Ostertagia circumcincta*: comparison of the local immune responses of 4½ and 10-month-old lambs. *J Comparative Pathol* 95(2), 235–245.
- SMN. 2019. Servicio Meteorológico Nacional. Normales Climatológicas del estado de Tabasco. In line in: <https://smn.cna.gob.mx/es/informacion-climatologica-por-estado?estado=tab>. Consulted 11/03/2019.
- Stear MJ, Fitton L, Innocent GT, Murphy L, Rennie K, Matthews L. 2007. The dynamic influence of genetic variation on the susceptibility of sheep to gastrointestinal nematode infection. *J of the Royal Society Interface* 4(16), 767-776.
- Sweeney T, Hanrahan JP, Ryan MT, Good B. 2016. Immunogenomics of gastrointestinal nematode infection in ruminants-breeding for resistance to produce food sustainably and safely. *Parasite Immunol* 38(9), 569-586.
- van Wyk JA, Mayhew E. 2013. Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: a practical lab guide. *The Onderstepoort J Vet Res* 80, 539
- Yacob HT, Mistre C, Adem AH, Basu AK. 2009. Parasitological and clinical responses of lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus* (L3) with and without ivermectin treatment. *Vet Parasitol* 166(1), 119-123.
- Zaragoza-Vera CV, Aguilar-Caballero AJ, González-Garduño R, Arjona-Jiménez G, Zaragoza-Vera M, et al. 2019. Variation in phenotypic resistance to gastrointestinal nematodes in hair sheep in the humid tropics of Mexico. *Parasitol Res* 118(2), 567-573.

Zaros LG, Neves MRM, Benvenuti CL, Navarro AMC, Sider LH, et al. 2014. Response of resistant and susceptible Brazilian Somalis crossbreed sheep naturally infected by *Haemonchus contortus*. Parasitol Res 113(3), 1155-1161.

Table 1. Arithmetic mean of faecal egg count, packed cell volume and total plasma protein throughout study period in female Pelibuey lambs classified as resistant, intermediate and susceptible according to segregation method.

Variable and method	Female lamb phenotype classification								
	Resistant			Intermediate			Susceptible		
	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD
Faecal egg count (EPG)									
Method 1. M3SE	22	67 ± 123 ^a		8	288 ± 532 ^b		10	672 ± 1068 ^c	
Method 2. QUM	10	39 ± 65 ^a		20	171 ± 372 ^b		10	672 ± 1068 ^c	
Packed cell volume (%)									
Method 1. M3SE	22	31.5 ± 3.9 ^a		8	32.3 ± 3.7 ^a		10	28.1 ± 4.7 ^b	
Method 2. QUM	10	31.5 ± 3.4 ^a		20	31.9 ± 4.0 ^a		10	28.1 ± 4.7 ^b	
Total plasma protein (g/dL)									
Method 1. M3SE	22	6.24 ± 0.49 ^a		8	6.02 ± 0.44 ^b		10	5.94 ± 0.50 ^b	
Method 2. QUM	10	6.16 ± 0.50 ^a		20	6.19 ± 0.48 ^a		10	5.94 ± 0.50 ^b	
Peripheral eosinophils (cells/μL)									
Method 1. M3SE	22	460 ± 633 ^a		8	407 ± 463 ^a		10	363 ± 380 ^a	
Method 2. QUM	10	377 ± 376 ^a		20	481 ± 673 ^a		10	363 ± 380 ^a	

EPG: Eggs per gram of faeces. QUM: Quartile method. M3SE: Means-3 standard error method. Different lowercase letters in the same row indicate significant differences ($P < 0.05$). SD: Standard deviation. SE: Standard error.

Table 2. Evaluation of the concordance between two segregation methods to detect resistant Pelibuey female lambs against gastrointestinal nematodes.

Item	Segregation method			
	Mean-3 Standard Error		Quartile	
	Value	CI 95%	Value	CI 95%
Sensitivity (%)	100.0	85.1-100.0	45.5	26.9-65.3
Specificity (%)	100.0	82.4-100.0	100.0	82.4-100.0
Positive predictive value (%)	100.0	85.1-100	100.0	72.2-100.0
Negative predictive value (%)	100.0	82.4-100	60.0	42.3-75.4
False positives proportion (%)	0.0	0.0-17.6	0.0	0.0-17.6
False negative proportion (%)	0.0	0.0-14.9	54.5	34.7-73.1
Accuracy (%)	100.0	91.2-100	70.0	54.6-81.9
Youden J index (%)	1.0		0.5	

Table 3. Correlation coefficients between the studied variables in Pelibuey female lambs classified as resistant and susceptible according segregation methods.

Variable	Resistant		Susceptible
	Method -3 SE	Quartile	Two methods
Age (days)			
Faecal egg counts (EPG)	0.01 ^{ns}	0.06 ^{ns}	0.29 ^{**}
Packed cell volume (%)	0.17 ^{**}	0.21 [*]	-0.09 ^{ns}
Total plasma protein (g/dL)	-0.12 ^{ns}	-0.15 ^{ns}	-0.27 ^{**}
Peripheral eosinophils (cells/ μ L)	0.47 ^{**}	0.45 ^{**}	0.44 ^{**}
IgA*- <i>H. contortus</i> antigen	0.47 ^{**}	0.47 ^{**}	0.50 ^{**}
IgA*- <i>T.colubriformis</i> antigen	0.44 ^{**}	0.34 ^{**}	0.42 ^{**}
PCV (%)			
Total plasma protein (g/dL)	0.147 [*]	-0.15 ^{ns}	0.12 ^{ns}
Peripheral eosinophils (cells/ μ L)	0.30 ^{**}	0.45 ^{**}	0.13 ^{ns}
IgA*- <i>H. contortus</i> antigen	0.35 ^{**}	0.47 ^{**}	0.26 [*]
IgA*- <i>T.colubriformis</i> antigen	0.32 ^{**}	0.34 ^{**}	0.24 ^{ns}
FEC			
Packed cell volume (%)	-0.04 ^{ns}	0.03 ^{ns}	-0.22 [*]
Total plasma protein (g/dL)	-0.02 ^{ns}	-0.02 ^{ns}	-0.26 ^{**}
TPP (g/dL)			
Peripheral eosinophils (cells/ μ L)	-0.06 ^{ns}	-0.10 ^{ns}	-0.23 [*]
IgA*- <i>T.colubriformis</i> antigen	0.19 [*]	0.22 ^{ns}	-0.04 ^{ns}
IgA*- <i>H. contortus</i> antigen			
IgA*- <i>T.colubriformis</i> antigen	0.88 ^{**}	0.91 ^{**}	0.95 ^{**}

IgA*: % OD respect to positive control. FEC: Faecal egg count. TPP: Total plasma protein. PCV: Packed cell volume.

** Highly significant differences (P<0.01). * Significant differences (P<0.05). ns= Not significant differences (P>0.05).

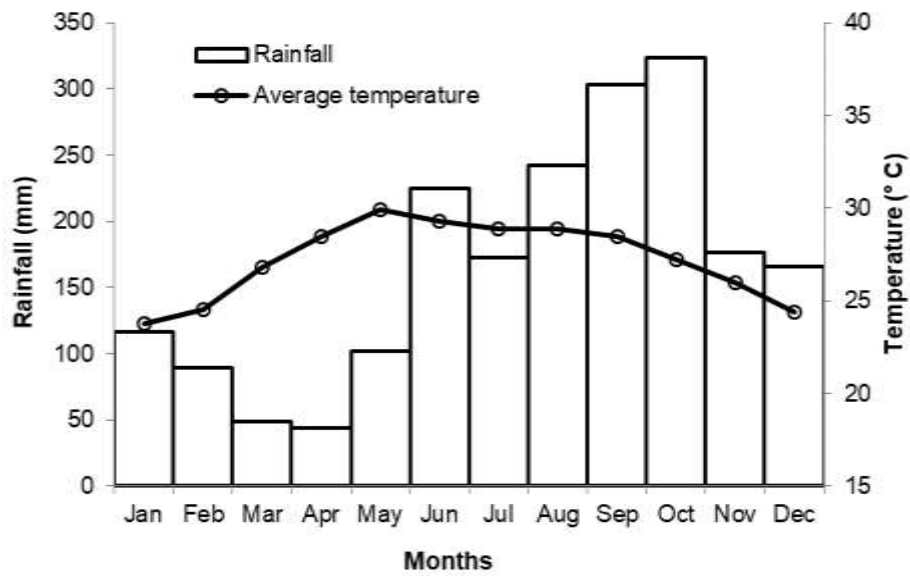


Figure 1. Mean monthly temperature (lines) and monthly distribution of rainfall (columns) throughout the year in Villahermosa, Tabasco, México. Obtained from the National Meteorological Service. Climatological norms of the Tabascos state. Online at <https://smn.cna.gob.mx/es/informacion-climatologica-por-estado?estado=tab>.

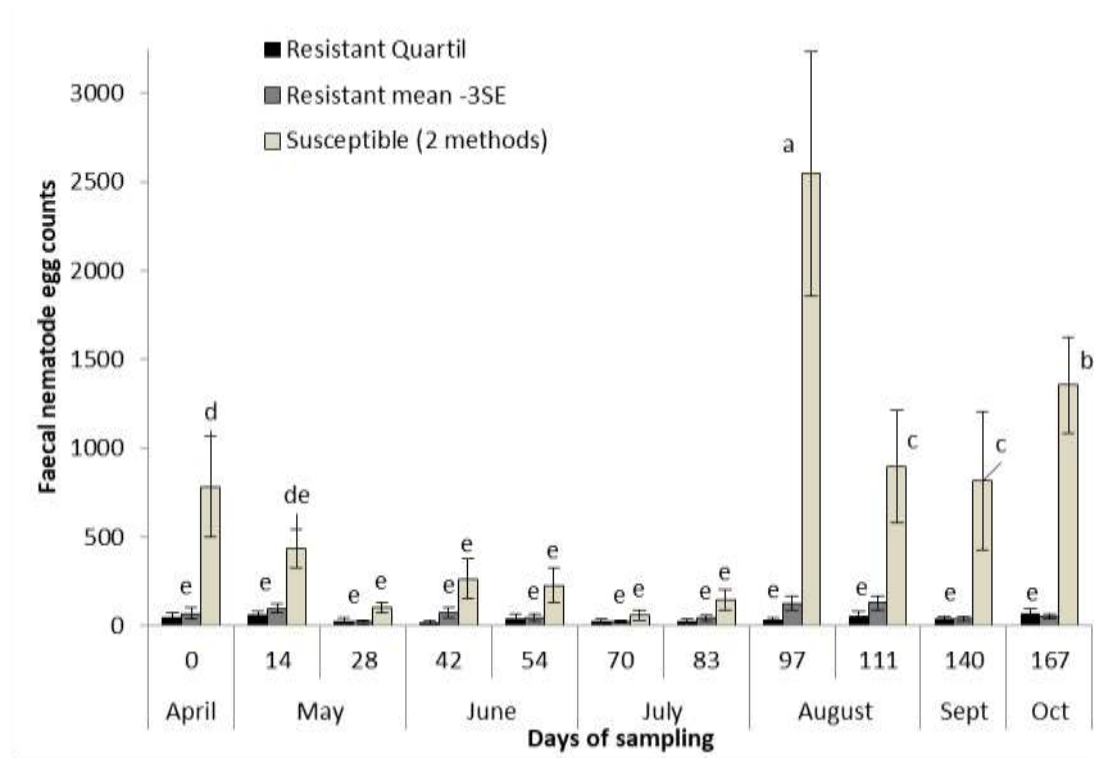


Figure 2. Divergent behaviour of nematode eggs per gram of faeces determined in resistant lambs (n = 10 in quartile method, n = 22 in mean – 3SE method) and susceptible lambs (n = 10; both methods were similar) in Pelibuey breed by month and sampling day. The bars represent the SE in each group. The different letters of each group represent statistical differences (P < 0.01).

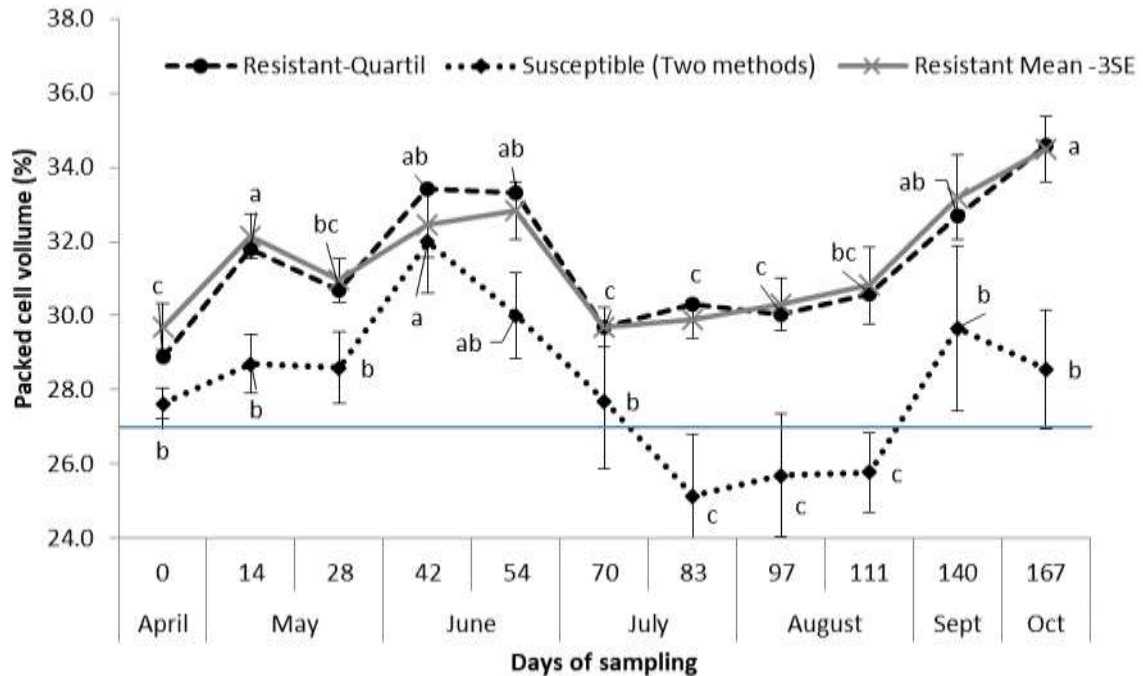


Figure 3. Divergent behaviour of PCV determined in resistant lambs (n = 10 in quartile method, n = 22 in mean – 3SE method) and susceptible lambs (n = 10; both methods were similar) in Pelibuey breed by month and sampling day. The bars represent the SE in each group. The different letters of each group represent statistical differences (P < 0.01). Solid line represents the threshold physiological level.

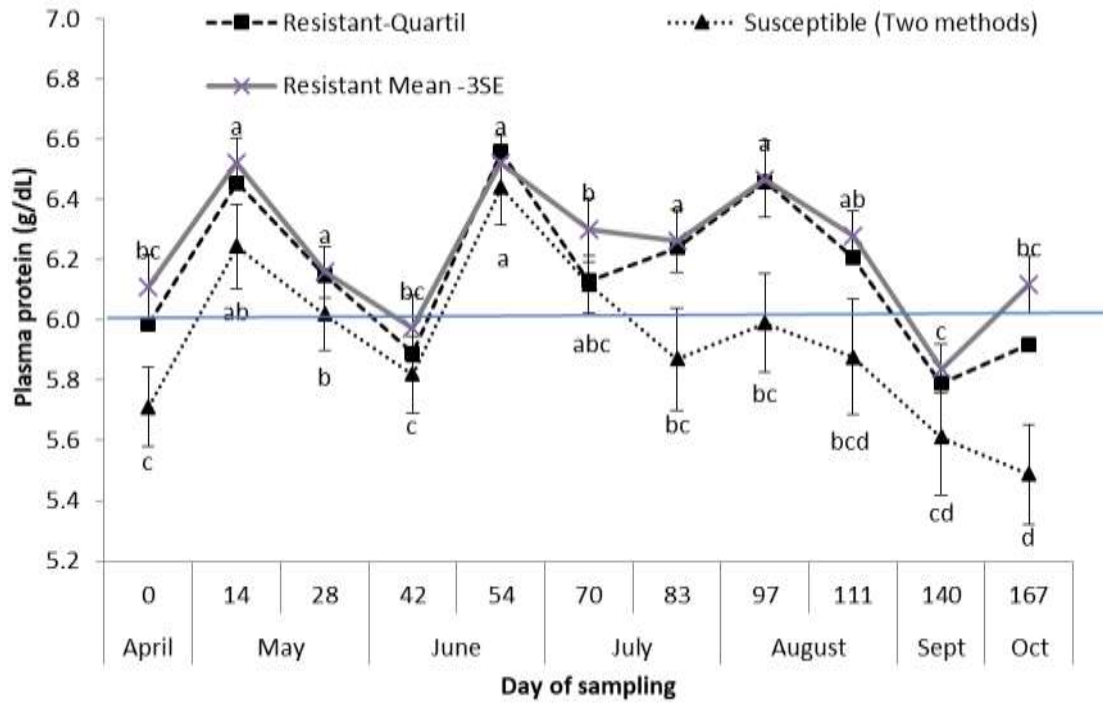


Figure 4. Divergent behaviour of TPP determined in resistant lambs (n = 10 in quartile method, n = 22 in mean – 3SE method) and susceptible lambs (n = 10; both methods were similar) in Pelibuey breed by month and sampling day. The bars represent the SE in each group. The different letters of each group represent statistical differences (P < 0.01). Solid line represents the threshold physiological level.

