

“Evaluación inmunológica de ovinos resistentes y susceptibles a la infestación por el nemátodo *Haemonchus contortus*”

Maestría en Ciencias Biológicas
Opción Biología Celular y Molecular
Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas
Facultad de Ciencias
Universidad de la República
Montevideo, Uruguay

Méd. Vet. Cecilia Soledad Escribano

Orientadora: Dra. Teresa Freire Gard
Co-orientadores: Dr. (MSc.) Daniel Castells Montes
Ing. Agr. (Ph.D.) Gabriel Ciappesoni

Grupo de Inmunomodulación y Desarrollo de vacunas, Departamento de
Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República
Plataforma de Salud Animal, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
Centro de Investigación y Experimentación “Dr. Alejandro Gallinal”, Secretariado
Uruguayo de la Lana



PEDECIBA

Abril de 2019

Agradecimientos

A los seres que comparten conmigo la vida. Al compañero de camino de amor infinito y paciencia inagotable, Leo, pilar fundamental para llegar a esta instancia en muchos sentidos. Por hacerme la vida más fácil en los corrales del experimento y en los de la vida. Gracias por mostrarme lo que no puedo ver y sostener las ausencias y frustraciones en el camino. A Balú y Ñinca, que con sus miradas lo dicen todo y me enseñan que la felicidad está en la simple presencia. Ñinca, estarás moviendo la cola desde algún lugar, gracias por esperarme para compartir caricias y juegos antes de emprender tu “viaje”. Te extrañamos...

A la familia de la cual provengo y a la abrazada en el camino, que de miles de maneras acompañan y apoyan cada día con amor, son parte de esta tesis. Particularmente a mis padres, ellos sembraron en mí alas, yo las cultivo y aprendo a usarlas cada día. Te extraño papi...

A Rosina, gran compañera y una hermosa amistad que me brindó Uruguay. Pilar fundamental del experimento en el SUL.

A Monique, por su colaboración en el campo y en el laboratorio, por su amistad y las hermosas charlas de camioneta.

A mis orientadores y en particular a Teresa, por su presencia constante y comprensión más allá de lo académico.

A los chicos del laboratorio de Facultad de Medicina, siempre dispuestos a ayudarme y orientarme en ese enorme mundo. Gracias Vero, Flor, Vale, Lucía, Sofi y Miguel, no sólo por lo técnico sino también por buena energía.

A toda la “barra” del SUL por su actitud dispuesta y amigable siempre y por ocuparse de los animales cuando yo no estaba.

A toda la Plataforma de Salud animal, por hacerme sentir parte y ofrecer siempre sonrisas al regresar. A Anderson particularmente, por su enorme trabajo, desde el corral al laboratorio, aprendí muchísimo. Gracias tantas horas robadas a su familia, a quienes también agradezco, y por manejar largas horas, aunque no fuera el mejor copiloto. A Yisell, por compartirme su lugar de trabajo y soportar el caos que armaba, por ayudarme con todo cuanto necesitara y tanta confianza compartida. A Ceci, “la Mone”, también por su enorme ayuda en el laboratorio, simplificando mi tarea, y también por su docencia en preparación de soluciones, además de las hermosas charlas compartidas. A Martín por su disponibilidad y buena energía.

A Laura C., con quien vamos encontrándonos en distintos puntos de nuestros trayectos por este mundo y compartimos andares.

Al Laboratorio Analítico Agropecuario Al Norte, por su disposición y eficiencia en el servicio prestado.

A mis ex compañeros de INTA, por el impulso, consciente o inconsciente, para emprender vuelo.

A las amistades tan valiosas que dejé atrás sólo en el sentido espacial, para hacer este trayecto y a la comunidad que me recibió tan amable y desinteresadamente cuando llegué a Uruguay.

Gracias infinitas a todos, porque nada hacemos solos y esa es la maestría de la vida entre otras cosas para mí.

“Basta mirar la vida con ojos de artista para ver que las historias y los personajes se relacionan entre sí con un sincronismo curioso y bello. Sólo hay que mirar con arte para verlo.” Ciruelo.

“El verdadero valor de un hombre Se determina según una sola norma: en qué grado y con qué objetivo se ha liberado de su Yo.” Albert Einstein.

“...al hombre se le puede arrebatar todo salvo una cosa: la última de las libertades humanas — la elección de la actitud personal ante un conjunto de circunstancias— para decidir su propio camino.” Viktor Frankl

Resumen

Las helmintiasis en animales de producción representan un importante problema socioeconómico. Es el caso de los nemátodos, por las pérdidas productivas que ocasionan en el ganado. Estas parasitosis ocasionan una disminución de la producción, aumento de los costos productivos y muertes. Entre los nemátodos gastrointestinales (NGI) de mayor prevalencia en ovinos en Uruguay, se encuentra *Haemonchus contortus* el cual causa muertes y pérdidas productivas importantes.

Dentro de la interacción parásito-hospedador, existe variabilidad individual en cuanto a la susceptibilidad y resistencia de estos últimos a la infestación parasitaria, regido por sus bases genéticas. En este sentido, se comenzó a trabajar, inicialmente en Australia en la selección de animales resistentes y susceptibles, para generar líneas genéticas divergentes en esta característica. En Uruguay, dada la creciente resistencia antihelmíntica observada por los NGI más frecuentes y más patógenos, se comenzaron los estudios de resistencia en la raza Corriedale a partir de 1994, lo cual derivó en la generación de dos líneas divergentes de ovinos: una con resistencia a la infección por *H. contortus* y otra susceptible.

El objetivo de esta tesis fue evaluar la respuesta inmune de ambas líneas de ovinos y la cruce de una raza de origen australiano, Merino Rylington, con Corriedale resistente (Rylington/Corriedale), durante un período de infestación por *H. contortus*. Se realizaron infestaciones experimentales con este nemátodo de ovinos resistentes y susceptibles y se obtuvieron muestras de plasma para analizar proporción de glóbulos rojos, blancos, linfocitos, eosinófilos, entre otros durante todo el transcurso de la infestación. Además, se pusieron a punto los inmunoensayos para la detección de anticuerpos IgA e IgG específicos del parásito presentes en saliva y plasma y se evaluó el título de anticuerpos durante todo el período. Por último, se evaluó la expresión relativa de citoquinas vinculadas a la respuesta inmune de tipo Th2, IL-4, IL-5, IL-13 y TNF- α en células mononucleares de sangre periférica.

De este trabajo se desprende que los animales resistentes poseen títulos de anticuerpos IgA específicos del parásito desde el inicio de la infestación, mientras que los susceptibles poseen una respuesta tardía, presentando altos títulos de anticuerpos únicamente cuando la infestación se encuentra en etapas avanzadas. A su vez, se observa una respuesta de citoquinas diferenciada entre los ovinos resistentes, Rylington/Corriedale y Corriedale, pero que en ambos casos son reflejo de una respuesta inmune de tipo 2 aumentada.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que existe una respuesta inmune diferenciada en cada grupo de ovinos evaluado, sugiriendo mecanismos inmunológicos diferentes en cada uno de ellos. Comprobamos la posibilidad de detectar dicha respuesta a través de las IgA específicas en saliva, siendo este procedimiento poco invasivo y con tecnología local disponible. Nuestro trabajo es relevante en el área de la producción ovina de Uruguay, y contribuye eventualmente al desarrollo de herramientas biotecnológicas como la selección de animales resistentes y, eventualmente, el desarrollo de tecnologías destinadas a la prevención como, por ejemplo, vacunas.

Tabla de contenido

Agradecimientos	1
Resumen	5
INTRODUCCIÓN	8
Fundamentación y antecedentes	8
I. Importancia de los nemátodos gastrointestinales a nivel productivo.....	8
II. <i>Haemonchus contortus</i>	9
1. Características generales	9
2. Patogenia.....	10
III. Inmunidad contra NGI	10
IV. Evasión de la respuesta inmune por <i>H. contortus</i>	12
V. Herramientas de control de infestación por NGI, incluyendo <i>H. contortus</i>	12
VI. Susceptibilidad y resistencia genética a NGI.....	13
VII. Características de la respuesta inmunológica inducida por <i>H. contortus</i> en líneas de ovinos susceptibles y resistentes.....	14
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS	16
Objetivo general	16
Objetivos específicos	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Ovinos	17
Cultivo de larvas de <i>H. contortus</i>	17
Coprocultivos	17
Mantenimiento de L3	19
Preparación de lisados parasitarios	19
Infestación experimental.....	20
Toma de muestras	20
Análisis coprológico por técnica de McMaster	20
Hematología.....	20
Inmunidad humoral.....	21
Determinación de citoquinas en células mononucleares de sangre periférica	21
Análisis estadístico	22
RESULTADOS	23
Parte I: Análisis de la respuesta inmune en ovinos Corriedale Resistentes y Susceptibles infestados experimentalmente	23
Análisis de leucocitos en sangre	36

Análisis de la respuesta inmune humoral	43
Inmunoglobulina A en saliva	44
Inmunoglobulina A en plasma	47
Inmunoglobulina G en plasma	51
Parte II	56
Análisis de la respuesta inmune en ovinos Rylington/Corriedale resistentes infestados experimentalmente	56
Análisis de leucocitos en sangre	61
Análisis de la respuesta inmune humoral	64
Inmunoglobulina A en saliva	64
Inmunoglobulina A en plasma	69
Inmunoglobulina G en plasma	74
Parte III: Análisis de la respuesta inmune celular	79
DISCUSIÓN	82
CONCLUSIONES GENERALES	90
BIBLIOGRAFIA	91

INTRODUCCIÓN

Fundamentación y antecedentes

I. Importancia de los nemátodos gastrointestinales a nivel productivo

Las helmintiasis en animales de producción representan un importante problema socioeconómico (Araújo y Madruga, 2001). Es el caso de los cestodos y tremátodos, por su implicancia en salud pública dado su potencial zoonótico, y los nemátodos, por las pérdidas productivas que ocasionan en el ganado. Estas parasitosis ocasionan una disminución de la producción, aumento de los costos productivos y muertes (Miller & Horohov, 2006). La mortalidad causada por las parasitosis es la forma de presentación clínica más extrema, pero la disminución de la producción de lana, carne y leche generada por las presentaciones clínicas agudas y crónicas, son de gran importancia. Los diferentes mecanismos patogénicos de las parasitosis generan disminución del apetito, de la digestibilidad de la proteína cruda, pérdida de proteína endógena, interferencia con la absorción, alteración en la síntesis de tejido corporal y alteración del metabolismo mineral, factores claves en el crecimiento y desarrollo de los animales, provocando efectos permanentes. A su vez, se produce una disminución en la eficiencia de conversión y cambio en la calidad de la res, generando un gran impacto en la producción ganadera (Giudici et al., 2013).

Entre los nemátodos gastrointestinales (NGI) de mayor prevalencia en ovinos en Uruguay, se encuentran el *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis* (Castells, 2004; Araújo y Madruga, 2001). Sin embargo, *H. contortus* es considerado el parásito más patogénico de los pequeños rumiantes (Peter & Chandrawathani, 2005), y representa el 35,1% de las infestaciones por NGI en ovinos de Uruguay (Castells et al., 2011), causando muertes y pérdidas productivas importantes. Según una experiencia llevada adelante por Castells y Nari (1996), los efectos de los NGI en las etapas de recría, no sólo se relacionan a una elevada mortalidad (50%) sino con pérdidas en el peso vivo (PV) (24%), y alteración de parámetros vinculados a la calidad de lana, peso de vellón sucio (PVS) (29%), largo de mecha (LM) (11%) y diámetro de fibra (D) (6%). También se reportó que la afectación en esta etapa del desarrollo del animal provocó efectos permanentes sobre el desarrollo final. A su vez, Fernández Abella (2006) encontró un efecto marcado del nivel de parasitosis sobre parámetros reproductivos como tasa ovulatoria (15-21%), significativa disminución de fertilidad, aumento en las pérdidas embrionarias y disminución marcada de la fecundidad. A ello también se le suma el desarrollo de resistencia anti-helmíntica que dificulta su control: 92,5% de los establecimientos relevados en Uruguay presentaron algún grado de resistencia a las drogas anti-parasitarias (Nari et al., 1996). Estudios desarrollados por el Secretariado Uruguayo de Lana (SUL, Florida) a principios de 1990, mostraron que, de no mediar tratamientos, en el primer año de vida la mortalidad puede llegar al 50%; el peso vivo afectarse hasta en un 23,6% y la producción de lana reducirse en un 29,4% (Castells & Nari, 1996).

II. *Haemonchus contortus*

1. Características generales

H. contortus es un nemátodo de la Clase Secernentea, Orden Strongylida, Superfamilia Trichostrongyloidea, Familia Trichostrongylidae, Subfamilia Haemonchinae. Se caracteriza por estómago retorcido y rojizo, debido a su carácter hematófago. Se describe su presencia en ovinos, caprinos, bovinos, bisones y venado (Anderson, 2000). Habita en climas templados, tropicales y subtropicales. Presenta un elevado potencial biótico, es decir que la hembra elimina miles de huevos por día, que en buenas condiciones de temperatura y humedad permiten la continuidad de entre cuatro a cinco generaciones anuales (Giudici et al., 2013). Su ciclo vital, como se visualiza en la figura 1, consiste en una etapa de contaminación, dentro del hospedador definitivo (ovino, entre otros), donde madura hasta producir los huevos que se eliminan por materia fecal para pasar a una fase exógena, con larvas de vida libre, que se encuentran en la pastura (Suárez et al., 2007). Luego realiza sus mudas a Larva 1 (L1), Larva 2 (L2), alcanzando su estadio infestante, Larva 3 (L3), en 10 a 14 días en climas cálidos. Las larvas de vida libre migran sobre la película acuosa de las hojas de los pastos en condiciones de humedad, donde el animal las ingiere con su alimentación. Una vez ingresado en el hospedador, las larvas se ubican en el abomaso donde mudan a L4, insertándose en la mucosa, desarrollando finalmente el estadio adulto (L5) (Selemon, 2018).

***Haemonchus* - Ciclo de vida**

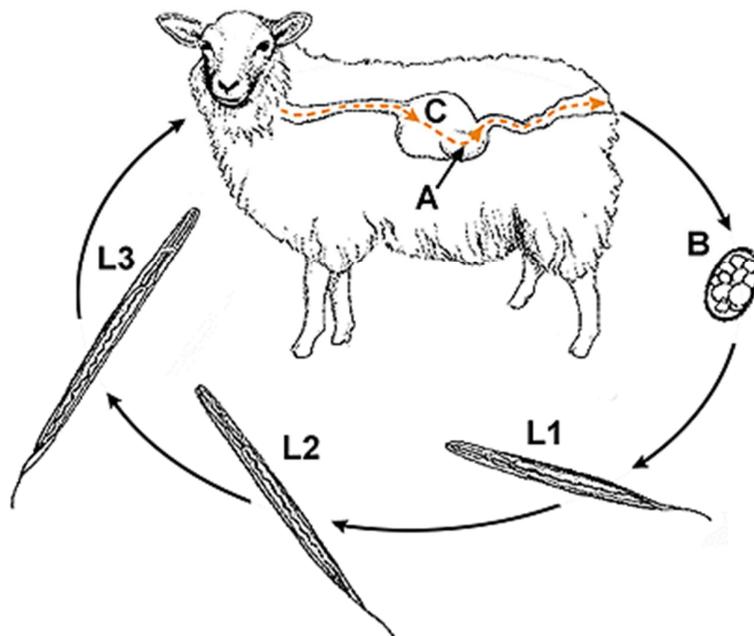


Figura 1: Ciclo biológico de *H. contortus*. A: Ubicación del adulto. B: Huevo tipo estróngilo. C: L3 desenvaina en el rumen (Johnstone, 1998)

2. Patogenia

El mecanismo patogénico del *Haemonchus spp.* está basado principalmente en la acción expoliatriz, que implica la utilización de los tejidos del hospedador para la alimentación del parásito, en este caso, hematofagia (Vignau et al., 2005) a nivel del abomaso por parte del cuarto estadio larvario (L4) y los adultos. La pérdida de sangre no sólo ocurre por la succión del parásito en sí mismo, sino también porque éste produce una sustancia anti-coagulante que impide la rápida hemostasia de los capilares, con lo que permanecen perdiendo sangre posterior a la alimentación del nemátodo. Como consecuencia, se producen anemias hemorrágicas, que pueden llegar a ser clínicas incluso antes de ser detectada la infestación por la presencia de huevos en las materias fecales, dependiendo del grado de carga parasitaria cursante (Johnstone, 1998).

Desde el punto de vista clínico, los animales infestados por *H. contortus* presentan anemia como signo principal, en tres tipos de cuadros: hiperagudo, con muerte repentina; agudo, con debilidad y mucosas pálidas; y crónico, donde se evidencian bajas ganancias de peso y menores tasas de crecimiento (Johnstone, 1998), entre otros efectos que se mencionan en el siguiente apartado.

Al examen clínico, los animales infestados muestran diversos grados de palidez en mucosas, que se correlacionan con el nivel de infestación. Esto tiene un valor diagnóstico práctico metodizado a través de la técnica de FAMACHA (Castells et al., 2013). Los hallazgos de necropsia se corresponden a los cuadros anémicos originados por hemorragia, con decoloración de tejidos y edemas, expansión de médula ósea y lesiones abomasales producto de la acción patogénica del parásito, junto con un contenido pardo y diversas cantidades de parásitos (Johnstone, 1998).

III. Inmunidad contra NGI

En paralelo a la infestación de *H. contortus*, se comienzan a desencadenar una serie de eventos moleculares y celulares en el hospedero que conducen a la puesta en marcha de los mecanismos efectores inmunes innatos y posterior activación de la respuesta inmune adquirida específica. La respuesta inmune específica contra *H. contortus* ha sido descrita como lenta e inestable, sin una fuerte vinculación con la edad y con una marcada relajación periparturienta, que es responsable de un aumento de huevos del parásito en las materias fecales, denominada alza de lactación. Las sucesivas mudas de las larvas generan antígenos que son detectados en la mucosa abomasal provocando la secreción de una serie de citoquinas que estimulan la diferenciación de linfocitos T (LT) CD4⁺ orientando la respuesta hacia los LTh2 asociada a la producción de IL-4, IL-5, IL-10, L-13, TNF α , las cuales estimulan la activación y proliferación de eosinófilos, basófilos y mastocitos, a la vez que linfocitos B (LB) productores de inmunoglobulinas, particularmente IgA, IgE e IgG1 (Alba-Hurtado & Muñoz-Guzmán, 2013; Li et al., 2012), constituyendo así una respuesta inmune adaptativa efectiva a nivel sistémico. La inmunidad a nivel de la mucosa abomasal consiste en la infiltración de neutrófilos, eosinófilos, mastocitos y la acción del sistema de complemento, además de la concentración de IgA e IgE en el mucus.

La IgA a nivel general, tiene como rol principal la exclusión de patógenos a nivel de mucosas (Tizard, 2013). Específicamente, en infestaciones parasitarias de trichostrongylidos podrían actuar mediante la inmovilización de larvas en agregados que luego son eliminados por peristaltismo (Harrison et al., 2003), activación del complemento, supresión de la producción de huevos (McCoy et al., 2008), entre otros. En ovejas se pudo demostrar el incremento de las IgA en suero y su correlación con su concentración en mucus gástrico, frente a *Teladorsagia*

circumcincta (Martínez-Valladares et al., 2005). La mayor parte de la IgA sérica es producida en la mucosa intestinal, dado que es el isotipo que mayor implicancia tiene en la respuesta inmune a ese nivel. Es por ello que niveles elevados de IgA en suero son asociados positivamente a la resistencia de los animales a los NGI (Mcrae et al., 2015). Dicha resistencia, según Mcrae, consiste en la limitación del crecimiento, desarrollo y fecundidad del parásito mediada por la IgA contra L4. Bowdridge (2013) comprobó una correlación entre los niveles de IgA totales en suero y la cantidad de Huevos Por Gramo de materia fecal (HPG) en ovejas de pelo periparturientas, a su vez que encontró mayores niveles de IgA específicas para *H. contortus* en estas ovejas resistentes que en razas susceptibles laneras.

En el caso de la IgG, no está claro aún su rol directo sobre el control de la carga parasitaria (Williams, 2011). Según McCoy y col. (2008) podría tener más relevancia en evitar el desarrollo de los parásitos adultos. Sin embargo Harrison y col. (2008) describieron una fuerte afinidad de las IgG a ciertas glicoproteínas de superficie de las L3 de nemátodos strongylidos. Lo cierto es que se han descrito incrementos en este isotipo en ovinos desafiados con diferentes especies de NGI y correlaciones negativas entre elevados niveles de IgG y HPG en líneas de ovinos seleccionados (Mcrae et al., 2015) y cargas parasitarias de *T. circumcincta* (Williams et al., 2010).

Finalmente, la IgE, está asociada a la citotoxicidad mediada por células (eosinófilos y mastocitos). Se produce un fenómeno de hipersensibilidad de tipo I que, si es rápido, logra expulsar las larvas, fenómeno conocido como de autocuración, o retardado, pero específico. A su vez, la degranulación de eosinófilos, mastocitos y basófilos, tanto por la vía innata o inespecífica como por la adquirida, genera aumento de la permeabilidad de la mucosa gastroentérica, aumento de la secreción de mucus, quimiotaxis y coagulación por acción de proteasas, prostaglandinas, serotonina e histamina (Giudici et al., 2013). La presencia de histamina y leucotrienos inhibe la motilidad parasitaria y promueve la hipersecreción e hipermotilidad abomasal, todos mecanismos contribuyentes a la eliminación de estos parásitos. Según Mcrae y col. (2015) los LT γ/δ , mediante la producción de IL-4 e IL-25, estimulan la respuesta de tipo Th2, cuyas células a su vez, producen IL-4 e IL-13, responsables de la producción de IgE, quien, como se mencionó, tiene una importancia clave en el control de la carga de parásitos adultos a nivel de mucosa.

Los efectos de la inmunidad sobre el parásito no sólo están marcados por la expulsión de los mismos, sino que se reportan disminución del tamaño, aumento del tiempo de prepatencia, inhibición del desarrollo reproductivo y del número de huevos en las hembras parásitas. Cabe destacar que existen muchos factores vinculados al animal que afectan la efectividad de la respuesta inmune, como condiciones estresantes, parto, lactancia e infecciones concomitantes, así como también factores genéticos (Giudici et al., 2013). Nisbet y colaboradores (2016) describen mecanismos bien diferenciados de inmunoprotección para el establecimiento del estadio L3 de *H. contortus* y la expulsión de los parásitos adultos. En el primer caso describe una expulsión rápida, vinculada a mecanismos no específicos en animales sensibilizados, donde se desencadena una respuesta de hipersensibilidad de tipo I, y una reacción retardada caracterizada por una marcada infiltración de eosinófilos en la mucosa y destrucción parasitaria por citotoxicidad mediada por anticuerpos, aumento de LT $\gamma\delta$, LT CD4⁺CD25⁺, y LB, destacándose el rol de la galectina-14, liberada por los eosinófilos. En cuanto a la inmunidad contra L4, se describe que la IgA de la mucosa, desarrollada para los productos de secreción-excreción de los nemátodos podría ser el mecanismo que detiene el desarrollo hasta que se genere una respuesta inmune que regule la carga parasitaria (Nisbet et al., 2016). Como fuera descrito anteriormente, la reducción lograda por este mecanismo se relaciona a la disminución en la

capacidad de postura de los adultos. La expulsión del adulto parece vincularse más al desarrollo de la inmunidad específica adquirida. Los productos de secreción de los parásitos pueden funcionar como antígenos para estimular la respuesta Th2, que se traduce sistemáticamente en una elevación de inmunoglobulinas específicas en suero, como se mencionara anteriormente, IgE e IgG1 (Tizard, 2013). A su vez, se describe un limitado cambio en la población de leucocitos en comparación con los generados por larvas, lo que puede vincularse a la inmunomodulación que el adulto produce sobre el huésped y al escaso contacto con los tejidos del mismo en comparación con las larvas (Nisbet et al., 2016).

IV. Evasión de la respuesta inmune por *H. contortus*

Los parásitos tienen la capacidad de poner en marcha diferentes mecanismos para evadir o modular la respuesta inmune del hospedador de manera de poder permanecer dentro del mismo crónicamente (Li et al., 2012). De hecho, diferentes estudios demuestran que *H. contortus* puede modular la respuesta inmune del hospedador, lo que podría ser el causal de la dificultad por parte de éste para desarrollar una respuesta inmunológica efectiva.

Algunos de los mecanismos de evasión inmunológica comprenden afectación en las vías del sistema del complemento como algunos platelmintos y *H. contortus*, que secreta un homólogo de calreticulina que, unida a C1q, bloquea su actividad (Tizard, 2013).

Otro importante mecanismo de evasión inmunológica por parte de NGI es la pérdida de antigenicidad, producto de la evolución del parásito en un sistema inmune activo, de modo que por selección natural se favorece la supervivencia del parásito. Por ejemplo, *H. contortus* es mucho menos antigénico para los ovinos, hospedero definitivo natural, que para conejos, especie raramente infestada. Es por ello por lo que los ovinos poseen respuestas inmunes atenuadas, frente a lo que haría un hospedero no natural como el conejo. De hecho, aunque los ovinos pueden desarrollar una respuesta inmune efectiva contra otros parásitos, presentan una respuesta inmune inefectiva o atenuada contra *H. contortus* (Tizard, 2013).

Por último, se ha reportado una regulación negativa en la expresión de algunos genes relacionados con la inmunidad, vinculados a diferentes citoquinas (Knight et al., 2010). Por ejemplo, se ha descrito que componentes de los productos de excreción/secreción (PES) de *H. contortus* son capaces de inhibir la producción de IL-4 e IFN γ y de potenciar la producción de IL-10 e IL-17 por células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de cabras (Gadahi et al., 2016). Asimismo, estos productos parasitarios disminuyen la producción de óxido nítrico (ON) de PBMC y su proliferación celular (Gadahi et al., 2016).

V. Herramientas de control de infestación por NGI, incluyendo *H. contortus*

La herramienta de control contra los NGI disponible para los productores nacionales de ovinos son los anti-helmínticos. Lamentablemente, la eficacia original de estos principios activos se ha visto reducida por el desarrollo de resistencia, siendo efectivos únicamente en una proporción de los parásitos. De hecho, si bien no disponemos de relevamientos continuos, ya en 1996 la resistencia alcanzaba al 92% de los establecimientos e involucraba a los Bencimidazoles y Levamisoles (Nari et al., 1996). Además, a partir del año 2000 se reportaron una cantidad muy importante de casos de resistencia de *H. contortus* a las Avermectinas (Castells et al., 2002) y al Monepantel (Mederos et al., 2014). Estas evidencias sitúan al control químico de nemátodos en dificultades y con la necesidad de sumarles otras alternativas de control. Si bien hay factores

ambientales que pueden determinar diferencias en el grado de parasitosis, existen factores genéticos que hacen que ante el mismo desafío de parásitos algunos animales se parasiten más y otros menos.

VI. Susceptibilidad y resistencia genética a NGI

La inmunidad a los NGI está controlada genéticamente y existe variabilidad entre razas y entre individuos (McManus et al., 2014; Woolaston & Piper, 1996). Esto ha sido estudiado y documentado en revisiones que datan del año 1930, de variación de la resistencia a *H. contortus*, *Trichostrongylus spp.* y *Ostertagia (Teladorsagia) spp.* entre razas (Baker & Gray, 2004). Sin embargo, la temática detuvo su avance en la década del '60 ante la implementación de las drogas anti-helmínticas, que como se mencionó al inicio, encuentran su límite en la creciente resistencia generada por los NGI. Ello llevó a la búsqueda de nuevas alternativas de control de los mismos, y el desarrollo de líneas de ovinos resistentes volvió a ser de interés (Castells, 2005), como parte de un programa de manejo integrado (McManus et al., 2014). De hecho, una de las ventajas más importantes de tener una población de animales genéticamente resistentes a los NGI es que no sólo se disminuye la contaminación de la pastura sino que además permite disminuir las dosificaciones y prolongar la efectividad de los anti-helmínticos (McManus et al., 2014). Por ello, puede constituir una herramienta sostenible para el control de estas parasitosis a largo plazo. En este sentido, se comenzó a trabajar, inicialmente en Australia, América del Norte y Europa bajo condiciones de clima templado, en la selección de animales resistentes y susceptibles, para generar líneas genéticas divergentes en esta característica. En general se utilizó la cantidad de HPG como medida de la resistencia y también el recuento de vermes post mortem. En los últimos años hubo un enfoque mayor en las razas autóctonas tropicales y bajo condiciones variadas de manejo (Baker & Gray, 2004) quizás debido a la evolución adaptativa generada por los desafíos naturales permanentes en algunas razas bajo ciertas condiciones en comparación con las menos adaptadas. Sin embargo, las bases subyacentes de los mecanismos involucrados en estas características aún no se encuentran claramente comprendidas (McManus et al., 2014).

En Uruguay, dada la creciente resistencia anti-helmíntica observada en los NGI más frecuentes y patógenos, como *H. contortus* (Castells et al., 2002), se comenzaron los estudios de resistencia en la raza Corriedale a partir de 1994, en la Central de Pruebas de Progenie (CPP) "Dr. Alberto Gallinal" del Secretariado Uruguayo de la Lana (SUL, Florida). Con los datos de los muestreos fecales y de genealogía de los animales, se elabora la evaluación genética para la resistencia a los parásitos. Entre dicho año y 1999 se evaluaron los reproductores mediante el modelo padre. A partir del año 2000 se comenzó la evaluación mediante el modelo animal e incorporando a los productores vinculados a la CPP. Es así como a partir de 1999 se constituye en el SUL un núcleo de ovinos de raza Corriedale resistentes y con aceptable productividad. A partir del 2003 se conforma la línea divergente, es decir, susceptible (seleccionada por alto HPG). Actualmente, se realiza la selección de animales resistentes por evaluación genética en raza Merino y Corriedale (Goldberg et al., 2011), a través de la característica HPG, efectuándose evaluaciones mediante técnicas de genética cuantitativa sobre la Diferencia Esperada en la Progenie (DEP) y su correlación con características productivas (Ciappesoni et al., 2009). Se encontró una heredabilidad para el HPG de 0.21 ± 0.02 (Castells, 2008). Diferentes muestreos para evaluar la resistencia a la infestación natural de las líneas seleccionadas a través del HPG indican que poseen una consistencia en el tiempo en cuanto a la resistencia o susceptibilidad ante NGI. Existen estudios que informan de la correlación desfavorable entre algunos caracteres productivos (como el peso, diámetro y largo de la lana, PVS, D y LM respectivamente) y la resistencia a patógenos (Castells, 2005). Se ha estudiado la relación entre la selección por

parámetros productivos y el desarrollo de inmunidad por parte del hospedador, con resultados variables dependiendo de la característica evaluada. Por ejemplo, la relación entre PV y resistencia parasitaria es favorable, o sea que a mayor resistencia, mayor PV (Shaw et al., 2012). Por otro lado, en experiencia local, la línea resistente posee un mayor diámetro de lana, lo cual disminuye su calidad (Castells y col., resultados no publicados). En consecuencia, los genes que controlan la resistencia en sí mismos no están necesariamente asociados a los de los parámetros productivos de interés (McManus et al., 2014). En este sentido, cabe resaltar que las líneas divergentes seleccionadas en el SUL poseen una marcada resistencia, pero como su selección ha sido exclusivamente por DEP/HPG, las características productivas se han movido de acuerdo a las correlaciones genéticas. En el año 2013 un reproductor de la línea resistente fue evaluado en la población Corriedale general del país en el SUL. En dicha evaluación el carnero confirmó su resistencia, siendo el mejor entre 279 reproductores, pero a su vez tuvo un índice productivo muy bajo (77.4 de un promedio 100), fundamentalmente debido a su diámetro de lana alto (+1.1).

Además de las líneas divergentes susceptibles y resistentes de la raza Corriedale obtenidas en el SUL, se hicieron cruzamientos con animales de la raza Merino evaluados como resistentes a NGI en Australia. Algunos de estos animales fueron también resistentes en nuestras condiciones (www.geneticaovina.com.uy). Los resultados preliminares obtenidos de dicha cruce muestran que los ovinos cruce Merino Rylington/Corriedale (a partir de ahora nombrados como Rylington/Corriedale) presentan conteos de HPG similares o menores a las líneas resistentes de Corriedale (Castells, com. pers.) Esto se puede deber a un efecto aditivo (selección) junto a la heterosis individual (por ser animales producto del cruzamiento de razas diferentes).

VII. Características de la respuesta inmunológica inducida por *H. contortus* en líneas de ovinos susceptibles y resistentes

Existen diferentes trabajos donde se evalúan las bases inmunológicas de la resistencia a NGI que estudian la expresión de genes relacionados a citoquinas y factores de transcripción vinculados a la respuesta inmune de animales resistentes, provocando una disminución en la cantidad de parásitos adultos en el tracto gastrointestinal, alterando la maduración de los mismos, su fertilidad y viabilidad de la infestación (Jacobs et al., 2016; Kemper et al., 2010). Más particularmente, las evidencias indican que los LT CD4⁺ cooperadores son esenciales en la eliminación de parásitos y se encuentran asociados con la resistencia a *H. contortus*. De hecho, la depleción de LT CD4⁺ en corderos de una raza naturalmente resistente a *H. contortus* condujo a la pérdida de la resistencia contra dicho parásito (Peña et al., 2006). Además, se ha determinado que los animales resistentes son capaces de desarrollar respuestas inmunes de tipo Th2, mientras que los susceptibles presentan mayor expresión de moléculas inhibitoras o reguladoras, como el FoxP3 presente en los linfocitos T reguladores que inhibe la polarización de LT hacia Th2 a través del control del factor de transcripción GATA3 (Jacobs et al., 2016). Por último, los anticuerpos de tipo IgA presentes en saliva podrían estar participando en la resistencia al *H. contortus* ya que se han determinado niveles elevados de IgA específicos a parásitos L3, y en menor medida a L4, en animales resistentes a la infestación (Shaw et al., 2012).

En este contexto, el uso de ovinos resistentes con fines productivos constituye una estrategia interesante para evitar las infestaciones por nemátodos. Además, disminuiría la necesidad de aplicación de anti-helmínticos. Evidencias experimentales de varios lugares del mundo sugieren que la resistencia contra *H. contortus* está mediada por el desarrollo y el mantenimiento de una efectiva respuesta inmune específica (Kearney et al., 2016). De hecho, se ha evidenciado que la

actividad de anticuerpos específicos contra el estadio infestivo de *H. contortus* (L3) puede ser un proceso fundamental que medie la resistencia a infestaciones gastrointestinales en ovinos (de la Chevrotière et al., 2012).

HIPÓTESIS

A pesar de la obtención de las líneas susceptibles y resistentes por el SUL, hasta el momento no se ha abordado el estudio de la respuesta inmunológica en estos animales. Ello sería de gran interés puesto que podría explicar las bases moleculares y celulares inmunológicas que establecen dicha resistencia/susceptibilidad. Teniendo en cuenta, como se mencionó anteriormente, que la eliminación de *H. contortus* por el ovino se asocia a una respuesta inmune de tipo humoral, con cambios en las poblaciones leucocitarias y con elevada producción de IgG e IgA, entre otras, la hipótesis de trabajo de esta tesis es que la resistencia a la infestación por *H. contortus* en los ovinos resistentes seleccionados posee una base inmunológica y que se encuentra determinada por la capacidad de los ovinos resistentes de modificar el perfil leucocitario y producir mayores niveles de IgG e IgA en suero y en saliva, específicos contra *H. contortus* tanto en su estadio larvario infestante (L3) como adulto, así como de desarrollar una potente respuesta de tipo Th2 siendo así, capaces de eliminar el parásitos en etapas tempranas de la infestación.

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general de esta tesis consistió en llevar a cabo la evaluación inmunológica en ovinos resistentes y susceptibles a la infestación por *H. contortus*. De esta forma dilucidar las bases inmunológicas que gobiernan la resistencia de dichas líneas y sus cruzas. Asimismo, dado que el HPG es un indicador que está afectado por una gran cantidad de factores no genéticos (Goldberg et al., 2011) el estudio de la respuesta inmunológica del hospedador podría brindar una nueva manera de medir el grado de resistencia y de aportar conocimientos para la generación de procedimientos inmunológicos en vista de mejorar la estrategia de selección de ovinos resistentes a nemátodos o de prevenir o tratar la infestación por nemátodos y en particular por *H. contortus*.

Objetivos específicos

1. Determinar la resistencia/susceptibilidad a la infestación por *H. contortus* de ovinos infestados experimentalmente previamente seleccionados genéticamente.
2. Evaluar parámetros hematológicos vinculados a la patogenicidad de *H. contortus* y a la respuesta inmunológica.
3. Evaluar e identificar el nivel de leucocitos en sangre de los animales infestados.
4. Evaluar la respuesta inmunológica humoral sistémica específica de los estadios larvario infestivo (L3) y adulto de *H. contortus* en ovinos susceptibles y resistentes a este nemátodo a través de la determinación de IgG e IgA específicas en circulación.
5. Evaluar la respuesta inmunológica humoral local parasitaria a través de la determinación de IgA específicas en saliva.
6. Determinación de producción de citoquinas de tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-13 y TNF- α) producidas por PBMC al ser estimulados por antígenos parasitarios.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ovinos

Se utilizaron ovinos machos de dos años de dos líneas genéticamente divergentes (resistentes y susceptibles a nemátodos gastrointestinales) de la raza Corriedale, que llamaremos línea “resistente” y “susceptible”, respectivamente. Además, también se evaluó la filial 1 de Corriedale resistente con Merino Rylington Australiano, denominada “Rylington/Corriedale” en esta tesis. Los animales fueron proporcionados por el Centro de Investigación y Experimentación Dr. Alejandro Gallinal (CIEDAG) del Secretariado Uruguayo de la Lana (SUL). Estos animales provienen de selección por evaluación genética en raza Merino y Corriedale a través de la característica HPG como se indicó anteriormente (Goldberg et al., 2011). Se efectuaron evaluaciones mediante técnicas de genética cuantitativa sobre la Diferencia Esperada en la Progenie (DEP) y su correlación con características productivas (Ciappesoni et al., 2009). Los animales fueron mantenidos en el mismo campo experimental, en instalaciones apartadas y acondicionadas a los fines del experimento, evitando la contaminación con heces de otros animales. Se alimentaron con pellets de alfalfa, suplementado con maíz y fardos de alfalfa. Los experimentos animales fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (Protocolo N° 461, Comisión de Ética del Secretariado Uruguayo de Lana).

Previo al inicio de los experimentos, los animales fueron desparasitados con Startect® (Derquantel 10 mg/ml y Abamectina 1 mg/ml) 1 ml cada 5 kg de peso vivo (ml/kg pv), vía oral. Se verificó la desparasitación con examen coprológico (técnica de flotación de McMaster, descrita a continuación). Tras comprobarse la presencia de huevos de NGI, se realizó una dosificación adicional con Zolvix® (Monepantel 25 mg/ml) a razón de 1 ml/10 kg pv (promedio 35,1 kg ±6,2).

Cultivo de larvas de *H. contortus*

La obtención de larvas infestantes L3 de *H. contortus* se realizó a partir de huevos del nemátodo extraídos de ovinos adultos donantes, los cuales fueron previamente sometidos al proceso de desparasitación previamente descrito, con posterior infestación con cepa pura de L3 de *H. contortus*. Concretamente, se realizaron coprocultivos provenientes de materia fecal de ovinos infestados. Los parásitos adultos se colectaron del abomaso de ovinos a campo, se seleccionaron hembras adultas que se colocaron en solución fisiológica a 37°C. Luego se llevaron a cultivo con vermiculita, un mineral formado por silicatos de hierro o magnesio, y materia orgánica a 25°C durante 8-10 días. La colección de larvas L3 de *H. contortus* puras de este cultivo permitió la infestación de un donante.

Coprocultivos

Se realizó la colección de materia fecal del donante mediante un dispositivo sujetado con arnés al animal (Foto 1) a los fines de obtener el volumen total de excretas diariamente. Esta materia fecal fue homogeneizada con vermiculita y humedecida con agua destilada (Foto 2).



Foto 1: Dispositivo de colecta de materia fecal.



Foto 2: Armado de cultivos de materia fecal con vermiculita y agua destilada.

Se dividió la mezcla en vasos descartables que se colocaron en estufa de cultivo a 25° C durante 8 a 10 días (Foto 3). Durante el período se airearon los cultivos, mezclaron y posteriormente se regaron con agua destilada dos veces por día.



Foto 3: Cultivo de materia fecal en estufa.

Al cabo del período establecido (10 días) se colectaron las larvas. Para ello se sobresaturaron los cultivos con agua destilada y se colocaron los vasos invertidos sobre placas de Petri, completando con agua la placa, durante aproximadamente 6 a 12 horas (Foto 4). Luego se recolectó la fracción líquida con pipetas Pasteur y se colocó en tubos cónicos de 50 ml en forma

horizontal al resguardo de la luz y el calor. Se realizó el control de la pureza del cultivo tomando una alícuota de lo colectado. Inicialmente se verificó la presencia y vitalidad de las larvas obtenidas y se utilizó tintura de iodo para visualizar en microscopio las estructuras larvianas, confirmando que se trataban de larvas L3 del género *Haemonchus* (Foto 5).

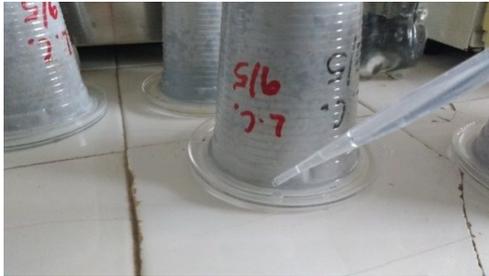


Foto 4: Recolección cultivos L3 *Haemonchus contortus*.



