

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
PEDECIBA BIOLOGÍA
SUB-AREA BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR Y BIOQUÍMICA

TÍTULO:

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN OVINOS RESISTENTES A PARÁSITOS
GASTROINTESTINALES MEDIANTE RNA-Seq

Lic. en Bioquímica Pablo Peraza Dos Santos

Orientador:

DMV Gonzalo Rincón

Investigador Principal - Animal Genetics

Zoetis Company, USA

Co-Orientadores:

Dr. José Sotelo Silveira PhD

Investigador Principal – Departamento de Genómica

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable – IIBCE, Uruguay

Ing. Agr. Gabriel Ciappesoni PhD

Investigador Principal – director del Programa de Carne y Lana

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria – INIA, Uruguay

Montevideo – Uruguay

Tesis aprobada por el tribunal integrado por la Lic. Eileen Armstrong PhD, Dra. Cora Chalar PhD y Dr. Pablo Smircich PhD el día 9 de mayo de 2017. Autor: Lic. BQ Pablo Peraza Dos Santos. Director de tesis: Dr. Gonzalo Rincón, Departamento de Ciencia Animal, Universidad de California, Davis, USA | Zoetis, Pfizer, USA y Co-directores Ing. Agr. Gabriel Ciappesoni PhD, Director del Programa Nacional de Carne y Lana del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Uruguay; y el Dr. José Sotelo-Silveira PhD, Profesor Titular del Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Uruguay.

AGRADECIMIENTOS

- Al INIA por darme la oportunidad de estudiar y trabajar en lo que me gusta.
- A la Unidad de Biotecnología de INIA Las Brujas por el apoyo que siempre me dieron todos para la realización de mi trabajo (tanto los que permanecen al día de hoy como los que ya no). Son muchos.
- Al Ing. Agr. Marco Dalla Rizza y al Ing. Agr. Gabriel Ciappesoni por la confianza desde el día 0.
- A la Dra. Lucy Kelly por orientarme y darme un gran entusiasmo al comienzo del trabajo.
- Al SUL y Dr. Daniel “Peto” Castells por su buena onda, compartir su conocimiento y sus trabajos de investigación y permitirnos trabajar con las líneas de selección a PGI
- IIBCE y al Dr. José Sotelo-Silveira por la confianza que me dio para finalizar el trabajo de maestría y el apoyo en todo ese proceso.
- A la Ing. Agr. Elly Navajas por los buenos consejos.
- Al Dr. J.F. Medrano y Alma Islas-Trejo, excelentes profesionales y excelentes personas que me permitieron trabajar dentro de un laboratorio de primer nivel dentro de la Universidad de Davis.
- Al Dr. Gonzalo Rincón en primer lugar por aceptarme como estudiante para realizar la maestría siendo un investigador referente en el tema. Por tenerme extrema paciencia, pero siempre con una gran calidez. Me enseñó a tener siempre una visión crítica y positiva de todas las situaciones (sobre todo de las malas) que se me plantearon a lo largo del trabajo. Le agradezco su ayuda y consejos, y espero poder llevarlos adelante en mi carrera como investigador.
- A mis compañeros y amigos, que por suerte son muchos y que están ahí (barras: #focas, INIA y La Paz)
- A Ceci por estar conmigo en todo y alentarme a mejorar.
- Y a mi familia, no le agradezco, sino que le dedico mis logros desde siempre (mamá, papá y Ga).

TABLA DE CONTENIDOS

HOJA DE APROBACIÓN	1
AGRADECIMIENTOS.....	2
1 ÍNDICE DE TABLAS	5
2 ÍNDICE DE FIGURAS	6
3 ABREVIACIONES	8
4 RESUMEN	9
5 INTRODUCCIÓN.....	11
5.1 Situación actual en el Uruguay	11
5.2 Parásitos Gastrointestinales en ovinos	11
5.3 Géneros y especies de nematodos parásitos en ovinos, relevantes en el Uruguay	13
5.4 Descripción y localización de los parásitos gastrointestinales en rumiantes.....	15
5.4.1 En el Abomaso	15
5.4.2 En el intestino delgado	15
5.5 Genética del nematodo.....	16
5.6 Métodos del Control de Parásitos Gastrointestinales	16
5.6.1 Antihelmínticos	17
5.6.2 Manejo de Ovinos.....	18
5.6.3 Selección de Ovinos por su Resistencia a Parásitos	18
5.7 Antecedentes de estudios moleculares sobre la resistencia a parásitos gastrointestinales en ovinos	19
5.8 Estudios de expresión génica en ovinos mediante Next Generation Sequencing (NGS)	21
5.9 Estudios de expresión génica mediante RNA-Seq en ovinos resistentes a PGI.....	22
5.10 Asociación de regiones genómicas asociadas a resistencia a las PGI	23
6 HIPOTESIS	26
7 OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS	27
7.1 Objetivos Generales	27
7.2 Objetivos Específicos.....	27
8 MATERIALES & MÉTODOS.....	28
8.1 Población de origen para seleccionar animales	28
8.2 Selección de los animales para el estudio de expresión génica.....	29
8.3 Extracción de los tejidos seleccionados	30
8.4 Extracción de ARN de las muestras, generación de bibliotecas y secuenciación	31
8.5 Secuenciación del RNA	31
8.6 Herramientas Informáticas Utilizadas	31
8.7 Genoma de Referencia y anotación.....	32
8.8 Ampliación de la anotación por búsqueda de ortólogos en bases de datos	32
8.9 Análisis de los datos de mapeo en el genoma ovino generados por RNA-Seq	32

8.10	Extensión de la anotación en el genoma ovino por Large Gap Read Mapping (LGRM)	34
8.11	Cálculo de los valores de expresión por RNA-Seq	34
8.11.1	Diferencias entre los valores RPKM y TPM en los reportes de expresión génica	35
8.12	Análisis estadístico de la Expresión Diferencial por RNA-Seq	35
8.12.1	El modelo estadístico utilizado.....	35
8.13	Análisis de Componentes Principales (Principal Component Analysis - PCA).....	35
8.14	Volcano Plot	36
8.15	Diagrama de Cajas o BoxPlot	36
8.16	Búsqueda de funcionalidad de los genes obtenidos mediante la expresión diferencial	37
8.17	Descubrimiento de variantes de secuencia SNP Basic Variant Detection (BVD)	38
9	RESULTADOS	39
9.1	Selección de los Animales	39
9.2	Extracción del RNA.....	39
9.3	Control de Calidad de las Secuencias Obtenidas	40
9.4	Mapeo de las Secuencias sobre el genoma ovino	43
9.5	Optimización de los resultados de mapeo en el genoma ovino.....	44
9.6	Análisis de RNA-Seq	48
9.6.1	Coeficientes de correlación entre muestras.....	48
9.6.2	Diagrama de Cajas o Box Plot.....	49
9.6.3	Análisis de Componentes Principales (PCA - Principal Component Analysis)	49
9.6.4	Diagramas de Volcano Plot	51
9.7	Estudios de Expresión diferencial entre las muestras Resistentes y Susceptibles.....	52
9.7.1	Genes obtenidos por expresión diferencial	52
9.8	Análisis de las listas de genes de expresión diferencial obtenidas	52
9.8.1	Análisis de los genes de expresión diferencial utilizando todos los tejidos resistentes y susceptibles (20 tejidos en total) y su anotación funcional	53
9.8.2	Análisis de los genes de expresión diferencial para abomaso y su anotación funcional.....	56
9.8.3	Análisis de los genes de expresión diferencial para duodeno y su anotación funcional	57
9.8.4	Análisis de los genes de expresión diferencial para yeyuno y su anotación funcional	58
9.8.5	Análisis de los genes de expresión diferencial para íleon y su anotación funcional.....	59
9.8.6	Análisis de los genes de expresión diferencial para ganglio y su anotación funcional.....	60
9.9	Búsqueda de variantes SNP (Single Nucleotide Polymorphism) en regiones codificantes utilizando los datos de secuenciación del RNA-Seq	61
10	DISCUSIÓN.....	64
10.1	Análisis funcional de los genes con expresión diferencial	67
10.2	Análisis funcional para los listados de genes de expresión diferencial	71
10.3	Potencial desarrollo en la generación de un panel de baja densidad de SNP a partir de marcadores seleccionados en poblaciones susceptibles y resistentes a PGI para una futura validación de los resultados.....	76
11	CONCLUSIONES	78
12	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFIAS	79