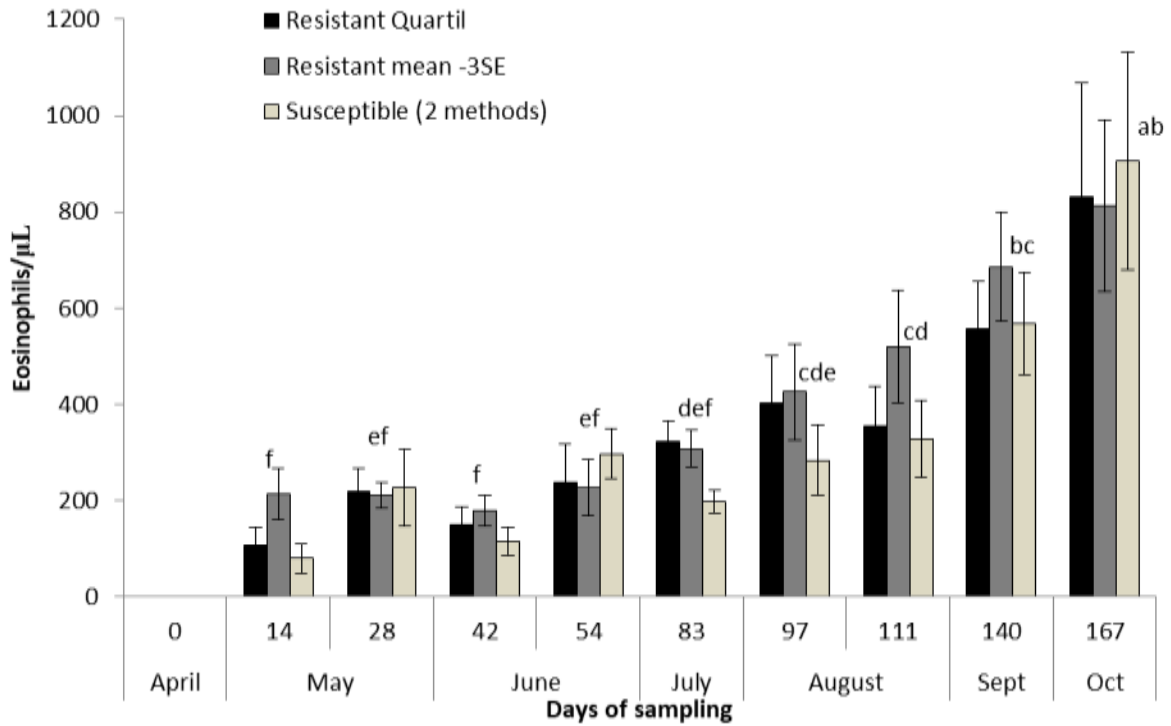


Figure 5. Simple effect of peripheral eosinophil counts in contemporary female Pelibuey lambs (n = 40) by sampled day and age. The bars represent the SE in each group and different letters represent significant statistical differences ($P < 0.01$). The different letters by the arithmetic mean for all groups represent statistical differences ($P < 0.01$).

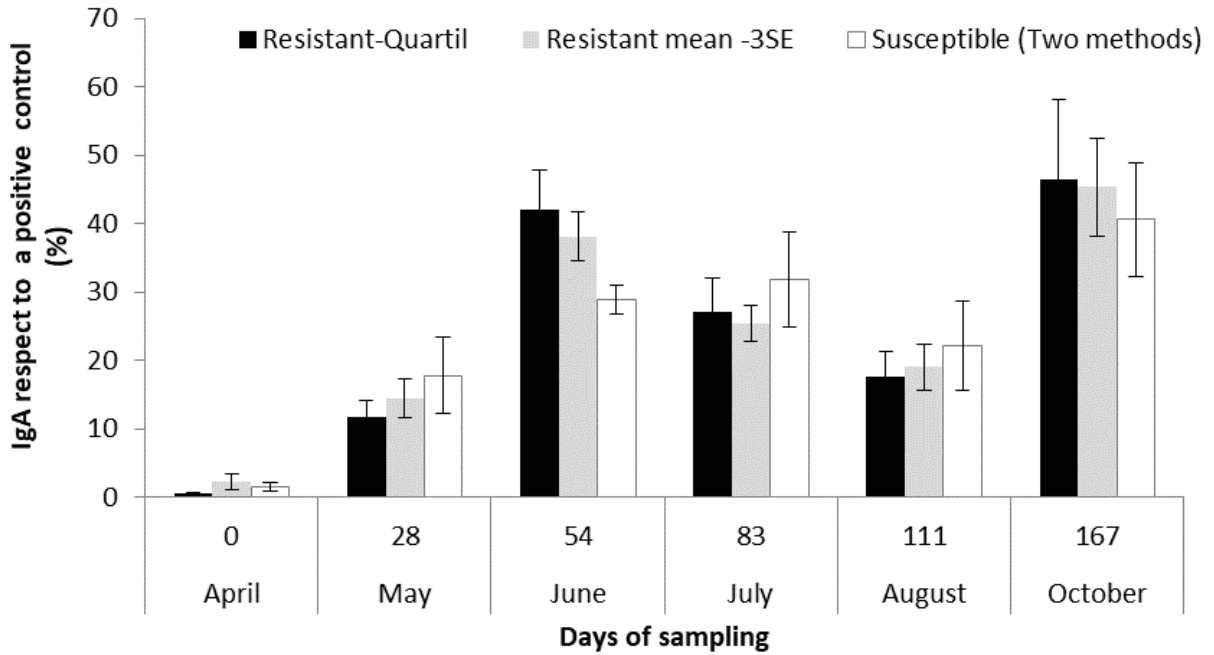


Figure 6. IgA levels respect to a positive standard control using *H. contortus* somatic antigen in resistant lambs (n = 10 in quartile method, n = 22 in mean – 3SE method) and susceptible lambs (n = 10; both methods were similar) in Pelibuey breed by month and sampling day. The bars represent the SE in each group. Similar response seen with *T. colubriformis*.

CAPITULO II. INDUCTION OF *Haemonchus contortus* INFECTIONS AS STRATEGY TO ACTIVATE THE IMMUNE RESPONSE IN LAMBS EXPOSED TO EXPERIMENTALLY AND GRAZING CONDITIONS ²

2.1. ABSTRACT

The objective was to evaluate the reduction in nematode faecal egg count (FEC) in Pelibuey lambs segregated as resistant (RES), susceptible (SUS) and intermediate (INT). Twenty-nine weaned Pelibuey lambs free of nematode infection were used. The study consisted of two phases: in Phase 1 the lambs were infected experimentally. In Phase 2, the lambs were naturally infected by grazing. Faecal and blood samples were taken every week. The packed cell volume (PCV) and total protein (TTP) were quantified. The maximum FEC value was recorded together with the reduction in FEC in the two phases. The data were analysed with a model of measures repeated over time. Nine lambs were RES, six were SUS and 14 were INT lambs. During Phase 1 the RES lambs showed the lowest values ($p < 0.05$) of the mean number of eggs per gram (EPG) of faeces (1061 ± 1053) compared to the other groups (INT: 2385 ± 1794 EPG and SUS: 3958 ± 3037 EPG). However, in Phase 2 no significant differences ($p > 0.05$) were observed between the groups of lambs (RES: 275 ± 498 EPG; SUS: 504 ± 1036 EPG; and INT: 603 ± 1061 EPG). At the end of the first phase the FEC of RES lambs was reduced by 75.5% ($p < 0.05$) and at the end of the second phase the reduction in FEC was 90% ($p > 0.05$). It is concluded that the first infection in the lambs induced a rapid immune response in resistant animals to the second infection.

Keywords: sheep, resistance, gastrointestinal nematodes, total plasma protein, eosinophils

² Manuscrito enviado a la revista Journal of Helminthology.

2.2. INTRODUCTION

The parasitism caused by *Haemonchus contortus* and other gastrointestinal nematodes (GINs) is responsible for significant economic losses in the production of sheep in grazing due to stunted growth, mortality and the expense of anthelmintic treatments for their control. However, the great genetic diversity of these parasites has allowed them to develop resistance to anthelmintics through mutations established in the population, causing the phenomenon of anthelmintic resistance (AR) (Hodgkinson *et al.*, 2019). Given this scenario, one alternative to avoid AR is the breeding of animals selected for their high resistance or low susceptibility to GINs. GINs resistance has a moderate heritability of between 0.2 and 0.4 (Sréter *et al.*, 1994) and is based on the capacity of the immune response to infections, which is very varied and produces in each generation a segregation of low-resistance or susceptible animals and others considered resistant by their ability to suppress the establishment and subsequent development of parasitic infection (Emery *et al.*, 2016).

This resistance to GINs is an individual characteristic that depends mainly on age and previous exposure to the parasite, which allows the animal to express innate immunity and develop acquired immunity that protects the host from infection (Greer and Hamie, 2016). The selection of individuals for their GIN resistance results in a reduction in the number of eggs in the environment, resulting in a decrease in the pasture, the source of parasitic infection (Sweeney *et al.*, 2016). The feasibility of selecting sheep resistant to GINs has been widely demonstrated in various breeds and environments (Moreno *et al.*, 2017; Woolaston *et al.*, 1990; Zvinorova *et al.*, 2016). In commercial flocks and experimental stations GIN-resistant individuals have been selected using phenotypic markers such as faecal egg count (FEC) to assess resistance status and packed cell volume (PCV) as a measure of natural infection impact. However, other phenotypic and molecular markers have been incorporated to categorize animals and to increase selection accuracy (Saddiqi *et al.*, 2012). Some breeds of hair sheep have been shown to have developed natural resistance to GIN infections, such as Blackbelly, St. Croix, Florida Native, Gulf Coast Native, Thin Tail, Garole and Red Masai (Miller and Horohov, 2006; Shakya *et al.*, 2009; Saddiqi *et al.*, 2010; Karrow *et al.*, 2014). In these breeds a genetic variation of resistance to *H. contortus* has also been confirmed; therefore, the selection of resistant individuals represents an option for the control of parasitic infections in

tropical and subtropical environments where high prevalence of AR is reported (Torres-Acosta *et al.*, 2012).

In Mexico, the Pelibuey breed has been reported to have resistance to GINs with significant variations within the breed (Morteo-Gómez *et al.*, 2004; Figueroa Castillo *et al.*, 2011; González-Garduño *et al.*, 2013; Zaragoza-Vera *et al.*, 2019), which makes it a candidate for selection to genetically improve this trait in this breed. In order to select resistant individuals, it is necessary to generate the infection and to monitor the development of the corresponding immunity. With many variants, oral immunisation of lambs with infective larvae (L₃) and their subsequent challenge with either artificial or natural infection is the most widely used protocol (Saccareau *et al.*, 2017), where the level of antigenic stimulus is an important event in the speed of acquisition of acquired immunity. In a previous study, it is reported that in Pelibuey lambs initially immunized orally with 7500 L₃ of *H. contortus* it was possible to successfully segregate resistant and susceptible individuals at the end of that infection according to their average FEC (Ojeda-Robertos *et al.*, 2017).

The objective of the present study was to determine the impact on the FEC due to the natural resistance presented by Pelibuey lambs segregated as resistant, susceptible and intermediate during two consecutive infections with GINs.

2.3. MATERIALS AND METHODS

Location of area of study

The study was conducted from February 4 to June 10, 2017 in the municipality of Salto de Agua, Chiapas, Mexico, with humid tropical climate (Kottek *et al.*, 2006); the average annual temperature is 26.6 °C and the precipitation is 3298 mm (CONAGUA, 2019).

Animal handling

From a group of 140 Pelibuey lambs born at the Center for Training and Reproduction of Minor Species (CECAREM) in Villahermosa, Tabasco, Mexico, 29 lambs were acquired after weaning. The age difference between them did not exceed 30 days. The lambs were identified with

a numbered collar and kept in elevated floor cages to keep them free of GIN infection. When they were approximately 5 months old (14 days before the start of the experiment) they were dewormed against GIN (levamisole 7.7 mg kg⁻¹ body weight, BW) and coccidian (toltrazuril 20 mg kg⁻¹ BW).

The study consisted of two phases: Phase 1 (day 0–day 70) and Phase 2 (day 84–day 154). In Phase 1 the lambs remained in the elevated-floor cages, where they received *ad libitum* an integral balanced food with 14% crude protein and water. At the end of Phase 1 (day 70) the lambs were dewormed against GIN (albendazol 10 mg kg⁻¹ BW) and kept in the cages until the beginning of Phase 2 (day 84) at which time they were introduced to grasslands of African star grass (*Cynodon plectostachyus*). They grazed approximately 10 hours per day and were housed in a galley in the afternoon where they received a dietary supplement with 14% crude protein at a rate of 300 g day⁻¹. The procedures were carried out in accordance with Official Mexican Standard 051-ZOO-1995 for humanitarian treatment in animal mobilisation and Official Mexican Standard 062-ZOO-1999 for technical specifications for the production, care and use of experimental animals.

Immunisation and natural infection

Infective larvae were obtained by coproculture (Corticelli and Lai, 1963) from two donor lambs previously infected with an oral dose of 300 L₃ from a local strain of *H. contortus*. The 29 lambs were immunised (Phase 1) by trickle infection on days 3, 5 and 7 orally with 100 L₃ of *H. contortus* per kg BW, receiving in total approximately 6000 L₃ per lamb. The natural infection (Phase 2) began on day 84 when the lambs were withdrawn from the cages and placed in grassland of *C. plectostachyus* that was being used by a herd of Blackbelly sheep infected with GINs kept in the meadows.

Measurements

Eleven measurements were made in each phase (Figure 1): each week, faecal samples were taken directly from the rectum of the lambs and blood from the jugular vein, using vacuum tubes containing EDTA as anticoagulant (Vacutainer, Becton Dickinson, USA). All samples were processed in the Animal Parasitology Laboratory of the South-East University Regional Unit (URUSSE) of the Chapingo Autonomous University (UACH) in Teapa, Tabasco, Mexico.

Parasitology

The FEC was determined in faeces by the McMaster method (Thienpont *et al.* 2003) with sensitivity of 50 eggs g⁻¹ (EPG) of faeces. The identification of GIN L₃ genera was performed according to available keys (van Wyk and Mayhew 2013) after coproculture of faecal samples on day 105.

Haematology

The PCV, total white blood cell count (WBC) and the differential count of three leukocyte fractions, consisting of lymphocytes (LYM), basophils, monocytes and eosinophils (MID) and neutrophils (GRAN), were determined by an automated haematological analyser based on electronic impedance (Medonic CA-620, Boule Medical AB, Sweden). Total plasma protein (TPP) was quantified by a manual refractometer (Atago, Japan.)

Lamb segregation model

At the end of the first phase, the lambs were segregated into three groups based on the FEC results: resistant (RES) lambs selected from mean EPG – three times the standard error (EE); susceptible (SUS) from mean EPG + three times the EE; and intermediate (INT), formed by the lambs not included in the other groups (Morteo-Gómez *et al.*, 2004).

Equation to calculate the FEC reduction

In the first phase in each group of lambs (RES, SUS and INT) the maximum value of FEC (FEC_{max}) was recorded together with the day this value occurred. With the FEC_{max} as a reference value, the reduction of the FEC was determined at the end of the first phase and at the end of the second phase. The following formula was used:

$$\text{Reduction in FEC (\%)} = 100 - (\text{FEC}_x / \text{FEC}_{\text{max}} \times 100)$$

where FEC_x is the faecal egg count at the end of Phase 1 (x = 1, day 70) and at the end of Phase 2 (x = 2, day 154).

Statistical analysis

Data were analysed between groups of segregated lambs such as RES, SUS and INT with a model of repeated measures over time using the MIXED procedure of the statistical package and the means were compared by the Tukey test (SAS, 2004). To eliminate asymmetry and to approximate the data to a normal distribution, the EPG values were transformed ($\log \text{EPG} + 1$). The following model was used:

$$Y_{ijkl} = \mu + \rho_i + \zeta_j + \gamma_{k(i)} + \delta(\zeta)_{jl} + \rho*\zeta_{ij} + \rho*\delta(\zeta)_{ijl} + \varepsilon_{ijkl}$$

where Y_{ijkl} = Variable response (EPG, PCV, WBC, LYM, MID, GRAN and TPP); μ = General mean; ρ_i = Fixed effect of the type of animal ($i = \text{RES, SUS, INT}$); ζ_j = Fixed effect of the phase ($j = \text{first, second}$); $\gamma_{k(i)}$ = Random effect of lambs nested in the type of lamb, $\delta(\zeta)_{jl}$ = Fixed effect of the sampling day nested in phase; $\rho*\zeta_{ij}$ = Interaction of type of animal with phase; $\rho*\delta(\zeta)_{ijl}$ = interaction of the type of animal with the sampling day nested in phase; and ε_{ijkl} = Random error associate to the l -th repeated measurement in the k -th lamb.

2.4. RESULTS

Parasitology

Faecal egg count

According to the segregation model, the RES group was composed of nine lambs, the SUS group of six and the INT group of 14. During Phase 1, the RES lambs presented the lowest values ($p < 0.05$) of average EPG (1061 ± 1053) with respect to the other groups (INT: 2385 ± 1794 and SUS: 3958 ± 3037). However, in Phase 2 no significant differences ($p > 0.05$) were observed between the groups of lambs (RES: 275 ± 498 , SUS: 504 ± 1036 and INT: 603 ± 1061). Fig. 2 shows the dynamics of the FEC in the two phases of infection. It is noteworthy that the FEC reduction started from day 28 in the RES group, two weeks before the SUS group (day 42) and three weeks before the INT group (day 49).