Foto 5: Tinción iodada de L3 de *Haemonchus* sp.

Mantenimiento de L3

Se realizó el aireado y renovación del medio de mantenimiento (solución fisiológica) de las L3, periódicamente hasta el momento la infestación.

Preparación de lisados parasitarios

Las larvas L3 y los parásitos adultos de *H. contortus* recolectados como se ha previamente descrito fueron conservados en freezer a -20°C hasta su utilización. Se descongelaron con solución buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4. Se colocaron en tubos cónicos de 50 ml en PBS conteniendo los siguientes inhibidores de proteasas: 2 mM AEBSF (4-benzenesulfonyl fluoride hydrochloride), 0.3 μM Aprotinin, 116 μM Bestatin, 14 μM E-64, 1 μM Leupeptin y 1 mM EDTA. Posteriormente se disgregaron mecánicamente. Luego se sometieron a 3 ciclos térmicos de congelación y descongelación de 30 min a -80°C seguido de 30 min a 25°C . Posteriormente se realizó la ultrasonificación, se centrifugó a 2500 rpm por 15 min, y se tomó el sobrenadante.

A continuación, se realizó la titulación de proteínas por colorimetría con el método de ácido bicinconínico (BCA). Brevemente, éste consistió en un ensayo colorimétrico en microplaca. Se realizó una curva de calibración con solución de albúmina de concentración conocida en diferentes diluciones en PBS (de 1, 0.8, 0.4, 0.2 mg/ml). Al mismo tiempo se incubaron diluciones de los lisados parasitarios. El revelado consistió en incubación por 30-45 min de ácido bicinconínico: CuSO_4 (50:1). Se le realizó la lectura en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm.

Infestación experimental

Se corroboró la vitalidad de las L3 mediante visualización de motilidad en microscopio de diferentes alícuotas de los tubos almacenados. Se realizó el conteo de L3 mediante inmovilización de éstas con tintura de iodo en placas de Petri graduadas. Se calculó la concentración de L3 en el medio de mantenimiento. Se calculó el volumen a proporcionar a cada animal en cada dosis. Se aplicaron 7500 L3 por animal divididas en 3 dosis de 2500 larvas aplicadas en días alternos, según los siguientes grupos:

Las infestaciones de los ovinos se realizaron de la siguiente manera:

- i. grupo 1: 8 ovinos Corriedale susceptibles desafiados con *H. contortus*;
- ii. grupo 2: 3 ovinos Corriedale susceptibles control;
- iii. grupo 3: 8 ovinos Corriedale resistentes desafiados con *H. contortus*;
- iv. grupo 4: 4 ovinos Corriedale resistentes control;
- v. grupo 5: 4 ovinos resistentes cruce Rylington/Corriedale desafiados con *H. contortus*;
- vi. grupo 6: 2 ovinos resistentes cruce Rylington/Corriedale control.

Toma de muestras

Se tomaron muestras de materia fecal, sangre y saliva a los días 0 (día de la infestación), 3, 7, 14, 21, 28 y 35 días luego de la infestación. Las muestras de sangre se obtuvieron por venopunción yugular con agujas 18G y jeringas descartables de 20 ml. Las muestras de materia fecal se obtuvieron directamente desde el recto. Se extrajeron muestras de saliva, embebiendo algodones de uso odontológico que fueron conservados en tubos Eppendorf en freezer a -20°C.

Análisis coprológico por técnica de McMaster

La carga parasitaria se determinó de manera indirecta a través de la cuantificación de ovoposición, determinada por el recuento de huevos por gramo de materia fecal (HPG) por la técnica de flotación de McMaster. Las muestras de materia fecal se extrajeron de forma individual directamente del recto, posteriormente se hizo una suspensión en NaCl saturado, se colocó una alícuota en cámaras de recuento adaptadas a tal fin y se contaron los huevos a través de microscopio (aumento 10X). La identificación de *H. contortus* se realizó a través del análisis de larvas L3 obtenidas a partir de los coprocultivos, ya que los huevos son morfológicamente indiferenciables (Fiel et al., 2011; Roberts & O'Sullivan, 1950)

Hematología

Las muestras de sangre se colectaron en un tubo de hematología de polipropileno de 6 ml con tapón de goma con 10.8 mg EDTA dipotásico líquido (anticoagulante) para remisión a laboratorio de referencia donde se realizó hemograma completo, utilizando el equipo Counter 19 (Weiner lab group., n.d.) que analiza por impedancia eléctrica. El recuento leucocitario total se realizó en cámara de Neubauer y el diferencial, por frotis (Blumenreich, 1990). Los parámetros analizados fueron: Serie Roja: Hematocrito (HTO), Hemoglobina Corpuscular Media (MHC), Volumen Corpuscular Medio (VCM), Amplitud de Distribución Eritrocitaria (ADE o RDWc), Hemoglobina

(Hb), Plaquetas (Pl) y Volumen Plaquetario Medio (VPM). Serie Blanca: Conteo Total de Células Blancas (WBC), Monocitos (Mon), Neutrófilos (Neu), Eosinófilos (Eos) y Linfocitos (Linf).

Inmunidad humoral

El mayor volumen de sangre extraída fue utilizado para la obtención de plasma. En este caso la sangre fue recolectada en una solución de buffer citrato de sodio a 105 mM. El plasma se extrajo por centrifugación a 2500 rpm (revoluciones por minuto) durante 20 min. El mismo fue conservado, al igual que las muestras de saliva, en freezer a -20°C para su posterior utilización en inmunoensayo (ELISA).

Los algodones fueron centrifugados a 4°C durante 15 minutos a 14000 rpm y luego se extrajo la saliva colocando los algodones dentro de jeringas de plástico descartables para presionar con el émbolo, depositando la saliva extraída en un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml.

Ambos tipos de muestras se utilizaron para la realización de ELISA indirecto para detección de Inmunoglobulinas (Igs) A y G específicas para antígenos parasitarios tanto de estado adulto como larvario (L3). Es importante destacar que durante esta tesis se realizó la puesta a punto de ambos ensayos de ELISA dado que no se contaba con un kit comercial.

Se utilizaron placas Nunc de 96 pocillos con fondo plano, maxisorp. Se utilizaron los siguientes anticuerpos comerciales: IgG policlonal de conejo anti IgA:HRP ovina (BIO-RAD, AHP949P) y anticuerpo policlonal de burro anti IgG:HRP ovina (antibodies-online Inc., ABIN336507). El procedimiento consistió en la sensibilización de las placas con 2 µg de lisado proteico parasitario larvario (L3 infectivo) o adulto por pocillo en buffer carbonato 0.2 M pH 9, durante toda la noche y posteriormente se bloquearon con gelatina al 1% en buffer fosfato salino (PBS) durante 1h/37°C. A continuación, se incubaron diferentes diluciones de plasma y saliva durante 1 h a 37°C para detección de IgG y 2h a la misma temperatura para detección de IgA. Finalmente, la detección de anticuerpos específicos se realizó utilizando los anticuerpos secundarios específicos anteriormente detallados en las siguientes diluciones: IgA 1/5000; IgG 1/10000 I. El revelado se realizó utilizando OPD/H₂O₂ y posterior determinación de absorbancia a 492 nm en un lector de microplacas Thermo Scientific Multiskan FC. El título de anticuerpos fue calculado como el Log₁₀ de la dilución mayor que dio el doble de absorbancia a la obtenida con plasmas provenientes de animales controles a la mayor dilución utilizada.

Determinación de citoquinas en células mononucleares de sangre periférica

La sangre obtenida también fue utilizada para purificar células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Brevemente, luego de la obtención del plasma, se extrajo la capa leucocitaria (buffy coat), la cual fue colocada sobre 6 ml de Histopaque densidad 1,077 g/ml y posteriormente centrifugada a 2500 rpm a 20°C por 30 min, con aceleración intermedia y sin freno. Posteriormente se extrajo el colchón de células correspondiente a los PBMCs y se efectuaron 3 lavados con PBS. Las células fueron almacenadas en Suero Fetal Bovino a -80°C hasta su utilización.

Para la determinación de citoquinas, las células fueron cultivadas a 1×10^6 células/pocillo en una placa de 24 pozos en presencia de lisado parasitario de adulto (10 µg/ml) por 5 días a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente las células fueron resuspendidas en TriReagent (Sigma-Aldrich), luego de lo cual se procedió a la purificación de ARN siguiendo las indicaciones del fabricante.

Brevemente, las células fueron lisadas con 500 μ L de TriReagent y se dejaron reposar 5 min a T amb. Luego se realizó la separación de fases agregando cloroformo (200 μ L por cada mL de TriReagent) y agitando vigorosamente en un vortex por 15 seg. La mezcla se dejó reposar por 10 min y se centrifugó a 13000 g por 15 min. Luego de la separación de fases, se colectó la fase acuosa superior la cual se precipitó posteriormente con isopropanol (0,5 mL por mL de TriReagent). Luego de centrifugar la mezcla a 12000 g por 10 min, se obtuvo un pellet con ARN, el cual fue lavado con Etanol 75%. La cuantificación del ARN obtenido se realizó a través de la medición de la absorbancia de 260/280 nm usando el equipo Nanodrop 2000.

A partir de 1 μ g de ARN se sintetizó el ADN copia utilizando el kit SensiFast de síntesis de ADN (Bioline). Las reacciones de PCR en tiempo real fueron realizadas utilizando el kit SyberGreen de Bioline en presencia de 2 mM de oligonucleótidos específicos (Tabla I) en un volumen final de 10 μ L. Las reacciones fueron realizadas en placas de 48 pocillos en el sistema Eco de Illumina. Las amplificaciones se realizaron en 40 ciclos con las siguientes características: 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C o 55°C (ver Tabla I), 30 segundos a 72°C. Los niveles de expresión fueron normalizados contra un gen normalizador (GAPDH o actina) y calculados utilizando el método del $\Delta\Delta$ Ct (Livak & Schmittgen, 2001). Este método consiste en la comparación de la expresión de un gen en dos condiciones diferentes (tratado y control, por ejemplo) mediante el valor del ciclo umbral o Ct. El valor de Ct de cada condición es expresado en relación a un gen control de referencia (GAPDH/Actina).

GEN	Oligo sentido	Oligo anti-sentido	Tm utilizada
IL-4	CAGCATGGAGCTGCCT	ACAGAACAGGTCTTGCTTGC	60°C
IL-5	CACTGCTCTCCACGCATCAA	TCATCAAGTCCCATCACCTATCA	60°C
IL-13	AGAACCAGAAGGTGCCGCT	GGTTGAGGCTCCACACCATG	55°C
TNF α	CCCGTCTGGACTTGGATCCT	TGCTTTTGGTGCTCATGGTG	60°C
GAPDH	TCATAAGTCCCTCCACGATG	GGTGATGCTGGTGCTGAGTA	55°C/60°C

Tabla I: Especificaciones, según gen evaluado, de las secuencias de oligonucleótidos y temperatura de melting (Tm) utilizadas.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante Anova y Test de Student utilizando el software Graphpad Prism version 6.01 para Windows.

RESULTADOS

A continuación, presentaremos los resultados según el siguiente orden. Inicialmente analizaremos la comparación entre las dos líneas de ovinos Corriedale, resistentes y susceptibles. En el segundo apartado compararemos la cruce Rylington/Corriedale, con las dos líneas Corriedale mencionadas anteriormente.

Dentro de cada apartado presentaremos en primer lugar los resultados de recuento de huevos parasitarios por gramo de materia fecal. Luego describiremos el análisis del hemograma, línea roja y línea blanca. A continuación, mostraremos los resultados obtenidos de la titulación de Inmunoglobulinas, IgA e IgG. Finalmente presentaremos el estudio de la respuesta celular de tipo Th2 a través de la determinación de citoquinas producidas por PBMCs.

Parte I: Análisis de la respuesta inmune en ovinos Corriedale Resistentes y Susceptibles infestados experimentalmente

El curso de la infestación por *H. contortus* fue analizado a través del conteo de los huevos por gramo (HPG) de materia fecal, tal como se describió en materiales y métodos previamente. Como se observa en la figura 2, los animales infestados artificialmente mostraron un incremento en el HPG durante el período de experimentación, mientras que los respectivos controles no infestados, no incrementaron el valor de este parámetro.

Los animales infestados comenzaron a mostrar incrementos en los valores de HPG a partir del día 21, en concordancia con el ciclo biológico de *H. contortus*. En la figura 3 observamos que los ovinos susceptibles mostraron valores claramente superiores en HPG a los resistentes a partir del día 21 del experimento ($p < 0,007$). Como era de esperar, no se observó aumento de HPG en los animales controles no infestados.

Posteriormente analizamos diferentes parámetros clínicos como glóbulos rojos, hemoglobina y volumen corpuscular medio, entre otros. Debido al carácter hematófago de *H. contortus* resultó interesante analizar estos parámetros durante el transcurso de la infestación y evaluar si los mismos eran diferentes en las líneas resistente y susceptible.

Según observamos en la figura 4A, no hubo diferencias significativas en el porcentaje de hematocrito (volumen de glóbulos rojos con relación al total de la sangre) a lo largo del experimento en ningún grupo, por lo que el hematocrito no se modificó en los ovinos resistentes ni susceptibles infestados. Sin embargo, encontramos una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,049$) entre resistentes y susceptibles en el día 21 (Figura 5). De hecho, los animales infestados de la línea susceptible presentaron menor hematocrito que los resistentes, lo que podría estar relacionado con el alto HPG encontrado de los animales susceptibles. El hematocrito de ambos grupos controles no varió en el transcurso del experimento (Figura 4B).

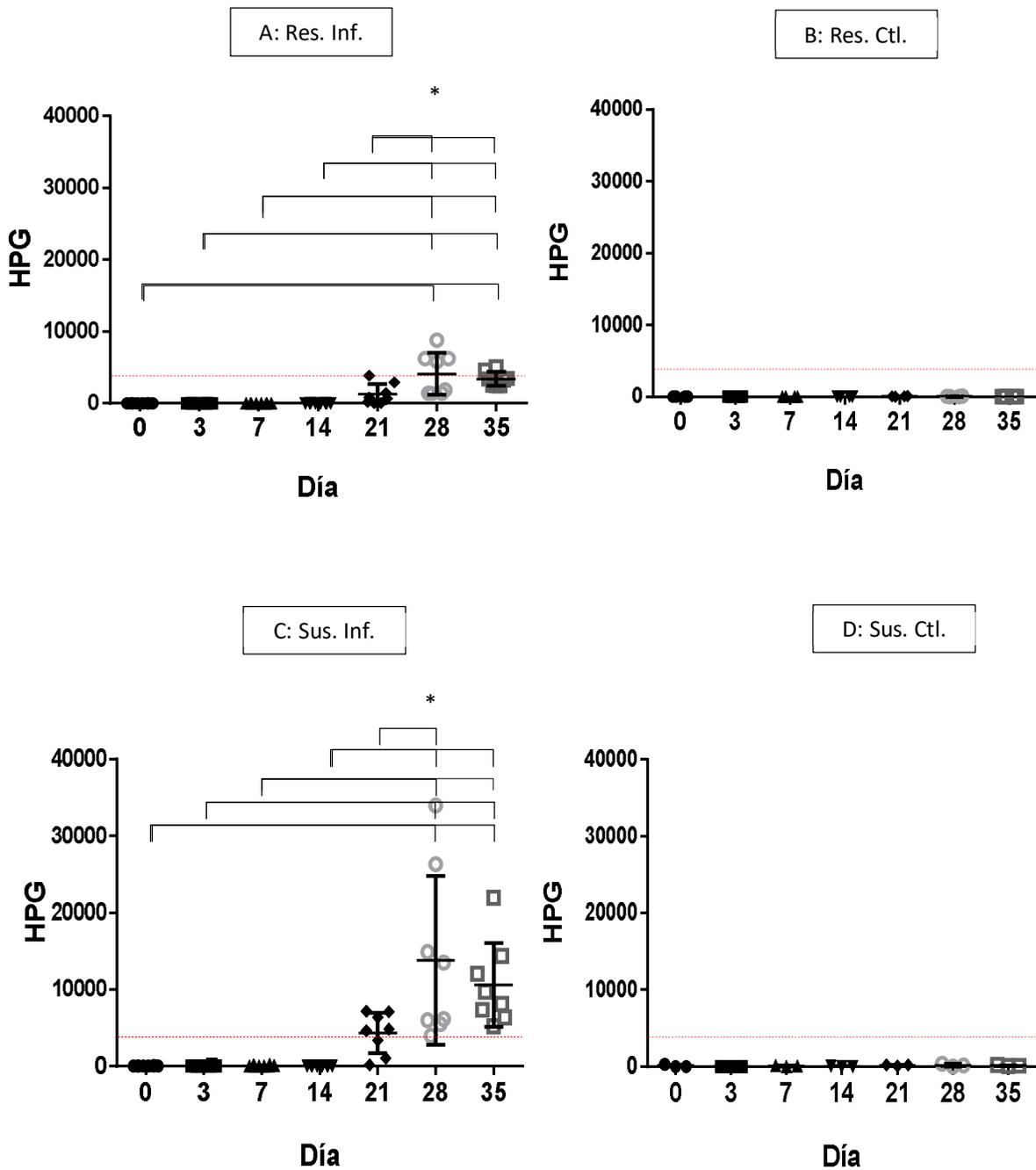


Figura 2: Evolución del nivel de infestación por *H. contortus*. Conteo de huevos por gramo de materia fecal (HPG) obtenidos por técnica de Mc Master. A: Corriedale resistente infestado. B: Corriedale resistente control. C: Corriedale susceptible infestado. D: Corriedale susceptible control. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

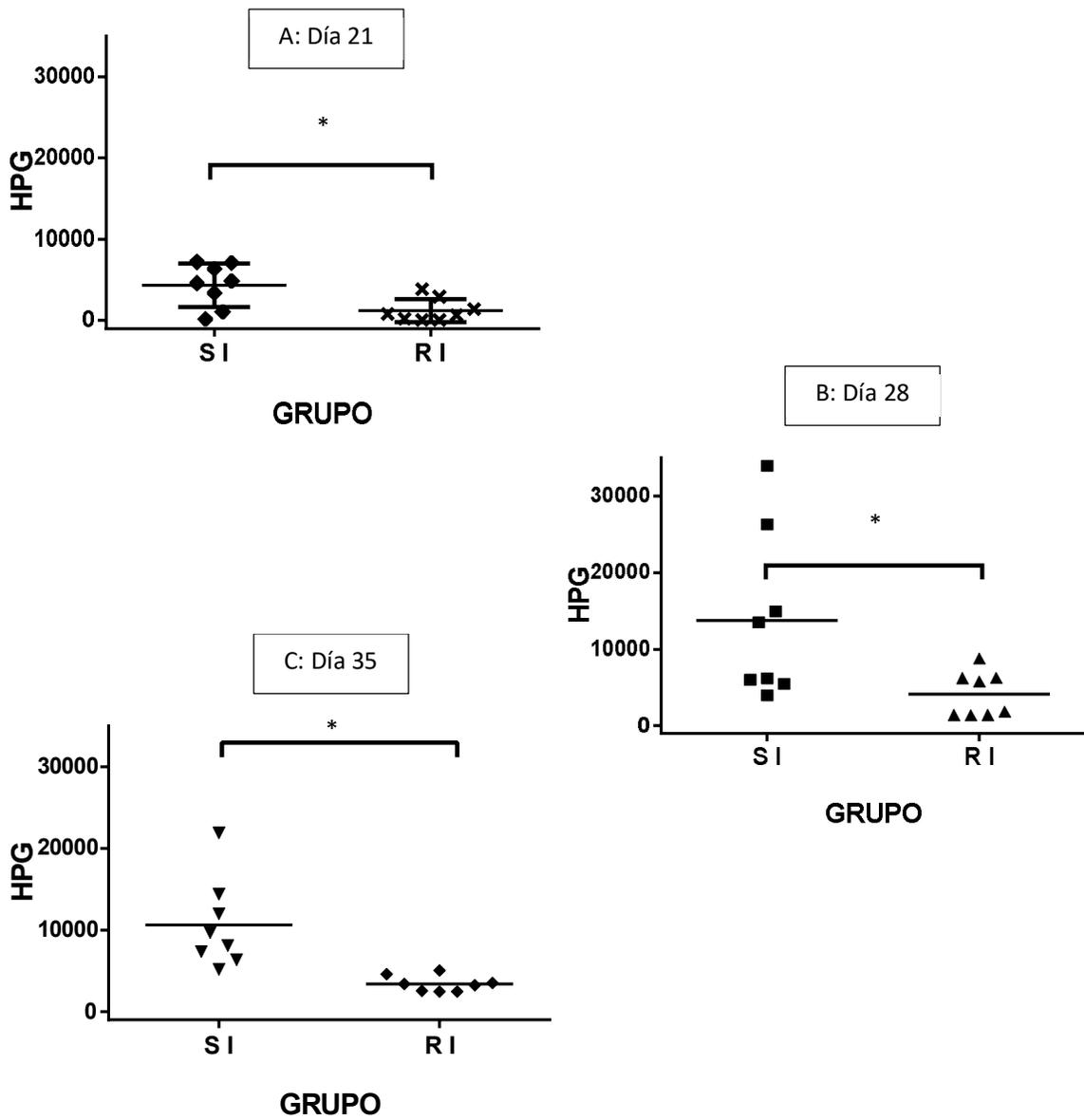


Figura 3: Comparación del nivel de infestación por *H. contortus* entre tratamientos. Conteo de huevos por gramo de materia fecal (HPG) obtenidos por técnica de Mc Master. A: Día 21 de infestación. B: Día 28 de infestación. C: Día 35 de infestación. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

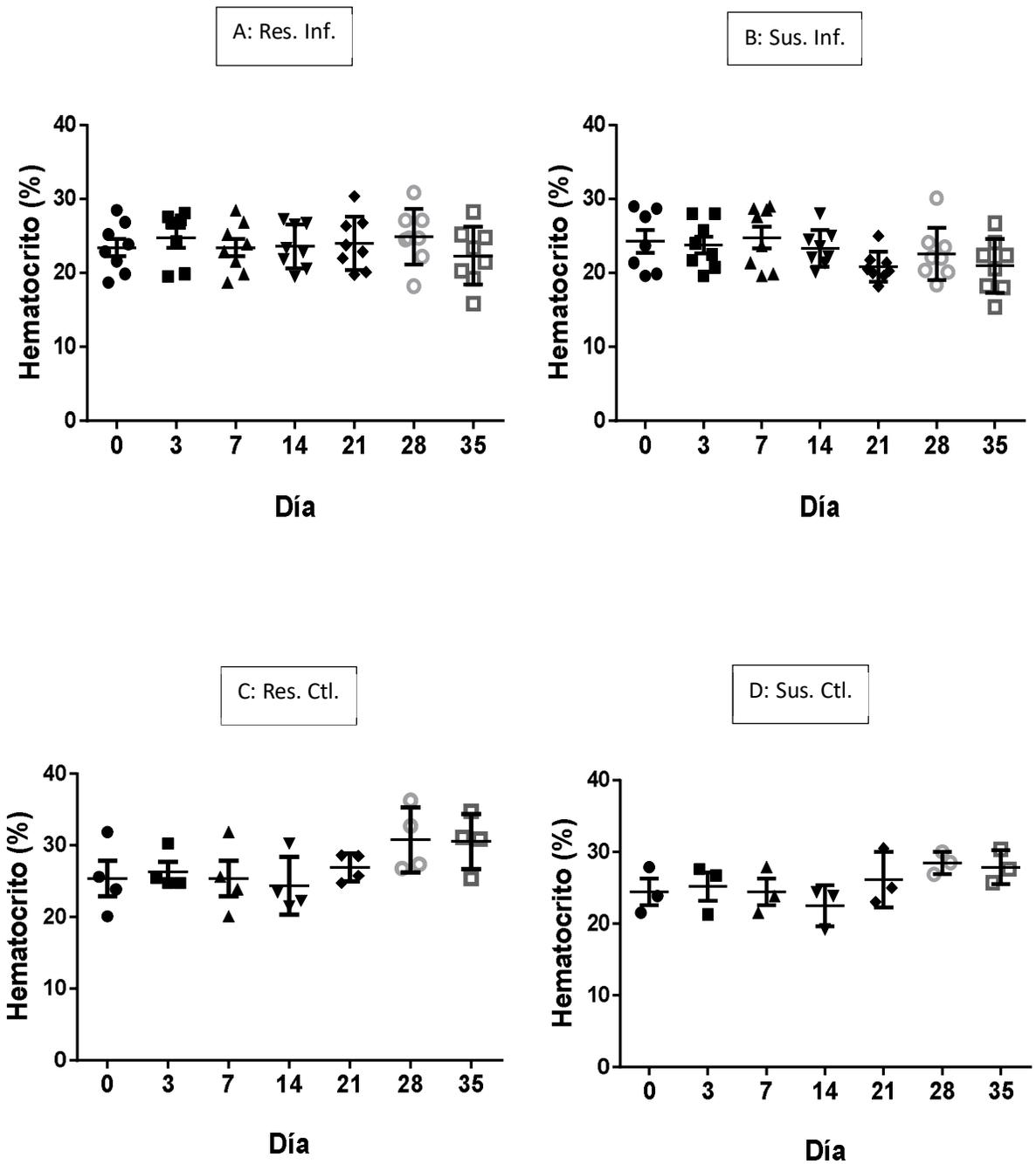


Figura 4: Evolución del porcentaje de hematocrito. A: Corriedale resistente infestado. B: Corriedale susceptible infestado. C: Corriedale resistente control. D: Corriedale susceptible control.

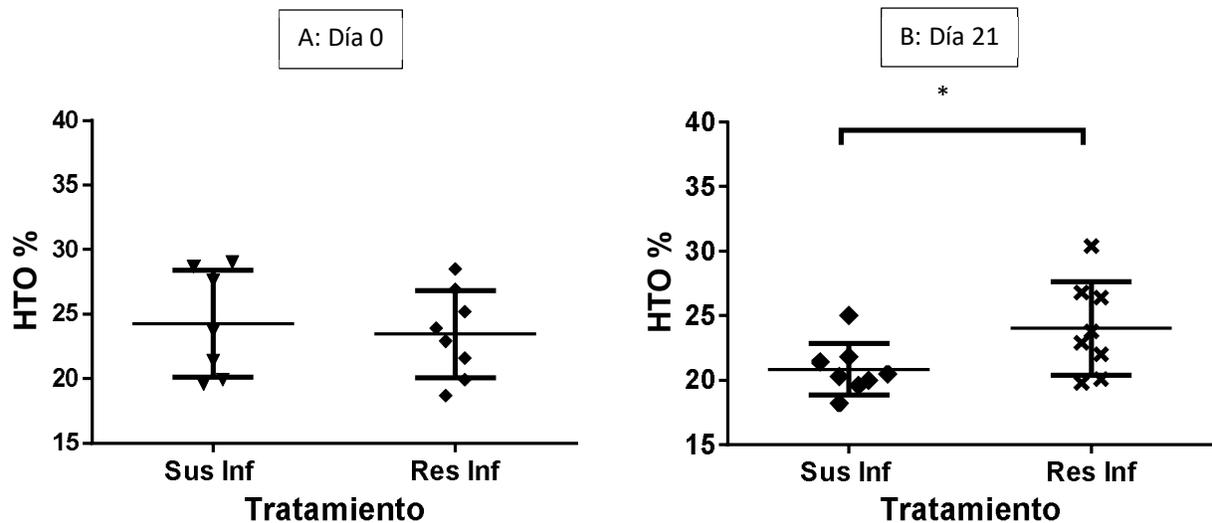


Figura 5: Comparación del porcentaje de hematocrito entre tratamientos al inicio y al día 21 del experimento. A: Día 0. B: Día 21 post infestación. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

Por otro lado, tanto la hemoglobina como la hemoglobina corpuscular media (MHC, medida de la masa de la hemoglobina en un glóbulo rojo) disminuyeron durante el transcurso de la infestación en los grupos infestados (Figura 6 y 7, respectivamente). Sin embargo, no se observaron diferencias en estos parámetros entre los animales resistentes o susceptibles infestados. Por último, los grupos controles no infestados no evidenciaron cambios en el valor de Hb y MHC (Figuras 6 y 7).

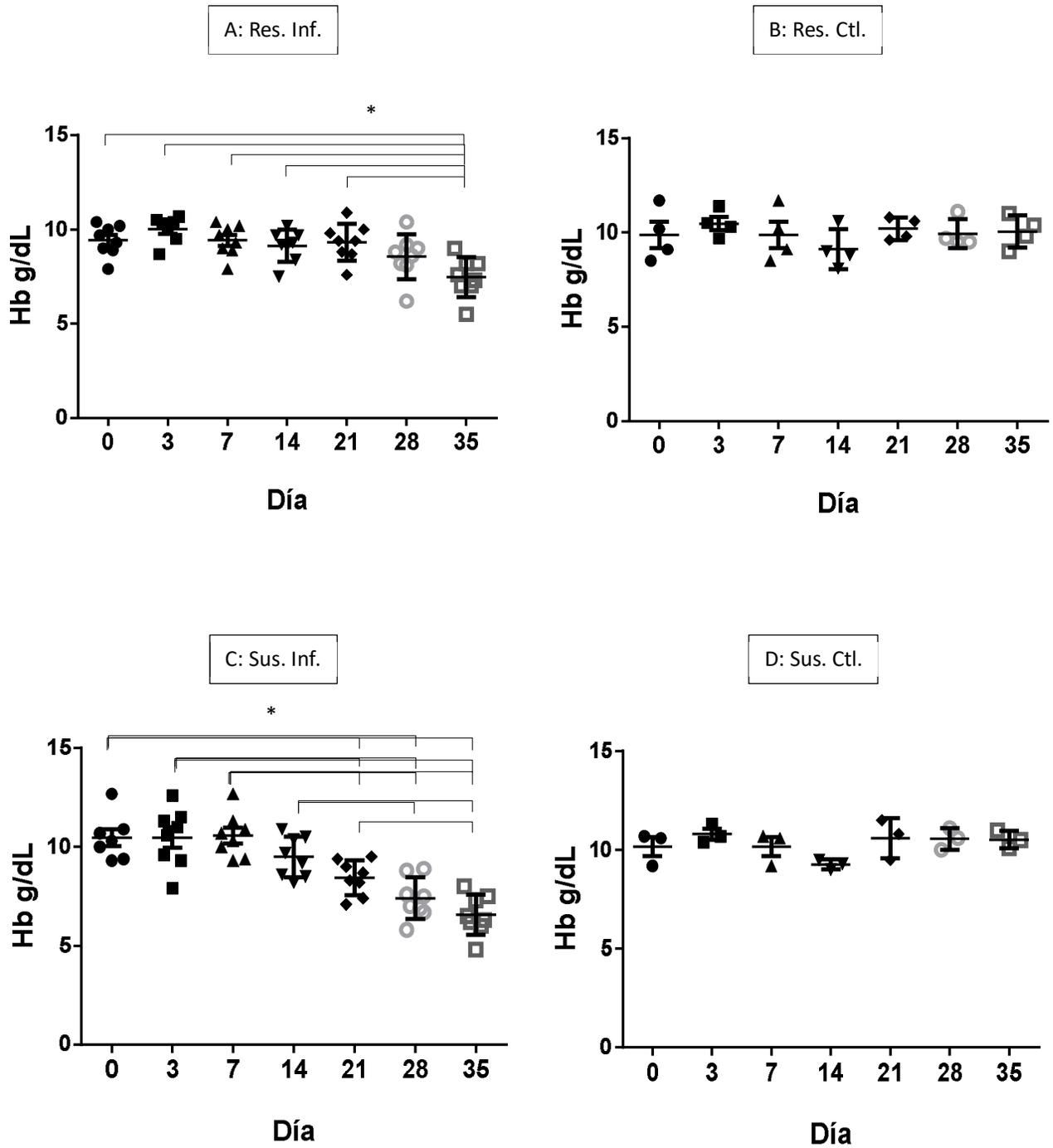


Figura 6: Evolución de la concentración de hemoglobina (Hb). A: Corriedale resistente infestado. B: Corriedale resistente control. C: Corriedale susceptible infestado. D: Corriedale susceptible control. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

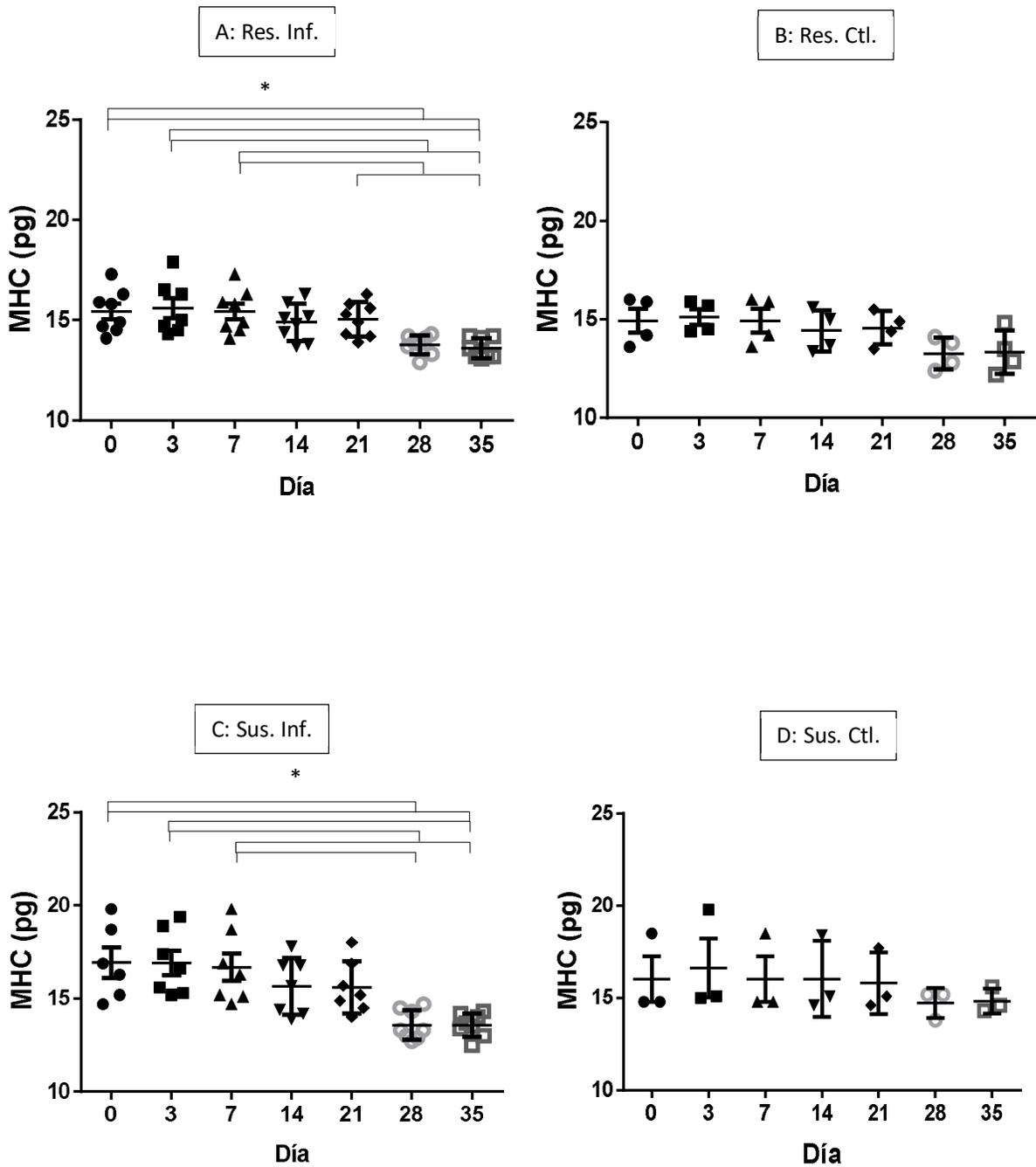


Figura 7: Evolución de la Hemoglobina Corpuscular Media (MHC). A: Corriedale resistente infestado. B: Corriedale resistente control. C: Corriedale susceptible infestado. D: Corriedale susceptible control. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

En los casos del Volumen Corpuscular Medio (VCM, parámetro que indica el volumen de los glóbulos rojos en promedio, como indicador de la madurez de dichas células) y la Amplitud de Distribución Eritrocitaria (del inglés RDWc), valor que indica el grado de dispersión que tiene el volumen eritrocitario, por lo tanto indicador de anisocitosis, variación del tamaño eritrocitario (Reagan & Sanders, 1999), mostraron incrementos a lo largo del experimento tanto en resistentes como susceptibles infestados, evidenciando una respuesta fisiológica a la pérdida de glóbulos rojos implicada en el mecanismo patogénico de *H. contortus* (Figuras 8 y 10). Particularmente, el VCM presentó un aumento significativamente mayor ($p=0,028$) en el grupo susceptible infestado en relación al resistente hacia el final del experimento (Figura 9). Por otro lado, el RDWc presentó un aumento significativo en ambos grupos ($p<0,0001$) así como también en los resistentes control.

En cuanto al porcentaje de plaquetas y su volumen medio (VPM, indicador de respuesta trombopoyética e inversamente proporcional al número de plaquetas), no presentaron cambios significativos en general, excepto en los susceptibles infestados que mostraron la relación inversa de incremento en el porcentaje de plaquetas y disminución del VPM, mencionada anteriormente, hacia el final del experimento (Figuras 11 y 12).

Concluyendo sobre los resultados mostrados para la serie roja, los mismos sugieren un efecto producido por la pérdida de sangre vinculada al carácter hematófago del *H. contortus*, con la consecuente disminución del volumen total de glóbulos rojos, concentración de hemoglobina y el aumento de formas inmaduras de hematíes en los dos grupos infestados. Sin embargo, se destacó un efecto más marcado en los animales susceptibles en el hematocrito, el VCM y un aumento significativo de plaquetas y consecuente disminución del VPM, como indicador de respuesta trombopoyética.