1 ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Sitios blanco de acción de los diferentes antihelmínticos mayormente utilizados (Lara, 2003). .	17
Tabla 2: Datos de HPG de los ovinos extremos para seleccionar. Para los 4 animales seleccionados se agrega también el dato del conteo directo de parásitos adultos en abomaso.	39
Tabla 3: Resumen de las extracciones de ARN de las muestras con sus valores de RIN.....	40
Tabla 4: Parámetros del Control de Calidad de las Secuencias	42
Tabla 5: Estudio de RNA-Seq realizado sobre el genoma ovino (Sheep Genome v3.1 versión 84, mayo 2016).....	43
Tabla 6: Porcentaje de mapeo mediante importación de lecturas en formato individual (single reads).	44
Tabla 7: Resultados de la extensión de la anotación en el genoma ovino por LGRM (Large Gap Read Mapping)	45
Tabla 8: Resultados de la extensión de la anotación en el genoma ovino por LGRM (Large Gap Read Mapping)	46
Tabla 9: Resultados de la cantidad de secuencias mapeadas, y los porcentajes de mapeo luego de la utilización del LGRM.....	47
Tabla 10: Abreviaciones de las secuencias de los tejidos a lo largo de los análisis	48
Tabla 11: Coeficientes de Correlación entre réplicas biológicas.....	48
Tabla 12: Número de genes DE en cada tejido determinados mediante la utilización de los parámetros p-valor, FDR y Fold Change.....	52
Tabla 13: Listado de los genes DE más extremos en el total de tejidos resistentes vs susceptibles con mayor nivel de significancia.....	53
Tabla 14: Principales vías metabólicas detectadas mediante la utilización de los genes regulados negativamente en los animales resistentes cuando se trabaja con todas las muestras resistentes y todas las muestras susceptibles. Los genes de las listas presentaban p-valor < 0.01 y FC > 2	54
Tabla 15: Principales vías metabólicas detectadas mediante la utilización de los genes regulados positivamente en los animales resistentes cuando se trabaja con todas las muestras resistentes y todas las muestras susceptibles. Los genes de las listas presentaban p-valor < 0.01 y FC > 2	54
Tabla 16: Vías metabólicas destacadas en el estudio global de resistentes y susceptibles (IPA - QIAGEN).	55
Tabla 17: Genes reguladores destacados en el estudio global de principales vías encontradas entre animales resistentes y susceptibles (IPA-QIAGEN).	55
Tabla 18: Enfermedades y desórdenes asociados en el estudio global de resistentes y susceptibles (IPA – QIAGEN).	55
Tabla 19: Listado de los genes DE en abomaso con mayor nivel de significancia para cada condición.	56
Tabla 20: Principales vías metabólicas detectadas mediante la utilización de los genes regulados negativamente para la condición resistente en Abomaso. Los genes de las listas presentaban p-valor < 0.01 y FC > 2	57
Tabla 21: Listado de los genes DE en duodeno con mayor nivel de significancia para cada condición	57

Tabla 22: Principales vías metabólicas detectadas mediante la utilización de los genes regulados positivamente en los animales susceptibles para Duodeno. Los genes de las listas presentaban p-valor < 0.01 y FC > 2	58
Tabla 23: Listado de los genes DE en yeyuno con mayor nivel de significancia para cada condición.	58
Tabla 24: Principales vías metabólicas detectadas mediante la utilización de los genes regulados negativamente en los animales resistentes para Yeyuno. Los genes de las listas presentaban p-valor < 0.01 y FC > 2	59
Tabla 25: Listado de los genes DE en Íleon con mayor nivel de significancia para cada condición.	59
Tabla 26: Listado de los genes DE en Ganglio con mayor nivel de significancia para cada condición.	60
Tabla 27: Principales vías metabólicas detectadas mediante la utilización de los genes regulados negativamente en los animales resistentes para Ganglio. Los genes de las listas presentaban p-valor < 0.01 y FC > 2	61
Tabla 28: Variantes de secuencia detectadas en el genoma de ovinos mediante la utilización de las secuencias de RNA-Seq. p-valor < 0.01 y un MAF > 0.01 (>1%)	61
Tabla 29: Genes a los que pertenecen los SNP de mayor significancia detectados entre las secuencias de RNA-Seq	63
Tabla 30: Genes pertenecientes a la vía PPAR expresados en los animales susceptibles. En azul los genes que tienen un perfil de expresión similar entre los diferentes tejidos.	74

2 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida del parásito <i>Haemonchus contortus</i> (Lapage, 1982b).	12
Figura 2: Distribución de especies de parásitos en el Uruguay (Nari et al., 1977).	14
Figura 3: Distribución (en %) de las diferentes especies de nematodos que parasitan al ovino en las distintas épocas del año (Castells y Gimeno, 2011)	14
Figura 4: Gráfico donde se observa la evolución de las DEP-HPG de las líneas divergentes en función de los años. En verde la línea resistente y en rojo la línea susceptible. FEC = Faecal Egg Count = HPG (Castells, 2016).....	28
Figura 5: Distribución de la carga parasitaria en los ovinos a lo largo del año (Castells y Gimeno, 2011) observándose dos picos claros en el otoño y en primavera.	29
Figura 6: Sitios donde se tomaron muestras del tracto gastrointestinal (Castells et al., 2002).	30
Figura 7: Imagen del mapeo de las lecturas de secuencias sobre la región del gen (en azul) sobre los diferentes exones de un transcrito (en verde).	33
Figura 8: Volcano Plot donde se grafica el $-\log_2$ del Fold Change en función del $-\log_{10}$ p-valor.....	36
Figura 9: Diagrama de Cajas donde se muestra un experimento de expresión sin normalizar (Diagrama A) y otro donde las muestras ya fueron normalizadas (Diagrama B).	37
Figura 10 Diagramas de cajas de los valores medios de expresión de cada muestra y la mediana de la frecuencia en general con sus dispersiones (rojo = Resistentes, verde= susceptibles). En el cuadro A se	

observan la dispersión de los valores originales y en el cuadro B la dispersión de los valores posteriores a la normalización.	49
Figura 11: Análisis de Componentes Principales en dos dimensiones para todas las muestras. Se ve en rojo las muestras de la línea susceptible y en azul las muestras de la línea resistente.	49
Figura 12: Análisis de Componentes Principales en tres dimensiones (3D) para todas las muestras. Se ve en rojo las muestras de la línea susceptible y en azul las muestras de la línea resistente.	50
Figura 13: Análisis de Componentes principales para las muestras de: A: Abomaso, B: Duodeno, C: Yeyuno, D: Íleon, E: Ganglio. Se ven en rojo las muestras de la línea susceptible (45 y 119) y en azul las muestras de la línea resistente (84 y 94).	50
Figura 14: Volcano Plot para el análisis de todos los tejidos. Se recuadra en color rojo los puntos seleccionados que se encuentran dentro de los parámetros; $p\text{-valor} < 0.01$ ($-\log_{10} p\text{-valor} > 2$) y $FC > 2 $ que para el caso de los animales susceptibles $\log_2 FC > 2$ y para el caso de los animales resistentes $\log_2 FC < -2$. A: Abomaso; B: Duodeno; C: Yeyuno; D: Íleon; E: Ganglio F: Todos los tejidos resistentes vs susceptibles.	51
Figura 15: Visualización del estudio de asociación entre los SNP con su p-valor obtenido mediante el mapeo de las secuencias, insertado en la anotación del genoma del ovino. En esta imagen se observa como algunas variantes se visualizan con un p-valor alto para el gen SROOM2.	62
Figura 16: Poder de detección del valor Fold Change en 1.4 en relación al número de réplicas biológicas utilizadas.	64
Figura 17: Mecanismos propuestos para la resistencia a la infestación a parásitos (Benavides et al., 2016) Las flechas indican el flujo de interacción entre las vías y las proteínas. Se marcan los genes que fueron reportados en el trabajo.	71
Figura 19: Ruta metabólica de señalización de PPAR (Peroxisomal Proliferator Activated Receptor) donde se encuentran marcados con una estrella roja los genes que fueron detectados en nuestro trabajo determinados por expresión diferencial para el análisis del tejido del Duodeno (KEGG Pathways - Kaneisha & Goto, 2000).	75

3 ABREVIACIONES

ATP2B1: plasma membrane calcium-transporting ATPase 1

CIEDAG: Centro de Investigación y Experimentación Dr. Alejandro Gallinal

DE: Diferencialmente Expresados

DRB1: major histocompatibility complex (MHC) class II DR b1

DYA: MHC class II antigen DY/

ADN: Ácido Desoxirribonucleico :Deoxyribonucleic acid

EPD: Expected Progeny Difference (Diferencia esperada en la progenie)