Faecal egg count reduction

Significant differences ($p < 0.05$) were observed in the FECmax between the segregated lambs in Phase 1, being 2883 EPG for the RES lambs on day 28, 8725 EPG for SUS lambs on day 42 and 5446 EPG for INT lambs on day 49. Table 1 shows the percentage reduction in FEC from

the FECmax at the end of Phase 1 (day 70) and Phase 2 (day 154). Significant differences were found in the reduction in FEC at the end of the first phase ($p < 0.05$), where the FEC of RES lambs was reduced by 75.5%, compared to 65.1% for SUS and 62.6% for INT lambs. No significant differences ($p > 0.05$) were found in the reduction in FEC at the end of the second phase, the highest value being that corresponding to INT lambs, of 94.4%.

Coprocultures

The GIN genera found in the coprocultures were *Haemonchus* (72.0%), *Trichostrongylus* (13.8%), *Cooperia* (12.3%) and *Oesophagostomum* (1.9%).

Haematology

Packed cell volume

The RES group presented the highest values ($p < 0.05$) of PCV with $26.2 \pm 4.0\%$ in Phase 1 compared to the other groups (SUS $25.1 \pm 4.8\%$ and INT $23.6 \pm 3.6\%$). In Phase 2, significant differences were observed ($p < 0.05$) where the RES ($27.0 \pm 3.0\%$) and SUS lambs ($26.7 \pm 3.2\%$) presented higher values than the INT group ($24.6 \pm 3.4\%$). Fig. 3 shows the changes in the PCV of segregated SUS, RES and INT lambs in the two phases of infection. In Phase 1, the decrease in PCV in all groups of lambs was evident from infection with the hematophagous parasite *H. contortus*. However, RES lambs showed their lowest PCV value on day 21 (two weeks post-infection) with 22.0%. The lowest PCV values for SUS and INT lambs were recorded on day 35 (4 weeks post-infection) with 20.0% and 21.3% respectively. Subsequently, the PCV values were increased in all groups until day 91. After the second infection, there was a slight gradual decrease until day 126 and again a recovery until the end of Phase 2.

WBC, LYM, MID, GRAN and TPP

In Phase 1, the RES lambs showed the highest values ($p < 0.05$) of the parameters WBC, LYM, MID, GRAN and TPP. In Phase 2, the highest values ($p < 0.05$) of the parameters WBC, LYM, MID and GRAN were for INT lambs, and RES and SUS lambs presented the higher TPP values ($p < 0.05$) than those of the INT group (Table 2).

2.5. DISCUSSION

First phase

In the first phase, immunisation with infectious larvae of *H. contortus* over 4 weeks allowed the RES lambs to demonstrate their ability to control the establishment of this parasite in the abomasum by mounting a rapid immune response, which was reflected in the smallest FEC values (Stear *et al.*, 1999), compared to the RES and SUS lambs. In addition, the FECmax in the RES group occurred two weeks before the other lambs (28 days post-infection).

Parasitological behaviour in lambs, measured through the FEC, during the first infection with GINs has long been observed in wool breeds (Stear *et al.*, 1995) and it has been indicated that after the prepatent period, without the expulsion of nematode eggs, a peak occurs in the FEC around 6–8 weeks post-infection. However, in hair breeds the FEC peak occurs around the fourth week post-infection, as observed in the present study and as reported in an artificial infection with 10,000 L₃ of *H. contortus* in Blackbelly (Notter *et al.*, 2003) and St. Croix lambs (Jacobs *et al.*, 2015). However, in this study a different response was observed, and only the RES lambs showed a peak at four weeks, while the SUS and INT lambs showed an FEC peak at the sixth week, reflecting a late response, similar to that observed in wool sheep. In a previous study with Pelibuey sheep, FEC peaks were also affected by the dose used in the experimental infection. The FEC peak was observed at 35 days when the animals had resistance against GINs, while other groups showed the FEC peak on days 42 and 56, which was observed in susceptible animals (González-Garduño *et al.*, 2019).

The percentage of FEC reduction in RES lambs at the end of the first infection was 75.5%, so 706 EPG were recorded at the end of the first phase. The other two groups (SUS and INT) reached the end of the first phase with EPGs more than three times that of the RES lambs. However, the percentage reductions in FEC measured as the difference from FECmax were similar (65.1% and 57.6%, respectively) and with not statistical differences between the three groups ($p > 0.05$). This indicates that all the lambs had the same capacity to mount an immune response. The differences observed were in the day on which the peak of infection was observed and in the value

of the FEC, which is directly related to the number of parasites implanted in the animal and the female egg-laying rate.

There is a report of St. Croix lambs being re-infected with 10,000 L₃ of *H. contortus* that indicates the development of an acquired immune response on day 7 post-infection by presenting high levels of lymphocytes, production of IgA, and the infiltration of immune cells into the mucosa of the abomasum. After an earlier infection, the immune parameters may limit the establishment of adult parasites and induce morphological changes that reduce their fertility and therefore shorten the duration and severity of the infection (Bowdridge *et al.*, 2015; McRae *et al.*, 2015).

During the first stage it was possible to distinguish higher cell counts of LYM, MID and GRAN in the RES lambs compared to the two remaining groups. This is related to what has been observed in the immune response of mammals to infection with helminths, which is characterised by an increase in cellular immune responses such as in eosinophils, basophils, cell mast cells and macrophages in response to tissue damage, these immune cells responding in turn with an increase in cytokine production (Karrow *et al.*, 2014). The rapid response of RES lambs was probably due to an early increase in circulating CD4⁺ T lymphocytes in response to the infiltration of *H. contortus* larvae into the abomasum. This release and excretion/secretion of products induces a combination of humoral immunity, eosinophilia and mast cell hyperplasia that leads to changes in the abomasum mucosa causing expulsion of L₃ and length reduction of L₄, which is related to the decrease in fertility in the adult stage (Karanu *et al.*, 1997; Bowdridge *et al.*, 2015).

This early response to primary infection is genetically controlled and has been reported for resistant sheep breeds in gene expression studies related to T lymphocyte proliferation (Terefe *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2015) with complementary activation. Both are the first events in the host's immune responses to infection (Lee *et al.*, 2011; Valilou *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2016). The same response occurs in the SUS and INT lambs, but in more days, which results in the establishment of a greater number of adult parasites and, of course, a high FEC.

The reduction in PCV associated with increasing FEC after immunisation with *H. contortus* is a reflection of infection with this parasite, whose hematophagous eating habits directly affect the

health of animals by reducing PCV; this negative relationship is reported in numerous studies (MacKinnon *et al.*, 2010; Figueroa Castillo *et al.*, 2011). RES lambs showed the highest PCV values during the first phase, which agrees with other studies, where higher levels of PCV have been found in resistant compared to susceptible sheep when infected with *H. contortus* (Mugambi *et al.*, 1997; Shakya *et al.*, 2009).

The TPP values of the SUS and INT lambs were significantly lower than those of the RES lambs. Decreased values of TPP in the SUS and INT lambs could be an important indicator because this reduction in TPP has been reported in sheep with clinical conditions such as hypoproteinaemia, diarrhoea, lack of appetite and malnutrition after infection with *H. contortus*, so this parameter can be effective in selecting animals with greater resistance to GINs (Zaros *et al.*, 2014).

Second phase

A study on the selection of animals with natural resistance showed that after a first experimental infection, a second peak was observed at 6–8 weeks of a second challenge, so it was suggested that two infections were sufficient to produce an effective immunity in the population (Stear *et al.*, 1995). However, the value of the FEC reduction had not been determined. This same behaviour was observed in the Pelibuey sheep flock under study. In response to the second infection, a consequent development of acquired immunity was seen: the three groups of lambs showed a significant reduction in FEC (RES = 91.2%, SUS = 94.4% and INT = 89.1%) with respect to the maximum value recorded in the first phase. This reduction was probably due to the phenomenon of ‘self-cure’, which is attributed to an immediate hypersensitivity mechanism triggered by a challenge after a period of little or no intake of infectious larvae and that causes the expulsion of adult nematodes (Balic *et al.*, 2002). The specific acquired immunity mechanism is characterised by an increase in T_H2 cytokines, the recruitment of eosinophils, mast cells and globular leukocytes, and an increase in the production of specific IgA (Balic *et al.*, 2002; Shakya *et al.*, 2009; Jacobs, 2013). This immune response intervenes in mechanisms to control the number of parasites either by reducing the establishment of larvae, inducing hypobiosis, stunting morphology or decreasing the fecundity of adult nematodes (Rowe *et al.*, 2008; Ortolani *et al.*, 2013).

To evaluate the degree of resistance to GINs, few studies have been carried out. In Australia, in 5-month-old Merino lambs selected for their resistance to GINs in natural infections, it was estimated that the degree of resistance evaluated by the reduction in FEC was 69% by acquired resistance (Eady *et al.*, 2003). In a previous study, during the first immunisation with a single and lower L₃ infection, an FEC peak was observed, but in the second infection a low acquired response was reported when an increase in FEC was observed (González-Garduño *et al.*, 2019). Consecutive immunisation with a high challenge with infective larvae produced a strong acquired response, enough to achieve a significant reduction in FEC during the second infection. This represents an important alternative, especially when the nematodes in the flocks show AR, especially since the persistence of infection can be very long when animals have insufficient immune stimulation to achieve self-cure (González-Garduño *et al.*, 2016).

Acquired resistance has been characterised by a local and blood eosinophilia response, as well as an increase in T cells (CR⁺ γδ) in the first 3 days after challenge. In addition, a very rapid increase in CD4⁺ T cells occurs. All subpopulations of lymphocytes and tissue and blood eosinophils are reduced on day 7 and subsequently increase at 28 days post-infection, suggesting a different immune response against larvae and adults (Robinson *et al.*, 2010). During the second phase, all groups of lambs showed similarities in cell values, PCV and TPP. At the same time that the FEC was reduced, improvement in the haematological value was observed, keeping the average within the normal values for the breed (Byers and Kramer, 2010).

2.6. CONCLUSION

An artificial trickle infection of Pelibuey lambs with a dose of 6000 L₃ of *Haemonchus contortus* induced a rapid immune response in the most resistant animals, which could be identified and selected to integrate a flock genetically resistant to GINs in the future.

2.7. ACKNOWLEDGEMENTS

The study was funded by the Academic Body Strengthening Program (PRODEP-DSA/103.5/15/14473). The author, Alvar Alonzo Cruz Tamayo is a PhD student of the Program of Genetic Resources and Productivity – Livestock at the Graduate College (RGP-COLPOS) and

thanks the Professional Teacher Development Program for the scholarship (PRODEP-DSA/103.5/16/5957 UNACAM-118). Edgar Hernández Rueda is a student of the High School of Agricultural Sciences of the Autonomous University of Campeche.

2.8. REFERENCES

- Balic, A., Bowles, V.M., Meeusen, E.N.T., 2002. Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Parasite Immunol.* 24, 39–46. <https://doi.org/10.1046/j.0141-9838.2001.00432.x>
- Bowdridge, S.A., Zajac, A.M., Notter, D.R., 2015. St. Croix sheep produce a rapid and greater cellular immune response contributing to reduced establishment of *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 208, 204–210. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.019>
- Byers, S.R., Kramer, J.W., 2010. Normal hematology of sheep and goats., in: Weiss, D.J., Wardrop, K.J. (Eds.), *Schalm's Veterinary Hematology*. Wiley-Blackwell, USA, pp. 836–842.
- CONAGUA, 2019. Servicio Meteorológico Nacional. Normales climatológicas. <http://smn.cna.gob.mx/climatologia/normales/estacion/tab/NORMAL27068.TXT>.
- Corticelli, B., Lai, M., 1963. Studies on the technique of culture of infective larvae of gastrointestinal strongyles of cattle. *Acta Med. Vet. Napoli* 9, 347–357.
- Eady, S.J., Woolaston, R.R., Barger, I.A., 2003. Comparison of genetic and nongenetic strategies for control of gastrointestinal nematodes of sheep. *Livest. Prod. Sci.* 81, 11–23. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(02\)00197-5](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00197-5)
- Emery, D.L., Hunt, P.W., Le Jambre, L.F., 2016. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? *Int. J. Parasitol.* <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.07.001>
- Figueroa Castillo, J.A., Medina, R.D.M., Villalobos, J.M.B., Gayosso-Vázquez, A., Ulloa-Arvizu, R., Rodríguez, R.A., Ramírez, H.P., Alonso Morales, R.A., 2011. Association between major histocompatibility complex microsatellites, fecal egg count, blood packed cell volume and blood eosinophilia in Pelibuey sheep infected with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 177, 339–344. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.11.056>
- González-Garduño, R., Gives, P.M.-D., Torres-Hernández, G., 2013. Variability in the fecal egg count and the parasitic burden of hair sheep after grazing in nematode infected paddocks. *Pesqui. Vet. Bras.* 33. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000400010>
- González-Garduño, R., López-Arellano, M.E., Mendoza-De-Gives, P., Ojeda-Robertos, N.F., Chay-Canul, A.J., 2016. Temporary Immunity of Blackbelly Lambs Reinfected with *Trichostrongylus colubriformis*. *Acta Sci. Vet.* 44, 1–6.

- González Garduño, R., López-Arellano, M.E., Torres-Hernández, G., Oliva-Hernández, J., Hinojosa-Cuéllar, J.A., 2019. Assessment of acquired resistance in previously infected lambs with. *Indian J. Anim. Res.* 53, 1223–1228. <https://doi.org/10.18805/ijar.B-928>
- Greer, A.W., Hamie, J.C., 2016. Relative maturity and the development of immunity to gastrointestinal nematodes in sheep: An overlooked paradigm? *Parasite Immunol.* 38, 263–272. <https://doi.org/10.1111/pim.12313>
- Guo, Z., González, J.F., Hernandez, J.N., McNeilly, T.N., Corripio-Miyar, Y., Frew, D., Morrison, T., Yu, P., Li, R.W., 2016. Possible mechanisms of host resistance to *Haemonchus contortus* infection in sheep breeds native to the Canary Islands. *Sci. Rep.* 6, 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep26200>
- Hodgkinson, J.E., Kaplan, R.M., Kenyon, F., Morgan, E.R., Park, A.W., Paterson, S., Babayan, S.A., Beesley, N.J., Britton, C., Chaudhry, U., Doyle, S.R., Ezenwa, V.O., Fenton, A., Howell, S.B., Laing, R., Mable, B.K., Matthews, L., McIntyre, J., Milne, C.E., Morrison, T.A., Prentice, J.C., Sargison, N.D., Williams, D.J.L., Wolstenholme, A.J., Devaney, E., 2019. Refugia and anthelmintic resistance: Concepts and challenges. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 10, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.05.001>
- Jacobs, J.R., 2013. Characterizing Peripheral Cellular and Humoral Immune Responses to *Haemonchus contortus* in Sheep.
- Jacobs, J.R., Greiner, S.P., Bowdridge, S.A., 2015. Serum interleukin-4 (IL-4) production is associated with lower fecal egg count in parasite-resistant sheep. *Vet. Parasitol.* 211, 102–105. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.04.024>
- Karanu, F.N., McGuire, T.C., Davis, W.C., Besser, T.E., Jasmer, D.P., 1997. CD4+ T lymphocytes contribute to protective immunity induced in sheep and goats by *Haemonchus contortus* gut antigens. *Parasite Immunol.* 19, 435–445. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1997.d01-149.x>
- Karrow, N.A., Goliboski, K., Stonos, N., Schenkel, F., Peregrine, A., 2014. Review: Genetics of helminth resistance in sheep. *Can. J. Anim. Sci.* 94, 1–9. <https://doi.org/10.4141/CJAS2013-036>
- Kottek, M., Grieser, J., Beck, C., Rudolf, B., Rubel, F., 2006. World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorol. Zeitschrift* 1–62. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2006/0130>
- Lee, C.Y., Munyard, K.A., Gregg, K., Wetherall, J.D., Stear, M.J., Groth, D.M., 2011. The influence of MHC and immunoglobulins A and E on host resistance to gastrointestinal nematodes in sheep. *J. Parasitol. Res.* 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/101848>
- MacKinnon, K.M., Zajac, A.M., Kooyman, F.N.J., Notter, D.R., 2010. Differences in immune parameters are associated with resistance to *Haemonchus contortus* in Caribbean hair sheep. *Parasite Immunol.* 32, 484–493. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2010.01211.x>