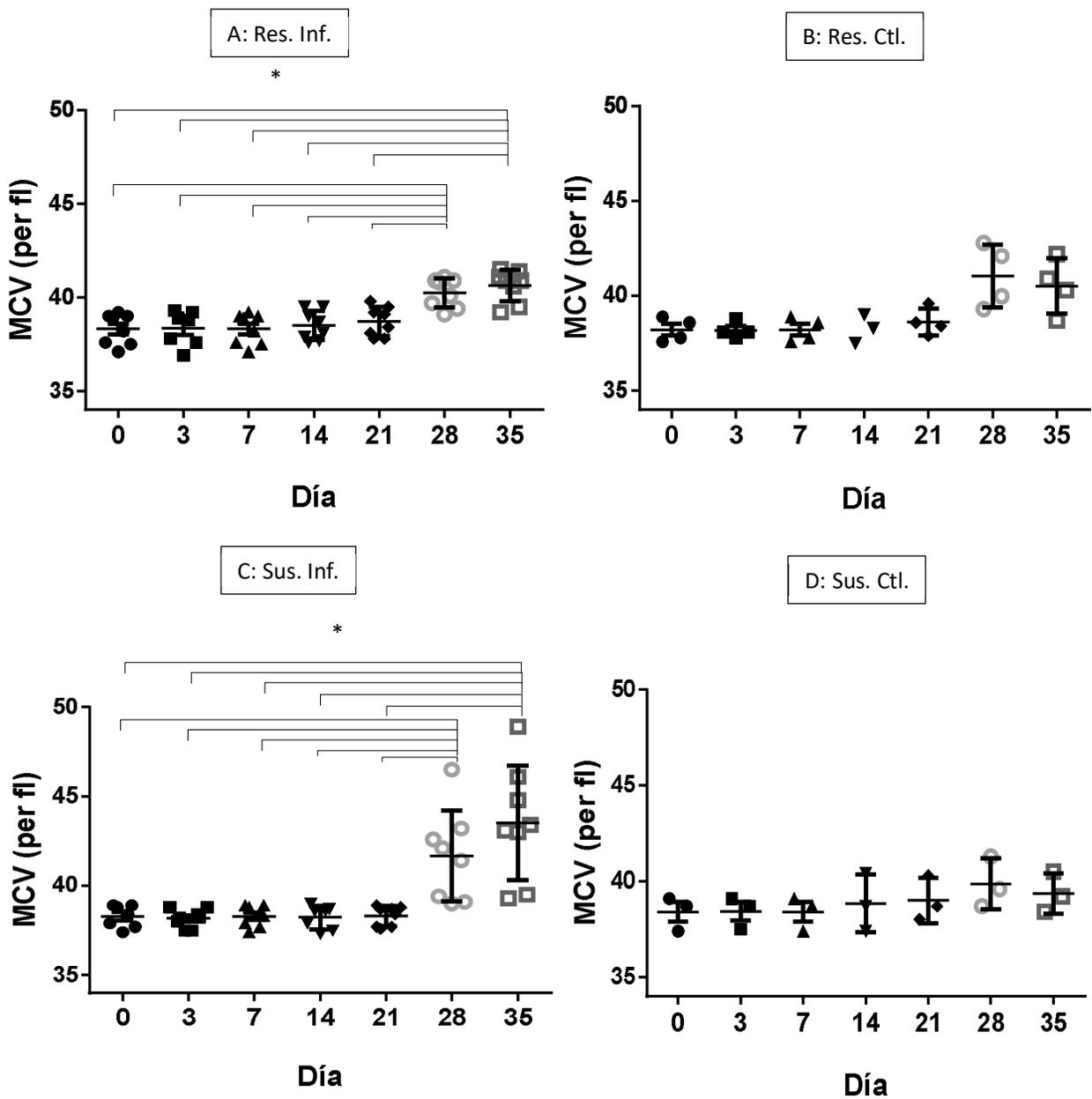


Figura 8: Evolución del Volumen Corpuscular Medio (MCV). A: Corriedale resistente infestado. B: Corriedale resistente control. C: Corriedale susceptible infestado. D: Corriedale susceptible control. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

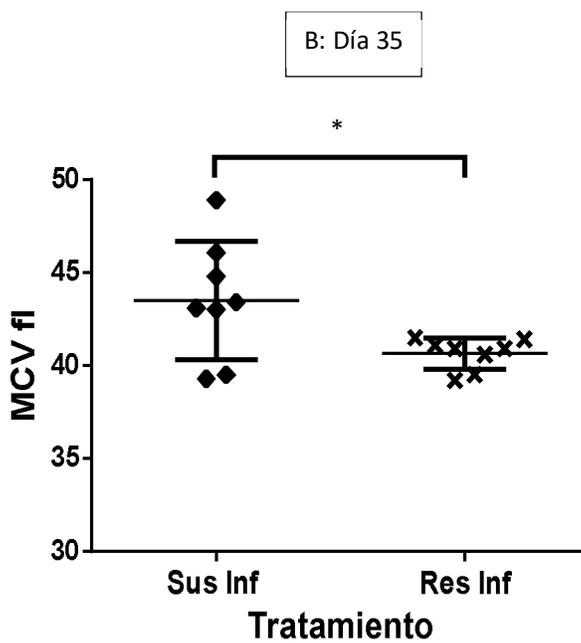
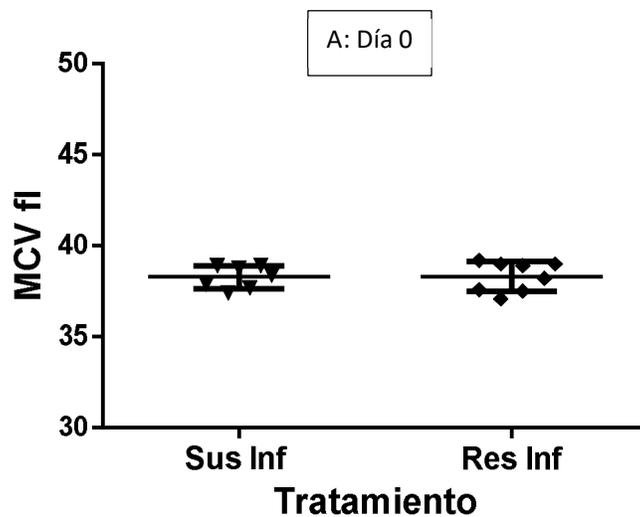


Figura 9: Comparación del volumen corpuscular medio entre tratamientos al inicio y al final del experimento. A: Día 0. B: Día 35 post infestación. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

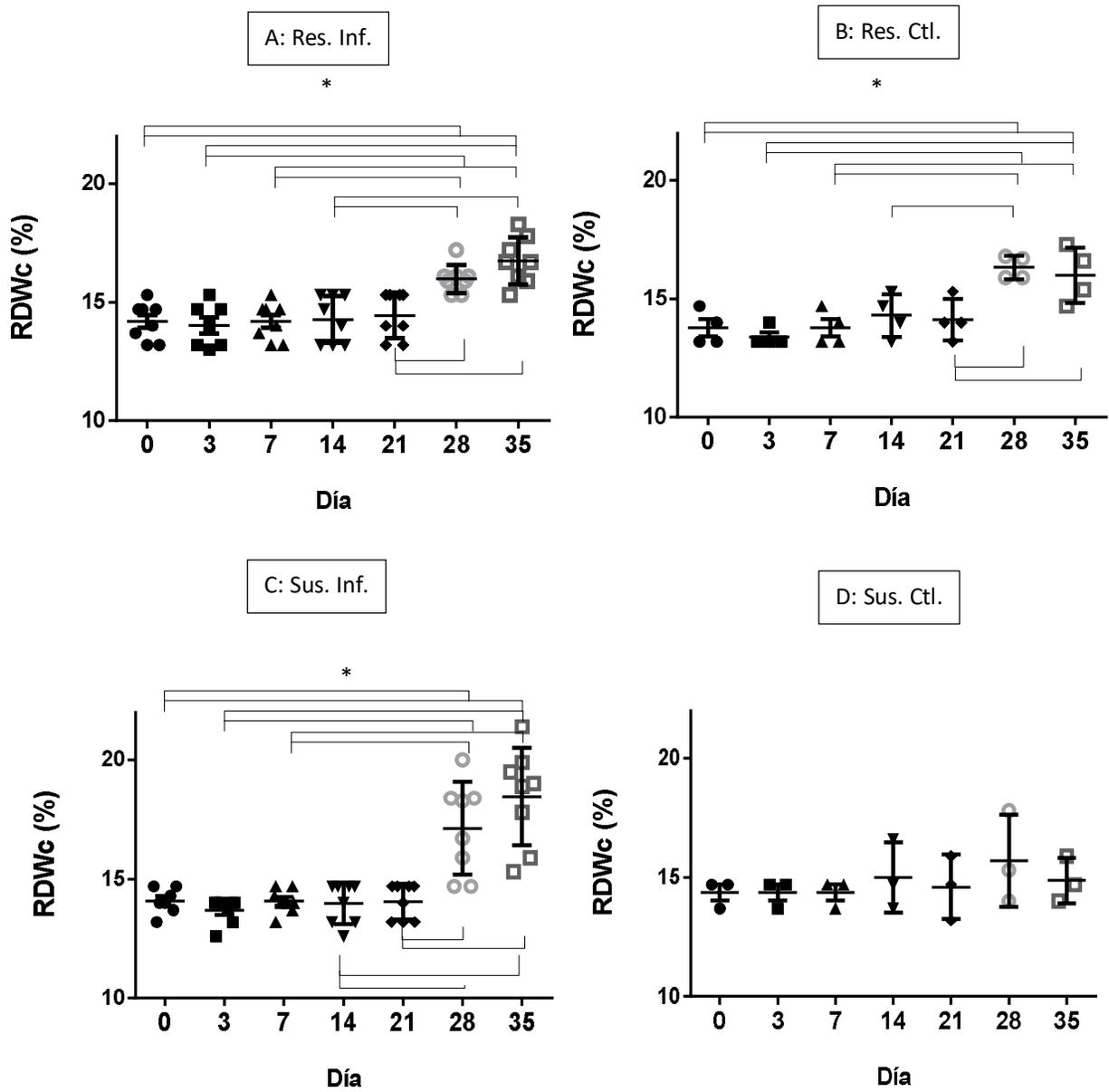


Figura 10: Evolución de la Amplitud de Distribución Eritrocitaria (RDWc). A: Corriedale resistente infestado. B: Corriedale resistente control. C: Corriedale susceptible infestado. D: Corriedale susceptible control. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

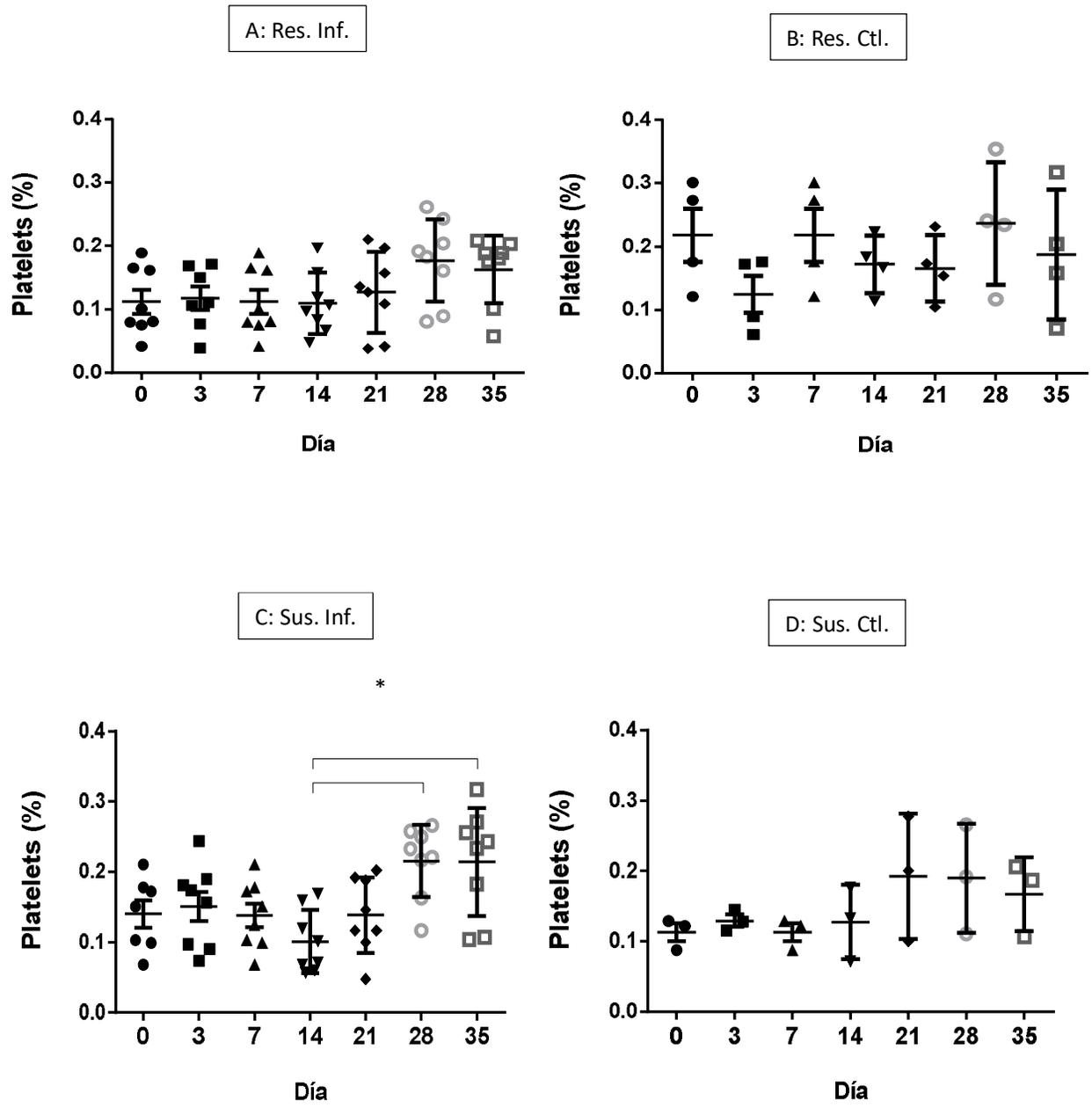


Figura 11: Evolución del porcentaje de plaquetas. A: Corriedale resistente infestado. B: Corriedale resistente control. C: Corriedale susceptible infestado. D: Corriedale susceptible control. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

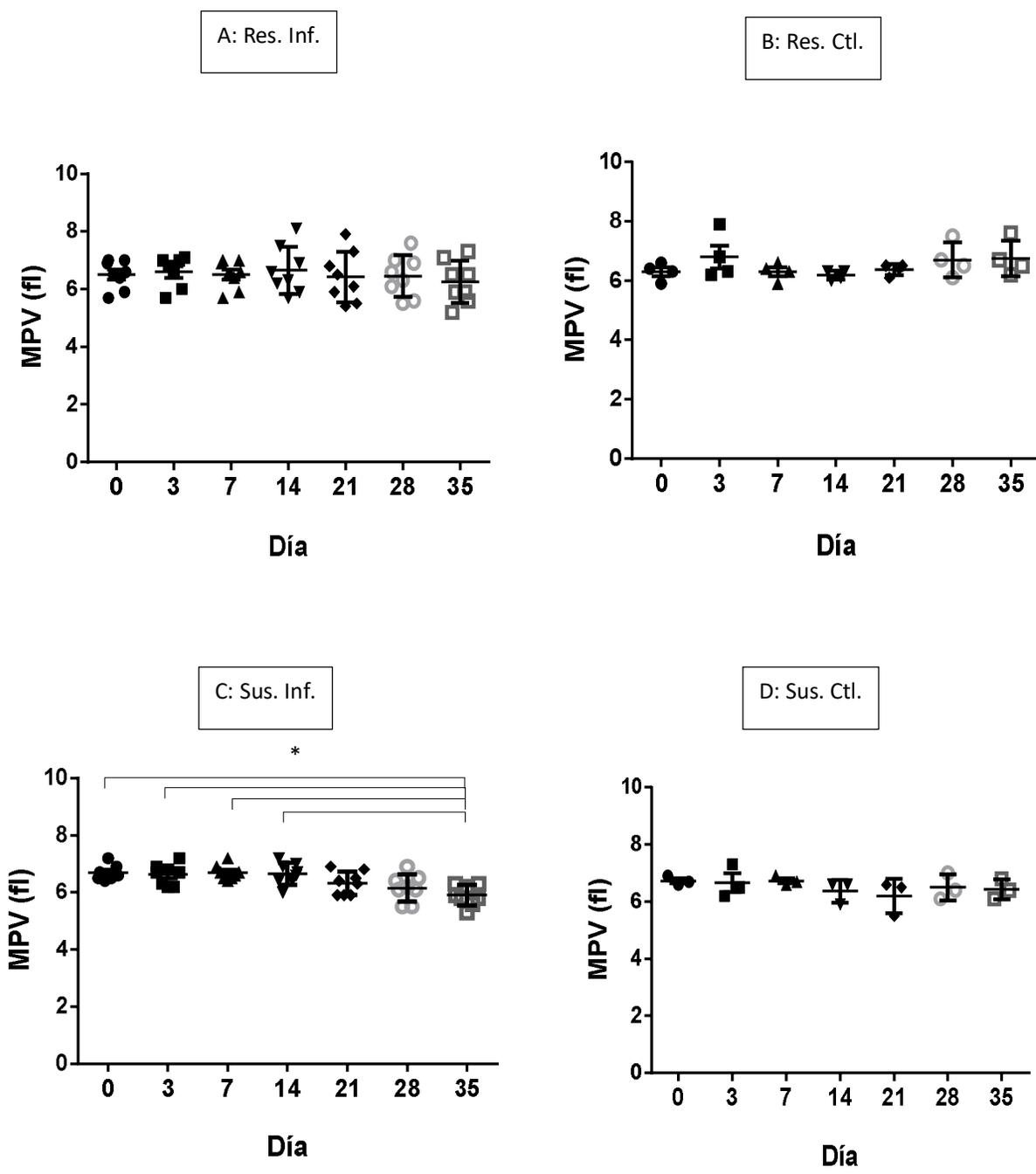


Figura 12: Evolución del Volumen Plaquetario Medio (MPV). A: Corriedale resistente infestado. B: Corriedale resistente control. C: Corriedale susceptible infestado. D: Corriedale susceptible control. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

Análisis de leucocitos en sangre

A continuación, como un primer paso de evaluación inmunológica, analizamos diferentes poblaciones leucocitarias en sangre para estudiar si las mismas se modificaban durante el transcurso de la infestación.

El conteo total de glóbulos blancos mostró un significativo incremento ($p=0,007$) hacia el final del experimento sólo en el grupo de ovinos resistentes infestados (Figura 13). Al realizar las comparaciones por día observamos que los animales susceptibles infestados presentaron un mayor conteo de células blancas al inicio del experimento en comparación con los resistentes infestados ($p=0,0004$). A su vez, el grupo resistente presentó diferencias entre sí (infestados y controles) en ese mismo momento ($p=0,02$) con un mayor conteo de glóbulos blancos en los controles. No encontramos diferencias significativas entre los grupos al final del experimento (Figura 14).

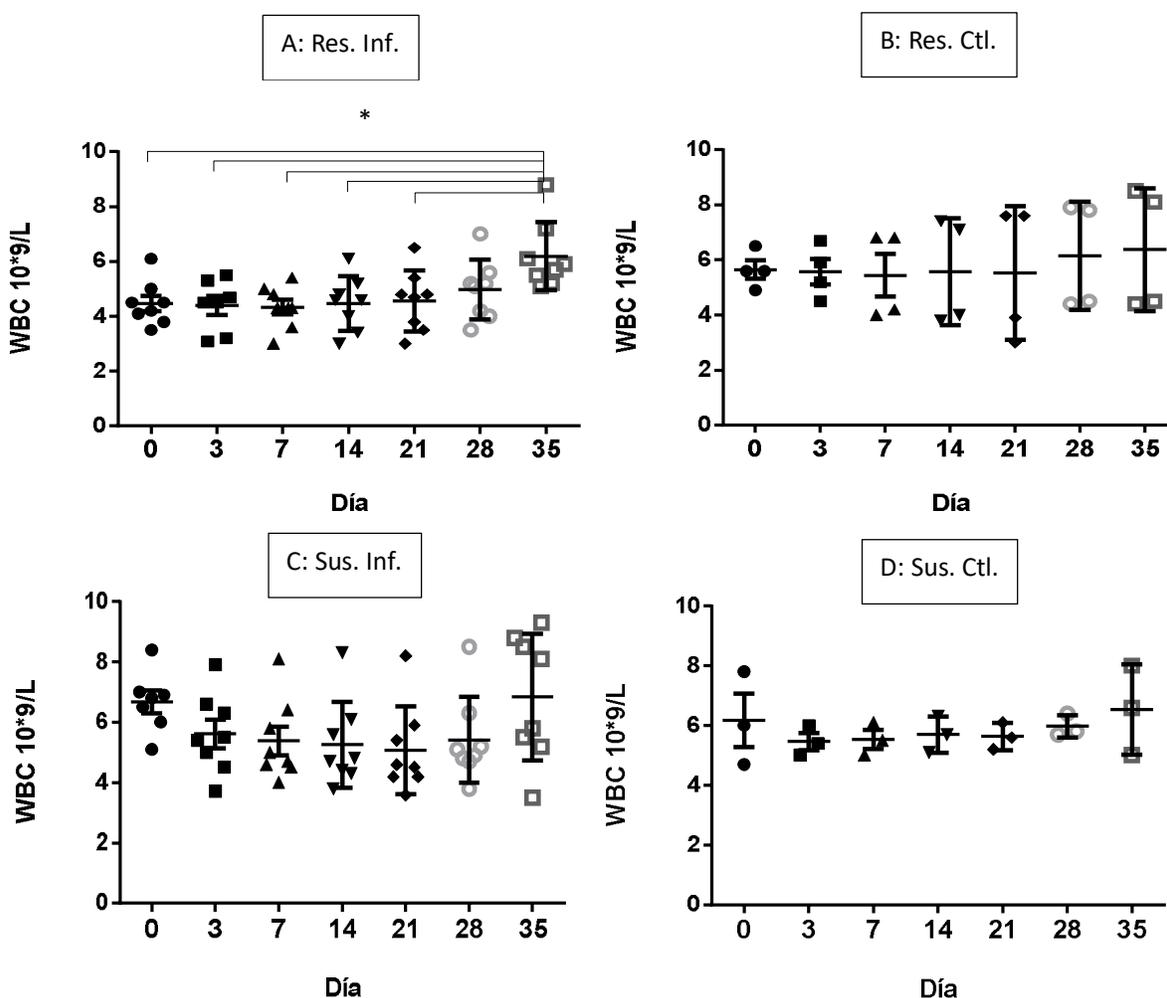


Figura 13: Evolución del recuento total de glóbulos blancos (WBC). A: Corriedale resistente infestado. B: Corriedale resistente control. C: Corriedale susceptible infestado. D: Corriedale susceptible control. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

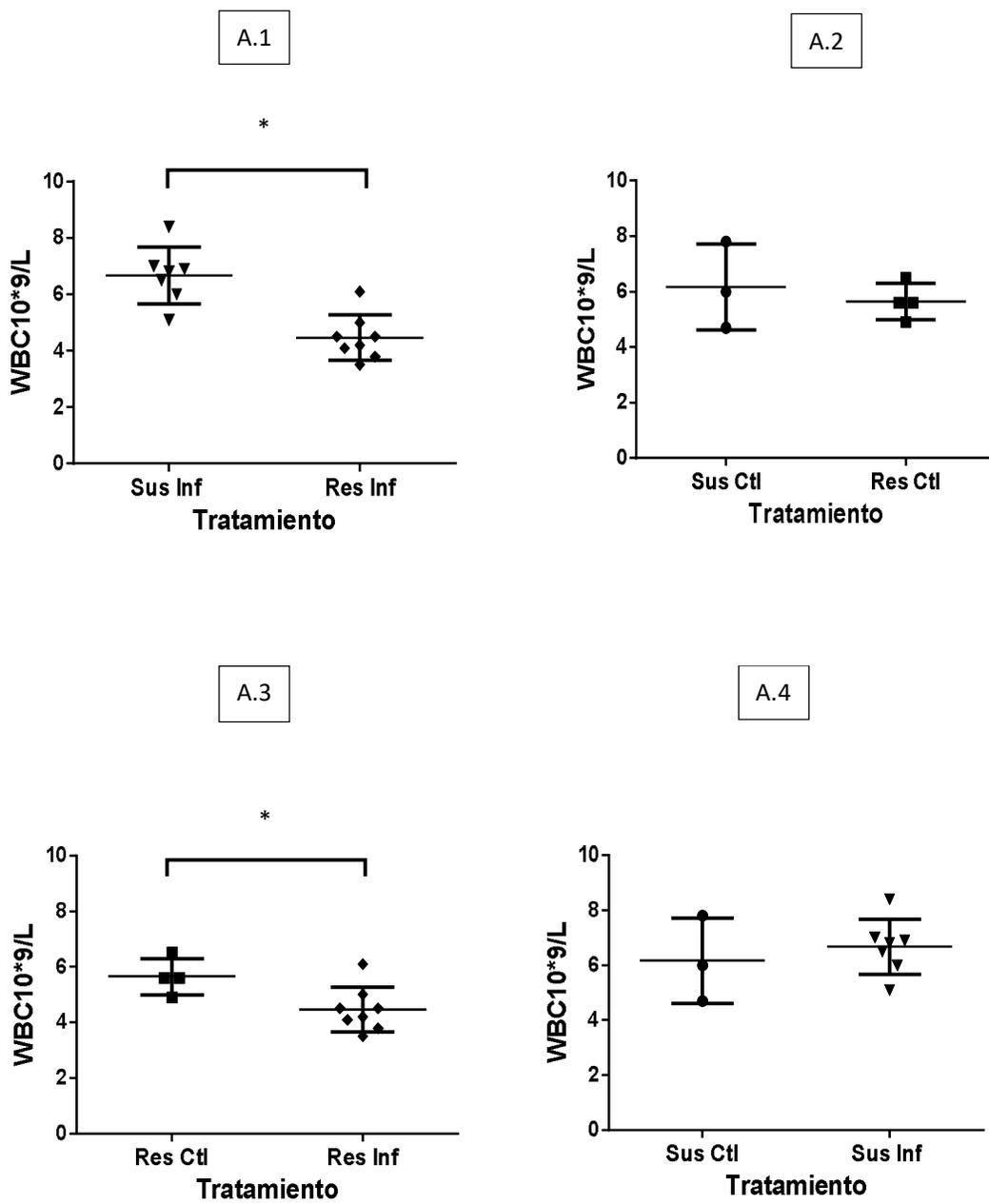


Figura 14 A: Comparación del recuento de glóbulos blancos totales (WBC) entre tratamientos en el día 0 del experimento. A.1: Corriedale resistentes y susceptibles infestados. A.2: Corriedale resistentes y susceptibles no infestados. A.3: Corriedale resistentes. A.4: Corriedale susceptibles. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

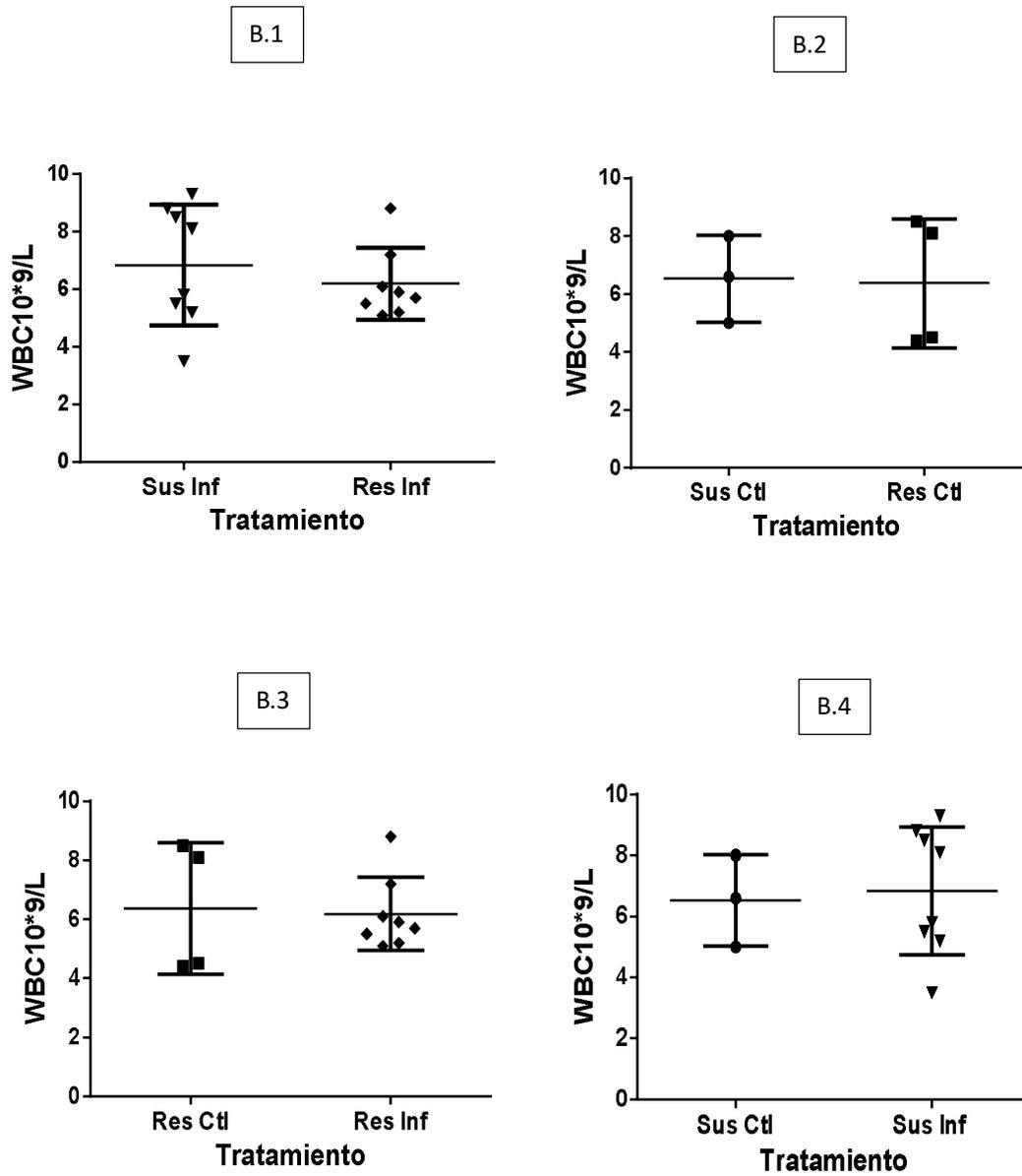


Figura 14 B: Comparación del recuento de glóbulos blancos totales (WBC) entre tratamientos en el día 35 del experimento. B.1: Corriedale resistentes y susceptibles infestados. B.2: Corriedale resistentes y susceptibles no infestados. B.3: Corriedale resistentes. B.4: Corriedale susceptibles.

En cambio, la concentración de monocitos mostró una disminución significativa ($p < 0,05$) en los grupos infestados, a partir del día 21 en los susceptibles y 28 en los resistentes (Figura 15).

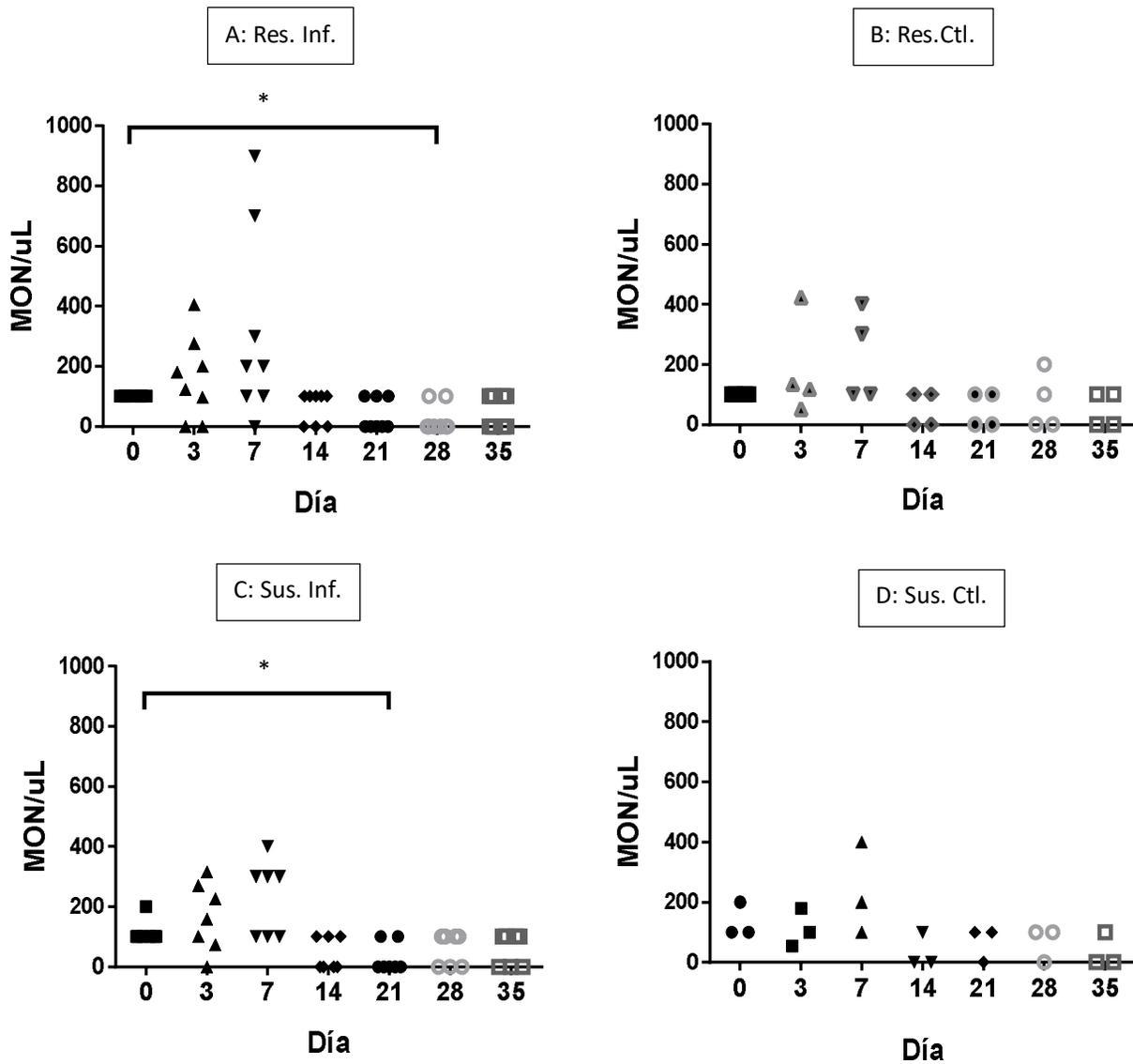


Figura 15: Evolución del recuento de monocitos (MON) durante el experimento. A: Corriedale resistentes infestados. **B:** Corriedale resistentes controles. **C:** Corriedale susceptibles infestados. **D:** Corriedale susceptibles controles. Las líneas horizontales representan diferencias estadísticamente significativas.

Por otro lado, los neutrófilos no mostraron un comportamiento diferencial relevante a lo largo del experimento en ningún grupo (Figura 16).

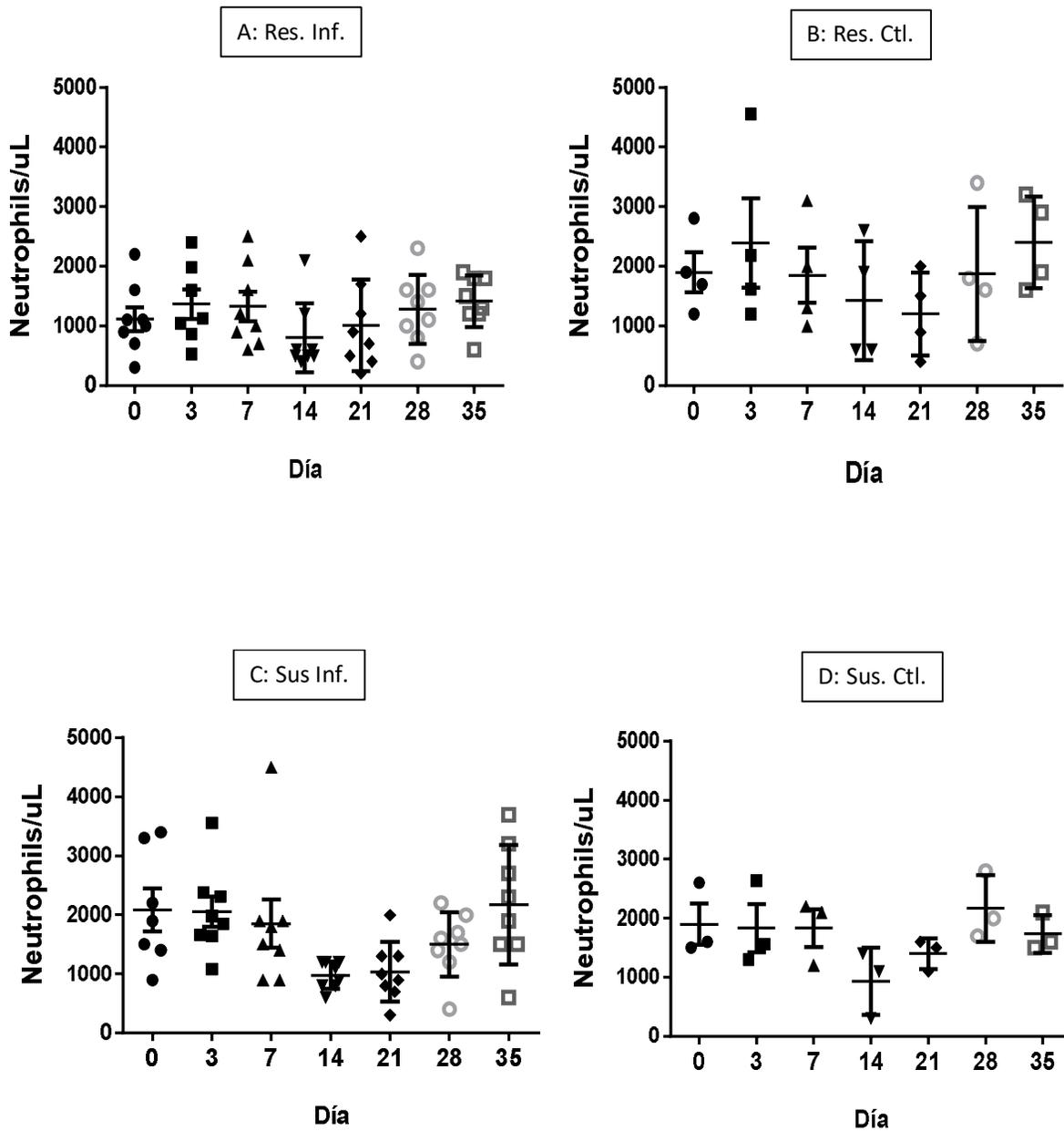


Figura 16: Evolución del recuento de neutrófilos durante el experimento. A: Corriedale resistentes infestados. B: Corriedale resistentes controles. C: Corriedale susceptibles infestados. D: Corriedale susceptibles controles.

Los eosinófilos presentaron una disminución a lo largo del experimento, con diferencias significativas ($p=0,007$) entre los días 0, 7 y 35, en los animales susceptibles infestados (Figura 17). En el resto de los grupos la concentración de eosinófilos se mantuvo constante.

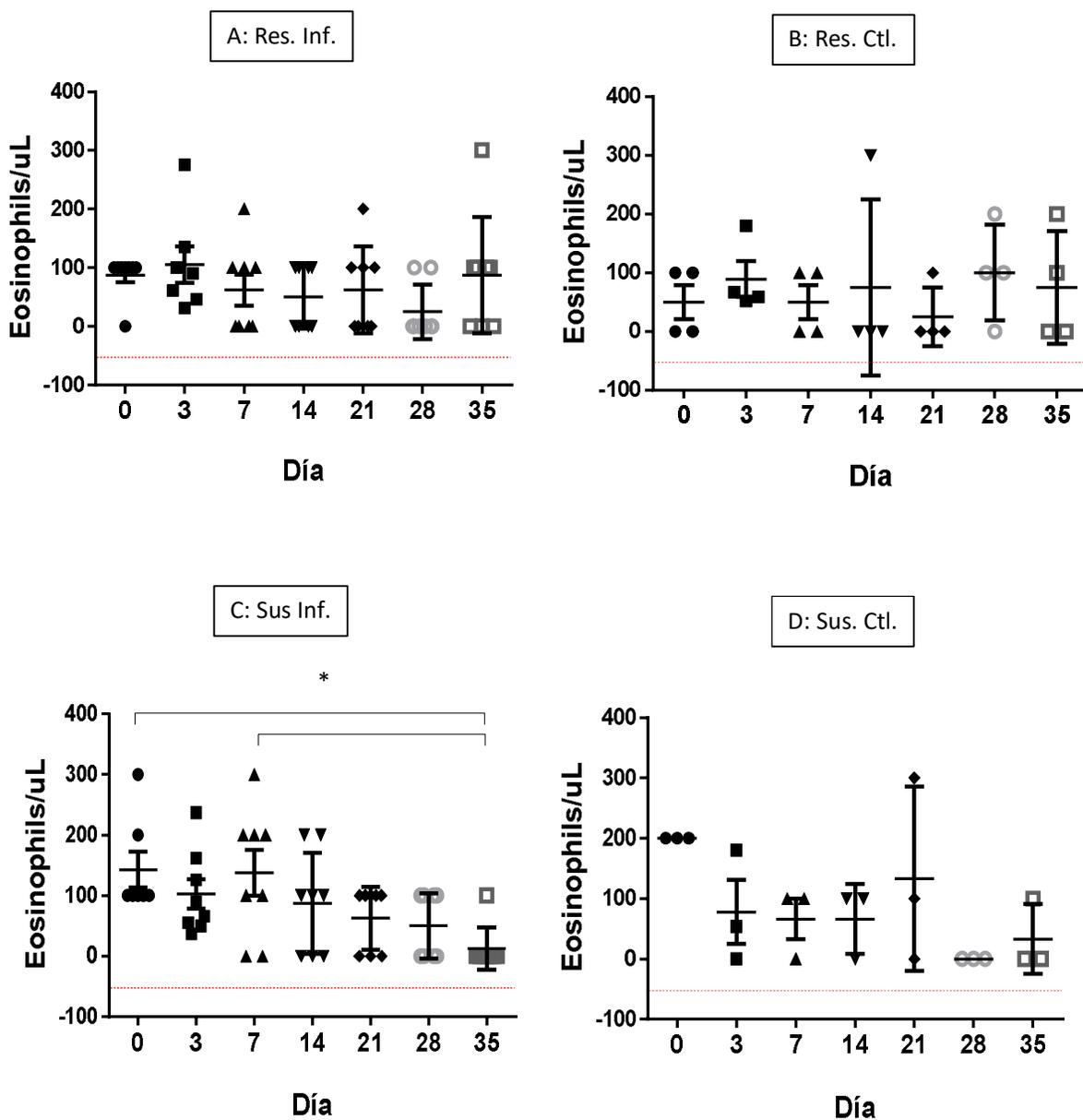


Figura 17: Evolución del recuento de eosinófilos durante el experimento. A: Corriedale resistentes infestados. B: Corriedale resistentes controles. C: Corriedale susceptibles infestados. D: Corriedale susceptibles controles. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

Por último, los linfocitos mostraron un aumento significativo ($p=0,0002$) hacia el final del experimento únicamente en el grupo de ovinos resistentes infestados (Figura 18). La concentración de linfocitos en sangre se mantuvo constante en el resto de los grupos.

En conclusión, se observó un aumento de los linfocitos en sangre en el grupo resistente infestado y una disminución en los eosinófilos de los animales susceptibles infestados, lo cual podría explicar el aumento de leucocitos en el grupo resistente inducido por la infestación.