FC: Fold Change

FDR: False Discovery Rate

FEC: Faecal Egg Count

GALNT: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase

HPG: Huevos por Gramo

IIBCE: Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

INAC: Instituto Nacional de Carnes

INIA: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

INSDC: International Nucleotide Sequence Database Collaboration

IgE: inmunoglobulina E

IFNg: interferon gamma

LRP8: low-density lipoprotein receptor-related protein 8 – apolipoprotein E receptor

MAF: Minor Allele Frequency

mTOR: Mammalian target of rapamycin

MUC: mucina

NGS: Next Generation Sequencing

OAR: Ovis Aries Chromosome

PCA: Principal Component Analysis

PDGFRA: platelet-derived growth factor receptor alpha

PCR: Polymerase Chain Reaction

PGI: Parásitos Gastrointestinales

PPAR: Peroxisome Proliferator Activated Receptors

QTL: Quantitative Trait Locus

RIN: RNA Integrity Number

Reads: Lecturas: pequeños fragmentos de secuenciación del ARN obtenidas por secuenciación masiva

R y S: Resistente y Susceptible

RNA: ARN: Ribonucleic Nucleotide Acid

RNA Seq: RNA sequencing

RPKM: Reads Per Kilobase of transcript per Million mapped reads

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

SUL: Secretariado Uruguayo de la Lana

TPM: Transcripts Per Kilobase Million

4 RESUMEN

Una de las principales limitantes sanitario-económicas de la producción ovina, tanto a nivel nacional como mundial, son las parasitosis gastrointestinales (PGI). El tratamiento de estas infecciones con drogas antihelmínticas se ha visto amenazado por el desarrollo de la resistencia parasitaria a las mismas. Por este motivo presentamos, como método de control alternativo, a la selección de ovinos resistentes a la parasitosis en los esquemas de selección animal. El estudio de los mecanismos inmunitarios, de defensa y respuesta implicados en la resistencia de rumiantes a las infecciones parasitarias ha planteado la posibilidad de caracterizar ciertos marcadores genéticos, de resistencia o susceptibilidad, que en el futuro podrían ser incorporados a los esquemas de selección ovina para la identificación de animales resistentes a estas infecciones.

La presente tesis de maestría tiene como objetivo principal, determinar la expresión génica diferencial en ovinos con fenotipos resistentes y susceptibles pertenecientes a líneas divergentes a PGI, con la finalidad de identificar conjuntos de genes asociados a la respuesta de infección y así obtener adicionalmente información sobre marcadores genéticos, vías metabólicas y/o regiones genómicas.

Con este propósito, se evaluó la expresión génica diferencial mediante la herramienta RNA-Seq. Se extrajo parte de los tejidos de duodeno, yeyuno, íleon, abomaso y sus nódulos linfáticos para luego proceder a realizar una extracción de ARN de cada tejido y realizar su secuenciación masiva.

Los resultados de los análisis de las secuencias del transcriptoma para cada tejido, evidenciaron un perfil diferencial de expresión entre las líneas resistente y susceptible. Para los tejidos de abomaso, duodeno, yeyuno y ganglio fue posible reportar un listado de genes diferencialmente expresados (DE) para ambas condiciones. Para estos tejidos, los genes pertenecientes a los animales de la línea genéticamente susceptible a PGI se sobreexpresan. Entre estos encontramos genes del metabolismo lipídico, como distintos tipos de apolipoproteínas APO, DGAT2 y ASA2 y genes vinculados a la secreción de mucosas y a cambios en las características de esta, como los genes MUC3, LGAL, ALPI que fueron detectados tanto en yeyuno, duodeno y abomaso en sus respectivos listados de expresión diferencial. También otros genes interesantes detectados en los animales susceptibles fueron genes del complejo mayor de histocompatibilidad HLA y MICA y un receptor de interleuquina 22 en abomaso y duodeno respectivamente. También fue posible identificar mediante genómica funcional algunas vías metabólicas detectadas y profundizar en dos de ellas; la vía de las PPAR y la vía mTOR, ambas relacionadas al establecimiento de la infección parasitaria.

Nos pareció interesante observar en los análisis de expresión diferencial, una clara sobreexpresión génica para la condición de susceptibilidad. Sin embargo, aunque para la condición de resistencia ésta no fuese tan marcada, los genes diferencialmente expresados encontrados se relacionan con el fenotipo de resistencia a PGI. Entre los genes reportados para la condición resistente en nuestro trabajo, describimos al gen intelectina 1 (ITLN1) producido en las mucosas del abomaso, de gran interés biológico ya que ha sido reportado como un agente que altera las propiedades de la mucosa secretada impidiendo la instalación de la infección parasitaria. Suponemos que la dificultad en observar una respuesta en la línea

resistente, con la misma magnitud que la observada en los tejidos susceptibles, podría deberse a una falta del agente infeccioso o de un nivel de infestación insuficiente para desencadenar una respuesta significativa al momento de la toma de muestras de los tejidos. Para ampliar el conocimiento de la respuesta de los animales resistentes creemos que sería de gran importancia continuar con esta línea de investigación, a lo largo de todo el desarrollo de la infestación parasitaria y en nuevas condiciones de infestación.

5 INTRODUCCIÓN

5.1 Situación actual en el Uruguay

Actualmente en el Uruguay existe un stock aproximado de 6.5 millones de cabezas ovinas (Anuario INAC, 2015). La producción ovina (carne, lana y cuero) es el cuarto sector de exportación del Uruguay, convirtiéndose en un rubro de alta importancia económica y social para el país (Montossi *et al.*, 2005). Para los animales criados por medio de pastoreo, la parasitosis gastrointestinal (PGI) es una enfermedad de gran importancia para la producción, tanto a nivel nacional (Castells *et al.*, 1991) como mundial (Bishop *et al.*, 1996; Sutherland & Scott, 2009) debido a que es un problema sanitario de gran impacto económico, que causa pérdidas de gran importancia en la producción agropecuaria. En concreto, el daño a los órganos internos de un animal parasitado o la simple competencia entre el hospedador y el parásito por los nutrientes en la sangre o en el intestino del hospedador, disminuirán su capacidad de desarrollarse, reproducirse y muchas veces de sobrevivir. Esto provoca daños económicos a los productores en forma de pérdidas o aumentos menores de peso, menor producción de leche, fertilidad reducida, o incluso muertes (Taylor *et al.*, 2007). Esta problemática persiste hasta el día de hoy a pesar de los avances en investigación que existen sobre el tema.

5.2 Parásitos Gastrointestinales en ovinos

Las parasitosis gastrointestinales (PGI) son causadas por nematodos pertenecientes a los órdenes *Strongyloidea* (Familias *Strongylidae* y *Trichostrongylidae*) y *Trichinelloidea* (Familia *Trichuridae*), cuyos ejemplares parasitan el tracto gastrointestinal (abomaso, intestino delgado e intestino grueso) de los ovinos y otros rumiantes. Los parásitos (nematodos o gusanos redondos), son helmintos de forma cilíndrica, con los extremos más finos y afilados, cuya longitud al estadio adulto puede alcanzar desde un milímetro (1 mm) a más de veinticinco centímetros (25 cm). La infección con parásitos suele recibir el nombre médico de parasitosis.

El ciclo biológico de estos nematodos se divide en una fase no parasitaria (desarrollada en el suelo y las pasturas), y en una fase parasitaria (desarrollada en un único huésped). Aunque este ciclo biológico tiene variaciones dependiendo del género parasitario, presenta 5 etapas larvianas previas al estado adulto (Lapage, 1982a).