- McRae, K.M., Stear, M.J., Good, B., Keane, O.M., 2015. The host immune response to gastrointestinal nematode infection in sheep. *Parasite Immunol.* 37, 605–613. <https://doi.org/10.1111/pim.12290>
- Miller, J.E., Horohov, D.W., 2006. Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. *J. Anim. Sci.* 84 Suppl, 124–132. https://doi.org/10.2527/2006.8413_supplE124x
- Moreno, C.R., Sallé, G., Jacquet, P., Blanchard, A., Chylinski, C., Cabaret, J., Francois, D., Saccareau, M., Astruc, J.M., Bambou, J.C., Mandonnet, N., 2017. La résistance génétique aux infections par les nématodes gastro-intestinaux chez les petits ruminants : un enjeu de durabilité pour les productions à l’herbe. *INRA Prod. Anim.* 30, 47–56.
- Morteo-Gómez, R., González-Garduño, R., Torres-Hernández, G., Nuncio-Ochoa, G., Becerril-Pérez, C.M., Gallegos-Sánchez, J., Aranda-Ibañez, E., 2004. Efecto de la variación fenotípica en la resistencia de corderos Pelibuey a la infestación con nematodos gastrointestinales. Effect of the phenotypic variation in the resistance of Pelibuey lambs to the infestation with gastrointestinal nematodes. *Agrociencia* 395–404.
- Mugambi, J.M., Bain, R.K., Wanyangu, S.W., Ihiga, M.A., Duncan, J.L., Murray, M., Stear, M.J., 1997. Resistance of four sheep breeds to natural and subsequent artificial *Haemonchus contortus* infection. *Vet. Parasitol.* 69, 265–273. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(96\)01128-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(96)01128-4)
- 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 Rumin. Res.* 47, 221–225. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(02\)00279-1](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(02)00279-1)
- Ojeda-Robertos, N.F., Torres-Acosta, J.F.J., González-Garduño, R., Notter, D.R., 2017. Phenotypic expression of parasite susceptibility to *Haemonchus contortus* in Pelibuey sheep. *Vet. Parasitol.* 239. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.015>
- Ortolani, E.L., Leal, M.L. do R., Minervino, A.H.H., Aires, A.R., Coop, R.L., Jackson, F., Suttle, N.F., 2013. Effects of parasitism on cellular immune response in sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 196, 230–234. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.02.014>
- Robinson, N., Piedrafita, D., Snibson, K., Harrison, P., Meeusen, E.N., 2010. Immune cell kinetics in the ovine abomasal mucosa following hyperimmunization and challenge with *Haemonchus contortus*. *Vet. Res.* 41, 1–10. <https://doi.org/10.1051/vetres/2010009>
- Rowe, A., McMaster, K., Emery, D., Sangster, N., 2008. *Haemonchus contortus* infection in sheep: Parasite fecundity correlates with worm size and host lymphocyte counts. *Vet. Parasitol.* 153, 285–293. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.01.040>
- Saccareau, M., Sallé, G., Robert-Granié, C., Duchemin, T., Jacquet, P., Blanchard, A., Cabaret, J., Moreno, C.R., 2017. Meta-analysis of the parasitic phase traits of *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Parasites and Vectors* 10, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2131-7>

- Saddiqi, H.A., Iqbal, Z., Khan, M.N., Muhammad, G., 2010. Comparative resistance of sheep breeds to *Haemonchus contortus* in a natural pasture infection. *Int. J. Agric. Biol.* 12, 739–743.
- Saddiqi, H.A., Sarwar, M., Iqbal, Z., Nisa, M., Shahzad, M.A., 2012. Markers/parameters for the evaluation of natural resistance status of small ruminants against gastrointestinal nematodes. *Animal* 6, 994–1004. <https://doi.org/10.1017/S1751731111002357>
- SAS, 2004. The SAS System for Windows. Version 9.
- Shakya, K.P., Miller, J.E., Horohov, D.W., 2009. A Th2 type of immune response is associated with increased resistance to *Haemonchus contortus* in naturally infected Gulf Coast Native lambs. *Vet. Parasitol.* 163, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.052>
- Sréter, T., Kassai, T., Takács, E., 1994. The heritability and specificity of responsiveness to infection with *Haemonchus contortus* in sheep. *Int. J. Parasitol.* 24, 871–876. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(94\)90013-2](https://doi.org/10.1016/0020-7519(94)90013-2)
- Stear, M.J., Bairden, K., Duncan, J.L., Murray, M., 1995. A comparison of the responses to repeated experimental infections with *Haemonchus contortus* among Scottish Blackface lambs. *Vet. Parasitol.* 60, 69–81. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)00776-9](https://doi.org/10.1016/0304-4017(94)00776-9)
- Stear, M.J., Strain, S., Bishop, S.C., 1999. Mechanisms underlying resistance to nematode infection. *Int. J. Parasitol.* 29, 51–56. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00179-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00179-9)
- Sweeney, T., Hanrahan, J.P., Ryan, M.T., Good, B., 2016. Immunogenomics of gastrointestinal nematode infection in ruminants – breeding for resistance to produce food sustainably and safely. *Parasite Immunol.* 38, 569–586. <https://doi.org/10.1111/pim.12347>
- Terefe, G., Lacroux, C., Andreoletti, O., Grisez, C., Prevot, F., Bergeaud, J.P., Penicaud, J., Rouillon, V., Gruner, L., Brunel, J.C., Francois, D., Bouix, J., Dorchies, P., Jacquiet, P., 2007. Immune response to *Haemonchus contortus* infection in susceptible (INRA 401) and resistant (Barbados Black Belly) breeds of lambs. *Parasite Immunol.* 29, 415–424. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.00958.x>
- Thienpont, D., Rochette, F., Vanparijs, O.F.J., 2003. Diagnosing helminthiasis by coprological examination, Third. ed. Janssen Research Foundation, Beerse, Belgium.
- Torres-Acosta, J.F.J., Mendoza-de-Gives, P., Aguilar-Caballero, A.J., Cuéllar-Ordaz, J.A., 2012. Anthelmintic resistance in sheep farms: Update of the situation in the American continent. *Vet. Parasitol.* 189, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.037>
- Valilou, R.H., Rafat, S.A., Notter, D.R., Shojda, D., Moghaddam, G., Nematollahi, A., 2015. Fecal egg counts for gastrointestinal nematodes are associated with a polymorphism in the MHC-DRB1 gene in the Iranian Ghezel sheep breed. *Front. Genet.* 6, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00105>

- van Wyk, J.A., Mayhew, E., 2013. Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: A practical lab guide. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 80, 1–14. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v80i1.539>
- Woolaston, R.R., Barger, I.A., Piper, L.R., 1990. Response to helminth infection of sheep selected for resistance to *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 20, 1015–1018. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(90\)90043-M](https://doi.org/10.1016/0020-7519(90)90043-M)
- Yang, Y., Zhou, Q.J., Chen, X.Q., Yan, B.L., Guo, X.L., Zhang, H.L., Du, A.F., 2015. Profiling of differentially expressed genes in sheep T lymphocytes response to an artificial primary *Haemonchus contortus* infection. *Parasites and Vectors* 8. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0844-z>
- Zaragoza-Vera, C. V., Aguilar-Caballero, A.J., González-Garduño, R., Arjona-Jiménez, G., Zaragoza-Vera, M., Torres-Acosta, J.F.J., Medina-Reynés, J.U., Berumen-Alatorre, A.C., 2019. Variation in phenotypic resistance to gastrointestinal nematodes in hair sheep in the humid tropics of Mexico. *Parasitol. Res.* 118, 567–573. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-06201-w>
- Zaros, L.G., Neves, M.R.M., Benvenuti, C.L., Navarro, A.M.C., Sider, L.H., Coutinho, L.L., Vieira, L.S., 2014. Response of resistant and susceptible Brazilian Somalis crossbreed sheep naturally infected by *Haemonchus contortus*. *Parasitol. Res.* 113, 1155–1161. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3753-8>
- Zvinorova, P.I., Halimani, T.E., Muchadeyi, F.C., Matika, O., Riggio, V., Dzama, K., 2016. Breeding for resistance to gastrointestinal nematodes - the potential in low-input/output small ruminant production systems. *Vet. Parasitol.* 225, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.05.015>

Table 1. Excretion of GIN eggs and percentage FEC reduction with respect to the maximum values (FECmax) exhibited during the first infection in Pelibuey lambs segregated into RES, SUS and INT groups in each infection phase.

Segregation	Experimental day	Mean EPG	FEC reduction (%)
Resistant (n = 9)	28 (FECmax)	2883	
	70 (FEC end Phase 1)	706	75.5 ^a
	154 (FEC end Phase 2)	253	91.2 ^a
Susceptible (n = 6)	42 (FECmax)	8725	
	70 (FEC end Phase 1)	3044	65.1 ^b
	154 (FEC end Phase 2)	483	94.4 ^a
Intermediate (n = 14)	49 (FECmax)	5446	
	70 (FEC end Phase 1)	2035	62.6 ^b
	154 (FEC end Phase 2)	592	89.1 ^a

^{a, b} Different letters in the same column indicate significant differences (p<0.05).

Table 2. Means and standard deviations of haematological parameters in Pelibuey lambs resistant, susceptible and intermediate to GIN.

Variable	Segregation			Reference values*
	Resistant (n = 9)	Intermediate (n = 14)	Susceptible (n = 6)	
WBC ($\times 10^3$ cell μL^{-1})				
Phase 1	8.85 \pm 2.27 ^a	8.25 \pm 2.43 ^b	8.24 \pm 2.08 ^b	4–12
Phase 2	9.01 \pm 1.98 ^a	9.33 \pm 2.53 ^a	8.21 \pm 1.64 ^b	
LYM ($\times 10^3$ cell μL^{-1})				
Phase 1	5.53 \pm 1.78 ^a	5.28 \pm 1.77 ^c	5.46 \pm 1.70 ^b	2–9
Phase 2	5.09 \pm 1.33 ^b	5.36 \pm 1.59 ^a	4.71 \pm 1.88 ^c	
MID ($\times 10^3$ cell μL^{-1})				
Phase 1	2.49 \pm 0.86 ^a	2.23 \pm 0.82 ^b	2.07 \pm 0.76 ^b	0–2
Phase 2	2.64 \pm 0.79 ^a	2.67 \pm 1.15 ^a	2.30 \pm 0.74 ^b	
GRAN ($\times 10^3$ cell μL^{-1})				
Phase 1	0.84 \pm 0.31 ^a	0.73 \pm 0.33 ^b	0.71 \pm 0.26 ^b	0.7–6
Phase 2	1.28 \pm 0.70 ^a	1.29 \pm 0.82 ^a	1.29 \pm 0.74 ^a	
TPP (g dL ⁻¹)				
Phase 1	6.26 \pm 0.55 ^a	6.00 \pm 0.49 ^c	6.11 \pm 0.55 ^b	6–7.5
Phase 2	6.47 \pm 0.53 ^a	6.36 \pm 0.54 ^b	6.49 \pm 0.55 ^a	

^{a, b} Different letters in the same row indicate significant differences ($p < 0.05$). *Byers and Kramer, 2010. WBC = blood cell count, LYM = lymphocytes, MID = medium cells (monocytes, basophils and eosinophils). GRAN = neutrophils, TPP = Total plasma protein.

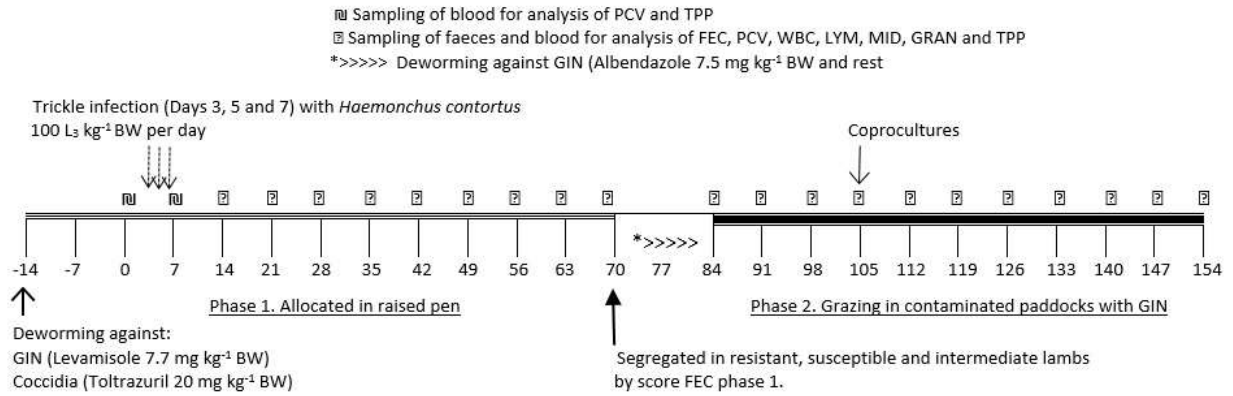


Figure 1. Deworming and sampling scheme for resistant, susceptible and intermediate Pelibuey lambs immunised with L₃ *H. contortus* and naturally challenged with GINs.

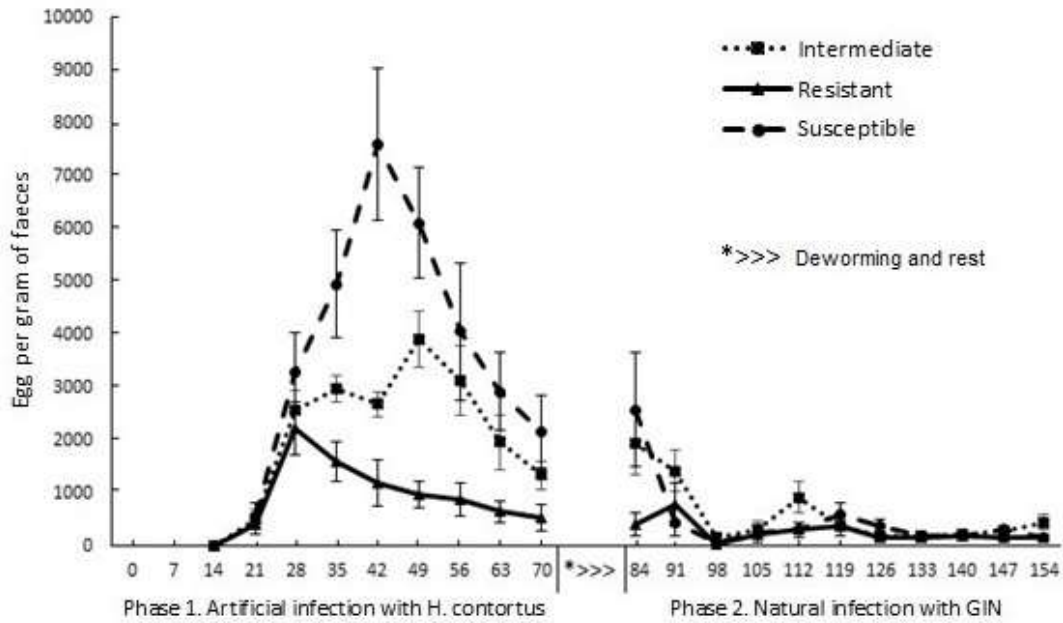


Figure 2. Faecal egg count means and standard error per phase and experimental day in resistant, susceptible and intermediate Pelibuey lambs immunised with *L3 H. contortus* and naturally challenged with GINs.

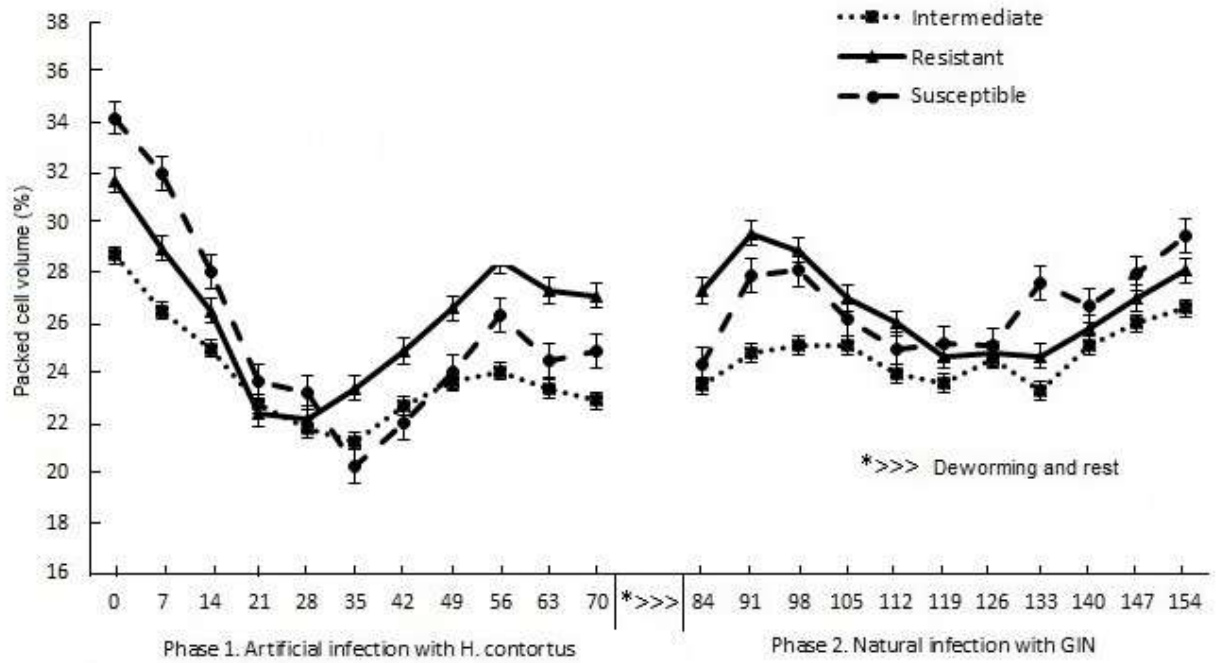


Figure 3. Packed cell volume means standard and error per phase and experimental day in resistant, susceptible and intermediate Pelibuey lambs immunised with L_3 *H. contortus* and naturally challenged with GINs.