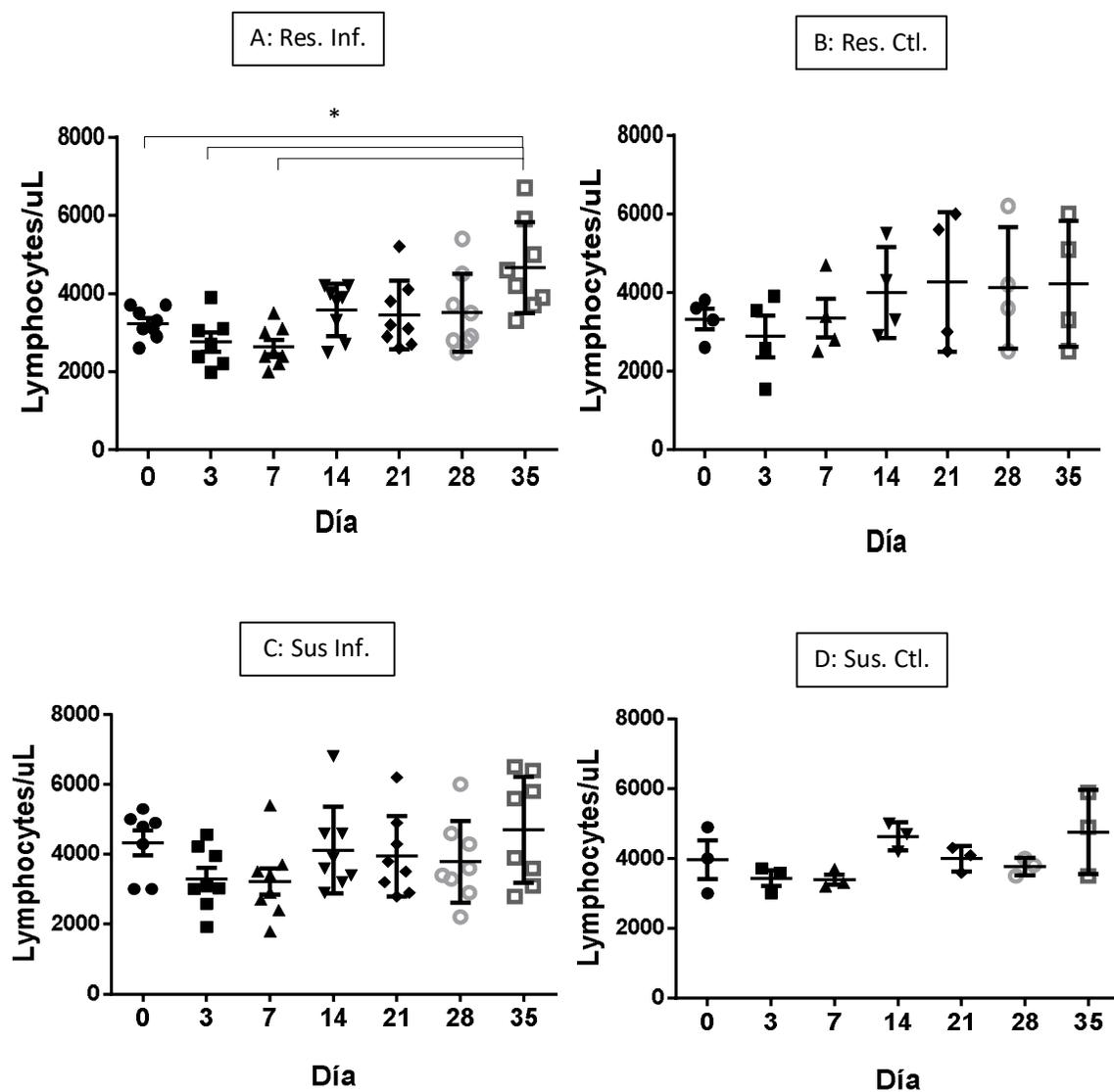


Figura 18: Evolución del recuento de linfocitos durante el experimento. A: Corriedale resistentes infestados. B: Corriedale resistentes controles. C: Corriedale susceptibles infestados. D: Corriedale susceptibles controles. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

Análisis de la respuesta inmune humoral

Con el fin de evaluar la respuesta inmune humoral en las dos líneas animales utilizados inducida por la infestación experimental, determinamos el título de inmunoglobulinas de isotipo IgA e IgG por un ensayo de tipo ELISA utilizando lisado de larvas L3 o de parásitos adultos y anticuerpos anti-ovino IgA e IgG, respectivamente. Los títulos de anticuerpos están presentados en títulos logarítmicos los cuales nos permitieron realizar comparaciones estandarizadas. Presentamos inicialmente los resultados de títulos de IgA en saliva contra antígenos adultos y larvarios (L3), IgA en plasma contra antígenos adultos y L3 y finalmente, IgG en plasma contra ambos antígenos.

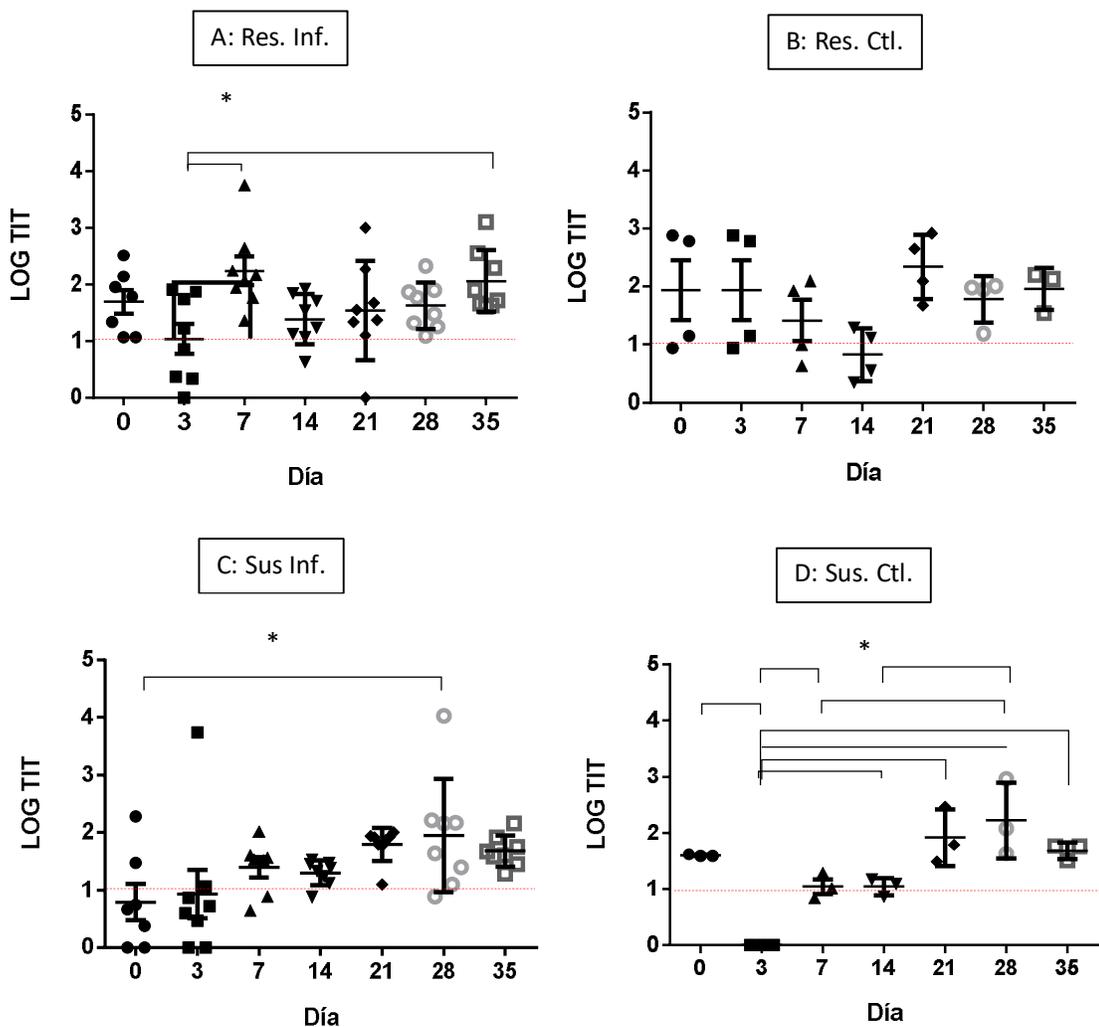


Figura 19: Evolución de logaritmos de títulos (LOG TIT) de IgA específicas para antígenos de *H. contortus* adulto en saliva. A: Corriedale resistentes infestados. B: Corriedale resistentes controles. C: Corriedale susceptibles infestados. D: Corriedale susceptibles controles. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

Inmunoglobulina A en saliva

Los ovinos resistentes infestados presentaron anticuerpos específicos contra antígenos de *H. contortus* adulto en saliva desde el inicio del experimento y se mantuvieron constantes durante el transcurso de éste. En cambio, los susceptibles infestados registraron un nivel bajo de IgA al inicio, con un aumento significativo ($p=0,018$) en el día 28 post-infestación. En el caso de los controles, los resistentes se mantuvieron con títulos constantes, mientras que los susceptibles disminuyeron en el día 3 para luego aumentar (Figura 19). Al comparar los grupos entre sí día por día, observamos que los resistentes muestran un nivel significativamente ($p<0,05$) más elevado de anticuerpos específicos contra antígenos de *H. contortus* adulto desde el inicio del experimento, en relación a los susceptibles, como mostramos en la figura 20.

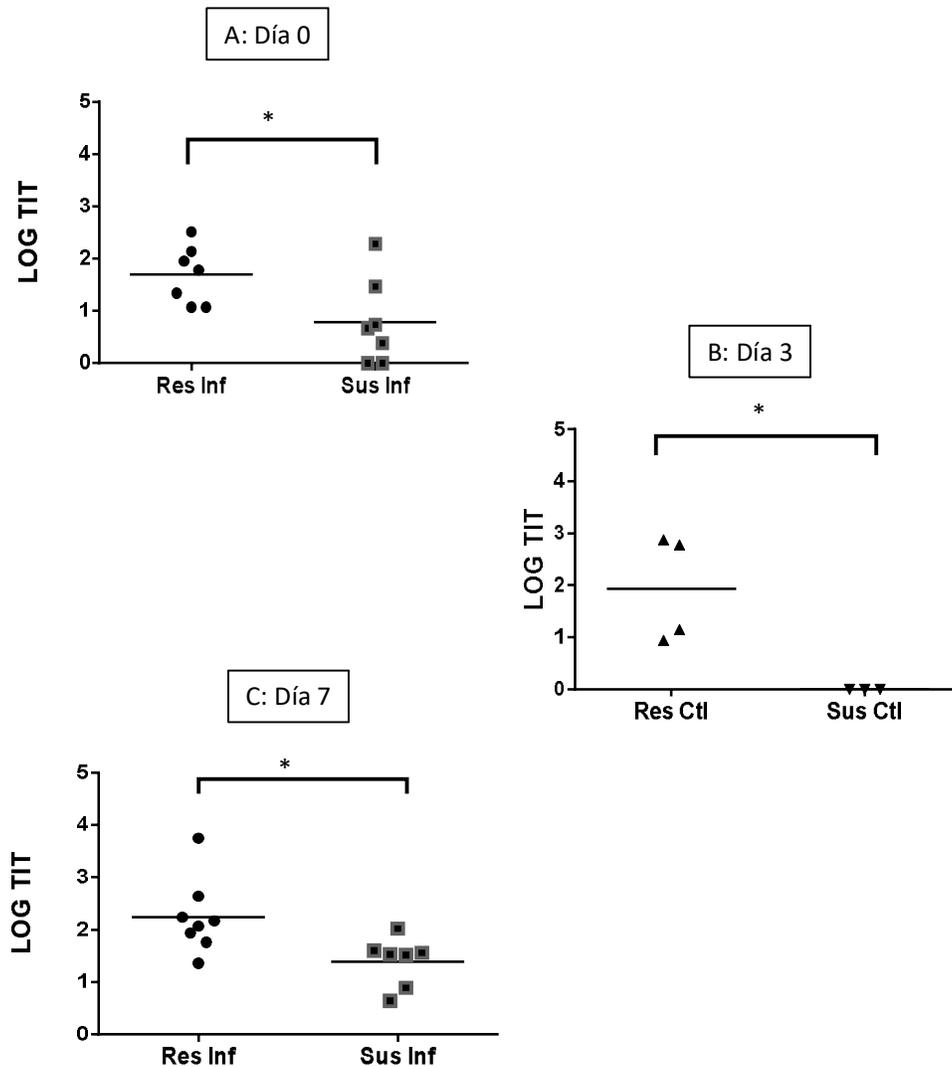


Figura 20: Comparación de logaritmos de títulos (LOG TIT) de IgA específicas para antígenos de *H. contortus* adulto en saliva entre tratamientos según días post infestación. A: Día 0. B: Día 3. C: Día 7. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

Para completar este análisis, también determinamos el título de IgA en saliva específica de antígenos larvarios. En este caso, sólo los susceptibles mostraron un aumento estadísticamente significativo entre los diferentes muestreos ($p < 0,01$), a partir del día 21 en el caso de los infestados y a partir del día 28 los controles (Figura 21). En cambio, los resistentes, al igual que en el caso anterior, se mantuvieron constantes.

Cuando comparamos los grupos día por día, observamos que los animales resistentes, tanto los infestados como los controles, presentaron mayores títulos desde el inicio hasta el final del experimento (Figura 22).

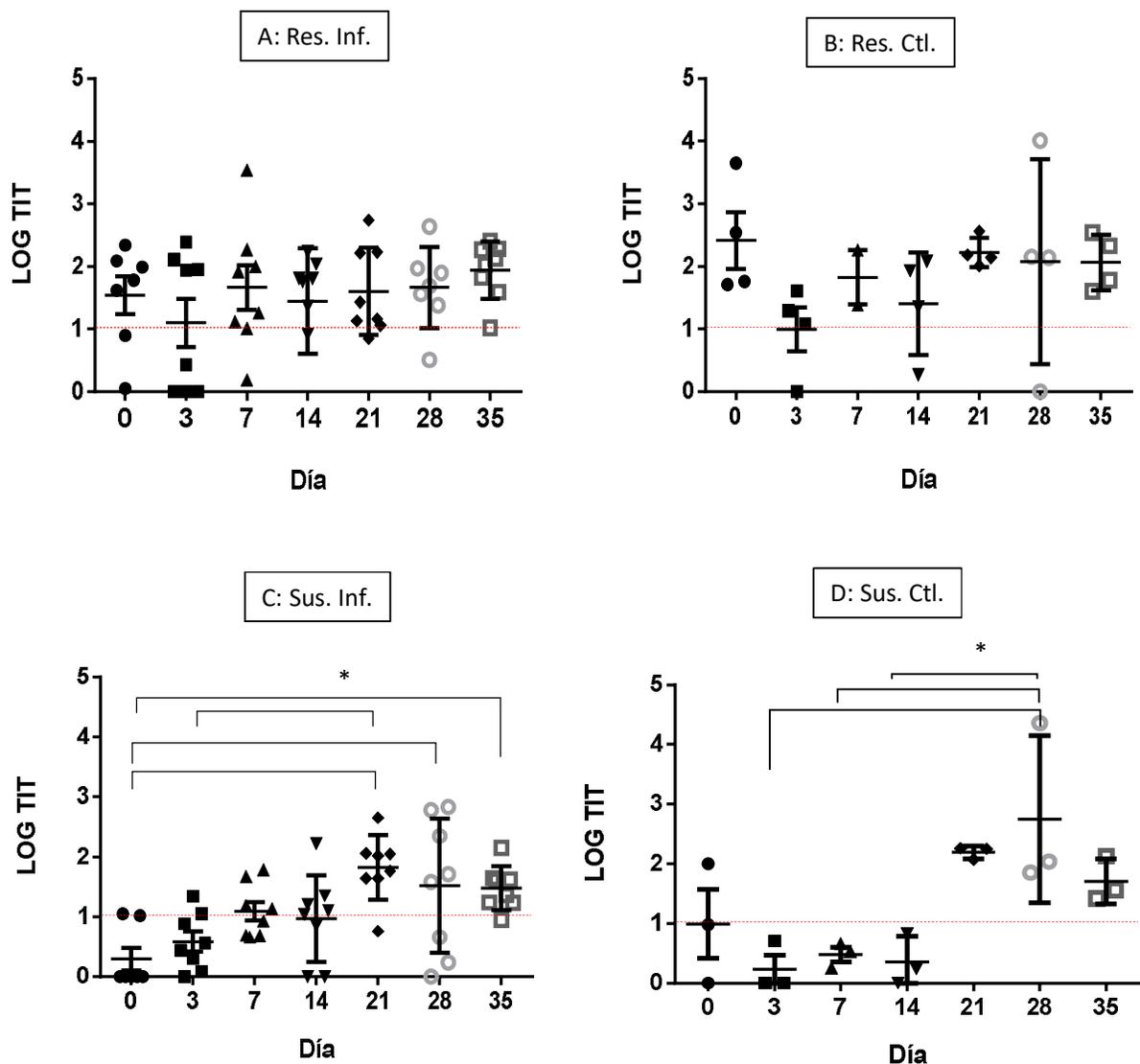


Figura 21: Evolución de logaritmos de títulos (LOG TIT) de IgA específicas para antígenos larvarios de *H. contortus* en saliva. A: Corriedale resistentes infestados. B: Corriedale resistentes controles. C: Corriedale susceptibles infestados. D: Corriedale susceptibles controles. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

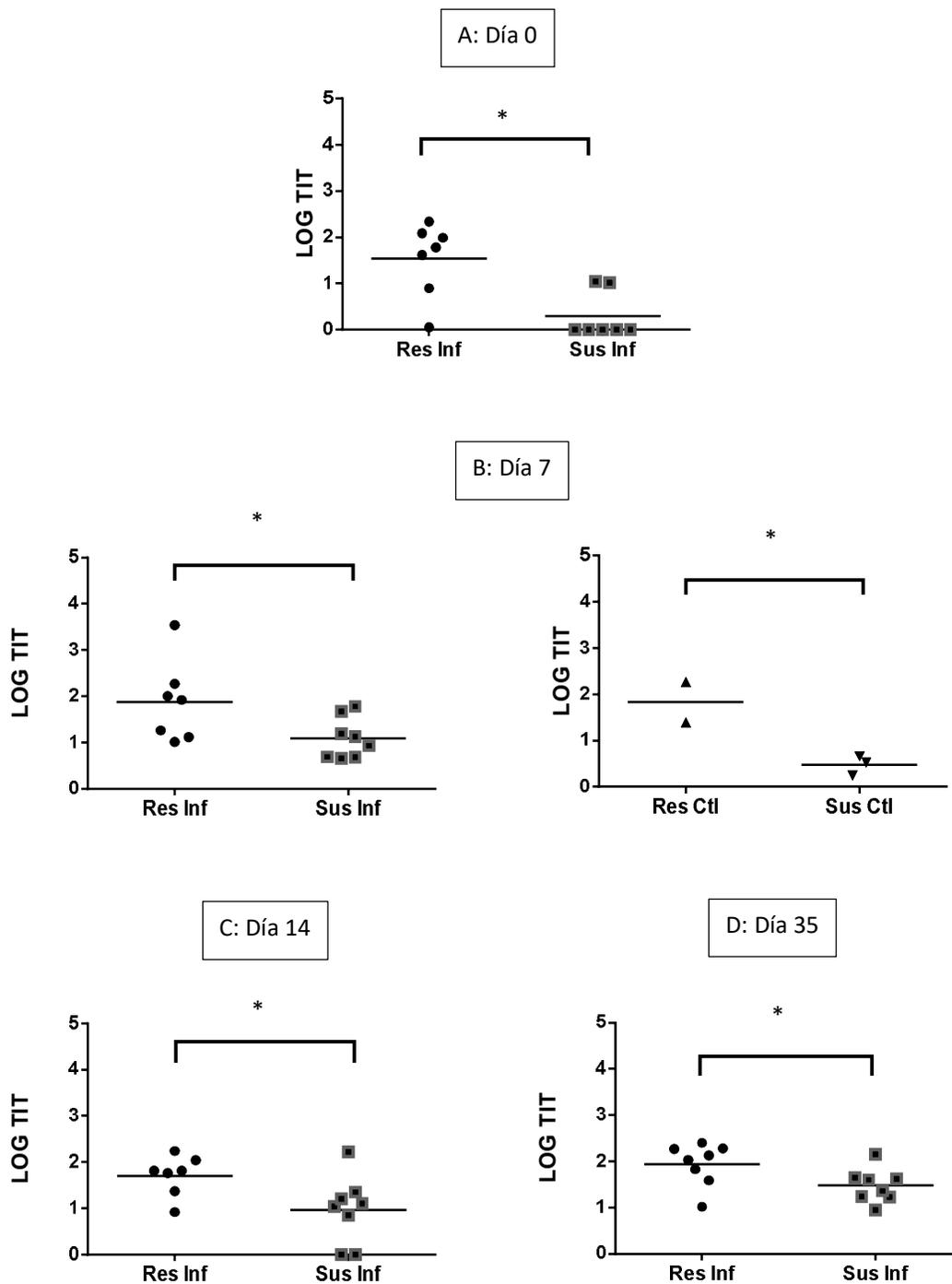


Figura 22: Comparación de los logaritmos de títulos (LOG TIT) de IgA específicas para antígenos larvarios de *H. contortus* en saliva entre tratamientos según día post infestación. A: Día 0. B: Día 7. C: Día 14. D: Día 35. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

Inmunoglobulina A en plasma

Los títulos de IgA en plasma contra antígenos del estadio parasitario adulto fueron más elevados desde el inicio del experimento en los animales resistentes en relación a los susceptibles y se mantuvieron constantes en los primeros a lo largo de todo el período (Figura 23A). En cambio, los títulos de IgA específica en los susceptibles infestados mostraron un incremento significativo ($p < 0,0001$) recién a partir del día 21, con una disminución posterior, hacia el final del experimento (Figura 23B y D y Figura 24). Al realizar las comparaciones día a día, observamos que el nivel de anticuerpos fue mayor en los ovinos resistentes, tanto controles como infestados a lo largo de todo el experimento (Figura 24).

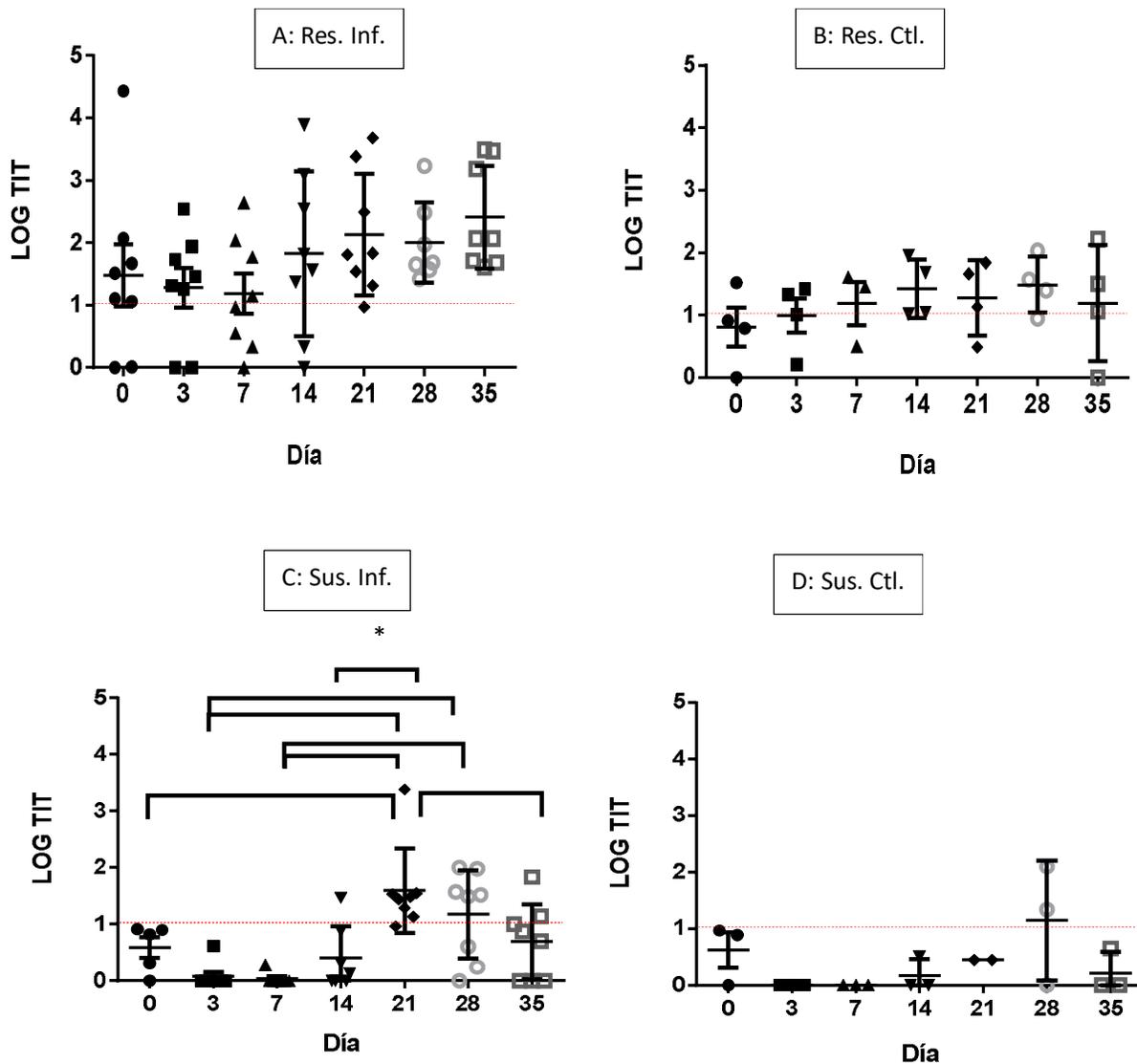


Figura 23: Evolución de logaritmos de títulos (LOG TIT) de IgA específicas para antígenos de *H. contortus* adultos en plasma. A: Corriedale resistentes infestados. B: Corriedale resistentes controles. C: Corriedale susceptibles infestados. D: Corriedale susceptibles controles. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

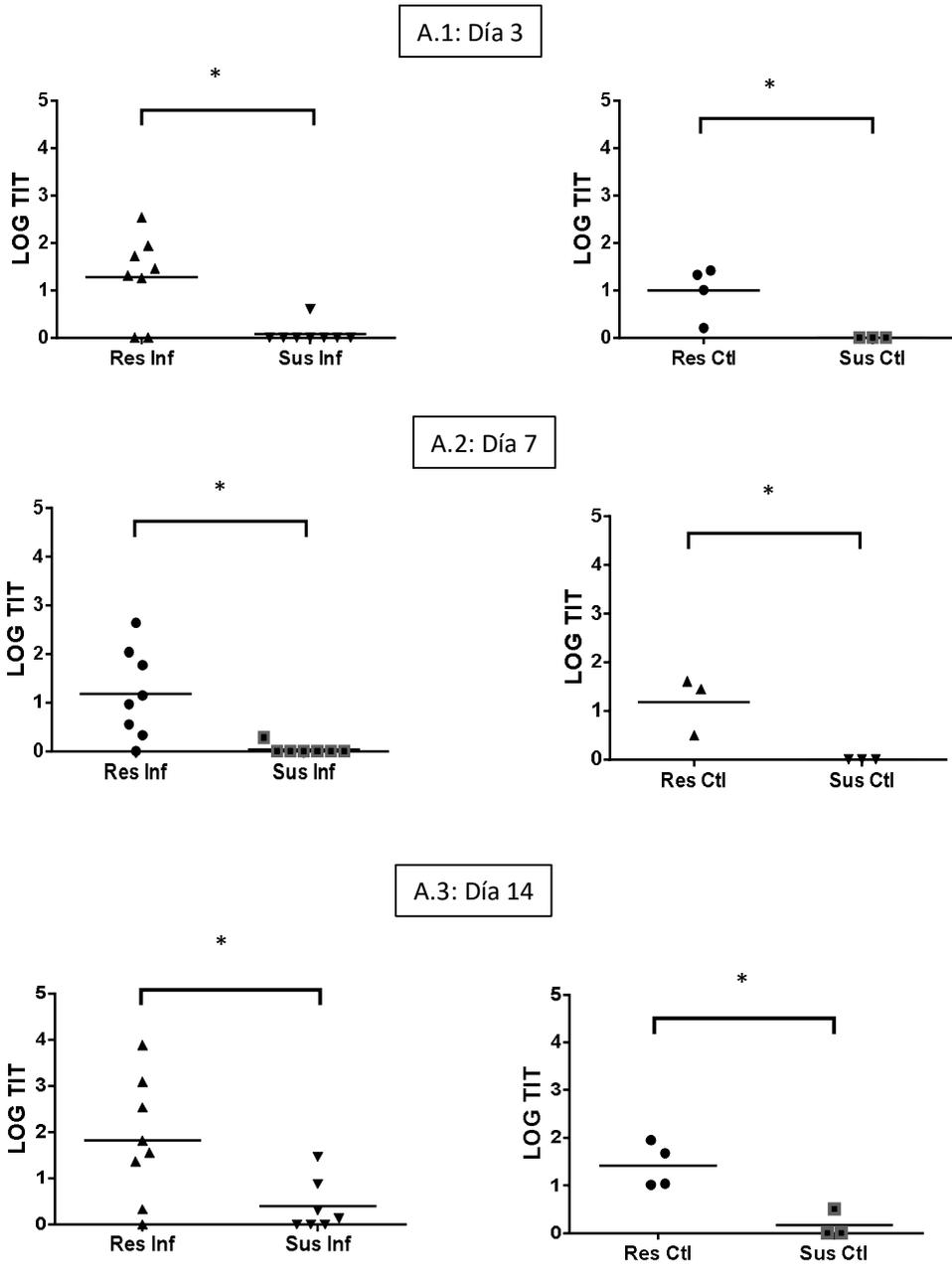


Figura 24 A: Comparación de los logaritmos de títulos (LOG TIT) de IgA específicas para antígenos de *H. contortus* adultos en plasma entre tratamientos según día post infestación. A.1: Día 3. A.2: Día 7. A.3: Día 14. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

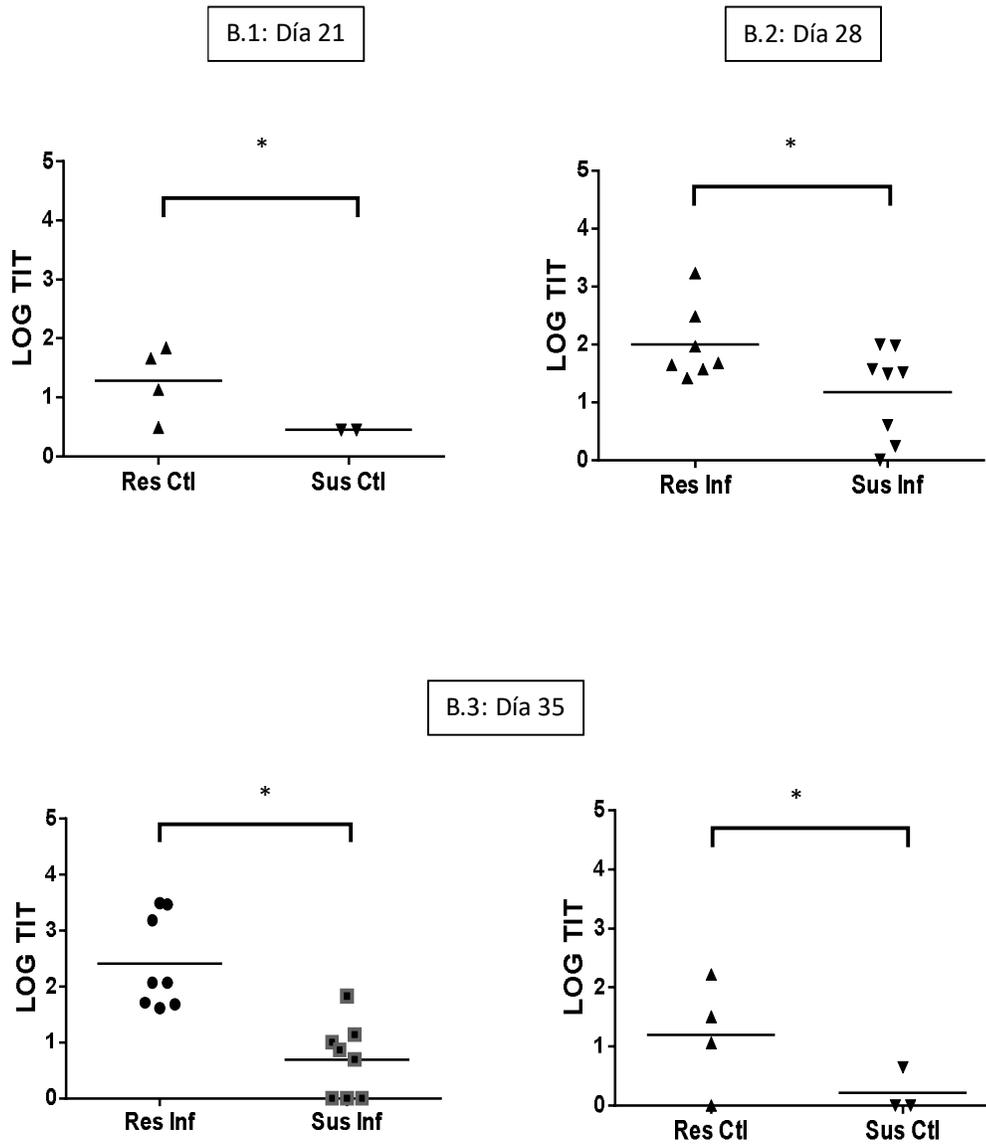


Figura 24 B: Comparación de los logaritmos de títulos (LOG TIT) de IgA específicas para antígenos de *H. contortus* adultos en plasma entre tratamientos según día post infestación. B.1: Día 21. B.2: Día 28. B.3: Día 35. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

Por otro lado, el nivel de IgA en plasma contra antígenos larvarios presentó un comportamiento estable en los resistentes infestados, mientras que los animales susceptibles infestados manifestaron un incremento significativo ($p < 0,0001$) de títulos recién a partir del día 21 (Figura 25). Por su parte, la línea resistente control mostró un incremento hacia el final del experimento. Para finalizar, al comparar ambos grupos en el día 35 pudimos comprobar que los resistentes infestados presentaron una diferencia significativa ($p = 0,04$) a favor en el nivel de IgA en plasma contra este antígeno (Figura 26) en relación a los susceptibles.

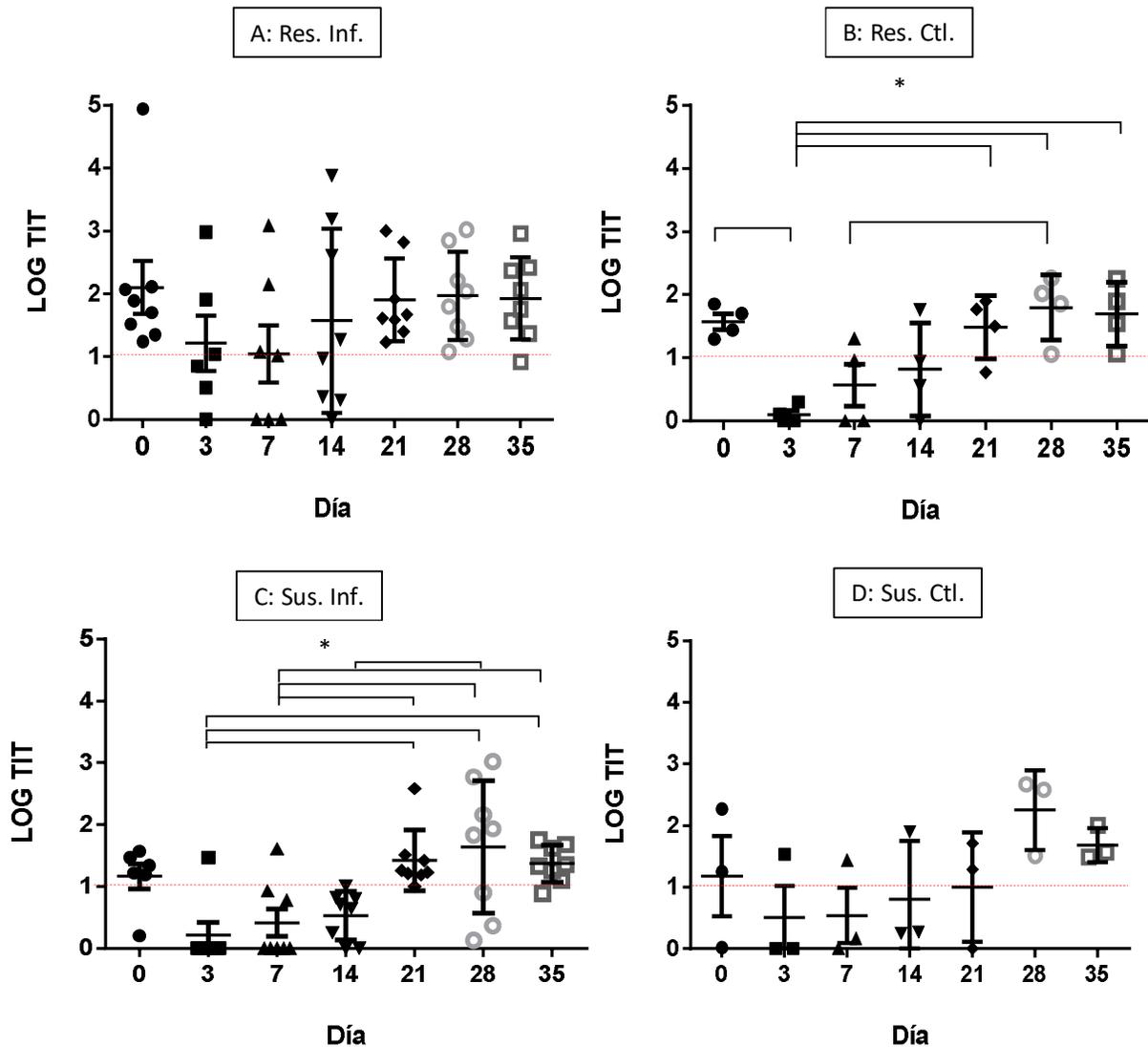


Figura 25: Evolución de logaritmos de títulos (LOG TIT) de IgA específicas para antígenos larvarios de *H. contortus* en plasma. A: Corriedale resistentes infestados. B: Corriedale resistentes controles. C: Corriedale susceptibles infestados. D: Corriedale susceptibles controles. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

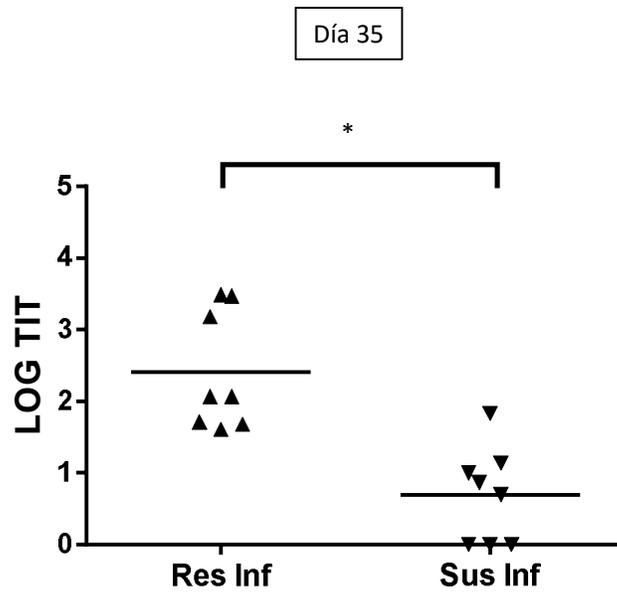


Figura 26: Comparación de los logaritmos de títulos (LOG TIT) de IgA específicas para antígenos larvarios de *H. contortus* adultos en plasma entre tratamientos en el día 35 post infestación. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

Inmunoglobulina G en plasma

Las IgG plasmáticas específicas de antígenos presentes en el estadio parasitario adulto mostraron títulos relativamente constantes en relación al inicio del experimento, tanto en la línea resistente como en la susceptible (Figuras 27A y C). Sin embargo, los resistentes mostraron una disminución de títulos de este anticuerpo alrededor del día 21 (controles) y 28 (infestados), mientras que los susceptibles controles, a partir del día 14, pero cabe destacar que los niveles en general fueron más elevados en los resistentes controles a lo largo de todo el experimento (Figuras 27B y D). Comprobamos estadísticamente estas diferencias ($p < 0,002$) analizando los títulos cada día de muestreo por separado, donde visualizamos que los resistentes controles tuvieron títulos más elevados que los susceptibles no infestados a lo largo de todo el experimento (Figura 28).