Los nematodos adultos machos y hembras habitan en la luz del tracto gastrointestinal del huésped, donde se reproducen sexualmente. Luego del apareamiento, las hembras ponen huevos morulados que son expulsados al exterior con la materia fecal del huésped y depositados en las pasturas, iniciándose así la fase no parasitaria del ciclo. Dentro del huevo, se desarrolla un embrión en el que ocurre la organogénesis, dando lugar a la formación de la larva de primer estadio (L1). Esta L1 sale del huevo y en el exterior se alimenta de bacterias, crece y sufre un proceso de ecdisis o muda, transformándose en larva de segundo estadio (L2). La larva L2 también se alimenta de bacterias y sufre una muda, desarrollándose la larva de tercer estadio (L3). Esta larva L3, a diferencia de las larvas anteriores, no se libera de la

epidermis previa, sino que la mantiene como una envoltura protectora que no le permite alimentarse del exterior, por lo que no se desarrollará a menos que sea ingerida por un nuevo huésped. Sin embargo, es una larva activa ya que es capaz de subir a tallos y hojas, favoreciendo su ingestión por el ovino. La larva L3 es la última de la fase de vida libre del nematodo y es la única que presenta capacidad infectiva, es decir, al ingresar al huésped por vía oral (ingestión de pasturas), es capaz de continuar el ciclo biológico, iniciando la fase parasitaria. Esta fase comienza con la pérdida de la envoltura de la L3, que ocurre en el tracto gastrointestinal inmediatamente anterior al que será el nicho definitivo del nematodo adulto. Una vez liberada, L3 establece un contacto estrecho con la mucosa del tejido gastrointestinal, donde se alimenta, crece y muda a larva de cuarto (L4) y quinto (L5) estadio. La larva L5, también considerada adulto joven, se desarrolla directamente a parásito adulto macho o hembra, el cual habita en la luz del tracto digestivo del huésped (Lapage, 1982b). En la figura 1 se resume los diferentes estadios larvarios dentro y fuera del sistema del ovino.

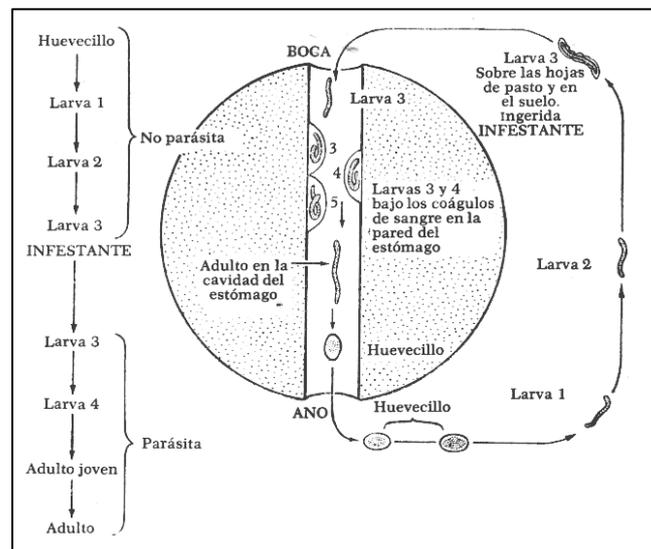


Figura 1: Ciclo de vida del parásito *Haemonchus contortus* (Lapage, 1982b).

Los parásitos gastrointestinales, han evolucionado a la par de los rumiantes a lo largo de la historia. El parasitismo, es una relación de tipo simbiótica que relaciona al parásito con el hospedador obteniendo algún beneficio el primero, intentando no generar daños mayores al hospedador prolongando la sobrevida y reproducción del parásito (Lapage, 1982a).

El cuerpo de estos parásitos está cubierto de una cutícula elástica pero bastante dura, que puede llevar espículas u otras estructuras externas. No muestran segmentación, poseen un sistema digestivo completo, así como órganos reproductores y sistemas nerviosos, pero carecen de un sistema circulatorio y de órganos excretores. La boca se sitúa en el extremo anterior y poseen estructuras especializadas (ventosas, garfios, placas cortantes, etc.) para adherirse al hospedador y alimentarse de él. En las hembras, el útero termina en una apertura vaginal denominada vulva. Los machos poseen un par de órganos quitinosos, las espículas copulatorias que les sirven para prenderse a la hembra durante la copulación. La morfología de los órganos reproductivos es muy específica para cada especie y se usa para su clasificación sistemática.

Dentro de los helmintos, los nematodos son el grupo con el mayor número de especies que parasitan el ganado en todo el mundo. Entre ellas hay especies muy dañinas como los parásitos pulmonares (p.ej. *Dictyocaulus viviparus*) y los intestinales (p.ej. *Haemonchus spp.*, *Ostertagia spp.*, *Trichostrongilus spp.*).

Los mismos parasitan sobre todo órganos internos (el hígado, el intestino, el estómago, los pulmones, etc.) en los que encuentran los nutrientes necesarios para sobrevivir y reproducirse. Por ello forman parte del grupo de los endoparásitos (o parásitos internos) en contraposición a los que parasitan el exterior del cuerpo que se denominan ectoparásitos (moscas, garrapatas, piojos, etc.).

Tras penetrar en el hospedador, la mayoría de los parásitos se instalan en órganos predilectos según cada especie, que es donde completan sus etapas de desarrollo y se reproducen (Sutherland & Scott, 2009).

La incidencia de los parásitos en el ganado, y su impacto económico depende mucho de la región geográfica y de su ecosistema, de la temporada del año, de las condiciones climáticas, etc. Los tipos de manejo del ganado (pastoreo natural o intensivo, estabulado, etc.) también influyen en la incidencia de los parásitos y en los niveles de infección (Sutherland & Scott, 2009).

En general, los parásitos tienden a ser un problema mayor en regiones con climas húmedos. Pero las condiciones de salud y de alimentación del hospedador también juegan un papel importante en la gravedad de las infecciones y en el daño causado: cuanto más debilitado está un animal (por enfermedades, por nutrición insuficiente, por el frío o el calor excesivos, etc.), tanto peor puede combatir las infecciones de gusanos y otros parásitos con sus defensas naturales.

5.3 Géneros y especies de nematodos parásitos en ovinos, relevantes en el Uruguay

La República Oriental del Uruguay tiene una superficie (176.215 Km²). Uruguay se encuentra en la zona templada del continente sudamericano (entre 30° y 35° latitud S), lo que, sumado a la inexistencia de zonas montañosas, determina que se espere una distribución similar de géneros y especies de nematodos gastrointestinales en todo el territorio. En climas templados como el de nuestro país, en el que coexisten géneros parasitarios típicos de climas fríos como *Nematodirus spp.*, con nematodos prevalentes en climas tropicales como *Cooperia spp.*, hacen que la variabilidad climática estacional afecte la dinámica poblacional de algunos géneros parasitarios, disminuyendo, en ciertas épocas del año, la distribución de larvas entre las pasturas. Esto determina que la presentación de nematodos gastrointestinales sea altamente estacional, es decir, que la importancia relativa de las diferentes especies dependa de la época del año. De esta manera, se observa que *H. contortus* es el parásito más importante en todas las estaciones, excepto en invierno, estación en la cual *T. colubriformis*, particularmente, y en menor medida *T. axei* y *O. circumcincta* asumen importancia (Nari *et al.*, 1977).

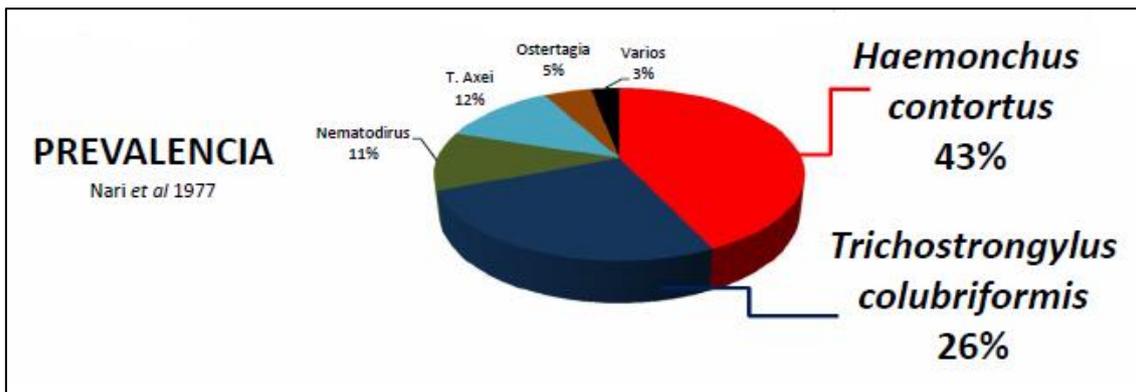


Figura 2: Distribución de especies de parásitos en el Uruguay (Nari et al., 1977).