CAPITULO III. EXPRESIÓN DEL RNAm DE CITOCINAS Y RECEPTOR *FCεRIA* DE IgE EN CORDEROS PELIBUEY INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *Haemonchus contortus*³

3.1. RESUMEN

El objetivo fue evaluar la expresión relativa de genes codificantes de citocinas y un receptor de IgE asociados a la respuesta inmune de corderos Pelibuey resistentes (RES) y susceptibles (SUS) a la infección por *Haemonchus contortus* (*H. contortus*). Se utilizaron 29 corderos destetados a los tres meses de edad que fueron mantenidos libres de infección de nematodos gastrointestinales (NGI). Luego se infectaron artificialmente con 100 larvas infectivas (L₃) de *H. contortus* kg⁻¹ de peso vivo (PV) tres veces durante una semana. Cada semana se determinó el conteo fecal de huevos (FEC), volumen celular aglomerado (VCA), Eritrocitos (ERI), Hemoglobina (Hb), cuenta total de leucocitos (LEU), linfocitos (LIN), eosinófilos (EOS), neutrófilos (NEU) y, cada 14 días la inmunoglobulina A (IgA). En el día 0 y 49 días post infección se determinó la expresión relativa de las citocinas *IL-2*, *IL-4*, *IL-5*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IL-13*, *IFN-γ*, *TGFβ1* y del receptor *FCεRIA*. Los corderos RES presentaron valores más bajos ($p < 0.05$) del FEC (1161 ± 1071) respecto al grupo SUS (3958 ± 3037). No se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en VCA, Hb, ERI, LEU, LIN, EOS, NEU e IgA. Se observó incremento en la expresión de los genes en los corderos RES. El incremento de expresión y valor ($p < 0.05$) se observó en los transcritos de las nueve citocinas y el receptor de IgE para el grupo RES entre 1.43 a 7.08 veces mayor con respecto al grupo no infectado y genes constitutivos. La respuesta para el grupo SUS fue sub-regulada para las citocinas con intervalo de 0.08 a 0.42 veces menor que los controles ($p > 0.05$); dentro de este grupo, el incremento de expresión de *FCεRIA* con valor $p = 0.1$ fue determinado. La expresión relativa de genes de *IL-4*, *IL-5* y *FCεRIA* en el grupo RES, fue diferente en cantidad de transcritos de RNAm con respecto al grupo SUS. Se encontró un coeficiente de correlación negativo entre el FEC e *IL-5* ($r = -0.95$, $p < 0.05$) para corderos RES. En los corderos SUS se encontró un coeficiente de correlación positivo entre el FEC e *IL-8* ($r = 0.80$, $p < 0.05$). Se sugiere el uso de estos parámetros en la selección de corderos Pelibuey para resistencia a NGI patógenos como *H. contortus*.

Palabras clave: Resistencia, nematodos gastrointestinales, ovinos de pelo, respuesta inmune

³ Manuscrito preparado en formato para la revista Experimental Parasitology.

3.2. INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista económico, *Haemonchus contortus* es uno de los nematodos gastrointestinales (NGI) de mayor importancia mundial, con habilidad para infectar a diferentes especies de rumiantes en zonas tropicales y templadas (Roeber *et al.*, 2013). La hemoncosis se caracteriza por causar signos clínicos como anemia, diarrea y en ocasiones edema. El tratamiento con antihelmínticos es altamente recomendado, cuando el producto conserva más del 70% de eficacia, en caso contrario, se pone en riesgo la vida del animal (Besier *et al.*, 2016). Sin embargo, ante la presencia de la resistencia antihelmíntica y la demanda de productos lácteos y cárnicos libres de residuos químicos, la crianza de animales resistentes a NGI surge como una estrategia sustentable y factible de llevarse a cabo (Zvinorova *et al.*, 2016). La adquisición y expresión de inmunidad contra NGI están controladas genéticamente y varían entre razas y entre individuos de la misma raza, considerando también las condiciones de manejo. Esta variación genética en la resistencia tradicionalmente es evidenciada mediante el uso de marcadores fenotípicos como el conteo fecal de huevos (FEC), volumen celular aglomerado (VCA), incremento de eosinófilos, inmunoglobulinas (IgA, IgE e IgG1) (McManus *et al.*, 2014). Así mismo, los genes que influyen en la inmunidad innata y adquirida pueden ser identificados para seleccionar individuos resistentes a NGI (Karrow *et al.*, 2014). Por ejemplo, las citocinas con actividad regulatoria e inflamatoria, así como las inmunoglobulinas son importantes mecanismos inmune en contra de NGI (Zaros *et al.*, 2010). Diversos estudios realizados en pequeños rumiantes, han notificado la susceptibilidad a la infección por NGI asociada con la respuesta primaria dirigida por células tipo T_{H1}; mientras que una respuesta adquirida o de memoria está relacionada con células T_{H2}, asociada a la resistencia en NGI (Lacroux *et al.*, 2006). En los últimos años, diferentes notificaciones mencionan la activación de ambos tipos de células T denominada respuesta dicotómica en contra de NGI, relacionada a resistencia a NGI (Estrada-Reyes *et al.*, 2017). Estos factores se han sumado a las características inespecíficas de la respuesta inmune como es la respuesta de células polimorfonucleares (Ortolani *et al.*, 2013; Bowdridge *et al.*, 2015).

En México la raza ovina Pelibuey ha sido clasificada con resistencia a NGI con variaciones importantes dentro de la raza debido a efectos ambientales, nutricionales y manejo de la pradera (Morteo-Gómez *et al.*, 2004; González-Garduño *et al.*, 2013; Zaragoza-Vera *et al.*, 2019). Está reportado el incremento de la expresión de genes codificantes de interleucinas (*IL's*) 5 y 6 (células

T_{H2}) en corderos Pelibuey resistentes y susceptibles infectados experimentalmente con *H. contortus* (Estrada-Reyes *et al.*, 2015). En otro estudio con corderos Pelibuey se evaluó la expresión de siete citocinas (*IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13*) relacionadas a la infección por nematodos y al receptor *FCεRIA* de IgE, donde los autores concluyeron que una infección primaria con *H. contortus* indujo una temprana expresión de citocinas T_{H1} y T_{H2} asociadas con periodos iniciales de la infección que puede ser esencial para el establecimiento de la respuesta inmune adquirida (Estrada-Reyes *et al.*, 2017). El objetivo del presente estudio fue evaluar la expresión de genes codificantes de citocinas *IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IFN-γ, TGFβ1* y del receptor *FCεRIA* en la respuesta inmune de corderos Pelibuey con características de fenotipo resistente y susceptible a la infección inducida por *H. contortus*.

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

El estudio de campo se realizó en el municipio de Salto de Agua, Chiapas, México, de clima cálido húmedo con temperatura media y precipitación anual de 26.6 °C y 3,298 mm, respectivamente; el periodo experimental fue del 4 de febrero al 10 de junio de 2017 (Kottek *et al.*, 2006; CONAGUA, 2017).

Condiciones de nacencias y alimentación

De un total de 140 corderos Pelibuey contemporáneos, nacidos en el Centro de Capacitación y Reproducción de Especies Menores (CECAREM) de Villahermosa, Tabasco, México, se adquirieron 29 corderos que fueron destetados a los tres meses de edad. Los animales se identificaron y se mantuvieron en jaulas elevadas para mantenerlos libres de infección por NGL. Los animales recibieron agua *ad libitum* y alimento integral con 14% de proteína cruda. Los procedimientos se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana 051-ZOO-1995 sobre trato humanitario en la movilización de animales y la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999 sobre especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales experimentales.

Diseño experimental y esquema de muestreo

A los cinco meses de edad (designado como día -14) los corderos se trataron con antihelmíntico y anticoccidiano comercial siguiendo las indicaciones del fabricante (Levamisol 7.7

mg kg⁻¹ PV y Toltrazuril 20 mg kg⁻¹ PV). Los días 3, 5 y 7 se infectaron con L₃ de *H. contortus*, se dejó un periodo de establecimiento de la infección para después en los días 14, 21, 28, 35, 42 y 49 tomar muestras de sangre en la vena yugular con tubos al vacío conteniendo EDTA K2 como anticoagulante (Vacutainer, Becton Dickinson, USA) para los análisis de citometría hemática y heces directamente del recto para determinar el FEC. Los días 0, 14, 28, 42 y 56 se tomaron muestras de sangre en la vena yugular con tubos al vacío sin anticoagulante para cuantificar el nivel de IgA en suero. Para los análisis de expresión relativa de genes asociados a la respuesta inmune, el día 0 se seleccionaron al azar cinco corderos sin infección para formar el grupo control y en el día 49 post infección después de segregar a los corderos, se seleccionaron al azar a 5 corderos resistentes para formar el grupo RES y 5 corderos susceptibles para formar el grupo SUS. De cada uno de ellos se realizaron tomas de muestra de sangre en la vena yugular con tubos Tempus Blood RNA para extracción de RNAm (Applied Biosystems, USA). El procesamiento de las muestras se realizó en el Laboratorio de Parasitología Animal de la Unidad Regional Universitaria Sursureste (URUSSE) de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) en Teapa, Tabasco, México y en el Laboratorio de Helmintología del CENID-SAI, INIFAP en Jiutepec, Morelos, México (Figura 1).

Parámetros parasitológicos

La infección con *H. contortus* en corderos se realizó por vía oral con 100 L₃ por kg⁻¹ PV, recibiendo aproximadamente 6000 L₃ por animal (Fleming, 1988; Saccareau *et al.*, 2017). Las L₃ de *H. contortus* fueron obtenidas de un rebaño del estado de Tabasco, México por coprocultivo de heces (Corticelli y Lai, 1963) de dos corderos donadores, previamente infectados con 300 L₃. EL FEC fue estimado por el método de McMaster con sensibilidad de 50 huevos por gramo de heces (EPG) (Thienpont *et al.*, 1986).

Modelo de segregación de corderos

Los corderos se segregaron en el día 49 post-infección con base en los resultados de FEC en dos grupos, los resistentes (RES) (media de HPG – tres veces el error estándar, EE) y los susceptibles (SUS) (media de HPG + tres veces el EE) (Morteo-Gómez *et al.*, 2004).

Parámetros hematológicos

Para determinar el volumen celular aglomerado (VCA), número total de eritrocitos (ERI), hemoglobina (Hb), cuenta total de leucocitos (LEU) y diferencial de tres partes linfocitos (LIN), eosinófilos (EOS) y neutrófilos (NEU) se utilizaron 200 µl de sangre con anticoagulante en el analizador hematológico automatizado basado en impedancia electrónica (Medonic CA-620 VET, Boule Medical AB, Sweden).

IgA

Las muestras de suero se obtuvieron por centrifugación a 2000 rpm por 10 min y fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso. El nivel de absorbancia de IgA (% densidad óptica, OD respecto a un testigo positivo) fue calculado utilizando la técnica de Ensayo indirecto por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) con antígeno del extracto crudo de nematodos adultos de *H. contortus* de acuerdo a la técnica de González-Garduño *et al.* (2017). La OD fue determinada con un lector de microplacas (Imark, Bio-Rad Laboratories, USA) a 450 nm.

Genes asociados a la respuesta inmune

Se cuantificó la expresión relativa de genes de nueve citocinas y un receptor de inmunoglobulina y tres genes constitutivos para el análisis de la respuesta inmune (Cuadro 1). Los detalles de la extracción, concentración, integridad de RNA total, eliminación de DNA genómico, síntesis de cDNA, RT-qPCR y cuantificación de la expresión génica se pueden consultar en el anexo 1. Los datos de expresión relativa de cada gen (*IL-2*, *IL-4*, *IL-5*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IL-13*, *IFN-γ*, *TGFβ1* y *FCεRI1A*) fueron analizados en la plataforma Data Analysis Center (Qiagen, Hilden, Germany).

Análisis estadístico

La normalidad y la homogeneidad de varianza fueron confirmados para cada variable usando el procedimiento UNIVARIATE (SAS, 2004). Para eliminar la asimetría y aproximar los datos a la distribución normal, los valores del FEC fueron transformados logarítmicamente (Log EPG+1). Los datos de las variables de los corderos segregados como RES y SUS fueron analizados con un modelo de medidas repetidas en el tiempo usando el procedimiento MIXED (SAS, 2004) y las medias se compararon por LSMEANS (SAS, 2004). Se utilizó el siguiente modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + \rho_i + \zeta_{j(i)} + \tau_k + \rho^* \tau_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

dónde: Y_{ijkl} = Variable respuesta (FEC, VCA, ERI, Hb, LEU, LIN, EOS, NEU e IgA); μ = media general; ρ_i = Efecto fijo del tipo de cordero (i =RES, SUS); $\zeta_{j(i)}$ = Efecto aleatorio del cordero anidado en el tipo de cordero, τ_k = Efecto fijo de tiempo (k =1, 2, 3...día de muestreo); $\rho^* \tau_{ik}$ = Interacción del tipo de cordero con el día de muestreo; ε_{ijk} = Error aleatorio asociado con la k -ésima medida repetida dentro del j -ésimo animal.

Las transcritos de RNAm de los genes (*IL-2*, *IL-4*, *IL-5*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IL-13*, *IFN- γ* , *TGF β 1* y *FC ϵ RIA*), entre corderos RES y SUS se analizaron mediante la prueba t de Student y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si $p < 0.05$. Las correlaciones (r) fueron obtenidas para cada tipo de cordero usando el procedimiento CORR (SAS, 2004).

3.4. RESULTADOS

Segregación de corderos

Con base en el modelo de segregación, el grupo RES quedó integrado por nueve corderos y el grupo SUS con seis corderos. Los resultados obtenidos de los parámetros estudiados por tipo de cordero segregado se observan en el Cuadro 2.

FEC

Los corderos RES presentaron los valores más bajos ($p < 0.0001$) de la media de HPG respecto a los corderos SUS. La figura 2a indica la dinámica del FEC durante la infección, mostrando la reducción del FEC inició a partir del día 28 en el grupo RES y en el día 42 para grupo SUS.

Volumen celular aglomerado

No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) del porcentaje de VCA para el grupo RES con valores de 25 ± 3.5 respecto al grupo SUS, 23.98 ± 4.12 . La figura 2b muestra los cambios en el VCA de los corderos segregados a partir de la infección por el parásito hematófago *H. contortus*. Los corderos RES tuvieron el valor más bajo en el día 28 y el SUS en el día 35.

Posteriormente el valor de VCA se incrementó paulatinamente en ambos grupos con tendencia a llegar a valores fisiológicos normales.

Citometría hemática

No se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) en ERI, Hb, LEU, LIN, EOS y NEU entre los corderos RES y SUS. Para ambos grupos de corderos, los valores de LEU, LIN y NEU se encontraron dentro los valores normales para la raza Pelibuey. Sin embargo, ERI en ambos grupos y Hb de corderos SUS se hallaron por abajo del límite inferior normal. La media de EOS para ambos grupos se encontró arriba del límite superior. La figura 2c muestra la dinámica de la respuesta de los EOS a la infección experimental.

IgA

En la figura 3 se aprecia la dinámica de la IgA. No se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) en la actividad de la IgA entre los dos grupos de corderos, a excepción del día 14 y 28 para el grupo de corderos RES respecto al testigo positivo, descendiendo posteriormente hasta niveles bajos de actividad.

Expresión génica

En el cuadro 3 se muestra los resultados de la expresión relativa del número de transcritos de RNAm correspondientes a nueve citocinas y al receptor *FCεRIA* asociados a la infección por *H. contortus* en corderos RES y SUS. Se observó un incremento en la expresión de estos genes correspondiente al grupo de corderos RES. El incremento de expresión se observó en los transcritos de las nueve citocinas y el receptor de IgE para el grupo RES entre 2.22 y 15.99 veces mayor con respecto al grupo no infectado y genes constitutivos. La respuesta para el grupo SUS fue sub-regulada para las citocinas con rango entre 0.01 y 0.34 veces menor al grupo no infectado y genes constitutivos. La figura 4 muestra los niveles de expresión de cada gen por tipo de cordero.

Correlaciones

Se encontró un coeficiente de correlación negativo entre el FEC e *IL-5* ($r=-0.95$, $p<0.05$) en el grupo de corderos RES. En el grupo de corderos SUS se encontró un coeficiente de correlación positivo entre el FEC e *IL-8* ($r=0.80$, $p<0.05$).

3.5. DISCUSIÓN

La prevalencia de infecciones por NGI en ovinos en la región tropical es alrededor del 80% (Fentahun y Luke, 2012). El problema se observa en forma clínica por este tipo de parasitosis debido a que frecuentemente los antihelmínticos no son funcionales por la elevada resistencia hacia ellos desarrollada por los NGI, lo que dificulta su control, aunado a esto existe el problema de la toxicidad de los residuos de esos fármacos en insectos y microorganismos del suelo, lo que ha llevado a organizaciones que procuran el bienestar animal a involucrar la selección de individuos tolerantes a nematodos, siendo una opción sustentables de producción de ovinos.

Las variaciones en el FEC permitieron formar dos grupos de corderos contrastantes, los RES y los SUS a la infección por *H. contortus*. Durante el desarrollo inmunológico de los corderos se observó que el número de células polimorfonucleares, linfocitos e IgA no mostraron diferencias significativas para ninguno de los dos grupos formados, pero si fue posible reconocer que la IgA muestra diferencias en el nivel de absorbancia, indicando tendencia a incrementar para el grupo RES conforme los animales desarrollan la inmunidad adquirida. Estos resultados sugieren retraso en la respuesta inmune a nivel de mecanismos inespecíficos, que pueden llegar a ser significativos para su relación con la hemoncosis en un mayor periodo de estudio.