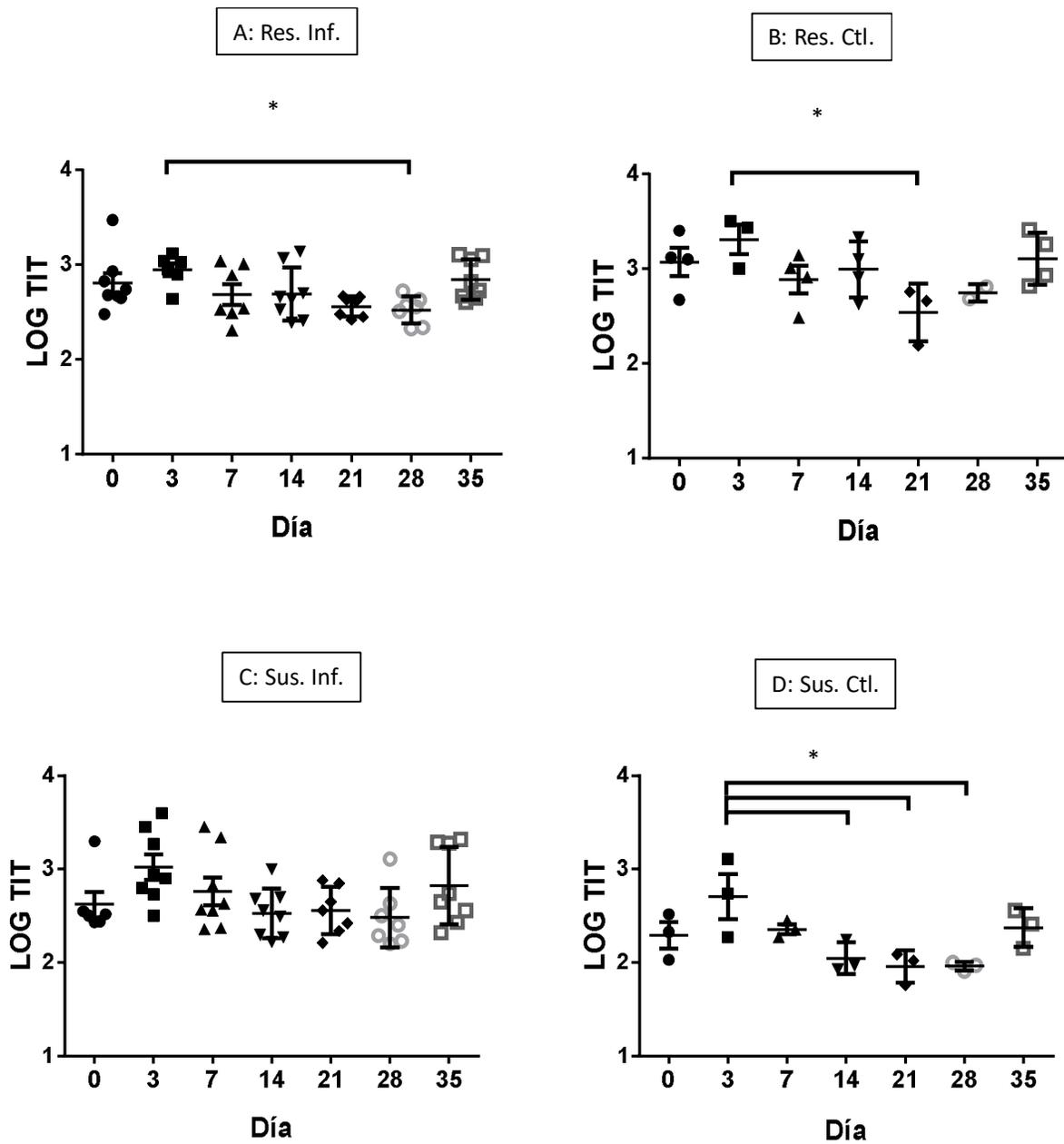


Figura 27: Evolución de logaritmos de títulos (LOG TIT) de IgG específicas para antígenos de *H. contortus* adultos en plasma. A: Corriedale resistentes infestados. B: Corriedale resistentes controles. C: Corriedale susceptibles infestados. D: Corriedale susceptibles controles. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

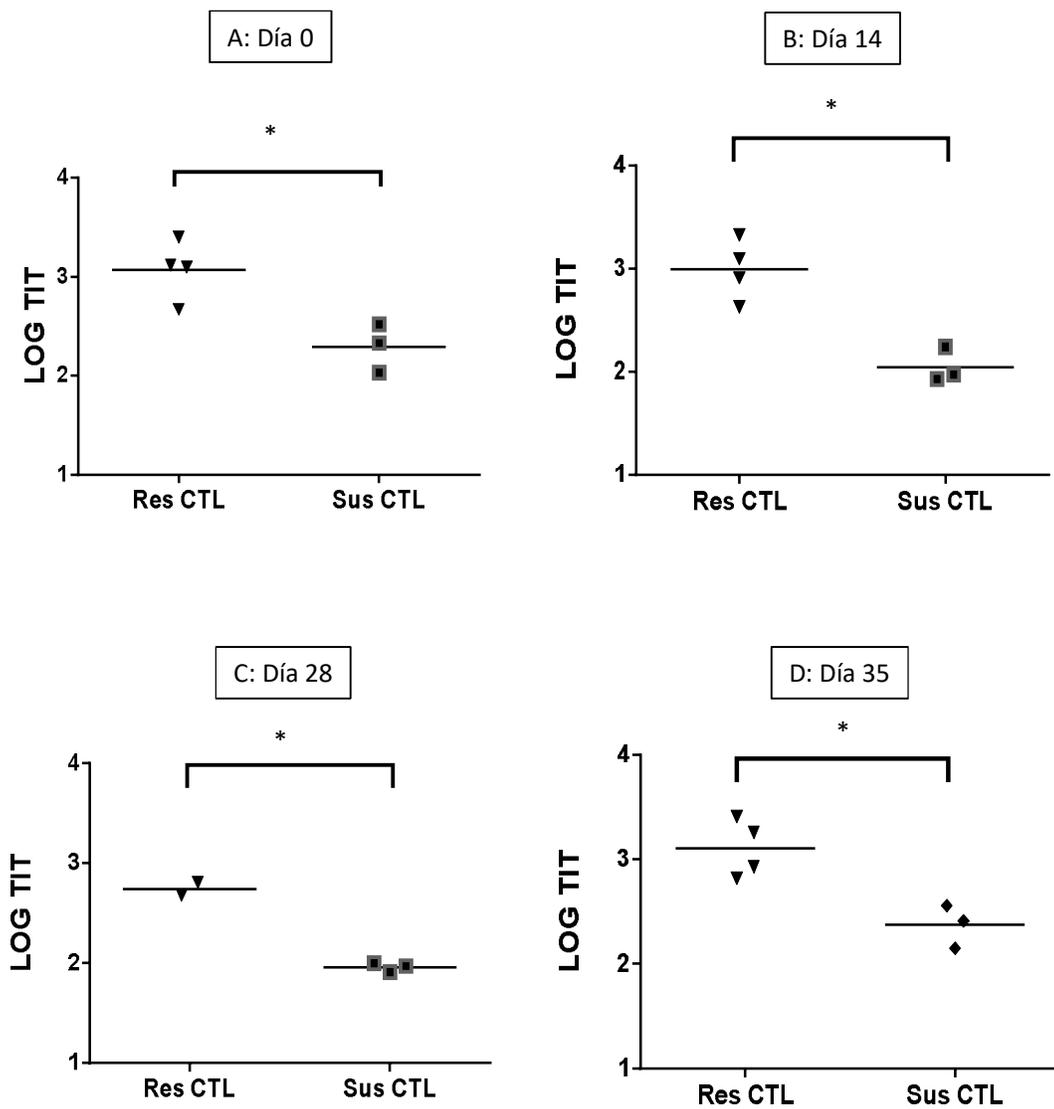


Figura 28: Comparación de los logaritmos de títulos (LOG TIT) de IgG específicas para antígenos de *H. contortus* adultos en plasma entre tratamientos según día post infestación. A: Día 0. B: Día 14. C: Día 28. D: Día 35. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

En el caso de las IgG específicas para antígenos larvarios de *H. contortus*, observamos un comportamiento similar, constante en todos los grupos y con niveles ligeramente superiores en los resistentes (Figura 29 y 30).

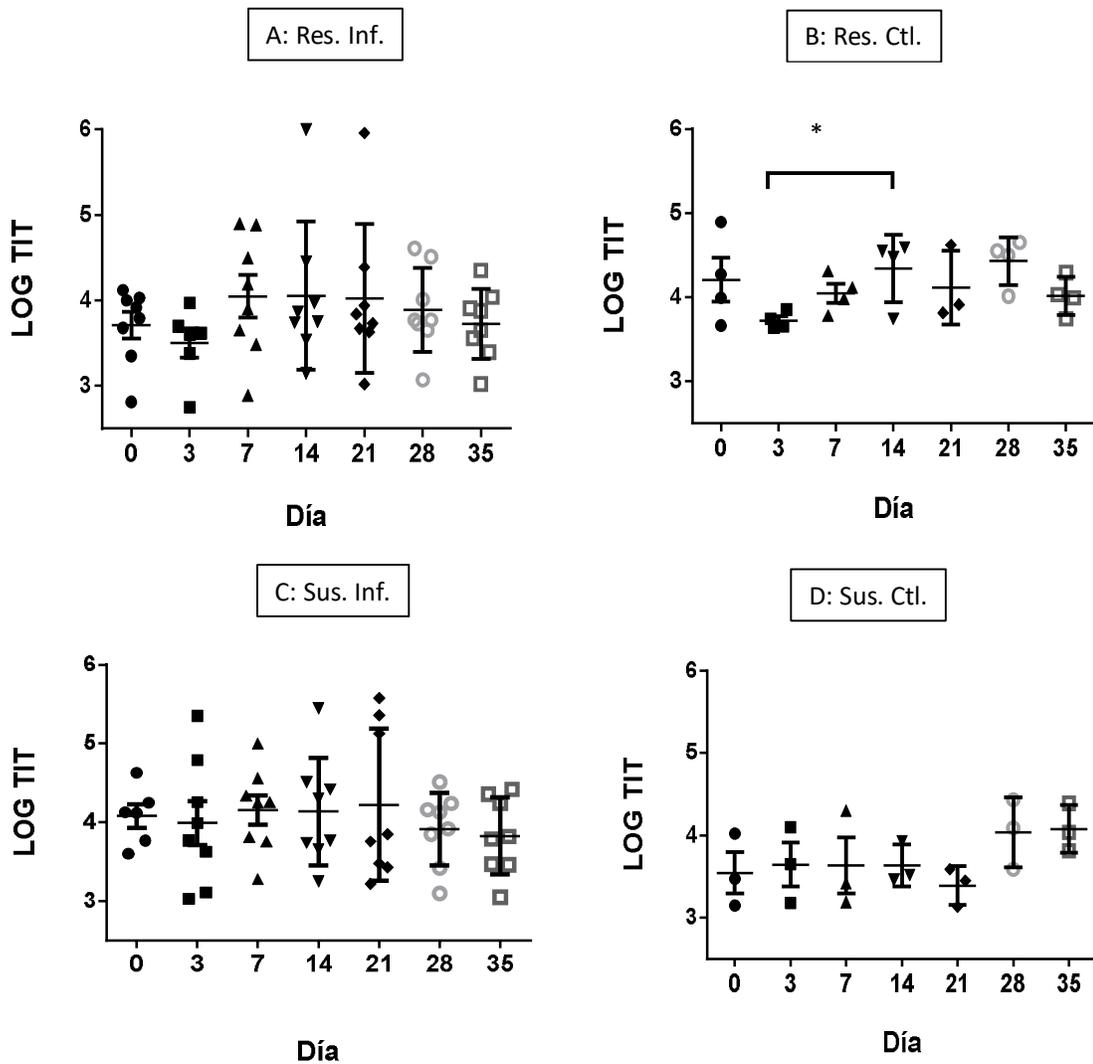


Figura 29: Evolución de logaritmos de títulos (LOG TIT) de IgG específicas para antígenos larvarios de *H. contortus* en plasma. A: Corriedale resistentes infestados. B: Corriedale resistentes controles. C: Corriedale susceptibles infestados. D: Corriedale susceptibles controles. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

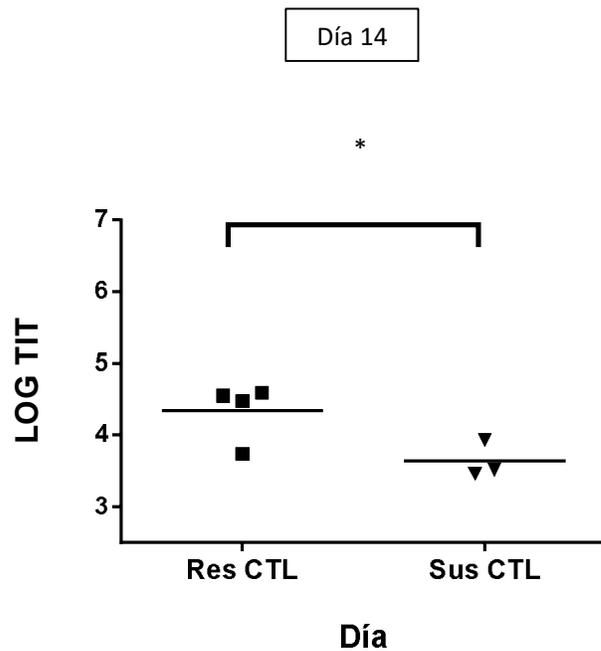


Figura 30: Comparación de los logaritmos de títulos (LOG TIT) de IgG específicas para antígenos larvarios de *H. contortus* en plasma entre tratamientos el día 14 post infestación. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

En conclusión, pudimos observar que la línea de ovinos resistentes a nemátodos gastrointestinales, presentó en general, títulos de anticuerpos IgA específicos de *H. contortus* más elevados desde el comienzo del experimento y se mantuvieron estables a lo largo del mismo, mientras que los susceptibles, partieron de niveles inferiores y sólo en algunos casos mostraron un aumento significativo posterior.

Parte II

Análisis de la respuesta inmune en ovinos Rylington/Corriedale resistentes infestados experimentalmente

A continuación, presentaremos los resultados obtenidos del análisis de la respuesta inmune a la infestación con *H. contortus* en ovinos Rylington/Corriedale resistentes. Cabe destacar que, en este caso, no disponemos de una línea cruce Rylington/Corriedale susceptible, por lo que las comparaciones se hacen con las líneas base Corriedale resistente y susceptibles analizadas en el apartado anterior y con los propios controles no infestados. El valor de estas comparaciones radica en la necesidad de aportar mayor información sobre el material genético introducido recientemente en Uruguay, que a su vez posee otras características productivas. Mostramos los resultados siguiendo la misma lógica y orden que el apartado anterior.

En primer lugar, mostramos el análisis del nivel de infestación a través del HPG, donde observamos que el grupo de animales infestados mostró un incremento de dicho parámetro a partir del día 28 del experimento (Figura 31), más tardíamente que las otras dos líneas analizadas. Al realizar la comparación con dichos grupos encontramos diferencias significativas ($p < 0,001$) en los días 21 y 35 (Figura 32). En ambos casos, los animales infestados que presentaron mayores valores de HPG correspondieron al grupo de susceptibles infestados, luego siguieron los resistentes infestados y finalmente, quienes mostraron los valores más bajos fueron los Rylington/Corriedale.

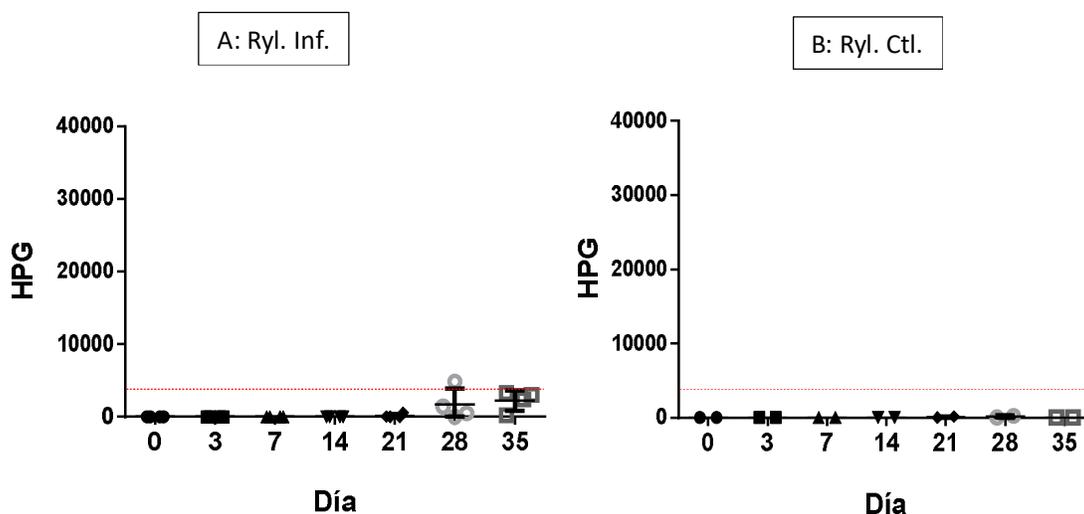


Figura 31: Evolución del nivel de infestación por *H. contortus*. Conteo de huevos por gramo de materia fecal (HPG) obtenidos por técnica de Mc Master. A: Rylington/Corriedale infestado. B: Rylington/Corriedale control.

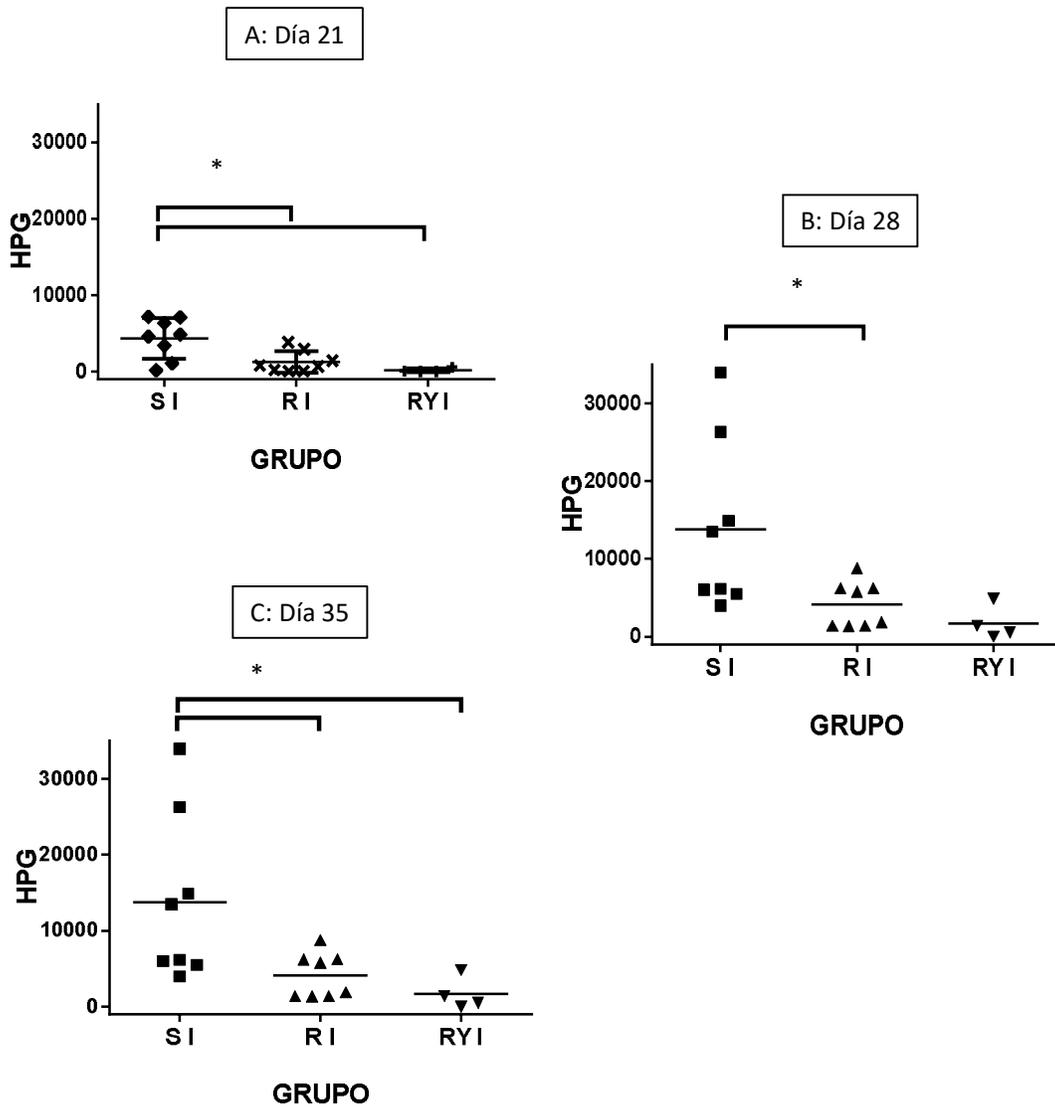


Figura 32: Comparación del conteo de huevos por gramo de materia fecal (HPG) entre tratamientos según día post infestación. A: Día 21. B: Día 28. C: Día 35. Las líneas horizontales representan diferencias estadísticamente significativas.

En cuanto a los parámetros hematológicos vinculados a la serie roja del hemograma, relacionados a la patogenia parasitaria, podemos mencionar en primer lugar que el valor de hematocrito no mostró variaciones significativas a lo largo del experimento en ninguno de los dos grupos, ni tratamiento ni control (Figura 33). En cambio, sí hubo una reducción significativa tanto del valor absoluto de hemoglobina ($p=0,003$), como del valor de HCM ($p=0,0027$) en el grupo infestado hacia el final del experimento (Figuras 34 y 35).

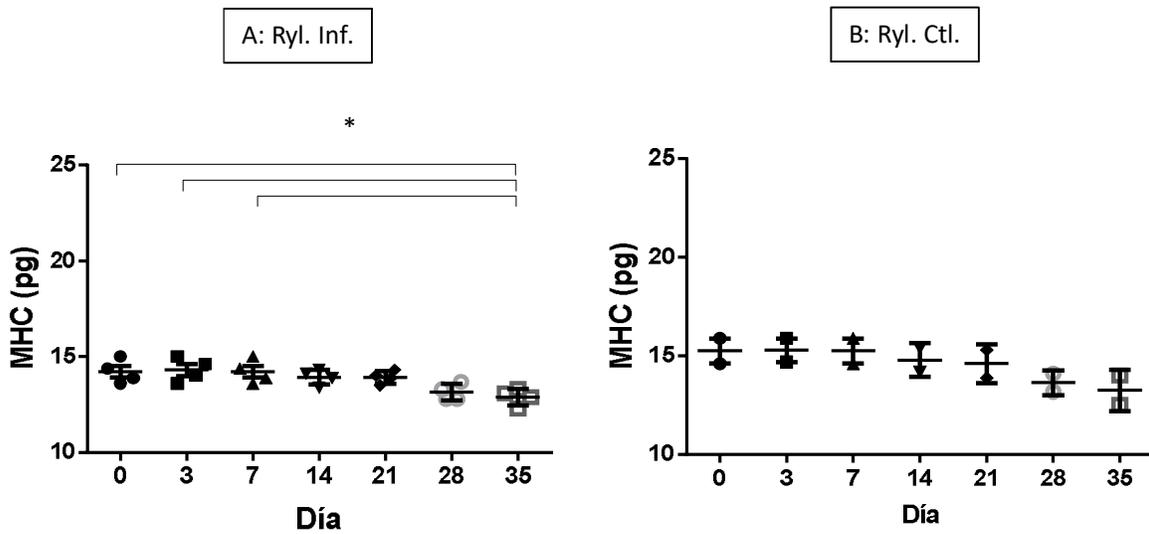


Figura 35: Evolución de la hemoglobina corpuscular media (MCH) en ovinos Rylington/Corriedale. A: Infestados. B: Controles. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

Por otro lado, el valor de VCM, se mantuvo estable en ovinos infestados y controles durante todo el experimento (Figura 36), mientras que el RDWc mostró un incremento significativo ($p < 0,02$) en ambos grupos (Figura 37).

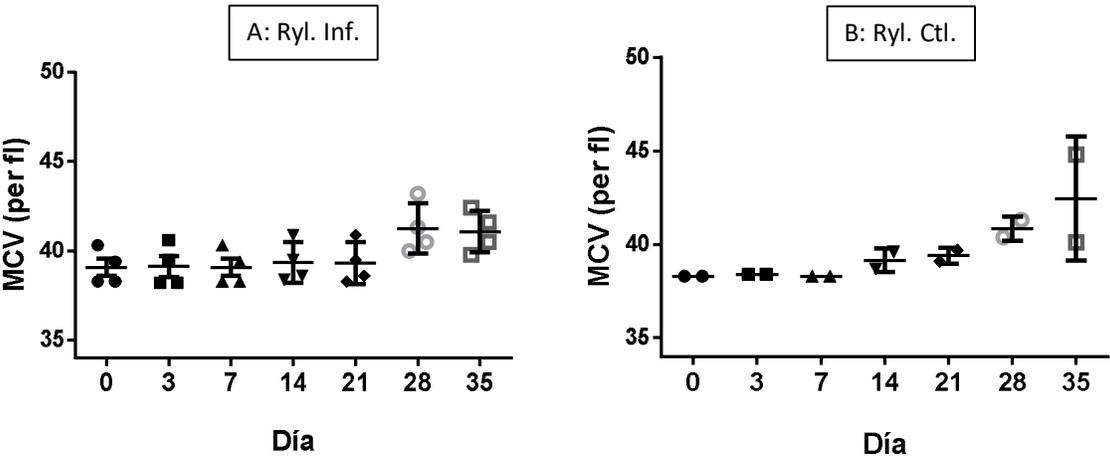


Figura 36: Evolución del volumen corpuscular medio (MVC) en ovinos Rylington/Corriedale. A: Infestados. B: Controles.

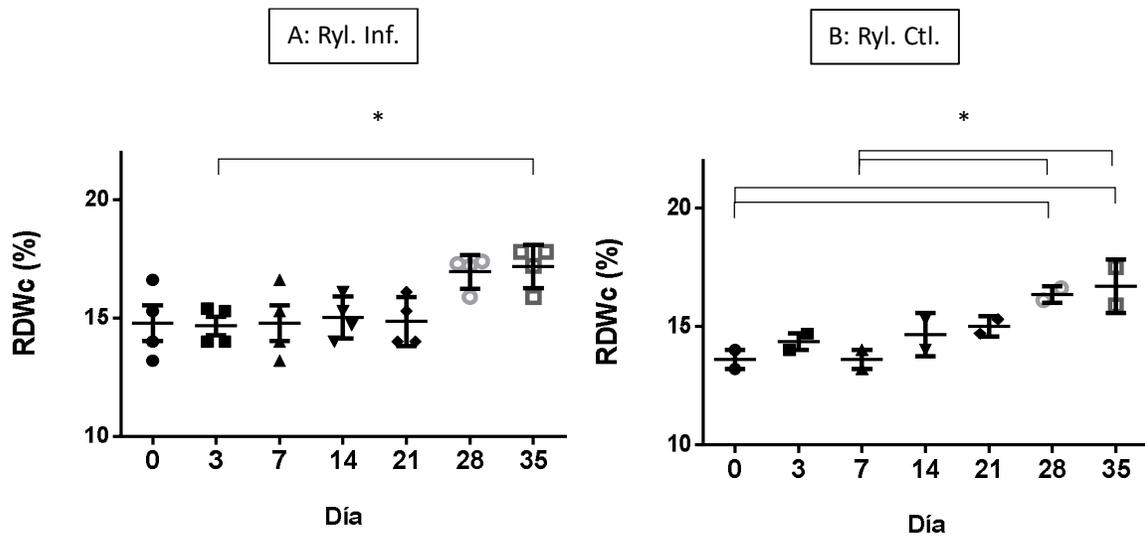


Figura 37: Evolución de la amplitud de distribución eritrocitaria (RDWc) en ovinos Rylington/Corriedale. A: Infestados. B: Controles. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

En cuanto los parámetros plaquetarios, porcentaje y VPM, observamos que se mantuvieron estable en ambos grupos, infestados y controles, a lo largo del experimento (Figura 38 y 39).

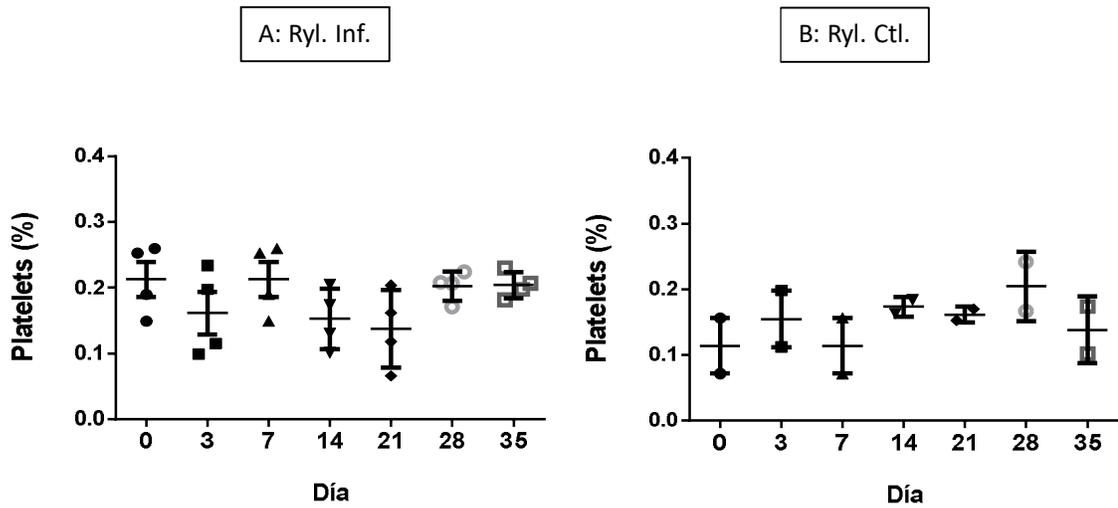


Figura 38: Evolución de porcentaje de plaquetas en ovinos Rylington/Corriedale. A: Infestados. B: Controles.

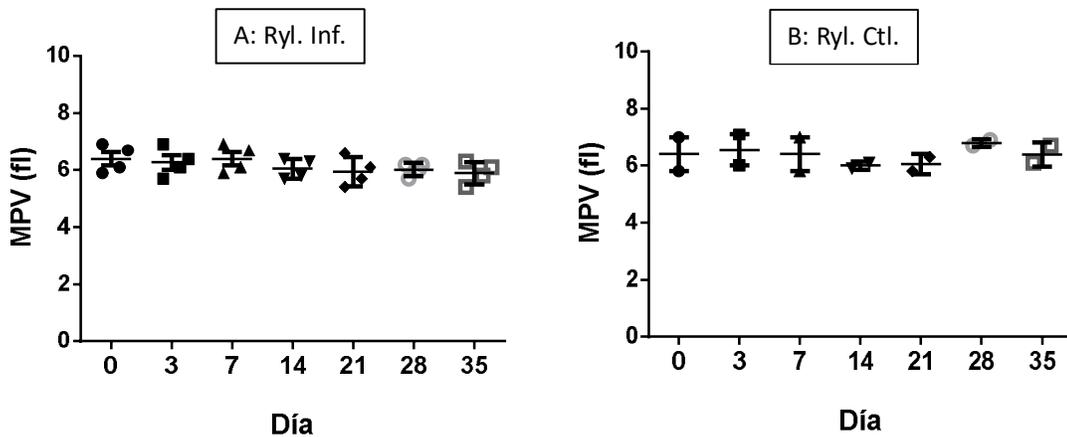


Figura 39: Evolución del volumen plaquetario medio (MPV) en ovinos Rylington/Corriedale. A: Infestados. B: Controles.

En conclusión, la línea de ovinos Rylington/Corriedale, presentó un comportamiento similar a los grupos analizados en el apartado anterior, particularmente a los resistentes Corriedale infestados. Los valores de hematocrito se mantuvieron estables, el valor de hemoglobina mostró disminución y RDWc incrementó su valor en el transcurso del experimento. En cambio, los valores de VCM y parámetros plaquetarios, se mantuvieron sin modificaciones durante todo el desafío.

Análisis de leucocitos en sangre

En este apartado, analizaremos las poblaciones de células leucocitarias, como parte de la respuesta inmunológica de los ovinos a la infestación parasitaria.

En relación al recuento total de glóbulos blancos, los ovinos infestados mostraron un comportamiento estable a lo largo del experimento, mientras que observamos un incremento significativo ($p=0,008$) en los animales del grupo control (Figura 40).

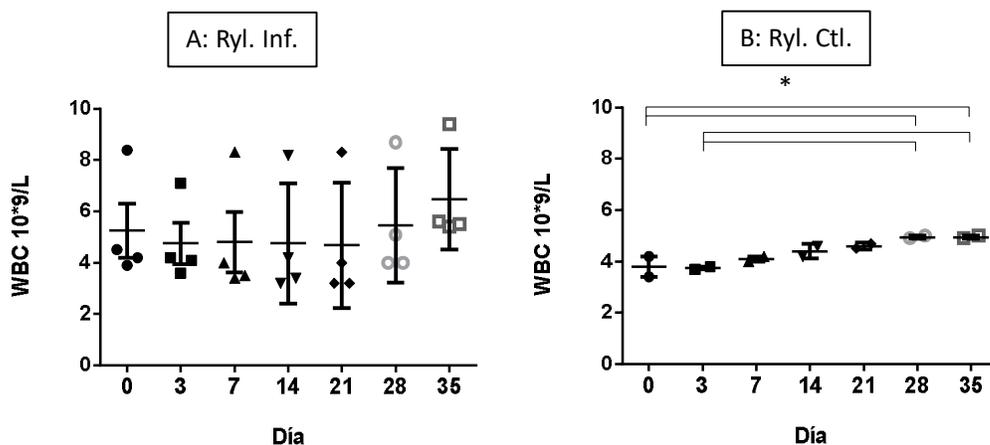


Figura 40: Evolución del recuento total de glóbulos blancos (WBC) en ovinos Rylington/Corriedale. A: Infestados. B: Controles. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

El análisis diferencial de las distintas poblaciones leucocitarias mostró que monocitos, eosinófilos y linfocitos permanecieron estables en ambos grupos durante el experimento (Figuras 41, 42 y 43). Asimismo, se mantuvieron constantes los neutrófilos en el grupo Rylington/Corriedale infestado, mientras que en los controles observamos un incremento significativo ($p=0,028$) el día 28 del experimento (Figura 44), correspondiendo con el incremento del recuento total de leucocitos en este grupo.

Por lo tanto, concluimos que ovinos resistentes y Rylington/Corriedale infestados podrían presentar respuestas inmune diferenciales a nivel celular.

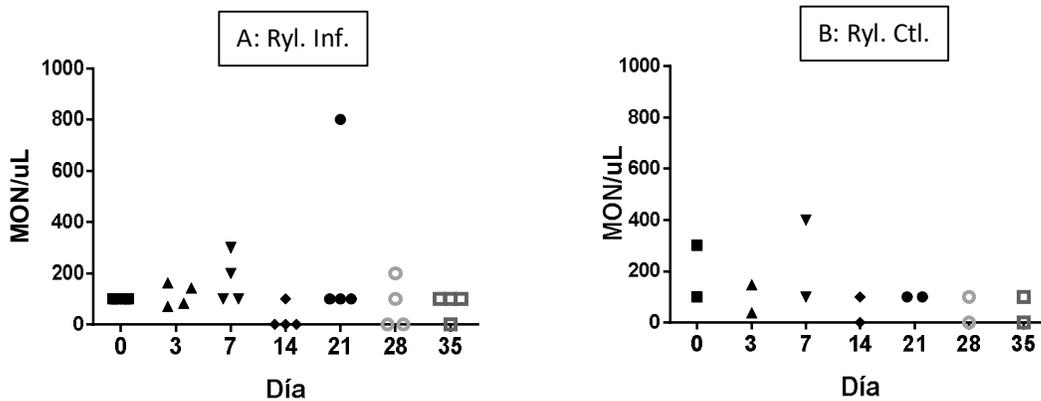


Figura 41: Evolución del recuento de monocitos (MON) en ovinos Rylington/Corriedale. A: Infestados. B: Controles.

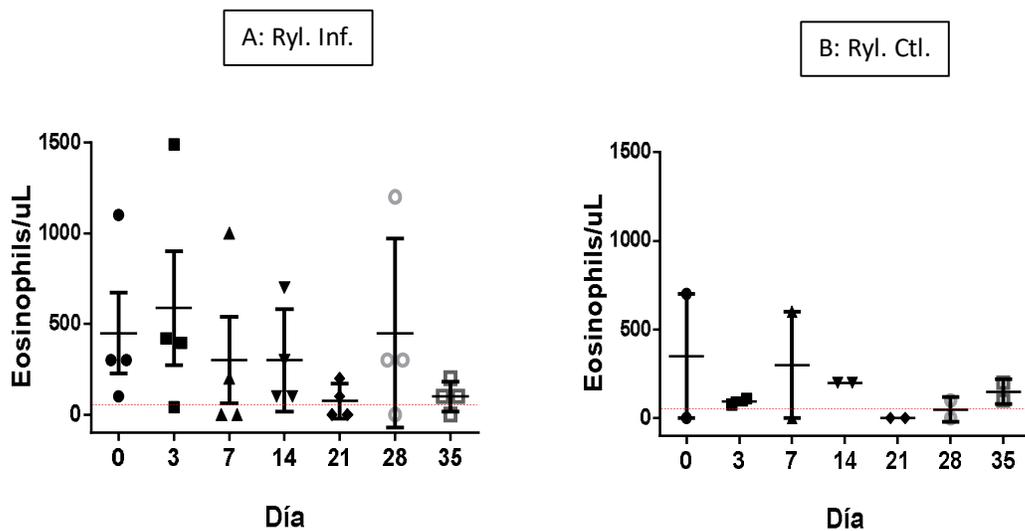


Figura 42: Evolución del recuento de eosinófilos en ovinos Rylington/Corriedale. A: Infestados. B: Controles.

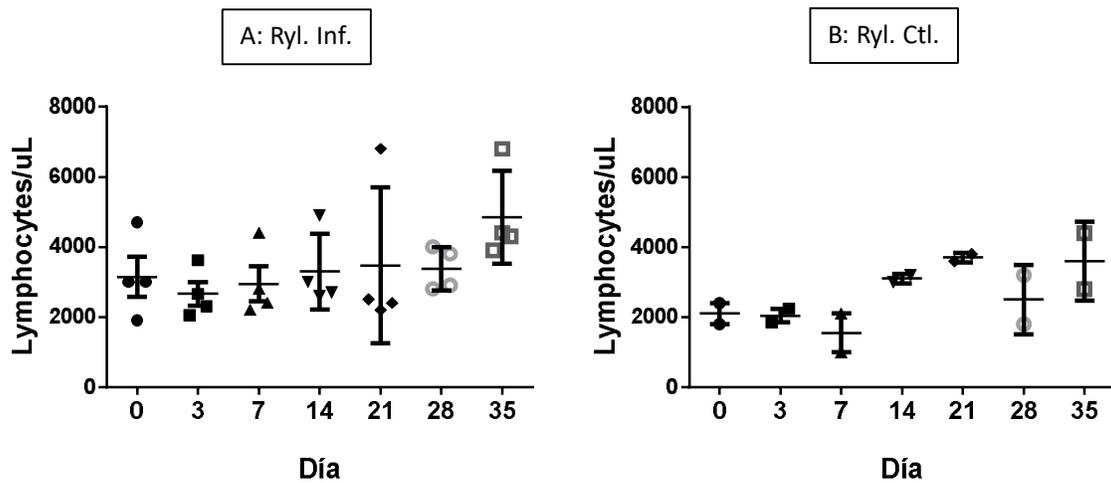


Figura 43: Evolución del recuento de linfocitos en ovinos Rylington/Corriedale. A: Infestados. B: Controles.

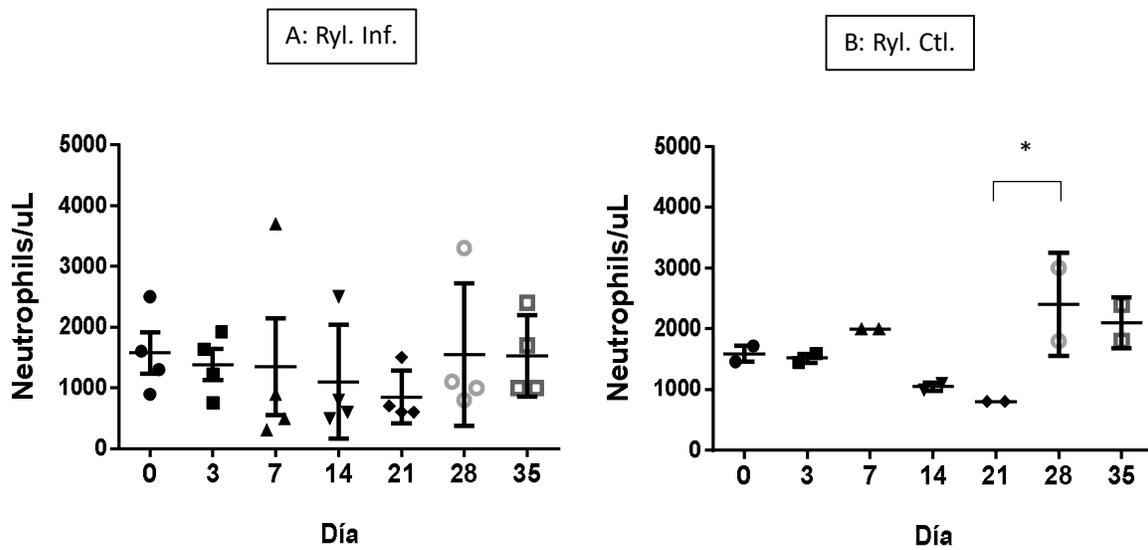


Figura 44: Evolución del recuento de neutrófilos en ovinos Rylington/Corriedale. A: Infestados. B: Controles. Las líneas horizontales representan diferencias estadísticamente significativas.

Análisis de la respuesta inmune humoral

Presentamos aquí los resultados de inmunoglobulinas en el mismo orden que la parte I, primero IgA en saliva, luego en plasma y, por último, IgG en plasma, todas evaluando la respuesta específica con los antígenos parasitarios presentes en *H. contortus* en estadio adulto y larvario (L3).

Inmunoglobulina A en saliva

El análisis de la IgA en saliva mostró presencia de inmunidad específica tanto para antígenos de parásito adulto, como para antígenos larvarios, que se mantuvieron constantes a lo largo del experimento (Figura 45). A continuación, analizamos la comparación de todos los grupos entre sí, Corriedale resistentes y Corriedale susceptibles, con los Rylington/Corriedale, infestados y controles, día por día. Los títulos de IgA mostraron diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$) con una mayor respuesta de los Rylington/Corriedale infestados contra ambos antígenos, en comparación con el grupo susceptibles, en el día 7 post-infestación. Mientras que los Rylington/Corriedale controles presentaron mayores niveles de IgA en saliva que los Corriedale susceptibles para antígenos de parásito adulto en el día 3 ($p = 0,0018$) y para antígenos larvarios, en el día 14 post-infestación ($p = 0,049$) (figuras 46 y 47).