Las principales especies de nematodos gastrointestinales que afectan a ovinos, identificadas en el Uruguay son: *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia (Ostertagia) circumcincta* y *Trichostrongylus axei*, en el abomaso; *Trichostrongylus colubriformis*, *Nematodirus fillicolis*, *Nematodirus spathiger*, *Strongyloides papillosus* y *Cooperia punctata*, en el intestino delgado y *Oesophagostomum venulosum* y *Trichuris ovis*, en el intestino grueso (Castro & Trenchi, 1954). En la figura 2 se puede observar un relevamiento realizado por el Dr. Armando Nari en el año 1977 sobre la prevalencia de las distintas especies de parásitos en el Uruguay. Entre estas, las especies más prevalentes están dadas por *Haemonchus contortus* (43%), *Trichostrongylus colubriformis* (26%), *Trichostrongylus axei* (12%) y *Nematodirus spp.* (11%) (Nari et al., 1977). El factor del clima en el Uruguay, también juega un papel muy importante en la prevalencia de los diferentes parásitos que afectan a la ganadería. En la figura 3, el Dr. Castells en el año 2011 realizó un relevamiento de la prevalencia de cada parásito en el Uruguay para determinar existe cierta relación con la estacionalidad climática y la especie de parásito.

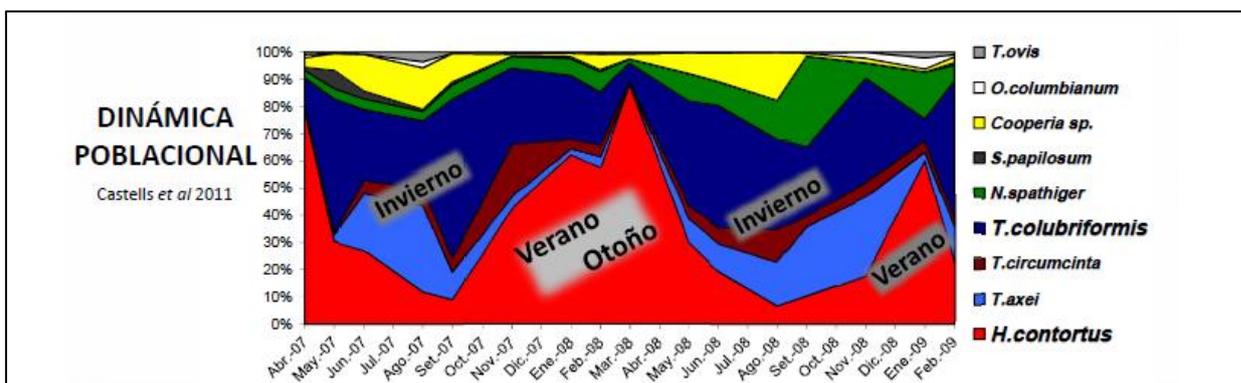


Figura 3: Distribución (en %) de las diferentes especies de nematodos que parasitan al ovino en las distintas épocas del año (Castells y Gimeno, 2011)

Como comentamos, el clima y la ubicación geográfica, como también el manejo del ganado, el tipo de rebaño y la presencia o ausencia de otro tipo de ganado en el predio son factores que impactan sobre el balance de las especies de parásito presentes en el campo.

5.4 Descripción y localización de los parásitos gastrointestinales en rumiantes

5.4.1 En el Abomaso

5.4.1.1 *Haemonchus*

Especies mayoritarias: *H. contortus*, *H. placei*

Es el nematodo más común que parasita el abomaso y uno de los más prolíficos, pudiendo la hembra depositar unos 10.000 huevos por día. *H. contortus* es principalmente un parásito de ovinos y caprino, pero puede ser encontrado también en bovinos y algunos cérvidos. Los adultos de estas 2 especies pueden llegar a medir de 2 a 3 cm y son fácilmente visibles en la superficie de la mucosa en los exámenes post mortem de los animales. *Haemonchus* spp. generalmente prefiere zonas cálidas y condiciones húmedas por lo que en zonas tropicales y subtropicales es un gran problema y en sus etapas de vida libre el parásito tiene dificultades para pasar el invierno en climas más fríos.

5.4.1.2 *Ostertagia*

Especies mayoritarias: *O. ostertagi* (*O. lyrata*)

Es un parásito de bovinos, y se considera el más importante en las regiones templadas. Es importante también en climas subtropicales cuando hay abundantes lluvias. Se adapta bien a climas fríos y sobrevive razonablemente al invierno como larva en estadio L3 en pasturas, en el suelo o dentro del animal.

5.4.1.3 *Teladorsagia*

Especies mayoritarias: *T. circumcincta*, *T. ostertagia trifurcata*, *T. davtiani*.

Teladorsagia spp. esencialmente ocupa un nicho en ovinos y caprinos, mientras que *O. ostertagi* lo hace en bovinos, aunque ambos comportamientos son muy similares. Por un largo tiempo estos organismos se clasificaban dentro del género *Ostertagia* (*O. circumcincta*). Recientemente, mediante análisis genéticos se han encontrado variaciones entre las diferentes cepas de *T. circumcincta* incluyendo una comparación entre las cepas encontradas en ovinos y caprinos (Grillo *et al.*, 2007). Ambas, *Ostertagia* spp. y *Teladorsagia* spp. son a veces referidas como la lombriz marrón del estómago.

5.4.2 En el intestino delgado

5.4.2.1 *Trichostrongylus*

Especies mayoritarias: *T. columbriformis*, *T. vitrinus*, *T. longispicularis*, *T. rugatus*

Son parásitos relativamente pequeños, de menos de 1cm de largo. *T. longispicularis* es un parásito principalmente de bovinos mientras que *T. columbriformis*, *T. vitrinus* son parásitos importantes de ovinos y caprinos. En las regiones cálidas de las zonas más templadas como las regiones subtropicales, *Trichostrongylus* spp contribuyen en gran parte a las infecciones y suelen presentar una muy alta tasa de conteo de huevos de parásito en el animal.

5.4.2.2 *Nematodirus*

Especies Mayoritarias: *N. battus*, *N. filicollis*, *N. spathiger*, *N. helvetianus*

Nematodirus spp. tiene una distribución muy cosmopolita. Su biología es atípica para un *trichostrongiloide*. La larva desarrolla el estadio L3 dentro del huevo, por lo tanto, éste aumenta el tamaño del huevo, retardando su desarrollo. Así, entra en un período de crecimiento lento, necesitando de mayor tiempo para desencadenar la eclosión. Esto lleva a que exista una sola generación de parásitos cada año. Las infecciones pasan de los corderos de un año a los corderos que nacen al año siguiente.

5.4.2.3 *Cooperia*

Especies mayoritarias: *C. oncophora*, *C. punctata*, *C. pectinata*, *C. surnabada*, *C. curticei*. Estas especies son generalmente consideradas de patogenicidad leve, aunque *C. punctata* y *C. pectinata* son más dañinas y llevan a un comportamiento más invasivo de las larvas (Taylor *et al.* 2007).

5.5 Genética del nematodo

La finalización del proyecto genoma para *C. elegans* reveló que su tamaño era de aproximadamente 100Mb, representando aproximadamente 20.000 genes, donde al menos la mitad son únicos para nematodos (Blaxter, 2003). Se puede comparar este dato contra los 15.000 genes descritos en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* o con los 30.000 a 40.000 genes descritos en mamíferos para evidenciar esa complejidad. El número de cromosomas en los nematodos muestra una variación considerable desde 1 a 25 (Blaxter, 2000). Algunos estudios muestran un alto nivel de diversidad genética entre diversas poblaciones de parásitos (Anderson *et al.*, 1998; Grillo *et al.*, 2007; Prichard, 2001). En los últimos años, con el advenimiento de nuevas tecnologías, han comenzado los avances en los borradores de los genomas tanto de *H. contortus* (Laing *et al.*, 2013) como de *T. columbriformis* (Cantacessi *et al.*, 2010) ya que éstos, son los parásitos de mayor relevancia, tanto en las pérdidas de producción como económicas relativas a la cría de pequeños rumiantes.

5.6 Métodos del Control de Parásitos Gastrointestinales

Existen distintos métodos para el tratamiento y control de las parasitosis gastrointestinales. Estos pueden ser: la utilización de productos químicos, el manejo del pastoreo, el trabajo con el desarrollo de la inmunidad del ovino mediante su nutrición o por la utilización de vacunas o mediante la selección de los más resistentes.