El menor FEC en los corderos RES en comparación con los SUS desde los 14 días post infección sugiere una mayor tolerancia de los animales, ya sea limitando el establecimiento de larvas, reduciendo la fecundidad de las hembras y/o rechazar a los nematodos ya implantados. Estudios similares fueron notificados en ovinos Blackbelly (Muñoz-Guzmán *et al.*, 2006), Gulf Coast Native (Shakya *et al.*, 2009) y St. Croix (Notter *et al.*, 2003). A pesar de las diferencias en el FEC entre los dos grupos de corderos se observó similitud ($p > 0.05$) en el comportamiento de los parámetros VCA, ERI, Hb, LEU, LIN, EOS y NEU, lo que podría estar relacionado con la actividad inmunológica durante la primera infección de todos los animales.

Los EOS de ambos grupos se elevaron moderadamente en sangre, condición importante asociada a la infección por NGI a nivel periférico (Lacroux *et al.*, 2006). Estudios *in vitro* han demostrado que la degranulación de EOS alrededor de larvas de *H. contortus* ocasionan daño directo y muerte a dichas larvas (Balic *et al.*, 2006). En nuestro estudio, la eosinofilia no fue un

parámetro fenotípico adecuado para identificar individuos resistentes a NGI, ya que en ambos grupos de corderos las concentraciones de EOS circulantes fueron similares ($p > 0.05$), tal como se ha notificado en corderos Blackbelly, INRA 401 (Terefe *et al.*, 2007), Santa Inés, Suffolk e Ile de France (Amarante *et al.*, 2007). Debido a su actividad, la eosinofilia observada en ambos grupos de corderos puede representar una respuesta inmunopatológica asociada a la inflamación inducida por la infección con parásitos (Shakya *et al.*, 2009) en general y por lo tanto para diferenciar entre RES y SUS se requiere de infecciones consecutivas en las que los corderos demuestren a nivel local y sistémico el grado de desarrollo inmune.

La producción de IgA en corderos RES y SUS también mostró una reducción en el nivel de absorbancia, pero similar a otros estudios, la baja producción de anticuerpos (ej. IgG, IgA) contra antígeno de las larvas durante el periodo prepatente podría estar asociada a niveles de protección, como sucede con la respuesta humoral de la vacuna irradiada del nematodo pulmonar de bovinos, *Dityocalus viviparus* (Lacroux *et al.*, 2006; Hein *et al.*, 2010).

En nuestro estudio, la expresión génica de nueve citocinas y del *FCεRIA* correspondió al día 49 post infección y fue compatible con una respuesta celular de tipo T_H1 y T_H2 caracterizada por moderada expresión de *IL-4*, *IL-5*, *IL-6*, *IL-10*, *IL-13* y *FCεRIA* para los animales RES y baja expresión para el grupo SUS, exceptuando el *FCεRIA*. La expresión relativa de *IL-4* fue mayor en los corderos RES que en los corderos SUS, un nivel similar de expresión se determinó para *IL-5* e *IL-13*, importantes en contra de NGI y antagonistas a *IFN-γ* (citocina T_H1). Las citocinas *IL-4* e *IL-13* comparten receptores y por lo tanto función, están asociadas a factores de la respuesta inflamatoria y humoral, en particular asociadas a bajo nivel de infección por NGI en corderos RES (Jacobs *et al.*, 2015). Así mismo, la sobre-regulación de *IL-5* en corderos RES sugiere mayor actividad en la quimiotaxis y diferenciación de EOS. Aunque, ésta respuesta podría estar más relacionada de manera local en el estómago de los rumiantes, debido a la presencia de *H. contortus* y al daño que causa en tejido como lo sugieren Meeusen y Balic (2000).

El incremento de transcriptos de RNAm de la citocina pro-inflamatoria *IL-6* también se relaciona al estímulo para la producción de inmunoglobulinas, hematopoyesis y producción hepática de proteínas de fase aguda, implicadas en la cascada pro-inflamatoria, caracterizada

durante los procesos de reparación tisular e inflamación, por lo que la *IL-6* tiene un papel central en los mecanismos de inmunidad del hospedero, sin embargo, su regulación debe ser importante para que no se convierta en daño crónico (Tanaka *et al.*, 2014). La actividad de las *IL-5* e *IL-6* ha sido estudiada en corderos Pelibuey infectados con *H. contortus* con elevada expresión detectada en células mononucleares de sangre periférica (Estrada-Reyes *et al.*, 2015).

La respuesta inmune en rumiantes tiene una función específica para regular la infección por nematodos, debido al daño a nivel tisular que podría causar la muerte del hospedero. Por ello, la expresión relativa de *IL-10* en los corderos resistentes, sugiere inmunorregulación para disminuir la patogénesis del nematodo. Además, contribuye a disminuir la secreción de citocinas T_H1 , macrófagos e incrementa la supervivencia de células B. En conjunto con *IL-4*, *IL-13*, e *IL-10* participa en la activación de linfocitos T $CD4^+$ (Dembic, 2015). Además, la *IL-13* inhibe la producción de citocinas inflamatorias por macrófagos y células T_H1 (Pernthaner *et al.*, 2005). Como se mencionó anteriormente, algunas funciones de la *IL-4* e *IL-13* actúan sinérgicamente, sobre todo en la respuesta inmune protectora contra NGI como la expulsión de los parásitos (Yang *et al.*, 2015). En nódulos linfáticos de corderos Blackbelly resistentes a *H. contortus* se observaron niveles elevados expresión de *IL-13* en comparación con los corderos susceptibles (Terefe *et al.*, 2007).

La *TGF β 1* en los corderos RES fue moderadamente mayor con respecto a los testigos negativos y a los genes constitutivos, diferentes resultados fueron observados en el grupo SUS. El *TGF β 1* es una citocina con funciones en el sistema inmune donde limita la función de los linfocitos, inhibe la activación de macrófagos, la proliferación de células T activadas, bloquea el efecto de las citocinas pro-inflamatorias sobre los neutrófilos y regula negativamente la producción de *IFN- γ* (Trinchieri, 2004). Los resultados de la expresión del receptor *FC ϵ RIA* son interesantes debido a que en ambos grupos de corderos se incrementó el número de transcritos. El *FC ϵ RIA* es muy importante en respuesta contra alergias, y los antígenos secretados por helmintos, ej. NGI, eliminan productos que activan este receptor para disminuir su efecto anafiláctico. El receptor *FC ϵ RIA* se expresa en las superficies de basófilos en respuesta a los niveles de IgE en suero, esto sugiere que los basófilos pueden estar involucrados en la fase de inicio de la respuesta contra NGI, por ser células inespecíficas del sistema inmune (Yang *et al.*, 2015). La expresión de *FC ϵ RIA* después de

un desafío primario de NGI en animales genéticamente resistentes es consistente con el establecimiento de una respuesta inmune tipo T_H2 (Kadarmideen *et al.*, 2011; MacKinnon *et al.*, 2015).

Sin embargo, también se presentaron niveles elevados de expresión en citocinas de la respuesta T_H1 . La temprana expresión de *IL-2* e *IFN- γ* fue mayor en corderos RES, la *IL-2* tiene actividad proliferativa y de señalización, es la primera en activarse ante el estímulo de linfocitos T para atraer otras citocinas. El *IFN- γ* , así como la quimiocina *IL-8* se relacionan a factores inflamatorios durante infecciones agudas e infecciones persistentes por daño en tejido (Trinchieri, 2004). Sin embargo, el daño a tejido debe ser reparado, ej. individuos RES, y en caso contrario persistirá llegando a causar la muerte del hospedero, ej. individuos SUS. El incremento de la expresión de ambas citocinas junto con el nivel de HPG, está asociado a la persistencia de infecciones parasitarias debido a que inhibe la respuesta T_H2 protectora por una regulación negativa de *IL-4*, *IL-5* y *FC ϵ RIA* (Venturina *et al.*, 2013; Dembic, 2015).

La patología causada por NGI es la inflamación y por ello, atrae una serie de moléculas asociadas a este mecanismo. La función de las células del sistema inmune debería ser equilibrada y conservar relación negativa con la infección por nematodos. Los efectos negativos de la inflamación es la muerte del individuo o convertirse en enfermedad crónica. Los ovinos Pelibuey son una raza tropical para la producción de carne y diversos patógenos están presente bajo las condiciones climáticas donde se desarrolla su actividad zootécnica. En los últimos años, la selección de individuos tolerantes a patógenos se realiza con base en la integración de parámetros fenotípicos y de activación del sistema inmune tipo protector. Sin embargo, cada individuo, incluso entre la misma raza se comporta diferente, por ello, la selección de animales con características de resistencia debe ser estricta.

3.6. CONCLUSIÓN

El presente trabajo indica la diferencia del FEC entre dos grupos de corderos RES y SUS, así como la tendencia de incremento de IgA en el grupo RES, indicando que estos marcadores fenotipos son básicos durante los estudios de selección. La cantidad de transcritos de RNAm de

los genes *IL-4*, *IL-5* y *FCεRI1A* fue mayor en los corderos RES con respecto a los corderos SUS. Por ello, se sugiere considerar estos parámetros en la selección de ovinos Pelibuey para resistencia a NGI altamente patógenos como es *H. contortus*.

3.7. AGRADECIMIENTOS

El estudio fue financiado por el Programa de fortalecimiento de cuerpos académicos (PRODEP-DSA/103.5/15/14473). Alvar Alonzo Cruz Tamayo es estudiante de doctorado del Programa de Recursos Genéticos y Productividad-Ganadería del Colegio de Postgraduados (RGP-COLPOS) y agradece la beca otorgada por el Programa de desarrollo profesional docente (PRODEP-DSA/103.5/16/5957 UNACAM-118).

3.8. REFERENCIAS

- Amarante, A.F.T., Rocha, R.A., Bricarello, P.A., 2007. Relationship relationship of intestinal histology with the resistance to *Trichostrongylus richostrongylus* colubriformis infection in three breeds of sheep sheep. *Pesqui. Vet. Bras.* 27, 43–48. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2007000100008>
- Balic, A., Cunningham, C.P., Meeusen, E.N.T., 2006. Eosinophil interactions with *Haemonchus contortus* larvae in the ovine gastrointestinal tract. *Parasite Immunol.* 28, 107–115. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00816.x>
- Besier, R.B., Kahn, L.P., Sargison, N.D., Van Wyk, J.A., 2016. The Pathophysiology, Ecology and Epidemiology of *Haemonchus contortus* Infection in Small Ruminants. *Adv. Parasitol.* 93, 95–143. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.022>
- Bowdridge, S.A., Zajac, A.M., Notter, D.R., 2015. St. Croix sheep produce a rapid and greater cellular immune response contributing to reduced establishment of *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 208, 204–210. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.019>
- CONAGUA, 2017. Servicio Meteorológico Nacional. Available in: <http://smn.conagua.gob.mx/es/informacion-climatologica-ver-estado?estado=tab>. Accessed 25 October 2017.
- Corticelli, B., Lai, M., 1963. Studies on the technique of culture of infective larvae of gastrointestinal strongyles of cattle. *Acta Med. Vet. Napoli.* 9, 347–357.
- Dembic, Z., 2015. Cytokines of the immune system: Interleukins., in: *The Cytokines of the Immune System*. Elsevier, pp. 143–239. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-419998-9.00006-7>

- Estrada-Reyes, Z., López-Arellano, M.E., Torres-Acosta, F., López-Reyes, A., Lagunas-Martínez, A., Mendoza-de-Gives, P., González-Garduño, R., Olazarán-Jenkins, S., Reyes-Guerrero, D., Ramírez-Vargas, G., 2017. Cytokine and antioxidant gene profiles from peripheral blood mononuclear cells of Pelibuey lambs after *Haemonchus contortus* infection. *Parasite Immunol.* 39, 6–10. <https://doi.org/10.1111/pim.12427>
- Estrada-Reyes, Z.M., López-Reyes, A.G., Lagunas-Martínez, A., Ramírez-Vargas, G., Olazarán-Jenkins, S., Hernández-Romano, J., Mendoza-de-Gives, P., López-Arellano, M.E., 2015. Relative expression analysis of IL-5 and IL-6 genes in tropical sheep breed Pelibuey infected with *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol.* 37, 446–452. <https://doi.org/10.1111/pim.12211>
- Fentahun, T., Luke, G., 2012. Small Ruminant Haemonchosis: Prevalence and Associated Determinants in Randomly Selected Restaurants and Hotels of Gondar Town, Ethiopia 4, 168–172. <https://doi.org/10.5829/idosi.ejas.2012.4.4.66141>
- Fleming, M.W., 1988. Size of Inoculum Dose Regulates in Part Worm Burdens, Fecundity, and Lengths in Ovine *Haemonchus contortus* Infections. *J. Parasitol.* 74, 975. <https://doi.org/10.2307/3282218>
- González-Garduño, Roberto, Gives, P.M. de, Torres-Hernández, G., 2013. Variability in the fecal egg count and the parasitic burden of hair sheep after grazing in nematode infected paddocks. *Pesqui. Vet. Bras.* 33, 469–475. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000400010>
- González-Garduño, R., López Arellano, M.E., Conde Felipe, M.M., De Gives, P.M., Marcelino, L.A., Díaz, G.J., 2017. Immune and haematological parameters of blackbelly ewes infected with gastrointestinal nematodes. *Rev. Colomb. Ciencias Pecu.* 30, 219–230. <https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v30n3a05>
- Hein, W.R., Pernthaner, A., Piedrafita, D., Meeusen, E.N., 2010. Immune mechanisms of resistance to gastrointestinal nematode infections in sheep. *Parasite Immunol.* <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2010.01213.x>
- Jacobs, J.R., Greiner, S.P., Bowdridge, S.A., 2015. Serum interleukin-4 (IL-4) production is associated with lower fecal egg count in parasite-resistant sheep. *Vet. Parasitol.* 211, 102–105. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.04.024>
- Kadarmideen, H.N., Watson-Haigh, N.S., Andronicos, N.M., 2011. Systems biology of ovine intestinal parasite resistance: Disease gene modules and biomarkers. *Mol. Biosyst.* 7, 235–246. <https://doi.org/10.1039/c0mb00190b>
- Karrow, N.A., Goliboski, K., Stonos, N., Schenkel, F., Peregrine, A., 2014. Review: Genetics of helminth resistance in sheep. *Can. J. Anim. Sci.* 94, 1–9. <https://doi.org/10.4141/CJAS2013-036>
- Kottek, M., Grieser, J., Beck, C., Rudolf, B., Rubel, F., 2006. World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorol. Zeitschrift* 1–62. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2006/0130>

- Lacroux, C., Nguyen, T.H.C., Andreoletti, O., Prevot, F., Grisez, C., Bergeaud, J.-P., Gruner, L., Brunel, J.-C., Francois, D., Dorchies, P., Jacquiet, P., 2006. *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits an unequivocal Th2 immune response. *Vet. Res.* 37, 607–622. <https://doi.org/10.1051/vetres:2006022>
- MacKinnon, K.M., Bowdridge, S.A., Zajac, A. M., Notter, D.R., 2015. Gene expression profiles of hair and wool sheep reveal importance of Th2 immune mechanisms for increased resistance to *Haemonchus contortus*. *J. Anim. Sci.* 93, 2074–2082. <https://doi.org/10.2527/jas2014-8652>
- McManus, C., Paim, T.D.P., De Melo, C.B., Brasil, B.S.A.F., Paiva, S.R., 2014. Selection methods for resistance to and tolerance of helminths in livestock. *Parasite* 21. <https://doi.org/10.1051/parasite/2014055>
- Meeusen, E.N.T., Balic, A., 2000. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? *Parasitol. Today* 16, 95–101. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(99\)01607-5](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(99)01607-5)
- Morteo-Gómez, R., González-Garduño, R., Torres-Hernández, G., Nuncio-Ochoa, G., Becerril-Pérez, C.M., Gallegos-Sánchez, J., Aranda-Ibañez, E., 2004. Efecto de la variación fenotípica en la resistencia de corderos Pelibuey a la infestación con nematodos gastrointestinales. Effect of the phenotypic variation in the resistance of Pelibuey lambs to the infestation with gastrointestinal nematodes. *Agrociencia* 395–404.
- Muñoz-Guzmán, M.A., Cuéllar-Ordaz, J.A., Valdivia-Anda, A.G., Buendía-Jiménez, J.A., Alba-Hurtado, F., 2006. Correlation of parasitological and immunological parameters in sheep with high and low resistance to haemonchosis. *Can. J. Anim. Sci.* 86, 363–371. <https://doi.org/10.4141/A06-010>
- 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 Rumin. Res.* 47, 221–225. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(02\)00279-1](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(02)00279-1)
- Ortolani, E.L., Leal, M.L. do R., Minervino, A.H.H., Aires, A.R., Coop, R.L., Jackson, F., Suttle, N.F., 2013. Effects of parasitism on cellular immune response in sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 196, 230–234. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.02.014>
- Pernthaner, A., Cole, S.A., Morrison, L., Hein, W.R., 2005. Increased expression of interleukin-5 (IL-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*. *Infect. Immun.* 73, 2175–2183. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.2175-2183.2005>
- Roeber, F., Jex, A.R., Gasser, R.B., 2013. Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - An Australian perspective. *Parasites and Vectors* 6, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-153>
- Saccareau, M., Sallé, G., Robert-Granié, C., Duchemin, T., Jacquiet, P., Blanchard, A., Cabaret, J., Moreno, C., 2017. Meta-analysis of the parasitic phase traits of *Haemonchus contortus*