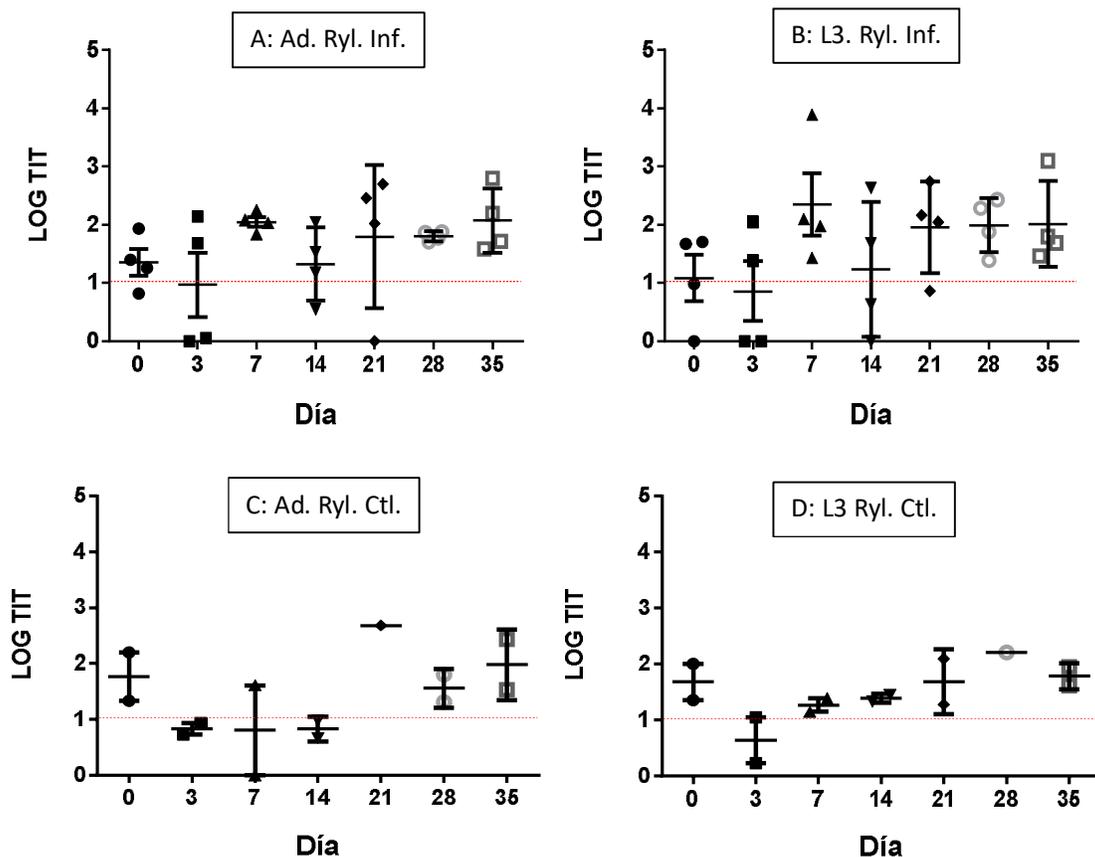


Figura 45: Evolución de logaritmos de títulos (LOG TIT) de IgA específicas para antígenos de *H. contortus* adultos y L3 en saliva en ovinos Rylington/Corriedale (Ryl.). A: IgA específicas de *H. contortus* (Hc.) adultos en Ryl. Infestados. B: IgA específicas de Hc. L3 en Ryl. Infestados. C: IgA específicas de Hc. adultos en Ryl. controles. D: IgA específicas de Hc. L3 en Ryl. Controles.

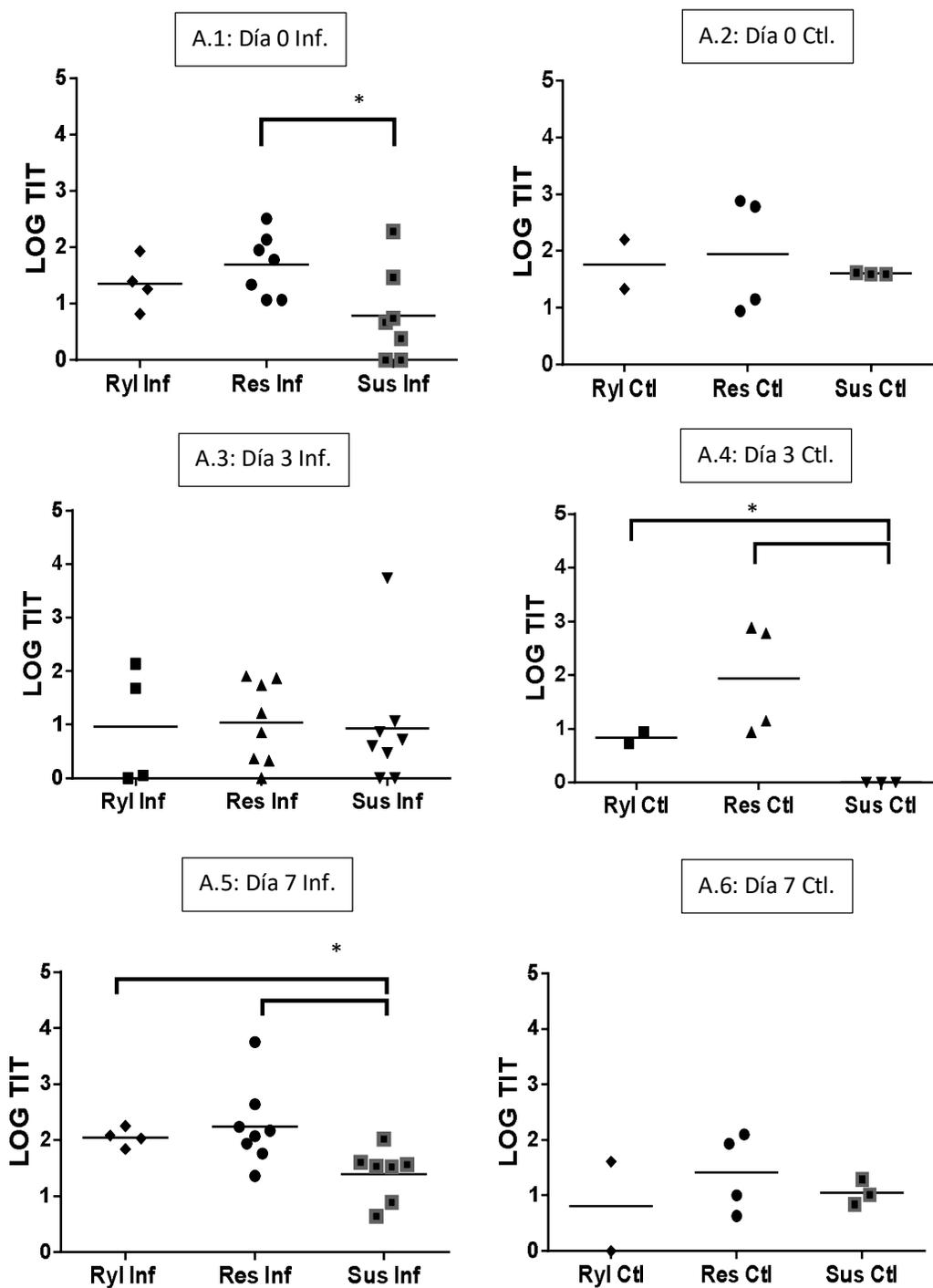


Figura 46 A: Comparación de los logaritmos de títulos (LOG TIT) de IgA específicas para antígenos de *H. contortus* adultos en saliva entre tratamientos según día post infestación. A.1: Día 0 en infestados. A.2: Día 0 en controles. A.3: Día 3 en infestados. A.4: Día 3 en controles. A.5: Día 7 en infestados. A.6: Día 7 en controles. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

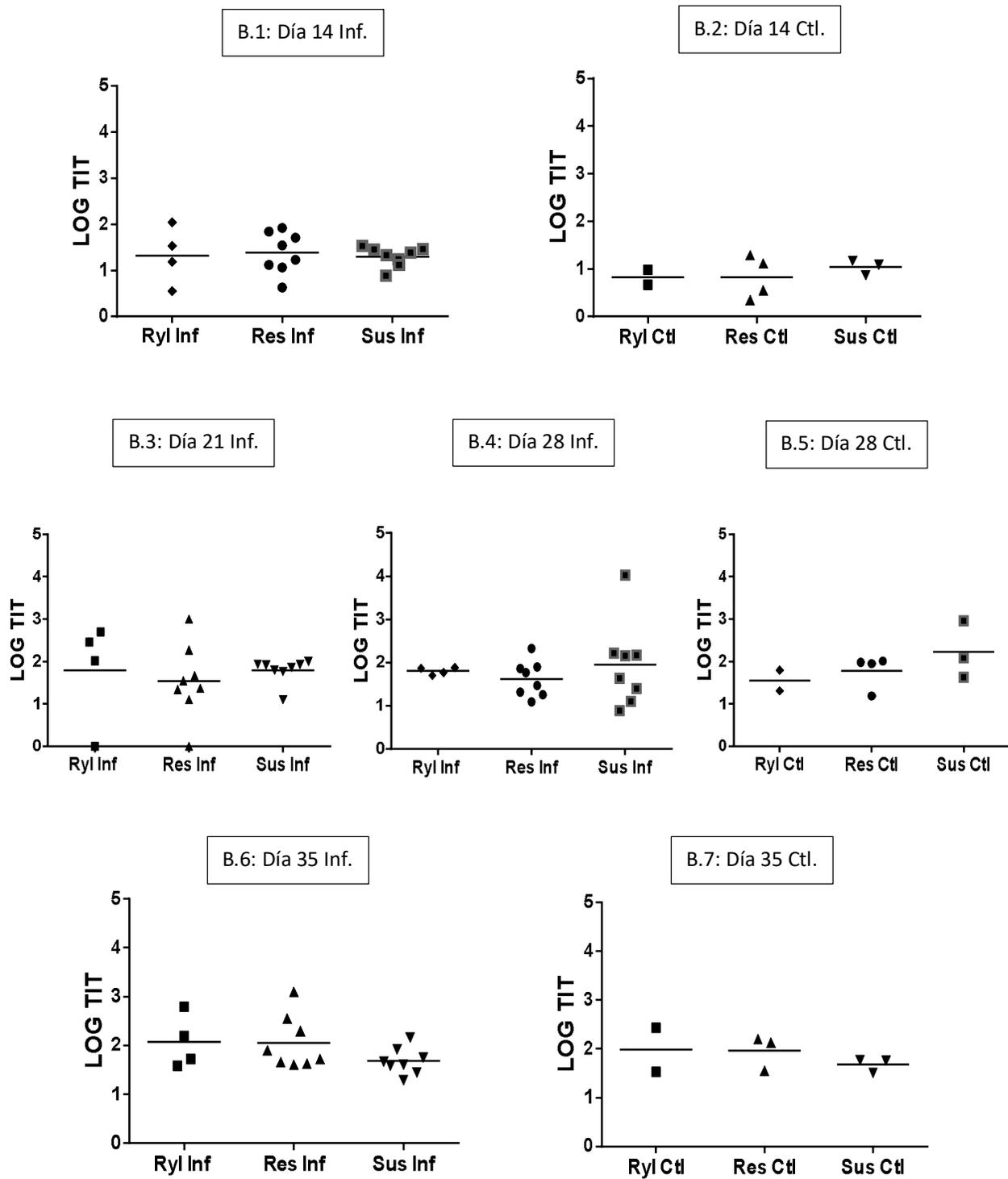


Figura 46 B: Comparación de los logaritmos de títulos (LOG TIT) de IgA específicas para antígenos de *H. contortus* adultos en saliva entre tratamientos según día post infestación. B.1: Día 14 en infestados. B.2: Día 14 en controles. B.3: Día 21 en infestados. B.4: Día 28 en infestados. B.5: Día 28 en controles. B.6: Día 35 en infestados. B.7: Día 35 en controles.

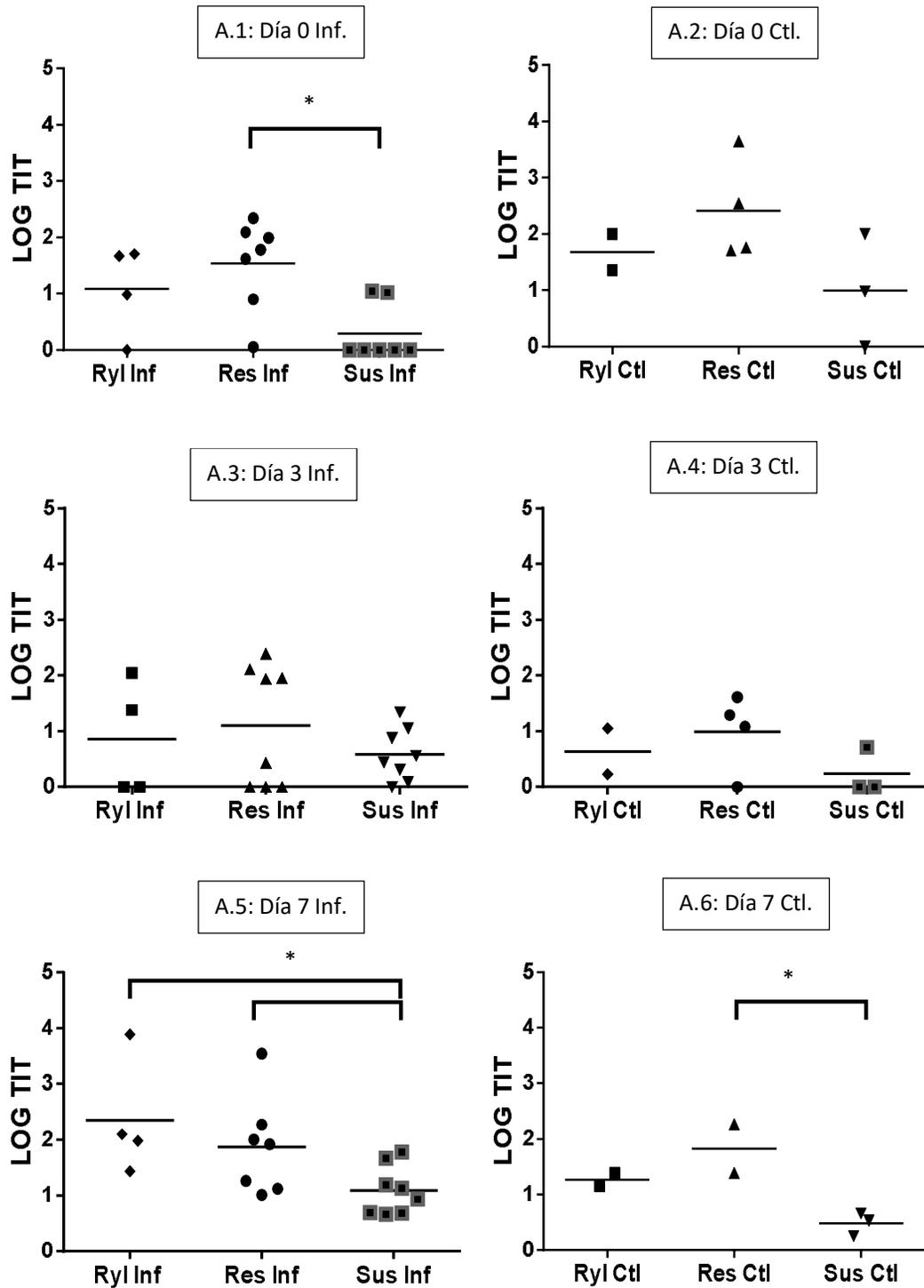


Figura 47 A: Comparación de los logaritmos de títulos (LOG TIT) de IgA específicas para antígenos larvarios de *H. contortus* en saliva entre tratamientos según día post infestación. A.1: Día 0 en infestados. A.2: Día 0 en controles. A.3: Día 3 en infestados. A.4: Día 3 en controles. A.5: Día 7 en infestados. A.6: Día 7 en controles. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

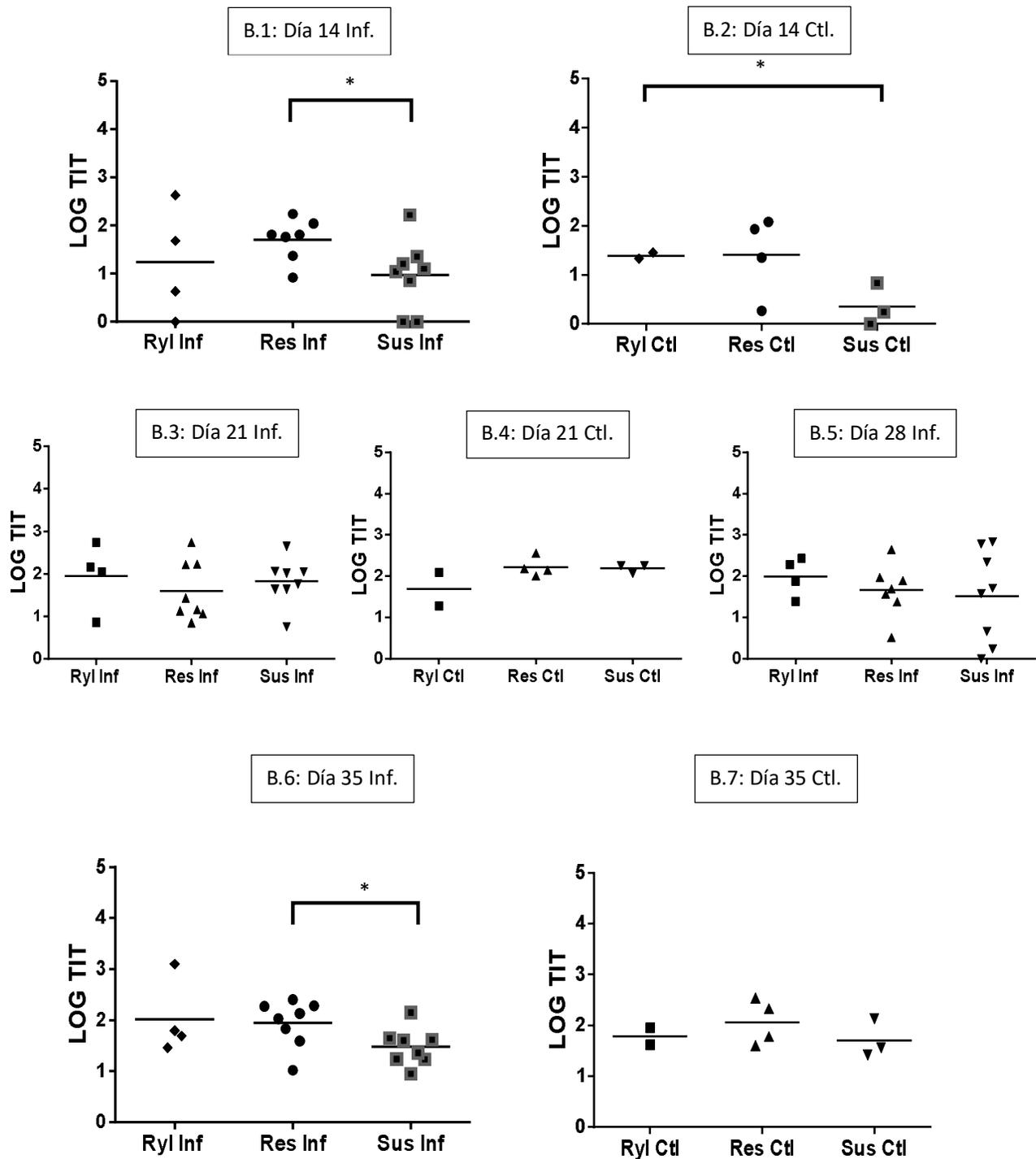


Figura 47 B: Comparación de los logaritmos de títulos (LOG TIT) de IgA específicas para antígenos larvarios de *H. contortus* en saliva entre tratamientos según día post infestación. B.1: Día 14 en infestados. B.2: Día 14 en controles. B.3: Día 21 en infestados. B.4: Día 21 en controles. B.5: Día 28 en infestados. B.6: Día 35 en infestados. B.7: Día 35 en controles. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

Inmunoglobulina A en plasma

El análisis de la evolución de las IgA en plasma contra antígeno parasitario adulto y larvarios de *H. contortus* mostró la presencia de respuesta específica por parte del grupo Rylington/Corriedale infestado constante a lo largo del experimento, mientras que el grupo control presentó niveles menores, con un aumento significativo ($p=0,0041$) a partir del día 14 contra antígenos adultos (Figura 48). Asimismo, las comparaciones entre los diferentes grupos evaluados, día por día, arrojaron como resultado que el grupo Rylington/Corriedale infestado presentó títulos más elevados de IgA en plasma que los ovinos susceptibles infestados tanto para antígenos parasitarios adultos ($p<0,02$) como larvarios ($p<0,01$) (Figuras 49 y 50). Mientras que el análisis de los grupos controles no mostró diferencias marcadas, salvo por un mayor nivel de anticuerpos en los resistentes en el día 7 y menor en los susceptibles el día 14, 21 y 35 para los antígenos de parásito adulto (Figuras 49 y 50).

Podemos concluir que los ovinos Rylington/Corriedale presentaron, en sus niveles de IgA, un comportamiento similar a los resistentes Corriedale.

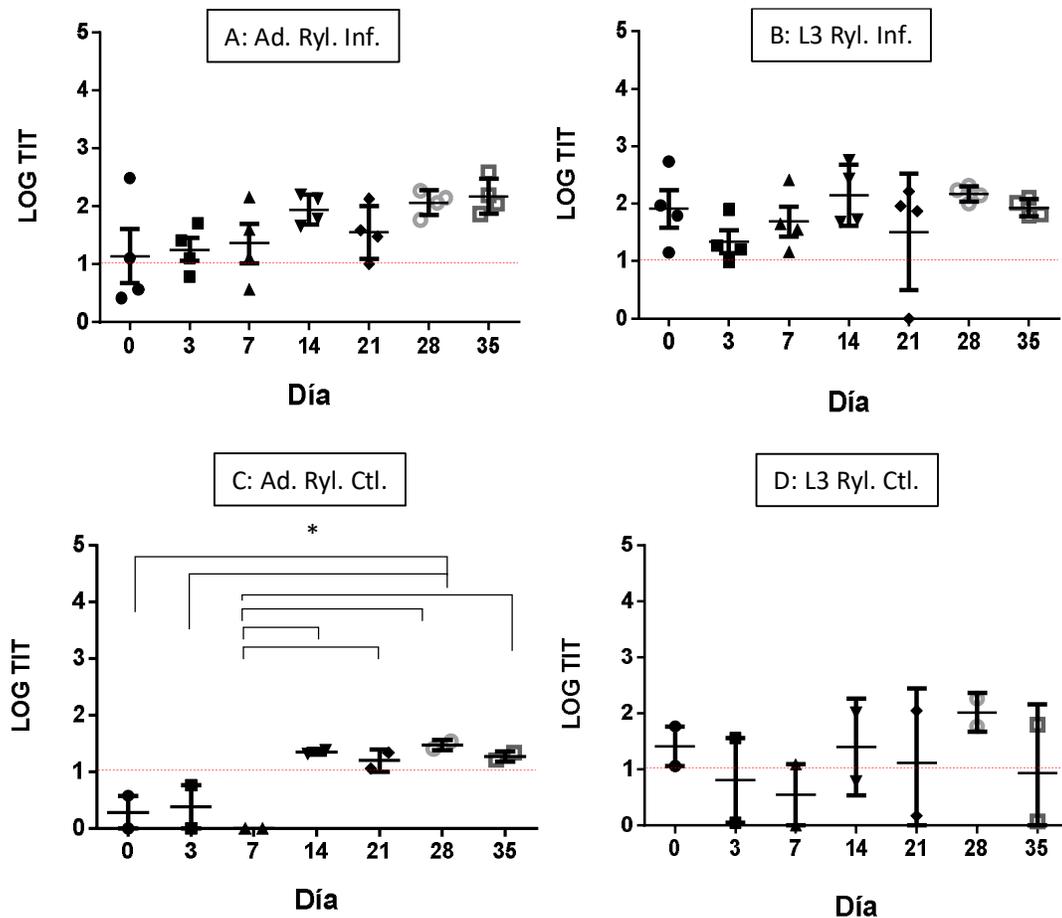


Figura 48: Evolución de logaritmos de títulos (LOG TIT) de IgA específicas para antígenos de *H. contortus* adultos y L3 en plasma en ovinos Rylington/Corriedale (Ryl.). A: IgA específicas de *H. contortus* (Hc.) adultos en Ryl. Infestados. B: IgA específicas de Hc. L3 en Ryl. Infestados. C: IgA específicas de Hc. adultos en Ryl. controles. D: IgA específicas de Hc. L3 en Ryl. Controles. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

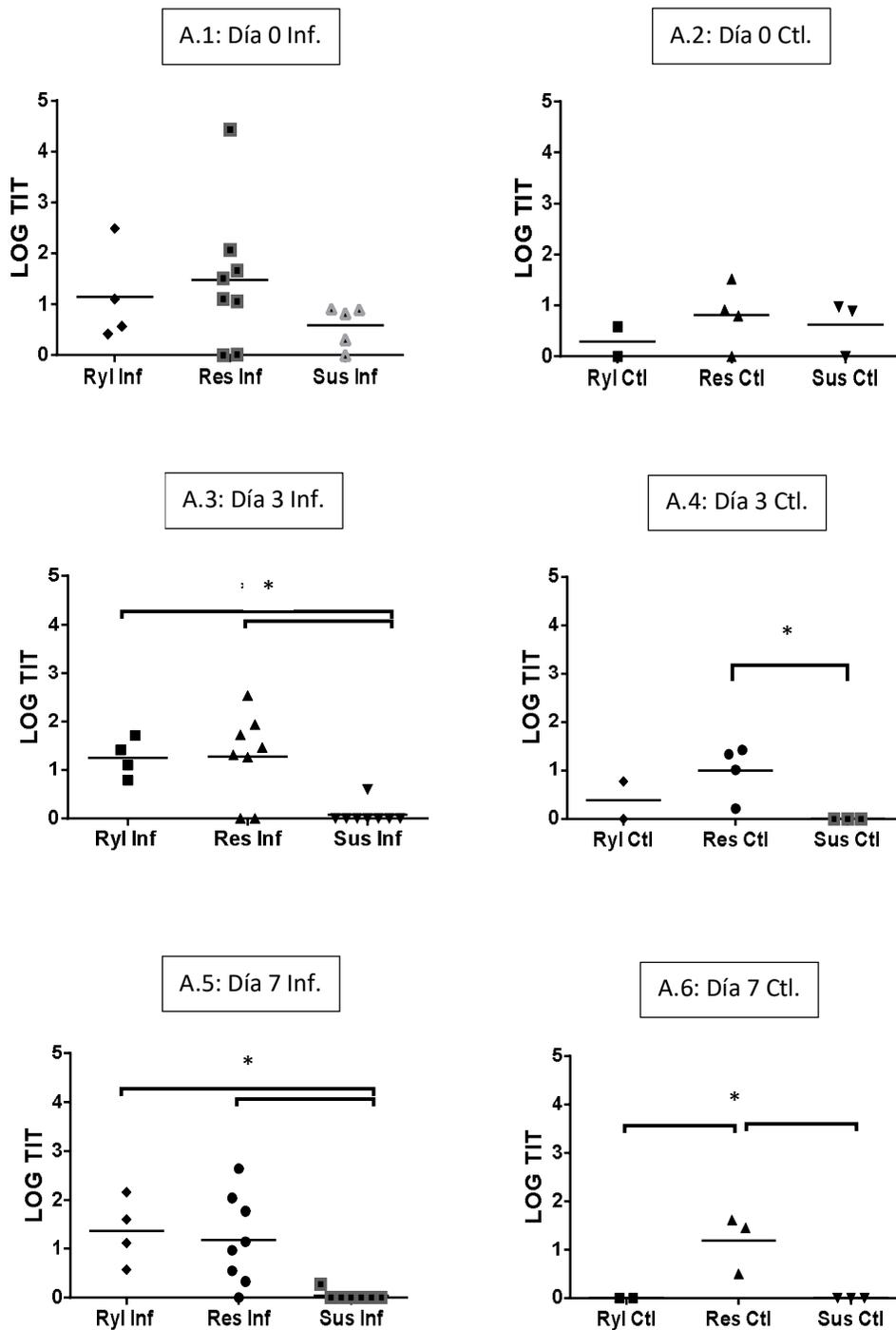


Figura 49 A: Comparación de los logaritmos de títulos (LOG TIT) de IgA específicas para antígenos de *H. contortus* adultos en plasma entre tratamientos según día post infestación. A.1: Día 0 en infestados. A.2: Día 0 en controles. A.3: Día 3 en infestados. A.4: Día 3 en controles. A.5: Día 7 en infestados. A.6: Día 7 en controles. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

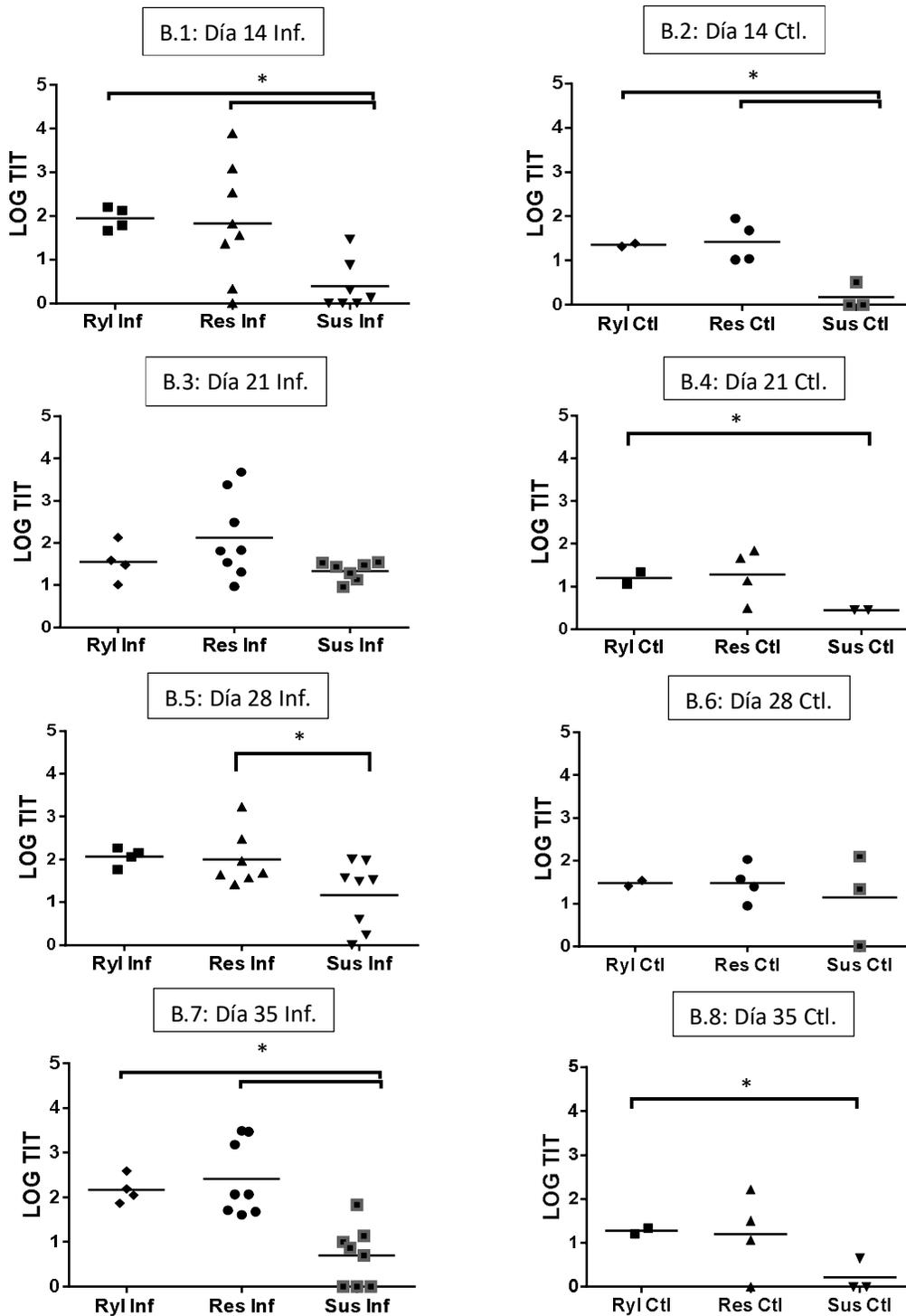


Figura 49 B: Comparación de los logaritmos de títulos (LOG TIT) de IgA específicas para antígenos de *H. contortus* adultos en plasma entre tratamientos según día post infestación. B.1: Día 14 en infestados. B.2: Día 14 en controles. B.3: Día 21 en infestados. B.4: Día 21 en controles. B.5: Día 28 en infestados. B.6: Día 28 en controles. B.7: Día 35 en infestados. B.8: Día 35 en controles. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

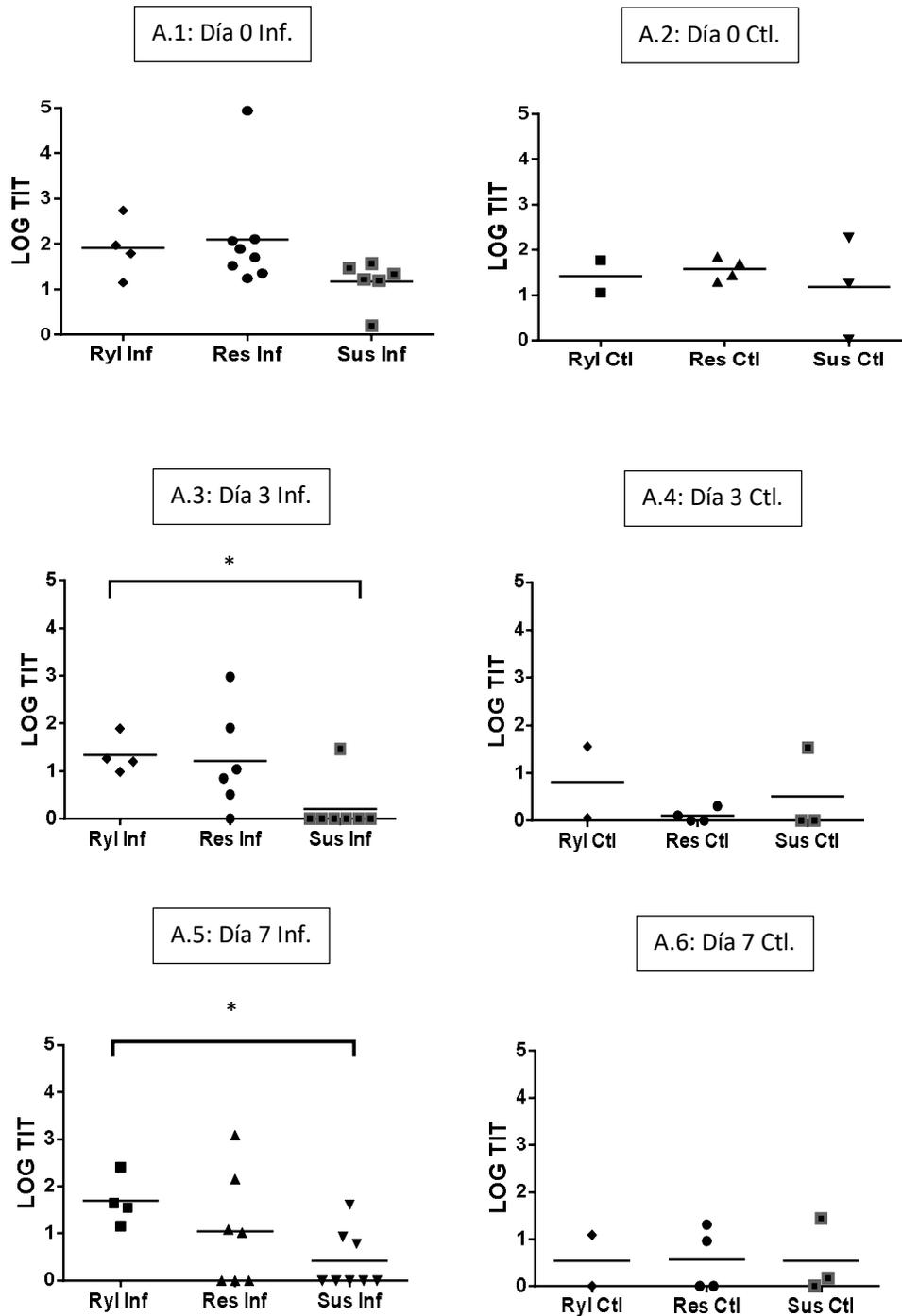


Figura 50 A: Comparación de los logaritmos de títulos (LOG TIT) de IgA específicas para antígenos larvarios de *H. contortus* en plasma entre tratamientos según día post infestación. A.1: Día 0 en infestados. A.2: Día 0 en controles. A.3: Día 3 en infestados. A.4: Día 3 en controles. A.5: Día 7 en infestados. A.6: Día 7 en controles. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

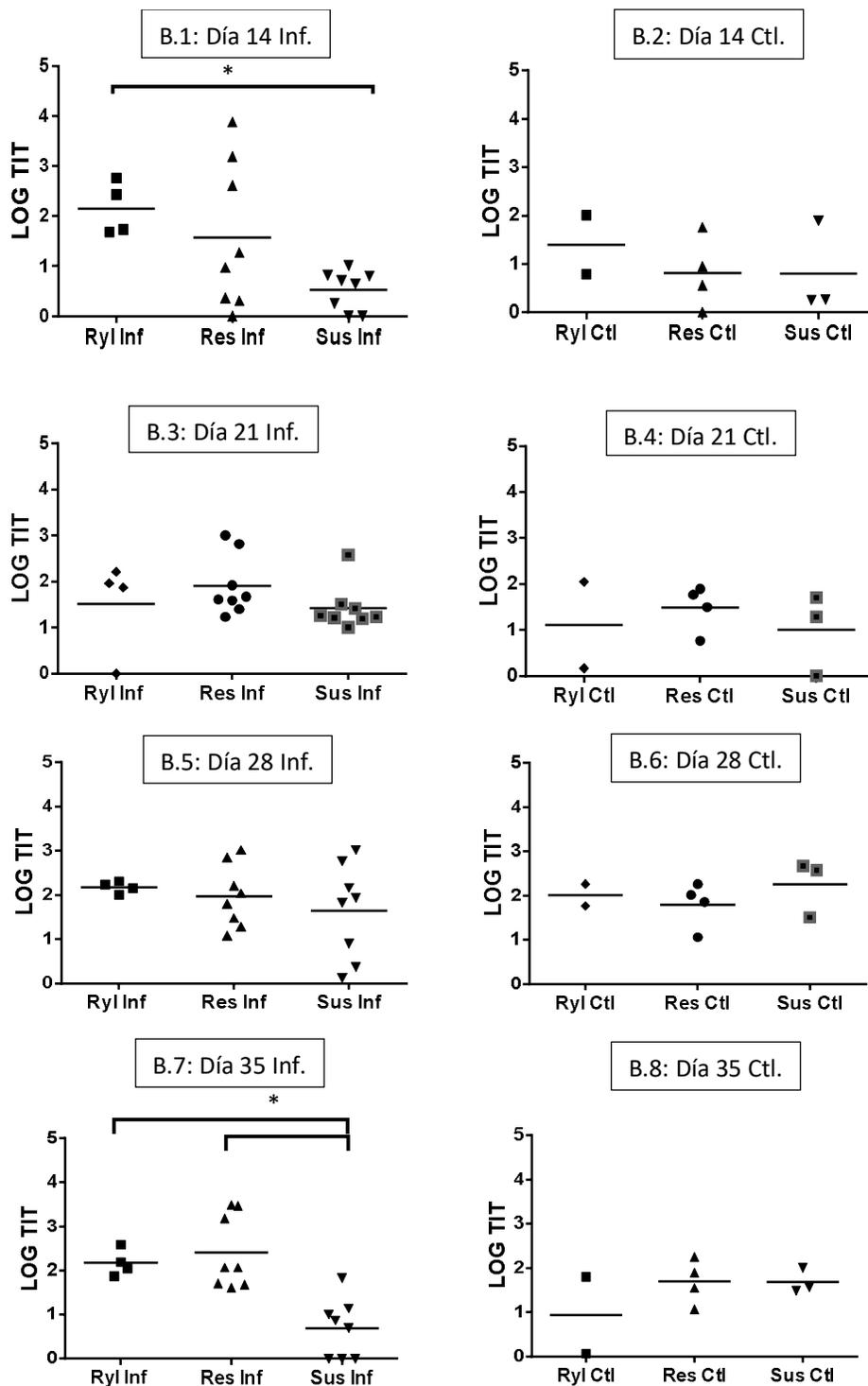


Figura 50 B: Comparación de los logaritmos de títulos (LOG TIT) de IgA específicas para antígenos larvarios de *H. contortus* en plasma entre tratamientos según día post infestación. B.1: Día 14 en infestados. B.2: Día 14 en controles. B.3: Día 21 en infestados. B.4: Día 21 en controles. B.5: Día 28 en infestados. B.6: Día 28 en controles. B.7: Día 35 en infestados. B.8: Día 35 en controles. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

Inmunoglobulina G en plasma

El análisis de la evolución de los títulos de IgG en plasma contra antígenos presentes en los parásitos adultos mostró una disminución, tanto en el grupo infestado como en el control, a lo largo del experimento (Figura 51). No obstante, cuando evaluamos la comparación entre los grupos por día, los Rylington/Corriedale presentaron en general mayores títulos de IgG que el resto de los grupos tanto infestados como controles (Figura 52).