5.6.1 Antihelmínticos

Actualmente, existen distintas maneras para controlar a las PGI en rumiantes, aunque el método más utilizado por excelencia, y el de mejores y más rápidos resultados es la utilización de drogas antihelmínticas. Estas drogas tienen como finalidad actuar sobre sitios blanco en parásitos, pero sin afectar de manera significativa a las características del huésped (ver tabla 1). Estas drogas remueven la carga parasitaria o previenen el establecimiento de las larvas ingeridas en estado infectivo. Los antihelmínticos deben ser tóxicos selectivamente para los parásitos mas no para los huéspedes, lo que puede lograrse por dos vías: por una parte, inhibiendo procesos metabólicos que sean vitales para los parásitos, pero no para los huéspedes y, por otra parte, que las propiedades farmacocinéticas de los antihelmínticos logren exponer a los parásitos a concentraciones más altas que las células del huésped (Lara, 2003).

Los antihelmínticos más comúnmente usados para el control de las PGI pertenecen a 3 grandes familias, los imidazoles (levamisol), los benzimidazoles (albendazol, oxiabendazol, fenbendazol triclabendazol), y las lactonas macrocíclicas (avermectina, ivermectina, doramectina, selamectina, moxidectina, milbemicina), todas ellas caracterizadas por tener diferentes ciclos de acción. De estas familias, la más conocida es la de los benzimidazoles, mientras que para las otras dos familias se sigue profundizando en el mecanismo de acción y respuesta. En la tabla 1 se realiza un resumen de los distintos antihelmínticos que se utilizan y sus blancos de actividad. El accionar más conocido, el de los benzimidazoles, inhibe la polimerización de la tubulina, creyéndose que la despolimerización de los microtúbulos ocasiona la inhibición del transporte celular y el metabolismo energético, ambos con un papel esencial de efectos letales sobre los parásitos al disminuirle progresivamente las reservas energéticas, inhibir la excreción de desechos y de factores protectores de las células.

Tabla 1: Sitios blanco de acción de los diferentes antihelmínticos mayormente utilizados (Lara, 2003).

Canales iónicos	Microtúbulos	Bioenergéticos	Desconocido
(Tetrahidropirimidinas) pirantel, morantel	Tiabendazol, Mebendazol, Albendazol, Netobimin)	Salicilanilidas (closantel)	Praziquantel
Levamisol		Sulfonamidas clorinadas (clorsulon)	Triclabendazol
Ivermectina, Moxidectina			

A pesar del gran impacto que generan las parasitosis, solo unas pocas familias de antihelmínticos de amplio espectro han sido descubiertas y comercializadas con éxito para el uso veterinario en los últimos 50 años (Sutherland & Scott, 2009). El poco éxito en el descubrimiento de nuevas drogas viene signado porque el mercado de los animales de pastoreo es mucho menor que el mercado de los animales de compañía o el de salud humana, lo que haría elevar demasiado los costos de producción para un bajo mercado. Otro factor potencial en la falta de desarrollo de nuevas drogas, es el éxito de la Ivermectina y sus compuestos asociados como antihelmíntico ya que hacen innecesaria la aparición de nuevas drogas.

Paradójicamente, este incremento en la utilización de Ivermectina, genera una sobre utilización de dosis, contaminando pasturas y desarrollando cierto nivel de resistencia de los parásitos a los químicos

utilizados y por consiguiente a la pérdida de la efectividad del antiparasitario. Esto lleva a que se reconsidere la postura de los posibles beneficios en el descubrimiento de nuevos antihelmínticos o de nuevos métodos de control de las PGI. Uno de los últimos antihelmínticos disponibles en el mercado es el ZOLVIX[®] (Monepantel) (Kaminsky *et al.*, 2008) el cual ya ha demostrado que existen parásitos con ciertos niveles de resistencia al antihelmíntico en el Uruguay (Mederos *et al.*, 2014) y Nueva Zelanda (Bartley, *et al.*, 2015).

5.6.2 Manejo de Ovinos

Esta opción, aunque laboriosa a nivel de campo, requiere de grandes superficies para realizar un correcto manejo de los ovinos. La idea general es movilizar a los animales entre distintas parcelas para no concentrar la eliminación de los huevos del parásito en superficies reducidas. De esta manera, se baja la densidad de huevos por unidad de superficie y se minimiza la ingesta de parásitos en estadio L3 por el ovino “diluyendo” la carga parasitaria en el campo.

5.6.3 Selección de Ovinos por su Resistencia a Parásitos

El término resistencia genética se ha utilizado, en relación a las PGI, para referirse a la capacidad de un animal para impedir el establecimiento y/o desarrollo de la infección parasitaria (Gruner, 1991).

La observación de que ciertas razas ovinas son más resistentes que otras a este tipo de parasitosis fue descrita por primera vez por los estudios de Stewart *et al.*, (1937). Posteriormente, experiencias realizadas por Warwick *et al.* (1949), demuestran la existencia de variación genética dentro de las razas. Desde ese momento, diversos trabajos describen una extensa variabilidad genética inter e intra razas en relación con las parasitosis gastrointestinales, habiéndose descrito para diversas razas ovinas como: Red Masai, Scottish Blackface, Florida Native, Dorset, Romney, Merino, Corriedale, Texel, Suffolk, entre otras (Barger, 1989; Good *et al.*, 2006).

En el Uruguay, el método que se utiliza de manera eficiente para disminuir el efecto de las PGI en los rodeos de ovinos, es el de realizar una selección de los ovinos resistentes a PGI. A nivel nacional, se realizan evaluaciones genéticas en algunos establecimientos agropecuarios para las razas de ovinos Merino Australiano y Corriedale para la característica de PGI. El método utilizado es el de conteo de huevos de parásito por gramo de materia fecal (HPG) estimando el valor genético de los animales mediante su Diferencia Esperada en la Progenie (DEP). El recuento de HPG resulta un indicador adecuado de resistencia ya que está correlacionado positivamente con la carga de nematodos adultos en el tracto gastrointestinal del ovino (McKenna, 1981).

El DEP se define como el desvío del promedio total, de la performance esperada en la progenie de un carnero respecto al promedio de todos los carneros para una característica específica (Coronel, 1999), en nuestro caso se trata del DEP de HPG. Estudios como los de Castells *et al.*, (2002) y Ciappesoni *et al.* (2010), han demostrado en base a los datos obtenidos que, mediante una selección de ovinos resistentes, es posible realizar un progreso genético en la mejora ovina.

Si bien la variación del recuento de HPG puede estar determinada por factores como edad, estadio reproductivo y nutrición del animal, también presenta un componente genético, estimándose su heredabilidad (h^2) en el orden de 0.2 a 0.4 (Gruner, 1991).

En base a esta información, se forma en el año 2000 dentro del Secretariado Uruguayo de la Lana (SUL) una población de animales resistentes y susceptibles genéticamente a PGI (Castells y Gimeno, 2011). Anualmente, el criterio único para la selección de los animales, tanto resistentes como susceptibles a PGI, es el valor de la DEP de HPG. Se aclara que el criterio único de selección es el HPG ya que no se tiene en consideración el resto de los valores de DEP para otras características.

5.7 Antecedentes de estudios moleculares sobre la resistencia a parásitos gastrointestinales en ovinos

Marcadores genéticos para la resistencia de los ovinos a los parásitos gastrointestinales han sido buscados por la industria ganadera como una forma de seleccionar individuos más resistentes y ayudar a los agricultores a reducir la transmisión del parásito mediante la identificación y remoción de los ovinos excretores de huevo en el rebaño. El número de trabajos focalizados en expresión génica viene siendo cada vez más debido al descenso del costo de las nuevas tecnologías y a gran cantidad de información que es obtenida a través de estos estudios (Benavides *et al.*, 2016). Anteriormente se realizaban estudios de asociación a la característica mediante distintas aproximaciones, como el estudio de regiones o QTL, estudios por asociación a microsatélites y los microarrays de expresión.

Por muchos años, la técnica mayormente utilizada fue la asociación asistida por marcadores, mediante la amplificación de microsatélites. Estas secuencias repetidas de entre 2 y 5 nucleótidos en el DNA, fueron utilizadas por varios grupos científicos para determinar asociaciones con esta y otras características.

Krawczyk y Slota, (2009) hacen una completa revisión sobre los estudios realizados hasta el momento sobre la resistencia a nematodos en ovinos, destacando los estudios en los que se hace un escaneo en los genes que codifican interleuquinas (IL-3, IL-4 e IL-5) buscando marcadores en la raza Corriedale e Ideal donde encuentra un microsatélite fiable CSRD2138. Otros trabajos realizados evidencian asociaciones a la resistencia a PGI en la raza Corriedale con el marcador MCM214 (Benavides *et al.* 2009, Beh *et al.* 2002) mediante estudios con microsatélites encuentra QTLs que muestran una asociación significativa con las PGI después de un primer y segundo reto al parásito *T. columbriformis* destacándose también la asociación de estos valores a otros varios microsatélites.