- infection in sheep. *Parasites and Vectors* 10, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-21317>
- SAS, Statistical Analysis System. 2004. SAS Version 9.2. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Shakya, K.P., Miller, J.E., Horohov, D.W., 2009. A Th2 type of immune response is associated with increased resistance to *Haemonchus contortus* in naturally infected Gulf Coast Native lambs. *Vet. Parasitol.* 163, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.052>
- Tanaka, T., Narazaki, M., Kishimoto, T., 2014. Il-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a016295–a016295. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>
- Terefe, G., Lacroux, C., Andreoletti, O., Grisez, C., Prevot, F., Bergeaud, J.P., Penicaud, J., Rouillon, V., Gruner, L., Brunel, J.C., Francois, D., Bouix, J., Dorchies, P., Jacquiet, P., 2007. Immune response to *Haemonchus contortus* infection in susceptible (INRA 401) and resistant (Barbados Black Belly) breeds of lambs. *Parasite Immunol.* 29, 415–424. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.00958.x>
- Thienpont, D., Rochette, F., Vanparijs, O.F.J., 1986. Coprological examination., in: *Diagnosing Helminthiasis by Coprological Examination.* pp. 17–43.
- Trinchieri, G., 2004. Cytokines and cytokine receptors. *Immunol. Rev.* 202, 5–7. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00217.x>
- Venturina, V.M., Gossner, A.G., Hopkins, J., 2013. The immunology and genetics of resistance of sheep to *Teladorsagia circumcincta*. *Vet. Res. Commun.* 37, 171–181. <https://doi.org/10.1007/s11259-013-9559-9>
- Yang, Y., Zhou, Q.J., Chen, X.Q., Yan, B.L., Guo, X.L., Zhang, H.L., Du, A.F., 2015. Profiling of differentially expressed genes in sheep T lymphocytes response to an artificial primary *Haemonchus contortus* infection. *Parasites and Vectors* 8. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0844-z>
- Zaragoza-Vera, C. V., Aguilar-Caballero, A.J., González-Garduño, R., Arjona-Jiménez, G., Zaragoza-Vera, M., Torres-Acosta, J.F.J., Medina-Reynés, J.U., Berumen-Alatorre, A.C., 2019. Variation in phenotypic resistance to gastrointestinal nematodes in hair sheep in the humid tropics of Mexico. *Parasitol. Res.* 118, 567–573. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-06201-w>
- Zaros, L.G., Bricarello, P.A., Amarante, A.F.T., Rocha, R.A., Kooyman, F.N.J., De Vries., E., Coutinho, L.L., 2010. Cytokine gene expression in response to *Haemonchus placei* infections in Nelore cattle. *Vet. Parasitol.* 171, 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.03.020>
- Zvinorova, P.I., Halimani, T.E., Muchadeyi, F.C., Matika, O., Riggio, V., Dzama, K., 2016. Breeding for resistance to gastrointestinal nematodes - the potential in low-input/output small ruminant production systems. *Vet. Parasitol.* 225, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.05.015>

Cuadro 1. Genes para la expresión relativa de citocinas y receptor *FCεRI1* de IgE utilizados para evaluar la respuesta inmune en corderos infectados experimentalmente con 6000 L₃ de *H. contortus*.

Gen	Abreviatura	Temperatura de fusión	Número de acceso GenBank
Interleucina 2	<i>IL-2</i>	81.77	NM_173920
Interleucina 4	<i>IL-4</i>	81.04	NM_173921
Interleucina 5	<i>IL-5</i>	81.66	NM_173922
Interleucina 6	<i>IL-6</i>	82.90	NM_173923
Interleucina 8	<i>IL-8</i>	80.57	NM_173925
Interleucina 10	<i>IL-10</i>	81.41	NM_174088.1
Interleucina 13	<i>IL-13</i>	80.71	NM_174089.1
Interferón gamma	<i>IFN-γ</i>	80.99	NM_174086.1
Factor de crecimiento transformante beta 1	<i>TGFβ1</i>	82.33	NM_001166068
Receptor de IgE	<i>FCεRI1</i>	83.06	NM_001100310
Beta-2 microglobulina	<i>B-micro*</i>	81.75	NM_003406
Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa	<i>GAPDH*</i>	84.40	NM_001034034.1

*Gen constitutivo

Cuadro 2. Media \pm desviación estándar de los valores de parámetros parasitológicos (FEC), hematológicos (VCA, ERI, Hb, LEU, LIN, EOS, NEU) e inmunológicos (IgA) en corderos resistentes y susceptibles infectados experimentalmente con 6000 L₃ de *H. contortus*.

Parámetro	Fenotipo		Valor de <i>p</i>
	Resistente (n = 9) $\bar{X} \pm DS$	Susceptible (n = 6) $\bar{X} \pm DS$	
FEC (HPG)	1166 \pm 1071	4430 \pm 3250	<.0001 *
VCA (%)	25 \pm 3.51	24 \pm 4.13	0.4312 ^{NS}
ERI (x10 ⁶ μ L ⁻¹)	7 \pm 0.96	6.3 \pm 1.36	0.0785 ^{NS}
Hb (g dL ⁻¹)	9.06 \pm 1.17	8.4 \pm 1.6	0.1131 ^{NS}
LEU (x10 ³ μ L ⁻¹)	9.30 \pm 2.5	8.54 \pm 2.12	0.3640 ^{NS}
LIN (x10 ³ μ L ⁻¹)	6.0 \pm 2.02	5.7 \pm 1.74	0.7246 ^{NS}
EOS (x10 ³ μ L ⁻¹)	2.47 \pm 0.84	2.07 \pm 76	0.0791 ^{NS}
NEU (x10 ³ μ L ⁻¹)	0.85 \pm 0.31	0.74 \pm 0.27	0.2583 ^{NS}
IgA (OD)	3.0 \pm 10.62	0.45 \pm 1.24	0.2603 ^{NS}

* $p < 0.05$ RES=Resistentes, SUS=Susceptibles, FEC=Conteo fecal de huevos, VCA=Volumen celular aglomerado, ERI=Eritrocitos, Hb=Hemoglobina, LEU=Leucocitos, LIN=Linfocitos, EOS=Eosinófilos, NEU=Neutrófilos, IgA=Inmunoglobulina A.

Cuadro 3. Valores de expresión relativa de genes de nueve citocinas y el receptor *FCεRIA* de IgE en corderos resistentes y susceptibles infectados experimentalmente con 6000 L₃ de *H. contortus*.

Gen	Corderos resistentes (n=5) Fold change	Corderos susceptibles (n=5) Fold change
<i>IL-2</i>	5.83***	0.62
<i>IL-4</i>	6.93***	0.71
<i>IL-5</i>	3.70***	0.24**
<i>IL-6</i>	6.98***	0.10***
<i>IL-8</i>	4.40***	0.21***
<i>IL-10</i>	5.54***	0.34***
<i>IL-13</i>	13.23***	0.12***
<i>IFN-γ</i>	2.22**	0.26*
<i>TGFβ1</i>	4.14***	0.01***
<i>FCεRIA</i>	15.99***	2.22***

IL=Interleucina; *IFN-γ*=Interferón gamma; *TGFβ1*=Factor de crecimiento transformante beta 1; *FCεRIA*=Receptor de IgE; Números en rojo=Sobrerregulación; Números en azul=Subregulación; Números en negro=Nivel de expresión sin cambio; ***= $p \leq 0.001$; **= $p \leq 0.01$; *= $p \leq 0.05$

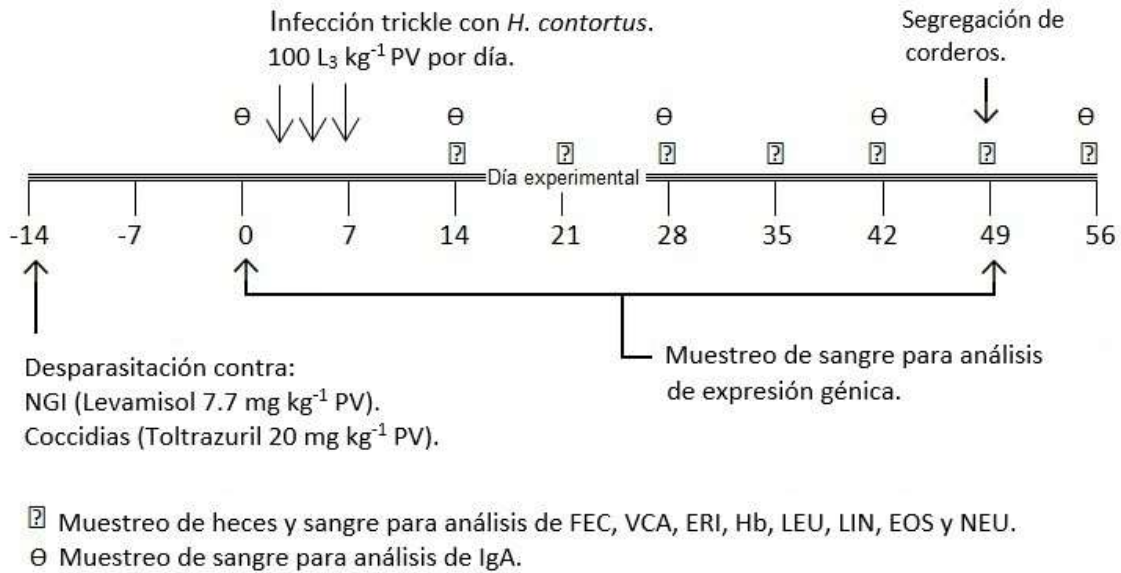


Figura 1. Infección, desparasitación, segregación y esquema de muestreo para corderos resistentes y susceptibles a la infección experimental con 6000 L₃ de *H. contortus*.

La figura muestra el tipo de muestras colectadas, así como los periodos para los ensayos parasitológicos (FEC), hematológicos (VCA, ERI, Hb, LEU, LIN, EOS, NEU), inmunológicos (IgA) y de expresión génica (*IL-2*, *IL-4*, *IL-5*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IL-13*, *IFN-γ*, *TGFβ1* y *FCεRI1A*).

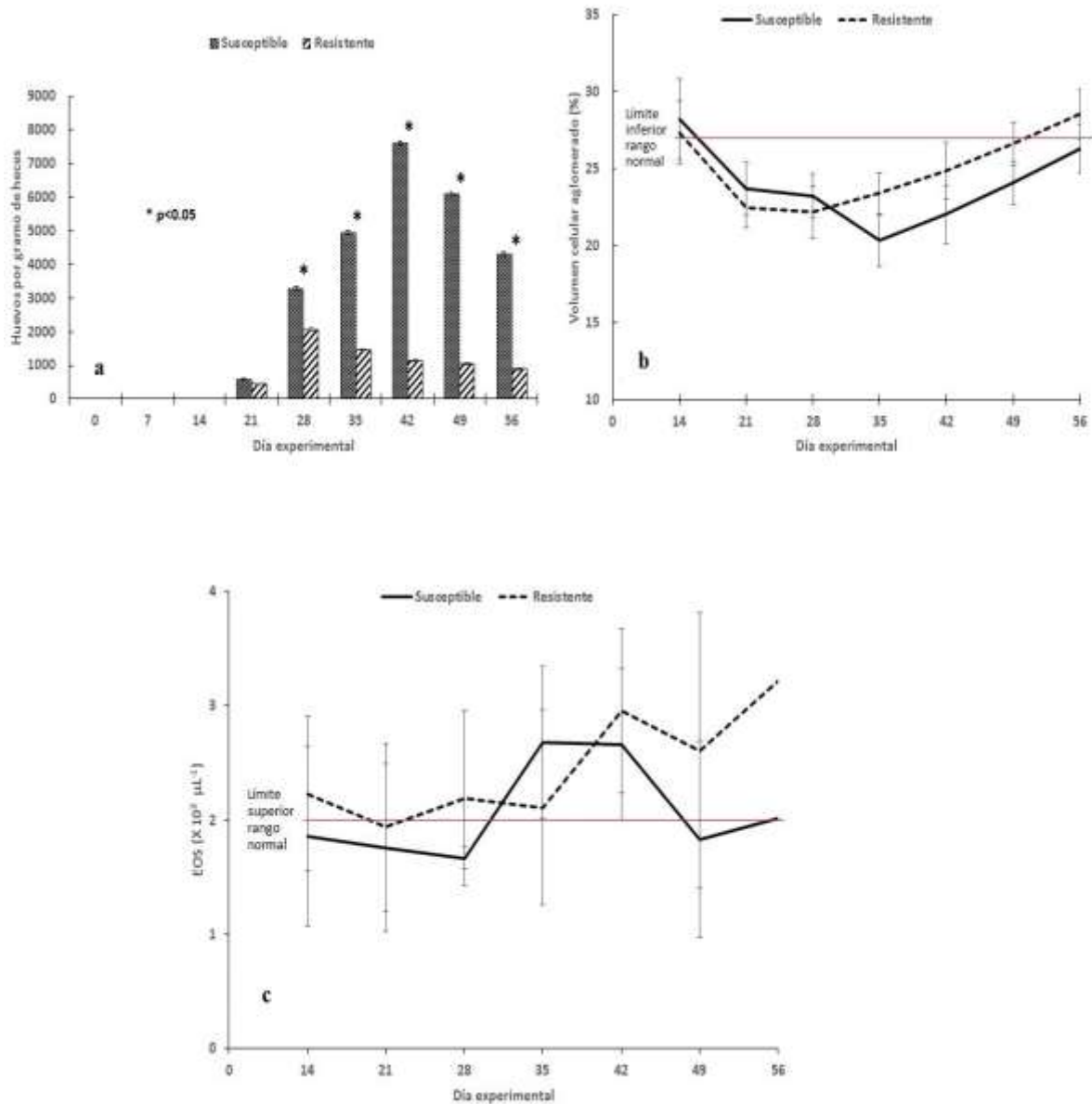


Figura 2. Medias y error estándar de parámetros fenotípicos por día experimental en corderos resistentes y susceptibles infectados experimentalmente con 6000 L₃ de *H. contortus*. (a) Conteo fecal de huevos (FEC), (b) Volumen celular aglomerado (VCA) y (c) Eosinófilos (EOS).

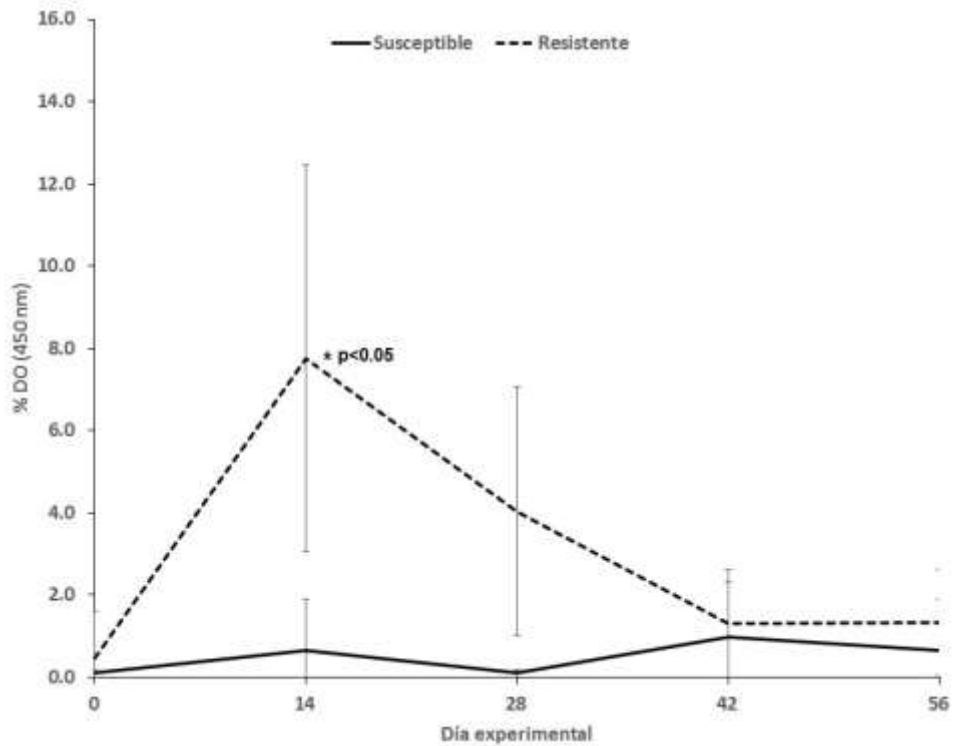


Figura 3. Medias y error estándar de la actividad de IgA por día experimental en corderos resistentes y susceptibles infectados experimentalmente con 6000 L₃ de *H. contortus*.