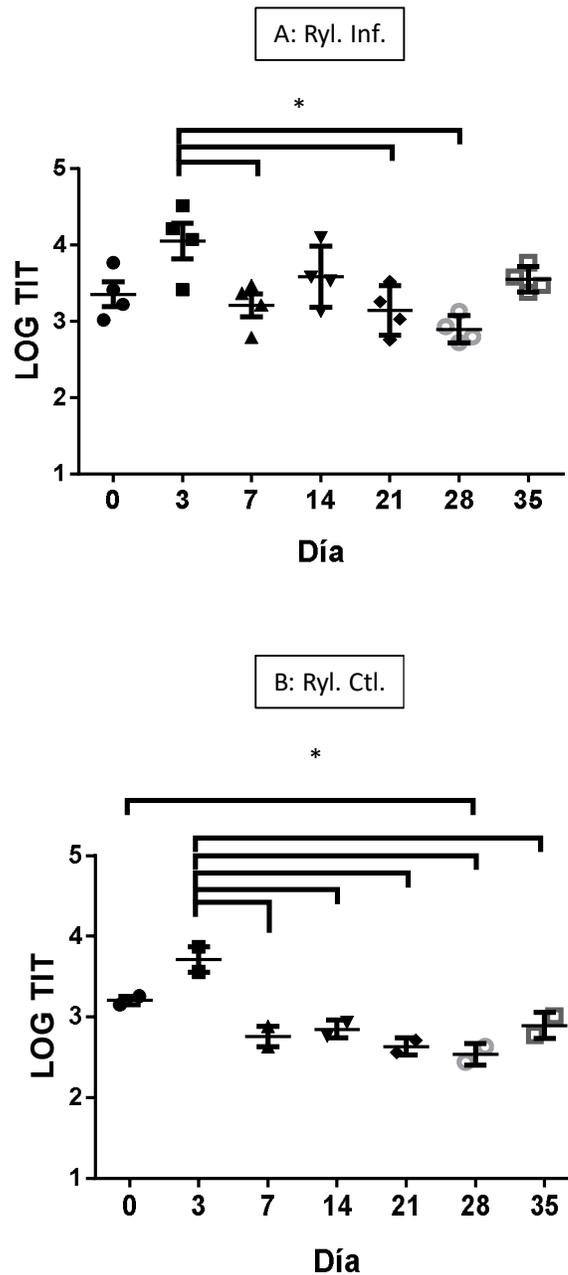


Figura 51: Evolución de logaritmos de títulos (LOG TIT) de IgG específicas para antígenos de *H. contortus* adultos en plasma en ovinos Rylington/Corriedale (Ryl.). A: Rylington/Corriedale infestados. B: Rylington/Corriedale controles. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

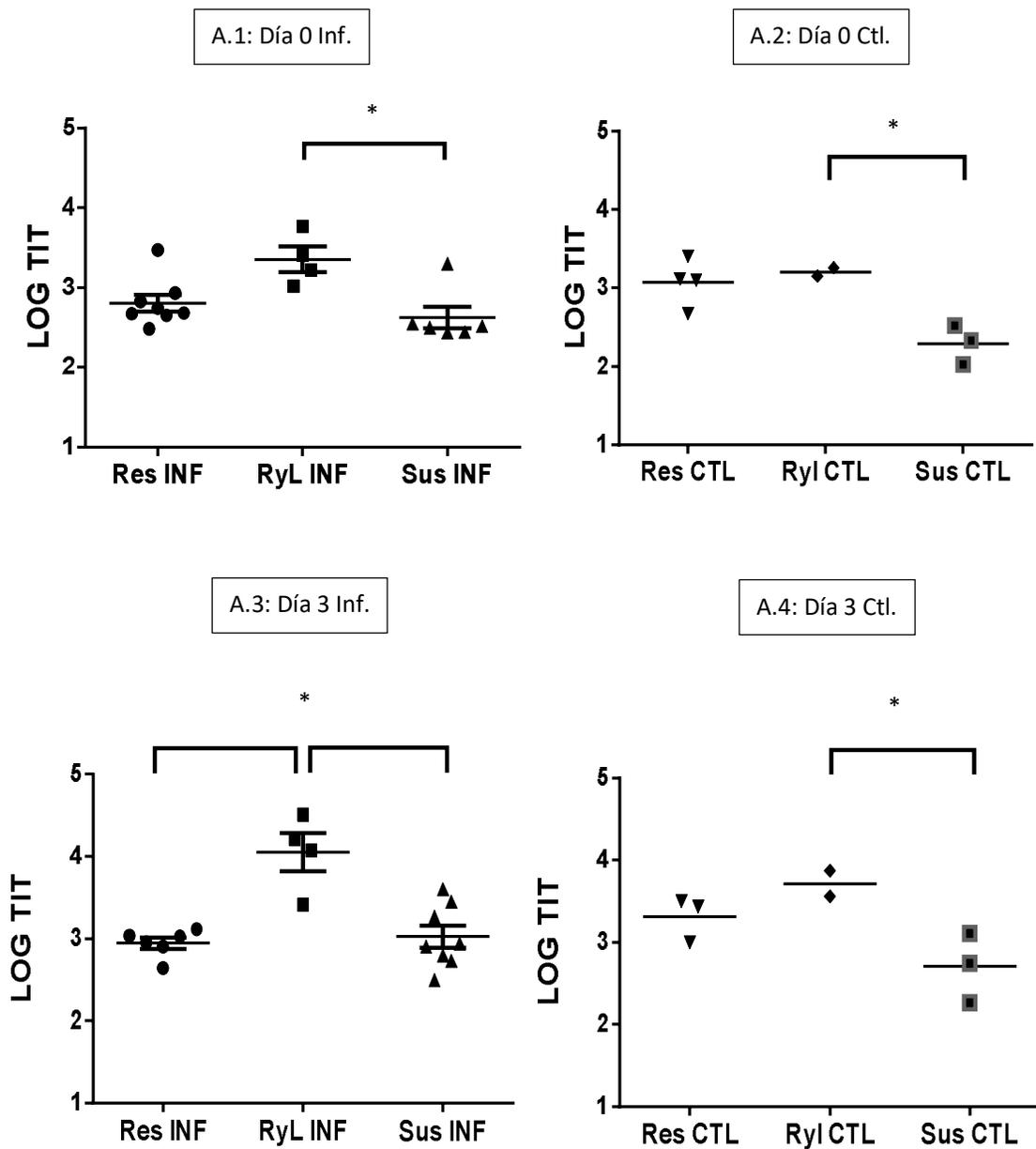


Figura 52 A: Comparación de los logaritmos de títulos (LOG TIT) de IgG específicas para antígenos de *H. contortus* adultos en plasma entre tratamientos según día post infestación. A.1: Día 0 en infestados. A.2: Día 0 en controles. A.3: Día 3 en infestados. A.4: Día 3 en controles. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

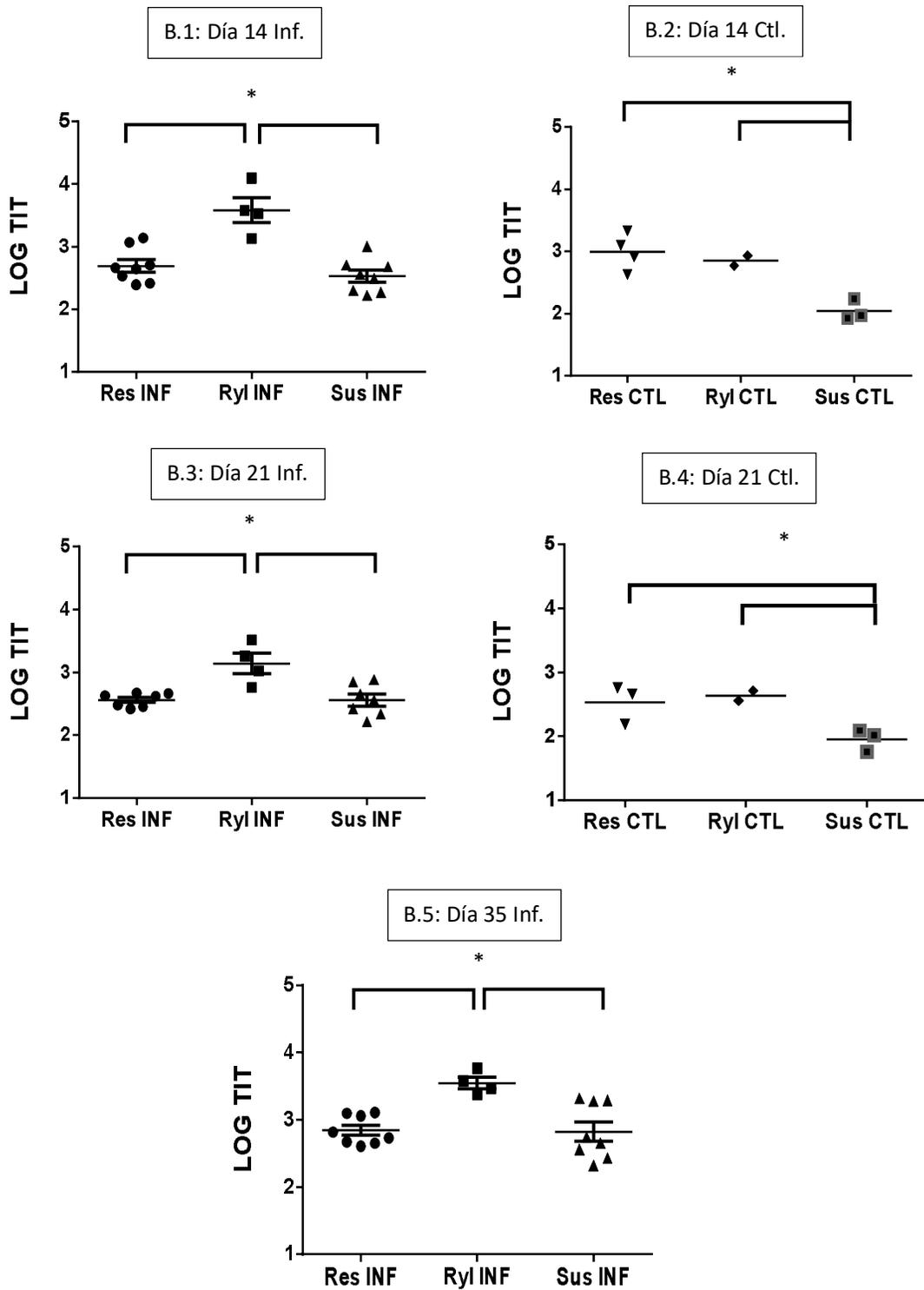


Figura 52 B: Comparación de los logaritmos de títulos (LOG TIT) de IgG específicas para antígenos de *H. contortus* adultos en plasma entre tratamientos según día post infestación. B.1: Día 14 en infestados. B.2: Día 14 en controles. B.3: Día 21 en infestados. B.4: Día 21 en controles. B.5: Día 35 en infestados. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

Por último, presentamos los resultados en relación a la respuesta específica de las IgG en plasma contra los antígenos larvarios (L3) de *H. contortus*. En este caso, observamos la presencia de respuesta específica desde el inicio del experimento que se mantuvo a lo largo del mismo en el grupo infestado, no así en el grupo control, que mostró una disminución significativa ($p=0,0007$) de los títulos de IgG hacia el final del experimento (Figura 53). Al comparar los grupos, observamos el mismo comportamiento que la respuesta de IgG contra antígenos adultos, los Rylington/Corriedale presentaron títulos más elevados que el resto de los grupos evaluados (Figura 54).

Para finalizar, podemos concluir que los ovinos Rylington/Corriedale, presentaron niveles más elevados de IgG específicas contra antígenos de *H. contortus* en relación a los diferentes grupos evaluados a lo largo del experimento.

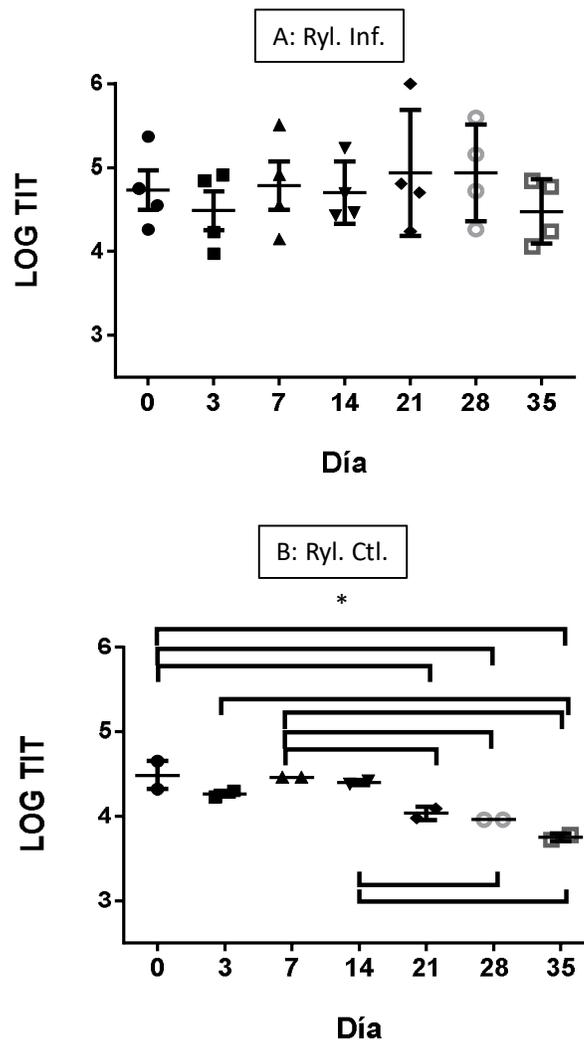


Figura 53: Evolución de logaritmos de títulos (LOG TIT) de IgG específicas para antígenos larvarios de *H. contortus* en plasma en ovinos Rylington/Corriedale (Ryl.). A: Rylington/Corriedale infestados. B: Rylington/Corriedale controles. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

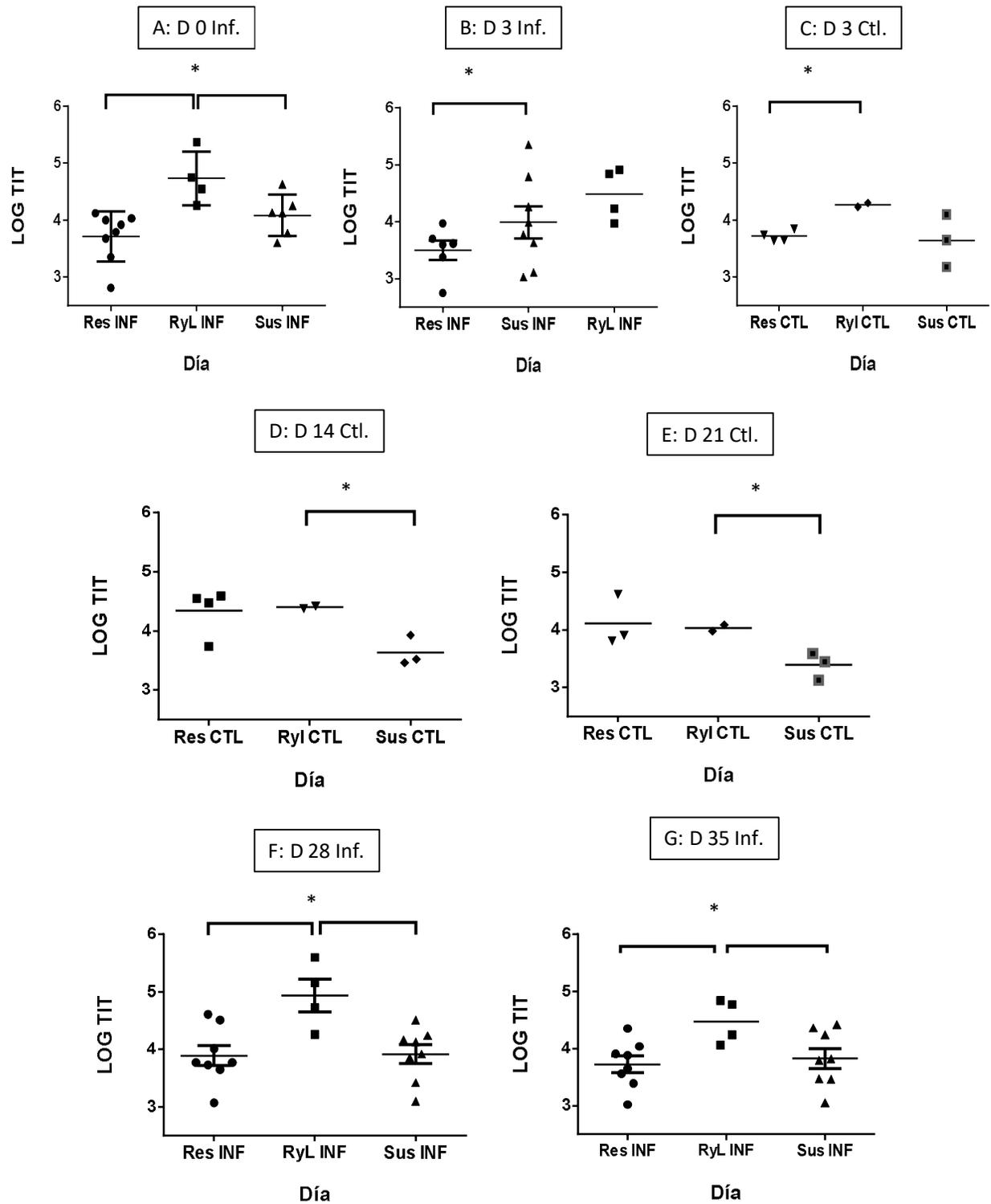


Figura 54: Comparación de los logaritmos de títulos (LOG TIT) de IgG específicas para antígenos larvarios de *H. contortus* en plasma entre tratamientos según día post infestación. A: Día 0 en infestados. B: Día 3 en infestados. C: Día 3 en controles. D: Día 14 controles. E: Día 21 controles. F: Día 28 infestados. G: Día 35 infestados. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas.

Parte III: Análisis de la respuesta inmune celular

Para poder determinar la respuesta inmune celular de tipo Th2 inducida por la infestación experimental en los diferentes grupos de ovinos evaluados, analizamos la expresión génica de citoquinas IL-4, IL-5, IL-13 y TNF- α producidos por PBMCs al inicio (día 7) y al final (día 35) de la infestación experimental. Para ello, los PBMCs fueron purificados y estimulados *in vitro* con antígenos parasitarios adultos, y posteriormente medimos la expresión génica de las citoquinas por PCR cuantitativa.

En este sentido, observamos que los niveles de expresión relativa de IL-4 e IL-13 tuvieron un incremento significativo en los Corriedale resistentes en relación a los susceptibles hacia el final del experimento (Figura 55). Por su parte, los ovinos cruza Rylington/Corriedale presentaron un aumento significativo de IL-5 y TNF- α hacia el día 35, en relación a los Corriedale resistentes y susceptibles (Figura 56).

En conclusión, observamos un incremento de IL-4 e IL-13 en los Corriedale resistentes infestados, mientras que los Rylington/Corriedale aumentaron la expresión de IL-5 y TNF- α , al final del período de experimentación, en comparación con los otros grupos, indicando una diferencia en el perfil de expresión relativa de citoquinas entre los ovinos resistentes evaluados.

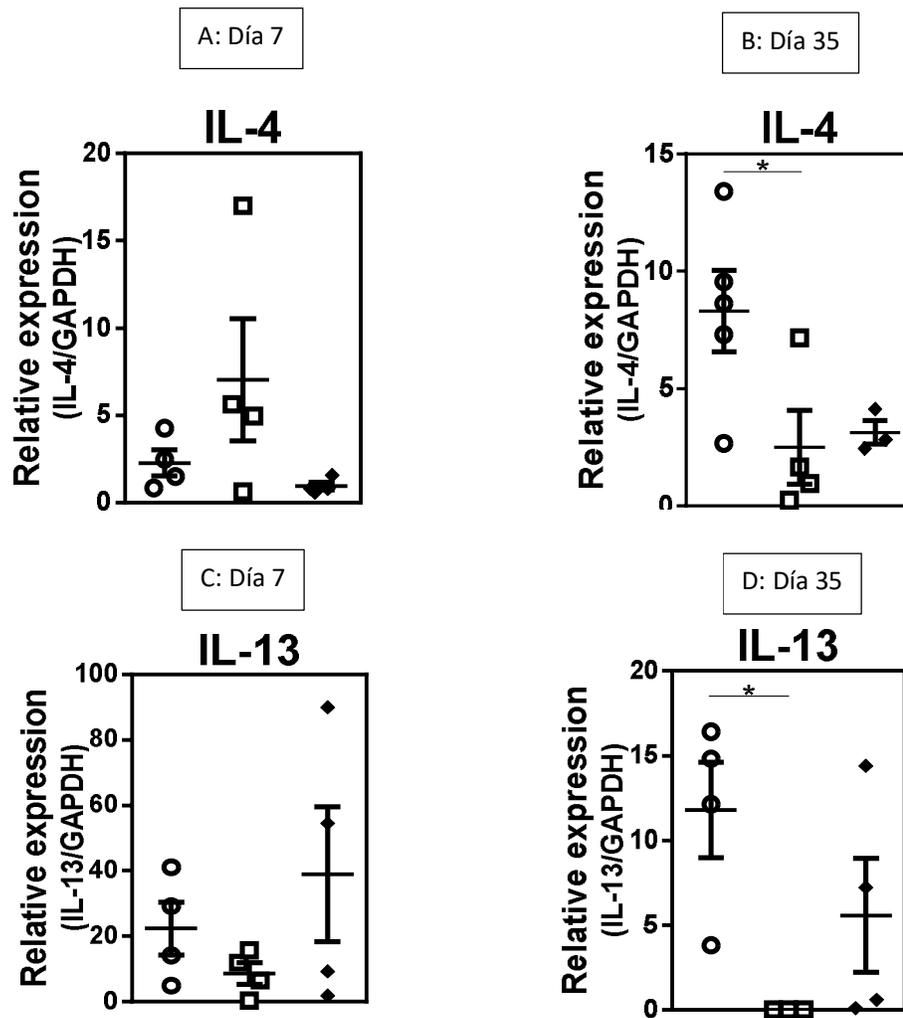


Figura 55: Comparación de la expresión relativa de citoquinas IL-4 e IL-13 entre las líneas de ovinos evaluadas, Corriedale Resistentes, Corriedale Susceptibles y cruce Rylington/Corriedale en los días 7 y 35 post infestación. A: IL-4 Día 7. B: IL-4 Día 35. C: IL-13 Día 7. D: IL-13 Día 35. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas. ● Corriedale Resistentes. □ Corriedale Susceptibles. ◆ Rylington/Corriedale resistentes.

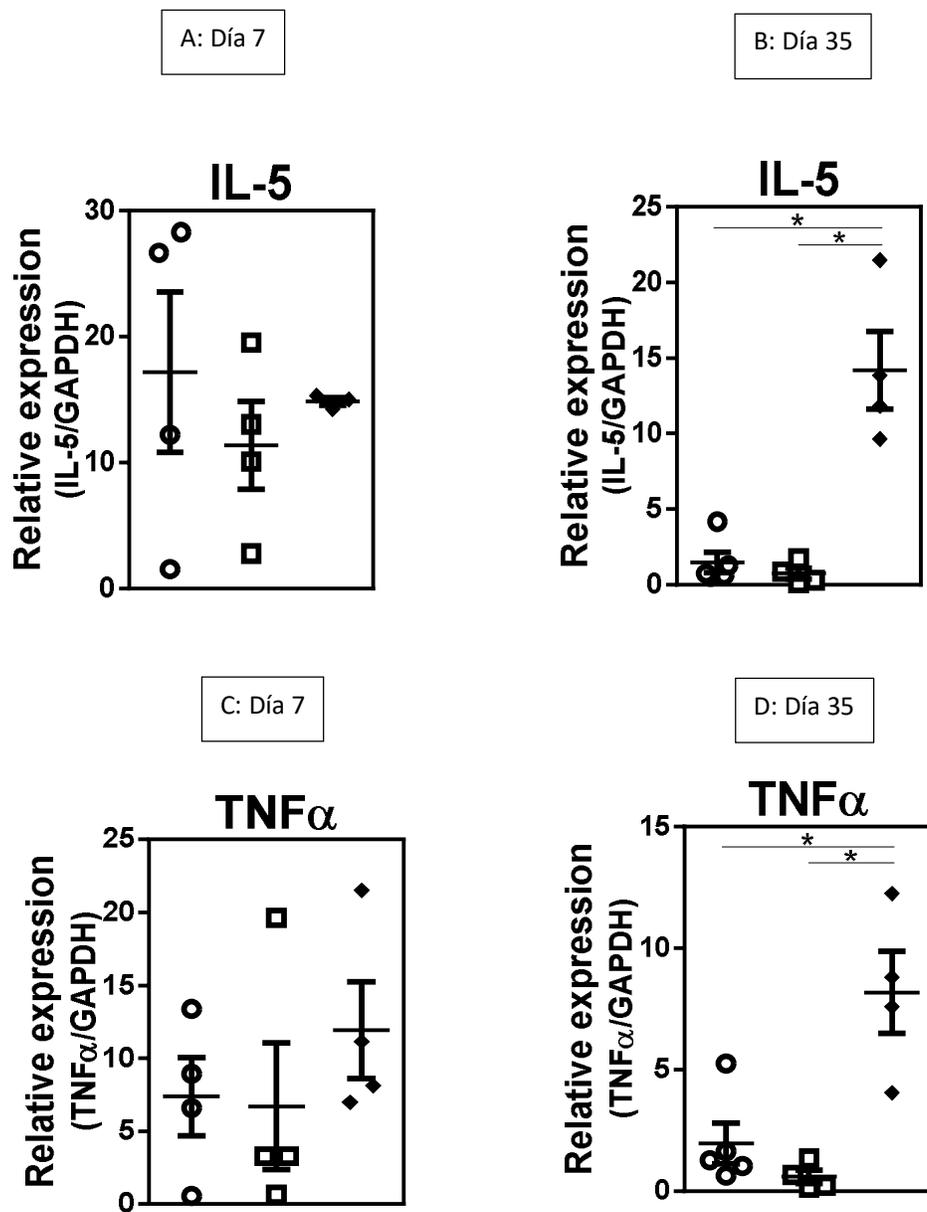


Figura 56: Comparación de la expresión relativa de citoquinas IL-5 y TNF- α entre las líneas de ovinos evaluadas, Corriedale Resistentes, Corriedale Susceptibles y cruce Merino Rylington/Corriedale en los días 7 y 35 post infestación. A: IL-5 Día 7. B: IL-5 Día 35. C: TNF- α Día 7. D: TNF- α Día 35. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas. ● Corriedale Resistentes. □ Corriedale Susceptibles. ◆ Rylington/Corriedale resistentes.

DISCUSIÓN

En esta tesis evaluamos aspectos inmunológicos de tres diferentes grupos de ovinos ante la infestación experimental con *H. contortus*. Los resultados confirman la expresión clínica diferencial de cada uno y sugieren que la resistencia a la infestación está asociada a respuestas inmunológicas diferentes con títulos elevados de anticuerpos específicos tanto en plasma como en saliva y respuestas de tipo Th2 más potentes.

En primer lugar, para la evaluación directa de la efectividad y éxito del ciclo parasitario ante la resistencia de los grupos ovinos, utilizamos el HPG y los parámetros hematológicos como indicadores. Comprobamos como era esperado, que los animales resistentes y cruza Rylington/Corriedale, presentaron mejor respuesta a la infestación experimental que los susceptibles, siendo los Rylington/Corriedale los que tuvieron menores valores de HPG durante todo el experimento. Nuestros resultados son coincidentes con los encontrados por otros autores en diferentes razas (González et al., 2008) y con las evaluaciones de selección por resistencia efectuadas en Uruguay (Castells et al., 2013; Goldberg, 2011).

En relación a los valores del hemograma vinculados a la serie roja, nuestros resultados son concordantes con la patogenia de *H. contortus*. Es un parásito hematófago y provoca anemia hemorrágica (Johnstone, 1998), de tipo regenerativa, por lo tanto, factible de evaluación por indicadores que aporta el hemograma (Zachary, 2017). El hematocrito (HTO) de los animales susceptibles mostró un menor porcentaje que los resistentes y los Rylington/Corriedale, en el día 21 de infestación, coincidentemente con el aumento del HPG. Estos resultados son concordantes con los reportados por otros autores (Morteo-Gómez et al., 2004; Vanimisetti et al., 2004) quienes encontraron que los animales menos susceptibles y con mayor mérito genético mostraron mayores valores de HTO antes, durante y después de la infestación, vinculado a menores valores de HPG. Asimismo, Bricarello y col. (2004) informaron correlaciones similares entre altas cargas parasitarias y bajos valores de HTO atribuibles a una menor resistencia en ovinos Corriedale que sustentan los resultados de esta tesis. A su vez, y confirmando lo sugerido por el valor de HPG, se ha descrito una correlación positiva entre el valor de reducción de HTO y la carga de *H. contortus* en abomaso (Shakya et al., 2009).

En cuanto a la concentración de hemoglobina (Hb), los resultados son los esperados en función de la patogenia involucrada en el parasitismo de *H. contortus* descrita anteriormente. La misma produce anemia debido a la hematofagia y hemorragias consecuentes (Johnstone, 1998). En nuestra investigación todos los grupos presentaron anemia, que se define como una disminución de la concentración de hemoglobina en sangre, en relación a los parámetros normales (Torrens, 2015). A su vez, estos resultados se correlacionan con los valores de VCM y RDWc aumentados. Este patrón de resultado se corresponde con el diagnóstico de anemia regenerativa, caracterizada por la liberación al torrente sanguíneo de eritrocitos inmaduros que son de mayor tamaño, por lo que el volumen medio de los mismos (VCM) aumenta y la dispersión de tamaño (RDWc) también (Aguiló, 2001). Nuestros resultados son coincidentes con los reportados por Arece García y col. (2015) quienes relacionaron el grado de anemia con el nivel de parasitismo. Sin embargo, difieren en parte de los reportados por Storillo (2016), quien no encontró anemia en animales resistentes y sí en susceptibles pero sin signos de regeneración. Estas diferencias podrían radicar en distinta dosis parasitaria de la infestación, así como también en aspectos nutricionales, los que incluyen el estado de los animales al inicio del estudio, así como también su alimentación durante todo el proceso.

Cabe mencionar que los resistentes no infestados presentaron un marcado incremento del RDWc sin estar esto vinculado a signos de anemia. Si bien no resultó estadísticamente significativo, también se puede visualizar un incremento simultáneo del VCM y HTO en este grupo a partir del día 28 de infestación. Este efecto podría explicarse a través de algún tipo de estimulación antigénica ambiental, analizada más adelante al estudiar la respuesta inmune humoral. Por lo tanto, podemos asumir que, si hubo respuesta de anticuerpos, es probable que haya habido activación de distintas poblaciones de leucocitos, con la consecuente secreción de factores y citoquinas. Se ha asociado la IL-3 a la respuesta ante nemátodos en modelo murino, vinculada a la activación de basófilos y su correspondiente producción de IL-4, crítica para la respuesta Th2, que analizaremos más adelante. La IL-3 está involucrada en el proceso eritropoyético promoviéndolo y es secretada por linfocitos T CD4⁺ y eosinófilos en menor medida, ambos involucrados en las respuestas inmune Th2 (Rodríguez, 2017; Schrader, 1998). Cabe considerar también que los animales pudieron estar bajo algún grado de estrés dada la estabulación y cambio de nutrición. Si bien tuvieron un período de acostumbramiento previo, las instancias experimentales siempre implican una serie de factores de cambio que pueden provocar estrés, que no siempre es expresado en todos los animales dada la variabilidad individual lógica en biología.

Por otro lado, y en concordancia con lo expresado en los resultados sobre la serie roja del hemograma, los animales susceptibles infestados mostraron un incremento en el porcentaje plaquetario junto a una disminución del valor de VPM, indicador del tamaño medio de las plaquetas. Estos resultados sugieren una vez más, la fisiopatogenia de la haemonchosis, como productora de hemorragias, no sólo por la acción expoliatriz del nemátodo, en sus estadios larvarios finales y adulto, sino porque secreta sustancias anticoagulantes que producen sangrado posterior a la alimentación del parásito en las lesiones generadas por el mismo (Johnstone, 1998). Estas hemorragias, no sólo son responsables de la anemia y su reflejo en los parámetros del hemograma en la serie roja revisados, sino que además generan una trombocitosis reactiva, secundaria a hemorragia (Vetlab, 2010) y caracterizada por un incremento del conteo y/o porcentaje plaquetario y menor VPM (Jackson & Carter, 1993). Por otro lado, se ha asociado la mayor presencia de eosinófilos a nivel local en la mucosa abomasal en respuesta a los nemátodos, con la secreción de factores tales como el de agregación plaquetaria que promueven la coagulación (Alba-Hurtado & Muñoz-Guzmán, 2013), probablemente en un intento de detener las hemorragias cursantes.

En cuanto al análisis de leucocitos totales, se destaca el incremento de los mismos en los ovinos resistentes infestados a lo largo del período de evaluación, coincidente con lo reportado por Bowdridge y col. (2015) en ovinos de pelo considerados resistentes a NGI. En este caso, ellos encontraron una contribución substancial para dicho aumento, por parte de los neutrófilos, concordando con nuestros resultados en la línea Rylington/Corriedale control, hacia el final del experimento. Sin embargo, en el caso de los Corriedale resistentes, el aumento de leucocitos totales hacia el final del período de infestación podría atribuirse a un incremento en los linfocitos, como veremos más adelante. Si bien el grupo Rylington/Corriedale que mostró un aumento de neutrófilos fue el no infestado, el cual probablemente pueda haber respondido ante la estimulación antigénica ambiental como fuera explicado con anterioridad, nos advierte de que la respuesta ante la misma podría tener otros mecanismos efectores al del grupo Corriedale resistente. De hecho, Chen y col. (2014) demostraron el rol de los neutrófilos en la estimulación de los macrófagos, generando un fenotipo de larga duración involucrado en la resistencia temprana a helmintos en un modelo murino.

En relación a los eosinófilos circulantes, sólo se vio alterado el valor en los animales susceptibles infestados, lo que podría estar relacionado con dicha susceptibilidad. Si bien el rol de los eosinófilos en la respuesta inmune parasitaria ha sido ampliamente estudiada (Angulo-Cubillán et al., 2007), y ante *H. contortus* en particular (Terefe et al., 2007), es necesario destacar la relación sugerida entre la resistencia de ovinos a *H. contortus*, el nivel de eosinófilos circulantes (Balic et al., 2000) y los presentes en la mucosa abomasal (Muñoz-Guzmán et al., 2012). A su vez, se ha encontrado una estrecha vinculación tisular entre los eosinófilos y las L4 de *H. contortus* (Balic et al., 2002). Terefe y col. (2007) sugieren la expresión diferencial entre razas resistentes y susceptibles de la IL-5, responsable de la funcionalidad de los eosinófilos y su movilización desde la médula ósea. En este sentido, se ha demostrado su rol en la protección contra *H. contortus* en ovinos resistentes (Robinson et al., 2010). La respuesta eosinofílica constituye uno de los mecanismos iniciales para la expulsión de las L3 (Nisbet et al., 2016), mediante la degranulación de sustancias citotóxicas mediada por anticuerpos (Meeusen et al., 2005). Una deficiencia en esta respuesta podría implicar la imposibilidad de atenuar la carga parasitaria posterior, en concordancia con lo sugerido por los hallazgos de Johnston y col. (2005) en un modelo murino.

Por su parte, los linfocitos circulantes mostraron un incremento hacia el final del experimento en los ovinos de la línea Corriedale resistente, lo cual podría corresponderse, como mencionáramos con anterioridad, con el incremento del recuento total de leucocitos en este grupo. Estos resultados son concordantes con lo reportado por Qamar y Maqbool (2012), quienes postularon que los linfocitos inducen una respuesta inmune combinada frente a *H. contortus*, humoral y de infiltrado celular local, que permite una disminución del tamaño y fecundidad de los parásitos. A su vez, Rowe y col. (2008) encontraron una correlación negativa entre el recuento linfocitario y la fecundidad de parásitos, lo cual afirma la teoría a su vez, de la existencia de una correlación positiva entre el recuento linfocitario en sangre y la resistencia a NGI. En este sentido, si bien el recuento leucocitario total de los animales resistentes infestados fue significativamente menor que el de los homólogos susceptibles al inicio del experimento, al final de este, no se mostraron diferencias significativas, con lo cual se confirma el incremento pronunciado de los primeros en respuesta al desafío parasitario.

Por otro lado, encontramos un descenso de los valores de monocitos circulantes tanto en los ovinos susceptibles como en los resistentes, siendo más temprana esta disminución en los animales susceptibles que en los resistentes. Podríamos sugerir un reclutamiento en la mucosa abomasal de estas células, importantes en la generación de la respuesta inmune adquirida (Angulo-Cubillán et al., 2007), y que, siendo los animales resistentes, más preparados para su afrontamiento, ante una infestación masiva, pudieran agotar los circulantes posteriormente a los susceptibles.

En relación al análisis de la respuesta inmune humoral, nuestros resultados sobre la IgA son consistentes con los encontrados por MacKinnon y col. (2010) comparando ovinos de pelo y lana frente a *H. contortus*, y Mcrae y col. (2015) para *T. circumcincta*. En general, los animales Corriedale resistentes y Rylington/Corriedale tuvieron títulos más elevados durante todo el experimento que los animales de la línea susceptible, tanto para antígenos de parásito adulto como larvarios. Observamos un comportamiento más estable en los animales resistentes y Rylington/Corriedale que en los susceptibles, tanto en plasma como en saliva. Esto sugiere, por un lado, la presencia de un nivel basal de anticuerpos específicos protectivos que posiblemente hayan estado involucrados en el mayor éxito de los ovinos resistentes y Rylington/Corriedale para limitar el desafío experimental. Y por otro, que la respuesta similar ante L3 y adultos de *H.*

contortus podría deberse a que compartan antígenos o existe reacción cruzada entre ambos. En este sentido, García-Coiradas y col. (2010) encontraron reactividad cruzada ante extractos larvarios y adultos con anticuerpos específicos para la fracción proteica p26/23. Asimismo, Hernández y col. (2016) mostraron evidencias de que ciertos antígenos larvarios involucrados en la modulación de la infestación podrían ser semejantes a los presentes en el estadio adulto.

Hay suficiente evidencia sobre la correlación entre la concentración en suero de IgA y la resistencia a nemátodos gastrointestinales en ovinos (Figueroa Castillo et al., 2011). En cuanto a la función que esta Ig tiene, se conoce que su verdadera actividad biológica se ejerce a través del tipo secretorio a nivel de mucosa (Venturina et al., 2013). La IgA en saliva proviene casi exclusivamente de producción local de células plasmáticas asociadas a las glándulas salivares, y en mucho menor medida de la circulación (Shaw et al., 2012). A su vez, Mcrae y col. (2015) postulan que la IgA sérica proviene de la producción a nivel intestinal, y Shaw y col. (2012) describieron que los niveles de IgA en saliva contra el antígeno CarLa (L3) es un reflejo de su título a nivel de la mucosa intestinal, por lo que podemos entonces asumir que habrá una fuerte correlación entre los tres sitios. De hecho, un estudio previo encontró correlación positiva entre los niveles de IgA séricos, de mucus gástrico y nasal ante *T. circumcincta* (Martínez-Valladares et al., 2005). Esto es concordante con los resultados presentados aquí, dado que los niveles de IgA específicas en ambos fluidos, plasma y saliva fueron similares, siendo los animales Corriedale resistentes y Rylington/Corriedale, los que presentaron mayores niveles de IgA en ellos, tanto para antígenos larvarios como contra antígenos de parásito adulto, en comparación con los animales susceptibles.

Si bien los animales Corriedale susceptibles mostraron un incremento en los títulos de IgA contra antígenos larvarios en saliva, este aumento sucedió más tardíamente que en los resistentes, quienes tenían un nivel basal elevado al comenzar el experimento. Esto comprueba la vulnerabilidad de aquellos, dado que la función de la IgA contra L3 está vinculada a la respuesta temprana contra el parásito en sus estadios larvarios (Harrison et al., 2003; MacKinnon et al., 2010; Nisbet et al., 2016). Asimismo, el grupo susceptible control mostró un incremento de títulos hacia el final del experimento, coincidentemente con los resultados de Piedrafita y col. (2012), quienes aducen estos efectos a posibles contaminaciones de los sitios de alojamiento de los animales o reacciones cruzadas a antígenos presentes en el alimento. Cabe destacar que en dicho trabajo se resalta el valor protector de la respuesta inmune humoral específica para antígenos larvarios del tercer estadio. En este sentido, un estudio reportó una respuesta de IgA contra antígenos larvarios en razas susceptibles, mientras que la respuesta del mismo anticuerpo contra antígenos solubles de parásito adulto fue la mediadora de la resistencia, en acción conjunta con los eosinófilos (Hernández et al., 2016).