Los polimorfismos relacionados con el complejo de histocompatibilidad y los genes del interferón IFN- γ han sido los marcadores más frecuentemente reportados asociados con la infección. Recientemente, una nueva imagen está surgiendo de los estudios del genoma, mostrando que no sólo los mecanismos inmunes son determinantes importantes de la resistencia del huésped, sino que la producción de moco gastrointestinal y las vías de hemostasia también pueden desempeñar un papel (Benavides *et al.*, 2016).

También se han realizado diversos estudios de asociación con genes que controlan la respuesta inmune ovina como lo es el gen (MHC-DRB) localizado en el cromosoma 20 del ovino, con la resistencia a parásitos (Sommer, 2005).

El grupo de Keane *et al.*, (2007) trabajando con líneas ovinas resistentes y susceptibles a nematodos con la tecnología de Microarrays y Real Time-PCR, describe varios genes con expresión diferenciada entre ambas líneas como: AGT, CAT, Ovar-DQA1, Ovar-DQB1, Ovar-DRA y MYLK para líneas resistentes y los genes ANXA2, FTL, GIMAP4 y LGASL2 para las líneas susceptibles (Keane *et al.* 2007). Dicho autor estima que pueden existir más de 100 genes que estén interactuando en dicha característica y que la variación de estos locus, induce a una mayor o menor resistencia de la repuesta inmune frente a una infección y que los niveles de expresión de cada una de las proteínas del MHC podrían ser críticas a la hora de determinar el estatus de la resistencia. También se han realizado trabajos sobre el perfil de expresión de genes que confieren resistencia a nematodos gastrointestinales en ovinos (Nagaraj *et al.* 2009). Este autor integra la base de datos de 49 experimentos de expresión candidatos por RT-PCR, totalizando 102 genes de relevancia para esta característica. En este tipo de estudios se comenzó a estudiar la interacción de estos genes y su relevancia biológica, identificando cuales codifican proteínas de la matriz extracelular y que puedan ser útiles como biomarcadores para identificar la resistencia a parásitos en ovinos. Para entender las bases genéticas de la resistencia ovina a parásitos y comprender la naturaleza de la dinámica regulatoria de la respuesta inmune, el grupo de Nagaraj, (2009) ha descrito un sistema en red que puede interaccionar y ser información útil para la selección de biomarcadores potenciales. De esta manera, plantea capturar el dinamismo inherente a la respuesta inmune por estudio de todos los genes expresados que interrelacionan cubriendo la regulación de la transcripción asociada a la característica. Se encuentran 703 genes conectados a 1.090 interacciones, pero luego de minimizar las interacciones génicas existen 102 genes relevantes en la red como: GAPDH, RPL y genes de expresión diferencial en animales resistentes y susceptibles en tejidos del intestino (KCNJ15, DYRK3) los cuales interaccionan con genes extracelulares IL16 y NT5E y que son candidatos para desarrollar futuros marcadores (Nagaraj *et al.*, 2009).

El grupo de Kadarmideen *et al.*, (2006) usando la herramienta de genotipado por microarrays para estudios de transcriptómica sobre tejidos de glándula mamaria de animales desafiados con parásitos gastrointestinales detecta una expresión diferencial de genes incluyendo co-expresión asociados a la duración de la respuesta. Los resultados revelan la expresión diferencial de genes con importantes funciones en la respuesta inmunológica humoral y mediada por células. Debido a ello, se estudió la heredabilidad estimada por la expresión de estos fenotipos con tales marcadores ($h^2= 0,1$ a $0,5$) indicando su potencial en el uso de la selección asistida por expresión (Kadarmideen *et al.* 2006).

A partir de estas aproximaciones genéticas, se estaría dando un paso clave en identificar genéticamente los genes y/o marcadores relevantes y hereditarios entre varios grupos de genes de expresión diferencial. En ese sentido, se pueden identificar blancos específicos para intervenir en la cría, en la selección y en el mejoramiento genético animal.

Los genes con alto nivel de conectividad con otros genes en una red donde se co-expresan, actuarían como un eje central, esencial para determinar diferentes funciones biológicas (Weston, 2002). Sobre esta

base se ponderó el análisis de la co-expresión en red. La h^2 de la expresión de un gen, es un indicador para determinar si el perfil de expresión es el eje regulatorio o el gen candidato en individuos que pueden ser usados como selección asistida por expresión.

En los últimos años, los estudios de expresión relacionados a la resistencia y susceptibilidad a PGI mediante el uso de nuevas técnicas de secuenciación ha venido en aumento hasta la fecha.

5.8 Estudios de expresión génica en ovinos mediante *Next Generation Sequencing* (NGS)

Los estudios globales del transcriptoma por secuenciación masiva (RNA-Seq) se llevan a cabo desde el año 2004 y se aplican de manera cuantitativa obteniendo valores de expresión para cada gen desde el año 2008 (Mortazavi *et al.*, 2008). Con estas técnicas, uno puede caracterizar todas las especies de ARN que se encuentran en una muestra como el ARN mensajero (ARNm), de transferencia (ARNt), ribosomal (ARNr) y micro (miARN). Mediante esta técnica es posible, entre otras cosas, realizar una cuantificación de manera precisa sobre el número de transcritos mediante su mapeo sobre el genoma, el descubrimiento de nuevos eventos de iso formas de genes (*splicing*) y los polimorfismos de nucleótido simple (SNP) obtenidos de secuencias expresadas (Wickramasinghe *et al.*, 2014). La cuantificación del ARNm está directamente relacionada al nivel de expresión de los genes del animal en estudio.

Para caracteres difíciles y costosos de medir, como lo es la resistencia a distintas enfermedades, obtener marcadores moleculares o regiones genómicas asociados a dicha característica resultaría en una herramienta extremadamente útil para la identificación de estos animales a edades más tempranas y su utilización en los sistemas de selección. Con esta herramienta, el genotipado aumentaría significativamente la precisión de la selección (Beuzen *et al.*, 2000). El entendimiento del transcriptoma es esencial para la interpretación de los elementos funcionales del genoma dentro de los constituyentes de células y tejidos, y entender los fenotipos animales.

Los transcriptomas en ovinos han sido previamente estudiados utilizando la tecnología de los *microarrays* de expresión y recientemente mediante el uso de la tecnología de *Next Generation Sequencing* (NGS) donde se realiza la secuenciación completa del RNA. El gran aporte de la secuenciación del transcriptoma es que analiza el transcriptoma contribuyendo al entendimiento de la expresión y la regulación diferencial de tipos celulares similares provenientes de individuos con respuestas fisiológicas diferentes (ante iguales condiciones ambientales). La técnica de secuenciación de ARN es el primer método que permite un análisis cuantitativo con alta resolución del transcriptoma permitiendo lograr un entendimiento funcional de los genes que intervienen en la expresión de fenotipos.

La secuenciación de alto rendimiento ha aportado herramientas únicas para anotar y cuantificar el transcriptoma como el RNA-Seq. Esta técnica ofrece importantes ventajas sobre los *microarrays* o a tecnologías de secuenciación de cDNA ya que no está limitado a detectar transcritos que correspondan a los ensamblajes actuales del genoma. El RNA-Seq puede además revelar la ubicación precisa y la organización del transcripto, detectar y cuantificar las variaciones en las secuencias y así como detectar

los altos niveles dinámicos de expresión. Puede también, a su vez, cuantificar con mucha precisión genes con bajos niveles de expresión debido a que puede capturar pequeñas secuencias y reportarlas luego de la secuenciación masiva (Wang *et al.*, 2009, Wilhelm y Landry, 2009).

La tecnología RNA-Seq ha sido últimamente utilizada para medir la abundancia del transcripto, isoformas del corte y empalme de los exones (*splicing*) y la influencia alélica de la expresión génica en diferentes especies (Bainbridge *et al.*, 2006, Nagalakshmi *et al.*, 2008). Esto último es muy importante para la propuesta actual. Todas las tecnologías relacionadas a los Secuenciadores de la Nueva Generación (*Next Generation Sequencing o NGS*) tienen en común generar secuencias a gran escala a una fracción del costo que es requerido para la secuenciación tradicional. Estas características son la base de la revolución actual permitiendo las aplicaciones por aproximaciones en secuenciación a cuestiones biológicas que no han sido ni económicamente ni logísticamente tratados en la práctica en oportunidades anteriores. Sin embargo, la enorme cantidad de datos generados por secuenciación de tecnologías NGS crea un reto informático que requiere un establecimiento de la rutina de los métodos de análisis de datos. Utilizando herramientas informáticas o bioinformáticas, muchos tipos de variantes, incluyendo SNP sinónimos y no-sinónimos, inserciones / deleciones, codones stop prematuros e isoformas del *splicing* pueden ser detectadas de manera muy precisa. Estas herramientas permiten también la comparación de variantes génicas entre grandes cantidades de muestras permitiendo el análisis entre múltiples individuos (Shendure y Ji, 2008).