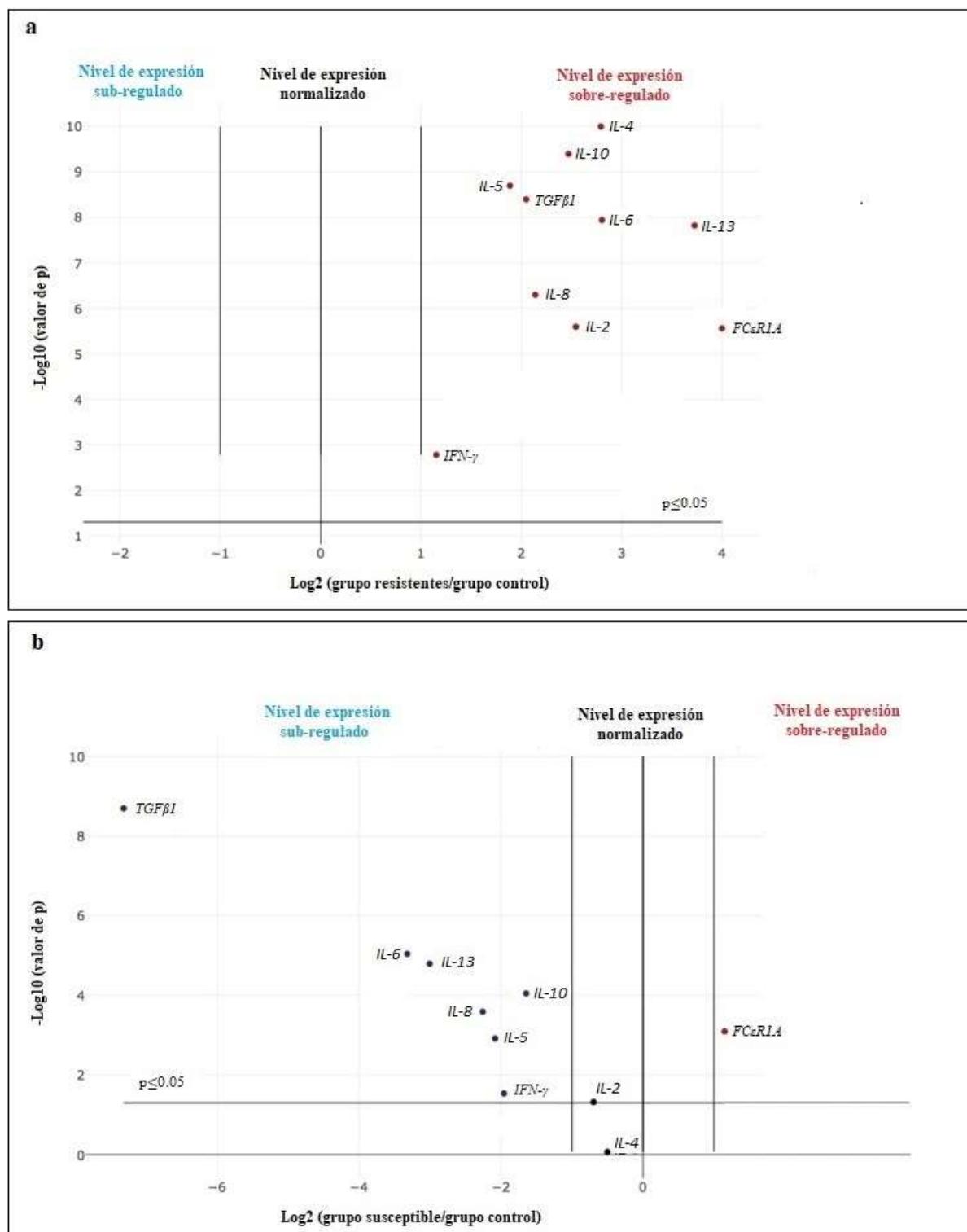


Figura 4. Expresión normalizada, sub-regulada y sobre-regulada de genes de nueve citocinas y el receptor de IgE en corderos resistentes (a) y susceptibles (b) infectados experimentalmente con 6000 L₃ de *H. contortus*.

Anexo 1. Procedimientos para cuantificar la expresión génica.

Extracción, concentración e integridad de RNA total

La extracción de RNA total se realizó con kit comercial Tempus Spin RNA Isolation (Applied Biosystems, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad y pureza de las muestras se determinaron con base en la concentración y contaminación de residuos fenólicos y de proteínas usando un espectrofotómetro a 260:280 nm (NanoDrop 1000, Thermo Scientific, USA). La integridad del RNA total (fragmentos 28s y 18s) se confirmó por electroforesis horizontal con agarosa al 1.5% y buffer TAE 1X siendo las condiciones de la cámara de 90V por 30 minutos.

Eliminación de DNA genómico y síntesis de cDNA

La descontaminación del DNA genómico (DNAg) se realizó con kit comercial (RQ1-RNase-Free Dnase, Promega, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La síntesis de cDNA se realizó con kit comercial (ImProm-II Reverse Transcription, Promega, USA) con la finalidad de contar con muestras de calidad con base en los transcritos maduros con colas polidT-Oligo (dT). En cada muestra se utilizó 250 ng y 1 µl de un master mix, después se dejó incubar de acuerdo a los siguientes 3 ciclos (5 min a 25 °C >>60 min a 42 °C >>15 min a 70 °C) en un termociclador. Al final se cuantificó el DNA genómico en espectrofotómetro con una relación de absorbancia de 260:280 nm (NanoDrop 1000, Thermo Scientific, USA).

RT-qPCR y cuantificación de la expresión génica

La expresión de los genes se cuantificó usando el Rotor-Gene Q y termociclador RT-qPCR 6000 (Qiagen, Hilden, Germany) bajo las siguientes condiciones (1 ciclo desnaturalización, 95 °C 10 min >>45 ciclos alineamiento 95 °C 15 seg; y extensión 60 °C 45 seg>>1 ciclo temperatura de fusión rampa 65-95 °C). Para analizar los datos de expresión se utilizó el valor de corte C_T (threshold cycle) de 0.1. Los valores de la expresión relativa se analizaron con el software bioinformático Data Analysis Center, Qiagen (<https://www.qiagen.com/mx/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>) usando los valores de C_T de genes asociados a la

infección por *H. contortus* y genes endógenos, así como datos del grupo testigo sin infectar. La normalización de datos se realizó utilizando los valores de C_T del grupo testigo mediante la $\Delta\Delta C_T$ (cambio en la regulación de la expresión de los genes de interés con respecto a los genes constitutivos) que resulta del cociente de $\Delta\Delta C_T$ de los animales experimentales con respecto a los testigos. Con este cociente se obtuvo el Fold Change (cambio en la expresión de cada gen).

DISCUSIÓN GENERAL

La selección de ovinos resistentes a NGI es ampliamente aceptada como una opción adicional al uso de antihelmínticos para su control, ya que los individuos resistentes poseen la capacidad de reducir el parasitismo, además de que su baja excreción de huevos da lugar a una menor contaminación de las praderas y por consecuencia menos costos por tratamientos antihelmínticos, mantenimiento de la eficacia de los principios activos y reducción de la población de parásitos con resistencia antihelmíntica. En México, la raza Pelibuey ha sido una de las principales razas de pelo adaptadas a climas cálidos y con ello con resistencia a los principales parásitos que afectan a los ovinos como son: *H. contortus*, *Trichostrongylus colubriformis* y *Cooperia curticei*. Los conteos fecales de huevos de nematodos presentan alta variación dentro de las razas y entre rebaños debido principalmente a efectos ambientales, nutricionales y manejo de la pradera. Sin embargo, existe variabilidad genética suficiente para que a través de individuos resistentes se reduzcan los conteos fecales de huevos y con ello se realice un programa de selección para mejorar genéticamente este rasgo. Para seleccionar a los individuos resistentes de la manera más acertada se requiere necesariamente generar en animales jóvenes la infección y monitorear el desarrollo de la inmunidad correspondiente. Considerando lo anterior la hipótesis planteada fue que los corderos Pelibuey infectados por *H. contortus* y otros NGI que muestran resistencia genética, tienen menores conteos fecales de huevos, mayores valores hematológicos y mayor expresión de genes asociados a la respuesta inmune que evita o reduce los efectos en la salud de los animales, en comparación con los animales susceptibles e intermedios.

Para contestar la hipótesis se plantearon tres objetivos: i) Comparar dos modelos de segregación para identificar la resistencia fenotípica posterior a una infección natural con NGI en ovejas en desarrollo, ii) Evaluar el grado de resistencia fenotípica en corderos infectados experimentalmente con *H. contortus* y reinfectados naturalmente con NGI durante el pastoreo y iii) Caracterizar la expresión de genes de nueve citocinas y el receptor de IgE *FCεRI1A* en corderos resistentes y susceptibles infectados experimentalmente con *H. contortus*.

El primer objetivo se logró en el primer experimento donde fue posible segregar 22 corderas resistentes, 10 corderas susceptibles y 8 corderas intermedias de un rebaño de 40 infectadas

naturalmente con NGI. El modelo de segregación más adecuado del estudio fue el de Morteo-Gómez *et al.* (2004), que permitió clasificar a los individuos resistentes como aquellos con los conteos más bajos y en el cual se incluyeron todas las corderas que no tuvieron excreción de huevos de nematodos mientras que el otro modelo estudiado (Palomo-Couoh *et al.*, 2016) considera esos conteos como falsos negativos y por lo tanto el modelo es de baja sensibilidad dejando fuera del grupo de resistentes a 12 corderas del 22 segregadas por el primer modelo. El primer modelo fue la referencia para segregar individuos en los subsecuentes experimentos. También se encontró en las corderas resistentes un elevado valor de los marcadores fenotípicos volumen celular aglomerado y proteína plasmática total que deben ser considerados en la selección fenotípica de individuos resistentes a NGI. Es importante hacer notar que la selección de corderos debe realizarse en poblaciones contemporáneas, debido a que los factores ambientales pueden superar a los efectos genéticos,

El segundo objetivo se alcanzó en el segundo experimento donde fue posible evaluar el grado de resistencia innata y adquirida a *H. contortus* y a otros NGI en un rebaño de 29 corderos, donde inicialmente fueron segregados con base al FEC nueve corderos resistentes, seis corderos susceptibles y catorce corderos intermedios. En este estudio se estimó el desarrollo de resistencia medido a través de la reducción en el conteo de FEC (grado de resistencia), a partir del valor máximo registrado y el valor de FEC al día 70 post infección. Los valores de reducción fueron de 75.5%, 65.1% y 62.6% respectivamente en la primera fase de infección experimental con 6000 L₃ *H. contortus*. Importante fue la habilidad de los corderos resistentes al controlar el establecimiento de los parásitos en el abomaso al mostrar una rápida respuesta inmune, lo cual se reflejó en el pico del FEC que ocurrió en el día 28 post infección contra el día 42 para corderos susceptibles y día 49 para corderos intermedios. En una segunda infección con NGI la reducción del FEC debido a la resistencia adquirida fue mayor al 94.4% en todos los grupos de corderos segregados. Igual que en el primer experimento, la proteína plasmática total fue mayor para corderos resistentes, la cual puede considerarse como un marcador fenotípico de resistencia a NGI. Estos corderos resistentes pueden ser seleccionados para integrar un rebaño genéticamente resistente a NGI, lo que permitirá poner en menor riesgo la salud de los corderos.

El tercer objetivo se logró en el tercer experimento donde fue posible caracterizar la expresión de genes asociados a la respuesta inmune y de un receptor de la IgE en los corderos infectados experimentalmente con *H. contortus*. Las categorías analizadas incluyeron a los corderos segregados como resistentes (n=9) y susceptibles (n=6). Se determinó que la expresión de los genes de *IL-4*, *IL-5* y *FCεRI1* en el grupo de corderos resistentes fue mayor respecto a los corderos susceptibles, por lo que se sugiere la posibilidad de utilizar la expresión de ellos como marcadores genéticos en la selección de ovinos Pelibuey con fenotipo de resistencia a nematodos gastrointestinales altamente patógenos como es *H. contortus*.

Con los resultados obtenidos se pudo confirmar la alta resistencia contra NGI que presentan los ovinos Pelibuey. Al segregar un grupo contemporáneo se observó que un 55% de los animales se clasificaron como resistentes, por lo que un aporte importante es determinar en primera instancia un método con el cual se puedan identificar aquellos animales que presenten la característica, por lo que quedó establecida una metodología que comparada con la de cuartiles permite seleccionar animales con algún grado de resistencia, otras metodologías que se han estudiado incluyen valores tan arbitrarios como elegir corderos con más de 1000 HPG y otros que eligen valores de cuartiles y deciles que no reflejan la distribución apropiada para elegir animales. También se contribuyó en el conocimiento del grado de resistencia que es posible obtener después de una infección experimental con un alto desafío, con la que se permitió generar resistencia adquirida y demostrar que la resistencia natural puede permitir hasta un 94 % de reducción en el conteo fecal de huevos de nematodos. Lo cual puede resultar en una forma natural de desarrollar inmunidad protectora contra nematodos y con ello la posibilidad de diseñar un modelo en el que se desarrolle inmunidad adquirida por medio de una infección experimental o natural y posteriormente una segunda infección que permitirá desarrollar la inmunidad adquirida y reforzar la protección y finalmente los animales podrán mandarse a pastoreo con las menores posibilidades de riesgo a su salud al desarrollar la resistencia contra NGI.

El estudio tiene utilidad científica al generarse información básica de marcadores moleculares que pueden ser candidatos para usarse para diferenciar animales resistentes de susceptibles y asociarlos al volumen celular aglomerado y la proteína plasmática. Con los datos obtenidos se avanza en la construcción de un índice de selección combinando algunos de los

marcadores como por ejemplo huevos por gramo de heces más proteína plasmática y además alguna de las interleucinas estudiadas.

Aunque el mejoramiento para la resistencia a NGI es posible ya que existe variación genética (individuos con bajo FEC) y una h^2 considerada de baja a moderada, con los productores ha sido difícil implementar los procedimientos convencionales para el mejoramiento de esta característica en los sistemas de producción de ovinos de pelo en condiciones tropicales de nuestro país, debido principalmente a que las unidades de producción son pequeñas, la falta de registros de producción, apareamientos no planificados y por tanto carencia de datos genealógicos. Sin embargo, existe la posibilidad de llevar a la práctica los resultados obtenidos a través de protocolos de infección natural en los que se promueva el desarrollo de resistencia adquirida, por lo que la selección después de la primera infección es muy importante para elegir aquellos animales con resistencia o bien descartar los de mayor susceptibilidad que son los que poseen el riesgo de perder la vida por efecto de la parasitosis.

Debido a las complicaciones técnicas que existen las metodologías son más apropiadas para rebaños con un número grande de animales para realizar una selección más intensa y con ello elegir a los animales con mayor resistencia, lo que se ha correlacionado con variables productivas como la ganancia de peso y de esta forma los rebaños seleccionados por mayor productividad pueden tener también mayor resistencia hacia los NGI. Con el estudio se mostró que en la segunda infección con NGI, los ovinos fueron capaces de montar una respuesta inmune tan fuerte que la infección no prospero a pesar de estar los animales en pastoreo, lo que permite el menor uso de antihelmínticos y con ello el desarrollo de resistencia. Esta metodología puede ser acondicionada con otras más como es la suplementación de energía para lograr desarrollar de manera natural la resistencia adquirida y reducir el uso de antihelmínticos, asociado a la detección y eliminación de animales muy susceptibles.

En protocolos experimentales es posible desafiar con L_3 de *H. contortus* y otros NGI, a los corderos/corderas de 4 a 5 meses de edad para evidenciar aquellos que presentan alto grado de inmunidad (resistencia). El uso de la expresión relativa de *IL-5* como marcador de resistencia a NGI en corderos infectados con 6000 L_3 de *H. contortus* es posible ya que esta interleucina está

fuertemente asociada a una disminución del FEC debido a una fuerte respuesta inmune T_H2 después de la infección artificial. Sin embargo, estos protocolos generalmente no son aplicables por productores por los costos que se generan.

Es deseable la intervención de programas gubernamentales asociados a la crianza y mejora de la resistencia, para ello, la combinación de protocolos experimentales y otros prácticos permitiría que los animales identificados como resistentes por su elevada expresión relativa de *IL-5* pudieran formar un núcleo básico y aparearse en su momento con sementales identificados como resistentes a NGI para poder esperar una prole con alta probabilidad de mantener ese rasgo. Posteriormente con la descendencia es deseable entonces llevar los registros productivos, genealógicos y monitorear el FEC, sobre todo para estar alerta de alguna respuesta correlacionada entre un bajo FEC y alguna característica de producción como la tasa de crecimiento. Se espera un mejoramiento en la resistencia a NGI a través del tiempo debido a que las crías cada vez estarán menos expuestas a la contaminación de las praderas por L_3 por disminución paulatina del FEC. Además, es necesario planear los apareamientos para mantener las características deseables y finalmente la distribución de sementales entre los productores para difundir la característica seleccionada.

CONCLUSIÓN GENERAL

Se determinó que el mejor modelo de segregación de ovinos Pelibuey fue utilizando la media menos tres errores estándar para identificar corderos con resistencia a *H. contortus* y a otros NGI. Se estableció que una infección experimental de 6000 L₃ de *H. contortus* es capaz de generar resistencia hacia nematodos gastrointestinales medida en una reducción del 75.5% en el conteo fecal de huevos y hasta un 94.4% de reducción después de la re-infección natural en pastoreo. Se determinó que la *IL-4*, *IL-5* y *FCεRI1A* pueden fungir como marcadores genéticos al resultar sobre expresado en corderos resistentes, por lo que son adecuados para incluirlos en la selección de animales resistentes a NGI.

Referencias

- Morteo-Gómez R, González-Garduño R, Torres-Hernández G, Nuncio-Ochoa G, Becerril-Pérez C, et al. 2004. Efecto de la variación fenotípica en la resistencia de corderos Pelibuey a la infestación con nematodos gastrointestinales. *Agrociencia* 38, 395-404.
- Palomo-Couoh JG, Aguilar-Caballero AJ, Torres-Acosta JF, Magaña-Monforte JG. 2016. Evaluation of different models to segregate Pelibuey and Katahdin ewes into resistant or susceptible to gastrointestinal nematodes. *Trop Animal Health Prod* 48(8), 1517-1524