Las acciones específicas de la IgA en las infestaciones parasitarias han sido revisadas, pero aún no están claros todos los mecanismos intervinientes. Se han encontrado evidencias de que las mismas tienen un mayor efecto sobre las L4 que sobre los adultos y que regulan el desarrollo y madurez de las poblaciones parasitarias dentro de los ovinos. Uno de los mecanismos propuestos es que puedan inhibir el accionar de enzimas proteolíticas parasitarias, lo cual impide la alimentación de las larvas. Se postula otro mecanismo también asociado a los eosinófilos, conocido como citotoxicidad dependiente de anticuerpos, donde la degranulación de los eosinófilos, causante del daño al parásito, estaría mediada por la unión a antígenos parasitarios a través de las IgA en la superficie celular (MacKinnon et al., 2010). Este mecanismo de acción está reportado en varios estudios, donde se comprobó una cinética similar entre los eosinófilos y las IgA, en la disminución del tamaño de los adultos de *T. circumcincta* (Henderson

& Stear, 2006). Sumado a esta cinética conjunta de IgA y eosinófilos, se suma la reportada por Lacroux y col. (2006) con IgG1, donde describen una correlación de estos parámetros, positivamente con la proporción de parásitos inmaduros y negativamente con la longitud de las hembras y el número de huevos en sus úteros.

Si bien algunos reportes aluden a que la respuesta de IgA podría tener mayor relevancia en la interacción con L3 y L4 (Amarante et al., 2005; Mcrae et al., 2015), por lo que habrían de esperarse mayores títulos ante los antígenos derivados del estadio larvario, no fue nuestro caso. Hein y col. (2010) postularon que el repertorio de anticuerpos del plasma podría ser diferente al que se encuentra en la interfase hospedero-parásito, siendo en esta última más enfocada la respuesta al estadio L3. Martínez-Valladares (2005) reportaron correlaciones positivas entre los niveles de IgA contra antígenos somáticos de L4 y adulto entre mucosa gástrica, suero y saliva en animales resistentes a *T. circumcincta*. Es importante destacar, a los fines de la utilidad diagnóstica que se propone del uso de la titulación de la IgA específica contra *H. contortus* como forma de identificar animales resistentes, que en la bibliografía se reportan resultados variables al respecto (Mcrae et al., 2015). Sin embargo, Amarante y col. (2005) sugieren, a través de la evaluación de 3 razas diferentes, que el nivel de IgA puede ser útil para diferenciar variaciones en la resistencia a NGI intrarracialmente, más que la comparación interracial.

Cabe aquí resaltar la ventaja que implica el diagnóstico en saliva como forma de selección de animales resistentes, ya que se ha reportado su heredabilidad y que metodológicamente es más eficiente, sencillo y menos invasivo que la toma de sangre y materia fecal (Shaw et al., 2012). A su vez, la utilización de lisados parasitarios como antígenos en vez de purificados permite la elaboración local de los mismos y un menor costo de producción.

En el caso de las IgGs específicas contra antígenos parasitarios, nuestros resultados muestran que los ovinos Rylington/Corriedale presentaron niveles superiores al resto de los grupos testeados tanto para antígenos larvarios como adultos. Dado que otros reportes asocian la mayor presencia de IgG con la resistencia ante *H. contortus* (Gill et al., 2000; Lacroux et al., 2006), podemos sugerir que esta craza posee un mecanismo inmunológico complementario que hace más efectiva su respuesta, como puede comprobarse por los menores HPG durante todo el experimento en relación a las otras dos líneas de ovinos evaluados, Corriedale resistentes y susceptibles. Asimismo, la comparación entre resistentes y susceptibles arrojó un resultado particular, donde las diferencias marcadas se obtuvieron en los animales no infestados. Esto podría sugerir que el nivel basal de IgG específicas, debido a la memoria inmunológica, es el responsable de limitar las infestaciones desde el inicio en los animales resistentes. Es importante mencionar también que los títulos fueron más elevados contra el antígeno larvario que contra el parásito adulto, coincidentemente con lo descrito en otros trabajos. Se ha encontrado una correlación positiva entre las IgG y el número de parásitos inmaduros y negativa con adultos de *T. circumcincta* en ovinos Merino resistentes a NGI, lo que podría sugerir otro mecanismo de acción tendiente a inhibir el desarrollo de los mismos (Williams et al., 2010). Si bien el rol de las IgG en la resistencia a NGI aún no está completamente definido, se ha postulado una acción directa en interacción con antígenos parasitarios en la reducción de la fecundidad de los mismos (McCoy et al., 2008). A su vez, existen evidencias de que la IgG1 contra L3 de *T. circumcincta* actuaría conjuntamente con la bradiquinina, péptido activo involucrado en la vasodilatación y contracciones del músculo liso digestivo, facilitando el acceso de las IgG1 al contacto directo con las larvas, permitiendo su expulsión (Williams, 2012). Gill y col. (2000) asociaron también la respuesta de IgG1 a nivel local con la resistencia a *H. contortus* en ovinos, por lo que sería

interesante continuar las investigaciones en las líneas resistentes uruguayas diferenciando los subtipos de IgG.

En relación al perfil de citoquinas producidas por PBMCs estimulados estudiado, se observó un aumento en la expresión de IL-4 e IL-13 en los ovinos Corriedale resistentes en relación a los susceptibles y de IL-5 y TNF- α en los ovinos cruza Rylington/Corriedale, en relación a las otras dos líneas evaluadas, en el día 35 post infestación, lo que podría estar indicando una diferenciación en los mecanismos efectores de la respuesta inmune de los dos grupos de ovinos resistentes a NGI.

Nuestros resultados son concordantes con lo publicado por otros autores en relación a la polarización de la respuesta inmune generada por los NGI en ovinos resistentes (Lacroux et al., 2006; Shakya et al., 2009; Terefe et al., 2007). En este tipo de respuestas, las citoquinas involucradas críticamente incluyen a IL-4 e IL-13 (Li et al., 2012; Meeusen et al., 2005). Estos mismos resultados fueron reportados por Pernthaner y col. (2005) quienes estudiaron la respuesta a nivel linfático local frente a *T. circumcincta* encontrando que las líneas de ovinos resistentes presentaron mayor expresión del gen codificante de IL-13, incluso en los no sensibilizados previamente, quienes no alcanzaron una respuesta completamente protectora pero lograron menores HPG que los homólogos susceptibles. Este mismo grupo, en una segunda instancia (Pernthaner et al., 2006) demostró que líneas de ovinos resistentes, en una segunda estimulación presentaron un incremento aún mayor que los susceptibles, con lo cual se podría asumir una falla en estos últimos para generar memoria.

Por otro lado, se reportaron mayores niveles de expresión de IL-4 en corderos resistentes que en susceptibles ante desafío con *H. contortus* en los primeros 10 días de exposición, mientras que luego del día 14 se asemejaron ambos grupos (Shakya et al., 2009). Esto se correlaciona con lo reportado por Meeusen y col. (2005) que describe que la IL-4, en conjunto con los mastocitos y leucocitos globulares, tendría un efecto primordial en la expulsión inmediata de larvas, mientras que la IL-13, junto al binomio IL-5/eosinófilos, mediarían una muerte retardada de larvas. Zaros y col. (2010) obtuvieron resultados similares en bovinos resistentes, con una sobreexpresión de IL-4 e IL-13 ante el desafío con *H. placei*.

En cuanto a la función de la IL-4, en un modelo murino se ha asociado a la respuesta ante nemátodos migrantes del tracto gastrointestinal. Secretada por basófilos y células T de memoria, junto con la IL-13, podrían inducir a los basófilos y citoquinas reclutantes de células vinculadas a la respuesta Th2 (Voehringer et al., 2004). Se ha descrito también que los eosinófilos secretan IL-4, con lo cual se sugiere su relevancia en la inmunoregulación de la respuesta contra NGI (Behm & Ovington, 2000). A su vez, se conoce que IL-4 induce la diferenciación de linfocitos B para la producción de IgG e IgE, importantes para la respuesta ante infestaciones con helmintos (de Oliveira et al., 2011).

Por su parte, el rol de la IL-13 en las infestaciones parasitarias aún está en estudio, pero se ha encontrado que modifica la función intestinal, en cuanto a motilidad (Akiho et al., 2002) y conjuntamente con IL-4, modifican la permeabilidad de la mucosa, interviniendo con un rol crítico en la protección contra NGI en un modelo murino (Madden et al., 2002). De hecho, posee una estructura similar a IL-4, es producida por LT CD4⁺ y está asociada a la modificación del perfil de citoquinas producidas por monocitos y LB, inhibiendo las que están vinculadas a las respuestas Th1 y T reguladoras (de Oliveira et al., 2011).

Asimismo, Lacroux y col. (2006) encontraron una sobreexpresión de IL-4 e IL-13 en conjunto con un incremento en los niveles de IgG sistémica e IgA local y movilización celular (eosinófilos entre

otros) más temprana y sostenida en corderos previamente sensibilizados, al contrario que en los primoinfectados con *H. contortus*. A su vez, encontraron una correlación entre estos parámetros y un menor desarrollo de los parásitos, menor longitud y número de huevos en útero de hembras adultas. Esto, en suma con lo reportado por Pernthaner y col. (2006) sobre la respuesta secundaria, avala nuestros resultados. Considerando que los animales utilizados para el presente estudio tuvieron estimulación antigénica natural previo al inicio del experimento, podemos reforzar la idea de que estos parámetros están involucrados en una respuesta adaptativa y específica a la vez que se desarrollan células de memoria (linfocitos adaptativos) que pueden actuar de inmediato y generar una respuesta sostenida en el tiempo (Mcrae et al., 2015).

En cuanto a la IL-5, como fuera mencionado anteriormente, está vinculada a la función de los eosinófilos, dado que estimula su movilización desde la médula ósea a la circulación, promoviendo su funcionalidad (Terefe et al., 2007). A su vez, se asocia esta citoquina, directamente a la inmunidad contra NGI dado que induce mastocitosis y producción de IgE (Gill et al., 2000). Nuestros resultados son concordantes en parte con los de Pernthaner y col. (2005) quienes encontraron mayores niveles de expresión de IL-5 en ovinos resistentes mientras que los susceptibles no pudieron generar dicha alza, por lo que concluyeron que esta podría ser una de las causas de la susceptibilidad. Pero, si bien coincidimos en el incremento de expresión relativa de IL-5 en los ovinos cruza Rylington/Corriedale con lo informado por otros autores, en general se reportan asociados al incremento de expresión IL-13 e IL-4 (Pernthaner et al., 2006; G. Terefe et al., 2007; Zaros et al., 2010), por lo que sería necesario profundizar el estudio de manera de poder dilucidar los patrones de expresión específicos de las líneas resistentes uruguayas.

Por su parte, el TNF- α tiene una importante función en la regulación de la proliferación, diferenciación y funcionalidad de células mielomonocíticas y está involucrado en actividades anti-parasitarias. También se sabe que provee señales activadoras para neutrófilos y macrófagos y tiene efectos estimuladores del crecimiento de fibroblastos. Además, induce la expresión de los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) (Cludts et al., 1993), fundamental para la generación de una respuesta inmune adquirida y la activación de linfocitos T CD4⁺, que, sumado a las funciones anteriormente descritas, podría ser de gran importancia en la inmunidad contra NGI de animales resistentes. En este sentido, nuestros resultados difieren con los obtenidos por Zaros y col. (2010) en ganado bovino, quienes reportaron un incremento del TNF- α en los animales susceptibles. Sin embargo, Li y col. (2007) describieron un incremento en la expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF- α en vaquillonas resistentes. Postularon que, si bien aquella no sería suficiente para matar el parásito por su propia funcionalidad, el cambio en el micro-ambiente mediado por óxido nítrico, enzimas líticas e intermediarios de oxígeno reactivo provenientes de macrófagos activados por su efecto, afectaría la fecundidad de los parásitos. Por su parte, Pernthaner y col. (2005) reportaron resultados similares en ovinos donde obtuvieron un incremento de la expresión del TNF- α , mayor en los animales resistentes. Además, destacaron que los susceptibles mostraron una disminución posterior del nivel de expresión alcanzado, lo que podría estar indicando algún mecanismo supresor de la respuesta inmune efectiva.

Para concluir, podemos confirmar la resistencia de los grupos de ovinos evaluados (Corriedale resistente y Rylington/Corriedale) en relación a los susceptibles y sugerir que esto se debió a respuestas inmunológicas de tipo humoral más intensas con niveles más elevados de IgG e IgA

específicas, tanto para antígenos larvarios como adultos del parásito, así como una mayor expresión de citoquinas vinculadas a las respuestas de tipo Th2.

Según los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos sugerir también una asociación entre los niveles mayores de anticuerpos y de linfocitos totales en los animales resistentes. Como sabemos, los anticuerpos son producidos por linfocitos B, por lo que un aumento en el número total sería congruente con una mayor respuesta humoral.

Si bien se postula que la capacidad de generar una respuesta Th2 se relaciona con el nivel de resistencia, podría ser la capacidad y velocidad de efectuar un cambio en el balance Th1/Th2/Treg, lo determinante de la resistencia genética a parásitos GI y esto estaría condicionado por una diferencia de expresión de los genes involucrados en la misma (Hassan et al., 2011). En este sentido, Bowdridge y col. (2013) concluyeron que ovinos de pelo resistentes presentaron un nivel mayor y más veloz en la respuesta inmune capaz de limitar eficientemente la infestación comprobada en el valor de HPG.

Todos los grupos genéticos evaluados en el presente estudio tuvieron el mismo tipo de exposición, por lo cual podríamos sugerir también que los ovinos Corriedale resistentes y más aún los Rylington/Corriedale, dado por la complementariedad de las razas que componen la cruce, suma de efectos aditivos y/o heterosis, presentan un mejor desarrollo de memoria inmunológica, puesta en marcha con mayor eficiencia en las subsiguientes estimulaciones antigénicas. De hecho, los títulos de anticuerpos al inicio del experimento (basales) fueron mayores que en los susceptibles, quienes probablemente hayan desarrollado memoria inmunológica menos eficiente para abordar el desafío parasitario.

Es importante destacar que los ovinos evaluados de la cruce Rylington/Corriedale fueron los que tuvieron menores valores de HPG durante todo el experimento, con lo cual se asume una mayor efectividad para limitar el desafío parasitario. Estos animales presentaron diferencias en los parámetros inmunológicos evaluados por lo que se sugiere que los mecanismos efectores por los cuales desarrollan su resistencia son diferentes a los observados en los Corriedale resistentes. Se hace necesario profundizar las investigaciones en este sentido y dilucidar si los resultados aquí presentados son producidos por diferencias raciales, por consecuencias genéticas propias del cruzamiento, como el efecto aditivo o la heterosis, como así también variaciones individuales de los progenitores.

En cuanto a la evaluación de la respuesta inmunológica como medio de selección de ovinos resistentes, es importante destacar que se han usado muchos marcadores, pero se ha cuestionado la confiabilidad de cada uno por separado, siendo más fiables las combinaciones de varios (Bishop, 2012; Saddiqi et al., 2011). Por otro lado, las respuestas adquiridas secundarias son más sólidas que las primarias y expresan mejor la resistencia genética (Saddiqi et al., 2011), algo importante a tener presente en las evaluaciones de prole.

La importancia de los resultados obtenidos por la presente investigación radica en que, dado que, y como fuera mencionado anteriormente, las respuestas inmunológicas asociadas a la resistencia a NGI difieren entre las razas estudiadas, los procesos de selección que generaron las líneas de animales y los protocolos de investigación utilizados (Saddiqi et al., 2011), es necesario conocer los mecanismos subyacentes particulares de la resistencia observada en los ovinos seleccionados en Uruguay para el futuro desarrollo de técnicas de selección más eficientes y la posible generación de tecnologías de inmunización efectivas y adaptados localmente.

La selección por resistencia a NGI tiene una serie de consecuencias por demás beneficiosas para el sector productivo y comunidad en general. Permite la modificación en la epidemiología del parásito, disminuyendo la contaminación y carga ambiental, se ha observado el desarrollo de resistencia cruzada entre distintas especies de NGI, se promueve el enlentecimiento de la generación de resistencia de los mismos a drogas antihelmíntica, se disminuyen los costos de aplicaciones y contaminación ambiental con las mismas (Saddiqi et al., 2011), todo lo cual redundará en sustentabilidad ambiental, aspecto cada vez más importante en los mercados internacionales.

La comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes que permiten el desarrollo de una respuesta inmune protectora y a su vez, heredable, es de gran impacto para la generación de estrategias de control de las parasitosis más importantes a nivel productivo (Li et al., 2012). Es necesario ampliar los estudios al respecto, evaluar la participación de otras inmunoglobulinas vinculadas a las respuestas frente a helmintos, como IgE, la evaluación diferencial de las IgG1 y ampliar los perfiles de citoquinas involucradas, a la vez que iniciar el estudio de la inmunidad local a nivel de mucosa abomasal.

En vistas de los presentes resultados, destacamos la necesidad de profundizar los estudios sobre la diferenciación en las respuestas inmunológicas de los ovinos resistentes seleccionados en Uruguay, a la vez que investigar la función de los anticuerpos específicos encontrados en la presente. Sería deseable conocer qué estructuras parasitarias reconocen y qué mecanismos efectores utilizan en la respuesta.

CONCLUSIONES GENERALES

Podemos confirmar la resistencia ante NGI de los ovinos cruce Merino Rylington/Corriedale producidas en Uruguay, además de la anteriormente seleccionada línea, Corriedale resistentes, en contraposición a su divergente, Corriedale susceptible.

El nivel de resistencia se vio reflejado en los parámetros hematológicos, si bien no se observaron tendencias determinantes que permitan inferir el grado de resistencia, se comprobó el menor daño provocado por el desafío experimental con *H. contortus* en los animales resistentes.

En cuanto a la inmunidad humoral, pudimos observar una respuesta diferenciada en cada grupo evaluado, lo que sugiere mecanismos inmunológicos diferentes en cada uno de ellos, que es necesario investigar en mayor profundidad. Comprobamos la posibilidad de detectar dicha respuesta a través de las IgA específicas en saliva, siendo este procedimiento poco invasivo y con tecnología local disponible.

Dada la importancia de *H. contortus* en la producción ovina de Uruguay, es necesario continuar en esta línea de investigación para conocer los mecanismos moleculares responsables de la resistencia a NGI, que permitan desarrollar herramientas, tanto sea para la selección de animales resistentes, como para el desarrollo de tecnologías destinadas a la prevención como por ejemplo, vacunas en las que se está trabajando actualmente (Bassetto et al., 2011; Martín et al., 2011).

BIBLIOGRAFIA

- Aguiló, J. (2001). Valores Hematológicos. *Clinica Veterinaria En Pequeños Animales*, 21, 9.
- Akiho, H., Blennerhassett, P., Deng, Y., & Collins, S. M. (2002). Role of IL-4, IL-13, and STAT6 in inflammation-induced hypercontractility of murine smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 282(2), G226–G232. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2002.282.2.g226>
- Alba-Hurtado, F., & Muñoz-Guzmán, M. A. (2013). Immune responses associated with resistance to haemonchosis in sheep. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/162158>
- Anderson, R. C. (2000). Nematode Parasites of Vertebrates. *Their Development and Transmission. 2nd Edition. CABI Publishing*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Angulo-Cubillán, F. J., García-Coiradas, L., Cuquerella, M., de la Fuente, C., & Alunda, J. (2007). *Haemonchus contortus* - Sheep relationship: A review. *Revista Científica Veterinaria*, XVII(6), 577–587.
- Arece García, J., Sanavria, A., Soca, M., Da Fonseca, A. H., Fidlarczyk Maciel, R., Da Silva, L. C., Zen Gianfrancisco, O. (2015). Relación de algunos indicadores sanguíneos con la infestación de parásitos gastrointestinales en ovinos. *Rev. Salud Anim* (Vol. 37). <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v37n2/rsa09215.pdf>
- Baker, R. L., & Gray, G. D. (2004). Appropriate breeds and breeding schemes for sheep and goats in the tropics. *Better Worm Control for Small Ruminants in Tropical Asia Worm Control for Small Ruminants in Tropical Asia*, 63–95.
- Balic, A., Bowles, V. M., & Meeusen, E. N. . (2000). The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Advances in Parasitology*, 45, 181–241. [https://doi.org/10.1016/s0065-308x\(00\)45005-0](https://doi.org/10.1016/s0065-308x(00)45005-0)
- Balic, A., Bowles, V. M., & Meeusen, E. N. T. (2002). Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Parasite Immunology*, 24(1), 39–46. <https://doi.org/10.1046/j.0141-9838.2001.00432.x>
- Bassetto, C. C., Silva, B. F., Newlands, G. F. J., Smith, W. D., & Amarante, A. F. T. (2011). Protection of calves against *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* after immunization with gut membrane proteins from *H. contortus*. *Parasite Immunology*, 33(7), 377–381. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2011.01295.x>
- Behm, C. A., & Ovington, K. S. (2000). The Role of Eosinophils in Parasitic Helminth Infections: Insights from Genetically Modified Mice. *Parasitology Today*, 16(5).
- Bishop, S. C. (2012). Possibilities to breed for resistance to nematode parasite infections in small ruminants in tropical production systems. *Animal*, 6(5), 741–747. <https://doi.org/10.1017/S1751731111000681>
- Blumenreich, M. S. (1990). The White Blood Cell and Differential Count. In *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. Butterworths. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21250104>

- 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*. *Veterinary Parasitology*, 208(3–4), 204–210. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.019>
- Bowdridge, S., MacKinnon, K., McCann, J. C., Zajac, A. M., & Notter, D. R. (2013). Hair-type sheep generate an accelerated and longer-lived humoral immune response to *Haemonchus contortus* infection. *Veterinary Parasitology*, 196(1–2), 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.01.008>
- Bricarello, P. A., Gennari, S. M., Oliveira-Sequeira, T. C. G., Vaz, C. M. S. L., Gonçalves De Gonçalves, I., & Echevarria, F. A. M. (2004). Worm burden and immunological responses in Corriedale and Crioula Lanada sheep following natural infection with *Haemonchus contortus*. *Small Ruminant Research*, 51(1), 75–83. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(03\)00188-3](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(03)00188-3)
- Castells, D. (2004). Epidemiología y Control de nemátodos gastrointestinales de ovinos en el Uruguay. In *INIA Serie de Actividades de Difusión N° 359*.
- Castells, D. (2005). Adaptación de genotipos a ambientes adversos : Resistencia genética de los ovinos a parásitos gastrointestinales. *Agrociencia Vol. IX, N° 1 y N°2. 587-593*. Castells, D. (2008). Evaluación de resistencia genética de los ovinos Corriedale a los nemátodos gastrointestinales en Uruguay: Heredabilidad y correlaciones genéticas entre el recuento de huevos de nemátodos y características productivas. *Tesis de Maestría en Producción Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República. Uruguay*. Castells, D., Gayo, V., Mederos, A., Martínez, D., Risso, E., Rodríguez, A., Banchemo, G. (2011). Epidemiological study of gastro-intestinal nematodes of sheep in Uruguay. Prevalence and seasonal dynamics. In *23rd International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. Argentina*.
- Castells, D., Mederos, A., Lorenzelli, E., & Macchi, I. (2002). Diagnósticos de resistencia antihelmíntica de *Haemonchus contortus* a las ivermectinas en el Uruguay. *Producción Ovina. Vol. 15, 43–48*.
- Castells, D., & Nari, A. (1996). Efecto de los nemátodos gastrointestinales sobre parámetros productivos en ovinos de recría y su impacto sobre el desempeño productivo posterior. In *Primer Congreso Uruguayo de Producción Animal*. (pp. 183–186).
- Castells, D., Romero, J., Mederos, A., & Nari, A. (2013). Control de nemátodos gastrointestinales en ovinos. In C. A. Fiel & A. Nari (Eds.), *Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes*.
- Chen, F., Wu, W., Millman, A., Craft, J. F., Chen, E., Patel, N., Gause, W. C. (2014). Neutrophils prime a long-lived effector macrophage phenotype that mediates accelerated helminth expulsion. *Nature Immunology*, 15(10), 938–946. <https://doi.org/10.1038/ni.2984>
- Ciappesoni, G., Mederos, De Barbieri, A., Rodríguez, I., Kelly, A., Nicolini, L., Montossi, V. (2009). Resistencia genética a parásitos gastrointestinales en ovinos: el enfoque del INIA. *Agrociencia. p83*. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/3603/1/Agrociencia-2009-p83.pdf>
- Cludts, I., Cleuter, Y., Kettmann, R., Burney, A., & Droogmans, L. (1993). Cloning and characterization of the tandemly arranged bovine lymphotoxin and tumour necrosis factor-alpha genes. *Cytokine*, 5(4), 336–341. [https://doi.org/10.1016/1043-4666\(93\)90065-d](https://doi.org/10.1016/1043-4666(93)90065-d)

- de Oliveira, C. M. B., Sakata, R. K., Machado Issy, A., Gerola, L. R. & Salomão, R. (2011). Cytokines and Pain. *Brazilian Journal of Anesthesiology*, 61(2), 255–265. [https://doi.org/10.1016/s0034-7094\(11\)70029-0](https://doi.org/10.1016/s0034-7094(11)70029-0)
- Fernández Abella, D., Castells, D., Piaggio, L., & Deleón, N. (2006). Estudio de la mortalidad embrionaria y fetal en ovinos. I. Efecto de distintas cargas parasitarias y su interacción con la alimentación sobre las pérdidas embrionarias y la fecundidad. *Producción Ovina*, 18, 25–31.
- Fiel, C. A., Steffan, P. E., & Ferreyra, D. A. (2011). Diagnóstico de las parasitosis más frecuentes de los rumiantes. Técnicas de laboratorio e interpretación de resultados. ISBN 978-987-33-1502-2
- Figueroa Castillo, J. A., Medina, R. D. M., Villalobos, J. M. B., Gayosso-Vázquez, A., Ulloa-Arvizu, R., Rodríguez, R. A., 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*. *Veterinary Parasitology*, 177(3–4), 339–344. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.11.056>
- Gadahi, J. A., Yongqian, B., Ehsan, M., & Zhang, Z. C. (2016). *Haemonchus contortus* excretory and secretory proteins (HcESPs) suppress functions of goat PBMCs in vitro. *Oncotarget*, Vol. 7(24).
- García-Coiradas, L., Angulo-Cubillán, F., Valladares, B., Martínez, E., de la Fuente, C., Alunda, J. M., & Cuquerella, M. (2010). Immunization against Lamb Haemonchosis with a Recombinant Somatic Antigen of *Haemonchus contortus* (rHcp26/23). *Veterinary Medicine International*, 2010, 1–8. <https://doi.org/10.4061/2010/852146>
- 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(3), 458–463. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2000.00974.x>
- Goldberg, V. (2011). Estimación de parámetros genéticos de la resistencia a nemátodos en el período del parto y pos-destete en ovinos Merino del Uruguay. *Tesis de Master interuniversitario en mejora genética animal y biotecnología de la reproducción. Universidad Politécnica de Valencia. España.*
- Goldberg, V., Ciappesoni, G., Barbieri, I. De, Rodríguez, A., & Montossi, F. (2011). Factores no genéticos que afectan la resistencia a parásitos gastrointestinales en Merino en Uruguay . *Producción Ovina*, 21, 1–11.
- González, J. F., Hernández, Á., Molina, J. M., Fernández, A., Raadsma, H. W., Meeusen, E. N. T., & Piedrafita, D. (2008). Comparative experimental *Haemonchus contortus* infection of two sheep breeds native to the Canary Islands. *Veterinary Parasitology*, 153(3–4), 374–378. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.02.019>
- Harrison, G. B. L., Pulford, H. D., Doolin, E. E., Pernthaner, A., Shoemaker, C. B., & Hein, W. R. (2008). Antibodies to surface epitopes of the carbohydrate larval antigen CarLA are associated with passive protection in strongylid nematode challenge infections. *Parasite Immunology*, 30(11–12), 577–584. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2008.01058.x>
- Harrison, G. B. L., Pulford, H. D., Hein, W. R., Barber, T. K., Shaw, R. J., McNeill, M., Shoemaker, C. B. (2003). Immune rejection of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep; a possible role for intestinal mucus antibody against an L3-specific surface antigen. *Parasite Immunology*, 25(1), 45–53. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2003.00602.x>

- Hassan, M., Hanrahan, J. P., Good, B., Mulcahy, G., & Sweeney, T. (2011). A differential interplay between the expression of Th1/Th2/Treg related cytokine genes in *Teladorsagia circumcincta* infected DRB1*1101 carrier lambs. *Veterinary Research*, 42(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-45>
- Hein, W. R., Pernthaner, A., Piedrafita, D., & Meeusen, E. N. (2010). Immune mechanisms of resistance to gastrointestinal nematode infections in sheep. *Parasite Immunology*, 32(8), 541–548. <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*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 112(1–2), 62–66. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.03.012>
- Hernández, J. N., Hernández, A., Stear, M. J., Conde-Felipe, M., Rodríguez, E., Piedrafita, D., & González, J. F. (2016). Potential role for mucosal IgA in modulating *Haemonchus contortus* adult worm infection in sheep. *Veterinary Parasitology*, 223, pp. 153-158.
- Jackson, S. R., & Carter, J. M. (1993). Platelet volume: Laboratory measurement and clinical application. *Blood Reviews*, 7(2), 104–113. [https://doi.org/10.1016/S0268-960X\(05\)80020-7](https://doi.org/10.1016/S0268-960X(05)80020-7)
- 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 Immunology*, 38(6), 333–339. <https://doi.org/10.1111/pim.12321>
- Johnston, C. E., Bradley, J. E., Behnke, J. M., Matthews, K. R., & Else, K. J. (2005). Isolates of *Trichuris muris* elicit different adaptive immune responses in their murine host. *Parasite Immunology*, 27(3), 69–78. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2005.00746.x>
- Johnstone, C. (1998). Parásitos y enfermedades parasíticas de los animales domésticos. Universidad de Pennsylvania. <http://cal.vet.upenn.edu/projects/merialsp/index.html>
- Kemper, K. E., Palmer, D. G., Liu, S. M., Greeff, J. C., Bishop, S. C., & Karlsson, L. J. E. (2010). Reduction of faecal worm egg count, worm numbers and worm fecundity in sheep selected for worm resistance following artificial infection with *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology*, 171(3–4), 238–246. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.04.005>
- Knight, J. S., Baird, D. B., Hein, W. R., & Pernthaner, A. (2010). The gastrointestinal nematode *Trichostrongylus colubriformis* down-regulates immune gene expression in migratory cells in afferent lymph. *BMC Immunology*, 11(1), 51. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-11-51>
- Lacroux, C., Nguyen, T. H. C., Andreoletti, O., Prevot, F., Grisez, C., Bergeaud, J. P., Jacquet, P. (2006). *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits an unequivocal Th2 immune response. *Veterinary Research*, 37, 607–622. <https://doi.org/10.1051/vetres>
- Li, R. W., Choudhary, R. K., Capuco, A. V., & Urban, J. F. (2012). Exploring the host transcriptome for mechanisms underlying protective immunity and resistance to nematode infections in ruminants. *Veterinary Parasitology*, 190(1–2), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.06.021>
- Li, R. W., Sonstegard, T. S., Van Tassell, C. P., & Gasbarre, L. C. (2007). Local inflammation as a possible mechanism of resistance to gastrointestinal nematodes in Angus heifers. *Veterinary Parasitology*, 145(1–2), 100–107.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.11.015>

- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4) 402-8.
- 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 Immunology*, 32(7), 484–493.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2010.01211.x>
- Madden, K. B., Whitman, L., Sullivan, C., Gause, W. C., Urban, J. F., Katona, I. M., Shea-Donohue, T. (2002). Role of STAT6 and Mast Cells in IL-4- and IL-13-Induced alterations in murine intestinal epithelial cell function. *The Journal of Immunology*, 169(8), 4417–4422.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.8.4417>
- Martín, S., Molina, J. M., Hernández, Y. I., Pérez, D., Matos, L., López, A. M., Ruiz, A. (2011). Inmunoprotección y variabilidad genética de proteinasas tipo cisteína de *Haemonchus contortus* en ovinos inmunizados a diferentes edades. *Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol.*, 70(2), 178–188.
- Martínez-Valladares, M., Vara-Del Río, M. P., Cruz-Rojo, M. A., & Rojo-Vázquez, F. A. (2005). Genetic resistance to *Teladorsagia circumcincta*: IgA and parameters at slaughter in Churra sheep. *Parasite Immunology*, 27(6), 213–218. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2005.00769.x>
- McCoy, K. D., Stoel, M., Stettler, R., Merky, P., Fink, K., Senn, B. M., Harris, N. L. (2008). Polyclonal and specific antibodies mediate protective immunity against enteric helminth infection. *Cell Host and Microbe*, 4(4), 362–373.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.08.014>
- McManus, C., Paim, T. do 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, 56.
<https://doi.org/10.1051/parasite/2014055>
- Mcrae, K. M., Stear, M. J., Good, B., & Keane, O. M. (2015). The host immune response to gastrointestinal nematode infection in sheep. *Parasite Immunology*, 37(12), 605–613.
<https://doi.org/10.1111/pim.12290>
- Meeusen, E. N. T., Balic, A., & Bowles, V. (2005). Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 108(1–2 SPEC. ISS.), 121–125.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.07.002>
- Miller, J. E., & Horohov, D. W. (2006). Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. *Journal of Animal Science*. 84(E. Suppl.)E124–132.
- Morteo-Gómez, R., González-Carduño, 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 nemátodos gastrointestinales. *Agrociencia*, 38(4), 395–404.
- Muñoz-Guzmán, M. A., Cuenca-Verde, C., Valdivia-Anda, G., Cuéllar-Ordaz, J. A., & Alba-Hurtado, F. (2012). Differential immune response between fundic and pyloric abomasal regions upon experimental ovine infection with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 185(2–4), 175–180. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.001>
- Nari, A., Salles, J., Gil, A., Waller, P. J., & Hansen, J. W. (1996). The prevalence of anthelmintic

- resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Uruguay. *Veterinary Parasitology*, 62(3–4), 213–222. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(95\)00907-8](https://doi.org/10.1016/0304-4017(95)00907-8)
- Nisbet, A. J., Meeusen, E. N., González, J. F., & Piedrafita, D. M. (2016). Immunity to *Haemonchus contortus* and Vaccine Development. *Advances in Parasitology*, 93, 353–396. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.011>
- Peña, M. T., Miller, J. E., & Horohov, D. W. (2006). Effect of CD4⁺ T lymphocyte depletion on resistance of Gulf Coast Native lambs to *Haemonchus contortus* infection. *Veterinary Parasitology*, 138(3–4), 240–246. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.12.026>
- Pernthaner, A., Cole, S.-A., Morrison, L., Green, R., Shaw, R. J., & Hein, W. R. (2006). Cytokine and antibody subclass responses in the intestinal lymph of sheep during repeated experimental infections with the nematode parasite *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 114(1–2), 135–148. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.08.004>
- 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*. *Infection and Immunity*, 73(4), 2175–2183. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.2175-2183.2005>
- Peter, J. W., & Chandrawathani, P. (2005). *Haemonchus contortus*: parasite problem No. 1 from tropics - Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. *Tropical Biomedicine*, 22(2), 131–137.
- Piedrafita, D. P., de Veer, M. J., Sherrard, J., Kraska, T., Elhay, M., & Meeusen, E. N. (2012). Field vaccination of sheep with a larval-specific antigen of the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*, confers significant protection against an experimental challenge infection. *Vaccine*, 30(50), 7199–7204. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.019>
- Qamar, M. F., & Maqbool, A. (2012). Biochemical studies and serodiagnosis of haemonchosis in sheep and goats. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 22(1), 32–38.
- Reagan, W. J., & Sanders, T. G. (1999). Hematología veterinaria: Atlas de Especies Domésticas Comunes. <http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IisScript=LIBRO.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mn=020512>
- Roberts, F., & O'Sullivan, P. (1950). Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, 1(1), 99. <https://doi.org/10.1071/AR9500099>
- 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*. *Veterinary Research*, 41(4), 1–10. <https://doi.org/10.1051/vetres/2010009>
- Rodríguez, F. (2017). Eritropoyesis - Blog de Laboratorio Clínico y Biomédico. <https://www.franzmn.com/eritropoyesis/>
- Rowe, A., McMaster, K., Emery, D., & Sangster, N. (2008). *Haemonchus contortus* infection in sheep: Parasite fecundity correlates with worm size and host lymphocyte counts. *Veterinary Parasitology*, 153(3–4), 285–293.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.01.040>

- Saddiqi, H. A., Jabbar, A., Sarwar, M., Iqbal, Z., Muhammad, G., Nisa, M., & Shahzad, A. (2011). Small ruminant resistance against gastrointestinal nematodes: a case of *Haemonchus contortus*. *Parasitology Research*, *109*(6), 1483–1500. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2576-0>
- Schrader, J. W. (1998). Interleukin 3. In *Encyclopedia of Immunology* (pp. 1442–1445).
- Selemon, M. (2018). Review on Control of *Haemonchus Contortus* in Sheep and Goat. *Journal of Veterinary Medicine Research*, *5*(5), 1–8.
- 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. *Veterinary Parasitology*, *163*(1–2), 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.052>
- Shaw, R. J., Morris, C. A., Wheeler, M., Tate, M., & Sutherland, I. A. (2012). Salivary IgA: A suitable measure of immunity to gastrointestinal nematodes in sheep. *Veterinary Parasitology*, *186*(1–2), 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.051>
- Storillo, V. M. (2016). Resistência , resiliência e sensibilidade de ovinos ao *Haemonchus contortus* : comparações hematológicas e bioquímicas. Tesis de Doctor en Ciencias. Programa de postgraduación en Anatomía de Animales Domésticos y Silvestres de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de San Pablo. Brasil.
- Suárez, V., Olaechea, F., Rossanigo, C., & Romero, J. (2007). Enfermedades parasitarias de los ovinos y otros rumiantes menores en el cono sur de América. *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina*. (pp. 2–34).
- Terefe, G., Grisez, C., Prevot, F., Bergeaud, J. P., Dorchie, P., Brunel, J. C., Jacquiet, P. (2007). In vitro pre-exposure of *Haemonchus contortus* L3 to blood eosinophils reduces their establishment potential in sheep. *Veterinary Research*, *38*(4), 647–654. <https://doi.org/10.1051/vetres:2007019>
- Terefe, G., Lacroux, C., Andreoletti, O., Grisez, C., Prevot, F., Bergeaud, J. P., Jacquiet, P. (2007). Immune response to *Haemonchus contortus* infection in susceptible (INRA 401) and resistant (Barbados Black Belly) breeds of lambs. *Parasite Immunology*, *29*(8), 415–424. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.00958.x>
- Tizard, I. R. (2013). *Veterinary Immunology. 9th Edition. Veterinary immunology* (9th ed.). Elsevier B.V.
- Torrens, M. (2015). Interpretación Clínica Del Hemograma. *Revista Médica Clínica Las Condes*, *26*(6), 713–725. <https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2015.11.001>
- Vanimisetti, H. B., Andrew, S. L., Zajac, A. M., & Notter, D. R. (2004). Inheritance of fecal egg count and packed cell volume and their relationship with production traits in sheep infected with *Haemonchus contortus*. 1602–1611. <https://doi.org/10.2527/2004.8261602x>
- Venturina, V. M., Gossner, A. G., & Hopkins, J. (2013). The immunology and genetics of resistance of sheep to *Teladorsagia circumcincta*. *Veterinary Research Communications*, *37*(2), 171–181. <https://doi.org/10.1007/s11259-013-9559-9>
- Vetlab. (2010). Plaquetas. http://www.vetlab.cl/index.php?option=com_content&view=article&id=91%3Aplaquetas

&catid=35%3Aart-vtl&Itemid=4

- Vignau, M. L., Venturini, L. M., Romero, J. R., Eiras, D. F., & Basso, W. U. (2005). Parasitología práctica y modelos de enfermedades parasitarias en los animales domésticos.
- Voehringer, D., Shinkai, K., & Locksley, R. M. (2004). Type 2 immunity reflects orchestrated recruitment of cells committed to IL-4 production. *Immunity*, *20*(3), 267–277. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(04\)00026-3](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(04)00026-3)
- Weiner lab group. (n.d.). Wiener lab. <http://www.wiener-lab.com.ar/ES/SitePages/DetalleInstrumentos.aspx?IdInstrumento=20>
- Williams, A. R. (2011). Immune-mediated pathology of nematode infection in sheep--is immunity beneficial to the animal? *Parasitology*, *138*(5), 547–556. <https://doi.org/10.1017/S0031182010001654>
- Williams, A. R. (2012). Short Communication: Some Observations on the Role of Bradykinin in Immunity to *Teladorsagia circumcincta* in Sheep . *Journal of Parasitology Research*, *2012*, 1–4. <https://doi.org/10.1155/2012/569287>
- Williams, A. R., Palmer, D. G., Williams, I. H., Vercoe, P. E., Emery, D. L., & Karlsson, L. J. E. (2010). Relationships between immune indicators of parasitic gastroenteritis, nematode burdens and faecal dry matter in sheep. *Animal Production Science*, *50*(3), 219. <https://doi.org/10.1071/an09144>
- Williams, A. R., Palmer, D. G., Williams, I. H., Vercoe, P. E., & Karlsson, L. J. E. (2010). Faecal dry matter, inflammatory cells and antibodies in parasite-resistant sheep challenged with either *Trichostrongylus colubriformis* or *Teladorsagia circumcincta*. *Veterinary Parasitology*, *170*(3–4), 230–237. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.033>
- Woolaston, R. R., & Piper, L. R. (1996). Selection of Merino sheep for resistance to *Haemonchus contortus*: Genetic variation. *Animal Science*, *62*(3), 451–460. <https://doi.org/10.1017/S1357729800014995>
- Zachary, J. F. (2017). *Pathologic basis of veterinary disease* (6th ed.). Elsevier B.V.
- 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. *Veterinary Parasitology*, *171*(1–2), 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.03.020>