Ejemplos claros existen en que la genómica ha cambiado fundamentalmente la práctica de la cría animal, como por ejemplo lo han sido las evaluaciones genómicas de diferentes razas bovinas (Wiggans *et al.*, 2011). RNA-Seq es el primer método de secuenciación que permite un análisis cuantitativo del transcriptoma en la que podríamos, frente a la evidencia y trabajos ya formulados, cambiar la práctica de la cría de animales en función del entendimiento de la expresión y lograr la selección de características genéticas. Con esto lograríamos una mejor comprensión funcional de los genes que intervienen en determinadas características, así como un mejor conocimiento de las redes de regulación y las vías que subyacen en la expresión de fenotipos extremos.

5.9 Estudios de expresión génica mediante RNA-Seq en ovinos resistentes a PGI

En los últimos años, existen algunos estudios pioneros tanto en el área de la transcriptómica de rumiantes como en la generación de nueva información sobre la estructura del genoma ovino. Para el año 2010, el genoma del ovino se encontraba en su versión 1.0 por lo que era aún bastante desafiante trabajar con él. El primero de los artículos y el que abrió un gran camino para generar información de referencia para el genoma ovino, fue el de Jäger *et al.*, (2011) en el cual trabajó en un estudio de diferencias en el retraso en la regeneración ósea en ovinos. En su investigación se detalla que previo a la realización de su estudio, solamente existían 1556 secuencias de genes (completas y parciales) en los servidores de acceso público. Luego de sus estudios mediante secuenciación, lograron identificar transcriptos de 13.987 genes incluyendo 12.431 nuevos genes de los que no existía información disponible hasta el momento. Lo que

en un inicio fue un trabajo de búsqueda de perfiles de expresión génica para observar los mecanismos del retraso en la regeneración ósea en ovinos, terminó resultando al mismo tiempo, en la generación de una gran cantidad de información sobre el genoma del ovino.

Rápidamente comenzaron los trabajos de expresión mediante el uso de la herramienta de secuenciación masiva sobre distintos tejidos, buscando nuevas interpretaciones para definir las causantes de la resistencia a las PGI. Li y Gasbarre, (2009) realizaron una caracterización del transcriptoma de abomaso en animales desafiados a PGI (en este caso *Cooperia* spp). Mediante su estudio establece que la carga parasitaria que soporta un animal está predominantemente influenciada por el tipo de respuesta del huésped y que la capacidad de disparar una rápida y eficaz respuesta inmune se mantiene solo después de una segunda infección, determinando más evidencias de que existen cambios genéticos que determinan un papel importante en la regulación de la resistencia del huésped. De sus resultados se extrae que muchos de los genes diferencialmente expresados (DE) en su estudio, forman parte del metabolismo de lípidos, ya que esto puede ser necesario para el desarrollo de la resistencia del huésped. El metabolismo de los lípidos está regulado de forma significativa en el intestino delgado del ovino. En respuesta a la infección parasitaria, el balance lipídico en el tracto gastrointestinal durante la infección parasitaria puede ser interrumpido (Li y Gasbarre, 2009). Los ácidos grasos poli insaturados (AGPI), especialmente los de las familias omega-3 (n-3) y omega-6 (n-6), como el ácido araquidónico y el ácido linoleico, se conoce que tienen efectos inmuno moduladores fuertes y podrían servir como un inhibidor potente para la respuesta Th1 (Hwang, 2000).

El resto de las vías metabólicas que encontró significativas en su estudio están asociadas a RXR (Retinoid X Receptor). Las vías incluyen la activación de FXR/RXR, LXR/RXR y LPS/IL-1. RXR coordina un gran número de vías de señalización dimerizándose con otros receptores nucleares como LXR (liver X Receptor), FDR (Farnesoid X receptor) y VDR (vitamina D). Esta asociación crea un control transcripcional activando diversas funciones desde la proliferación y diferenciación celular hasta cambios el metabolismo lipídico (Varga *et al.*, 2011)

5.10 Asociación de regiones genómicas asociadas a resistencia a las PGI

La investigación de genes candidatos, entre variantes génicas relacionadas a la respuesta inmune fue la primera aproximación que se realizó para la búsqueda de marcadores asociados a resistencia a PGI en el huésped (Outteridge *et al.*, 1985).

Entre los marcadores genéticos reportados, los más frecuentemente citados son aquellos relacionados con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en el cromosoma 20 del ovino (OAR20) (Benavides *et al.*, 2009). Estos genes son altamente polimórficos y juegan un rol muy importante en el procesamiento de la presentación de antígenos a los linfocitos T, causando su activación y posteriormente una cascada de eventos que construirán la inmunidad del ovino. Otro marcador ampliamente citado es el gen que codifica al interferón gamma (IFN- γ) en el cromosoma 3 (OAR3) (González *et al.*, 2004). Esta citoquina es

producida por los linfocitos T, y su función más importante es la activación de los macrófagos. Según datos de modelos de ratones, altos niveles de IFN- γ interfiere negativamente con el desarrollo de una respuesta Th2 hacia las PGI (MacKinnon *et al.*, 2015).

En la revisión de Benavides *et al.*, (2016) se reportan algunas regiones genómicas relacionadas a la invasión de *H. contortus* y *T. columbriformis* en el cromosoma 1 y 6 (OAR1 y OAR6). Muchos genes relacionados a la hemostasis se encuentran localizados en OAR1, incluyendo el gen TAL1 siendo importante para formación de plaquetas y para la diferenciación de los mastocitos, el gen PPAP2B regula la cicatrización y el gen LRP8 relacionado con la vía metabólica de la hemostasis de plaquetas (Gutiérrez-Gil *et al.*, 2009).

Algunos genes *toll-like receptors* (TLR1, 10 y 6), NF- κ B y vías de diferenciación de respuestas Th₁₇ están presentes dentro del OAR6. TLRs son proteínas del sistema inmune innato que detectan la invasión de un patógeno en la mucosa intestinal y son esenciales para activar la respuesta inmune Th₂ (Moncada *et al.*, 2003). Estas proteínas están localizadas en una amplia zona del cromosoma 6 (55.9 – 112.8Mpb). Esta misma región codifica genes que responden a la respuesta inmunológica del ovino como PDGFRA y KIT (Beraldi *et al.*, 2007) y genes implicados en la presentación del antígeno en el MHC de clase I. También se encuentran genes que codifican quimioquinas que inducen la respuesta IFN- γ como CXCL9, 10, 11 y 13 y MUC3 involucrada en la biosíntesis de mucina.

Existen algunas regiones genómicas que tienen cierta exclusividad al ser asociadas a la actividad de cierto parásito, aunque estos genes anteriormente mencionados, relacionados al sistema inmune, a la protección de la mucosa y a la hemostasis son respuestas comunes entre los análisis realizados en distintos PGI.

Como es de esperarse, la mayoría de las regiones genómicas se encuentran flanqueadas por genes de respuesta Th₂ típicos de una respuesta a infección gastrointestinal como eosinofilia, mastocitosis y producción de inmunoglobulina E (IgE) (Balic *et al.*, 2000).

Junto con la respuesta inmune adquirida, hay una creciente evidencia que indica que los genes implicados en la glicosilación de las mucinas (MUC o GALNT) y en la hemostasia, se encuentran alrededor de los marcadores reportados, y estos también podrían estar desempeñando un rol importante en la lucha contra las PGI (Hasnain *et al.*, 2013). Los genes involucrados en la glicosilación de las mucinas, parecen encontrarse cerca de los genes envueltos en la hemostasis.

La mucosa del abomaso, donde el principal componente es la mucina, se considera como el componente primario de inmunidad innata en la defensa a la infección parasitaria, viral bacteriana y fúngica (Hasnain *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que inmunizando ovinos con inoculaciones diarias de una carga baja de *H. contortus* no genera un cambio sustancial en la mucosa gástrica luego de las 48hs de la infección, mostrando que el huésped es capaz de controlar su propia mucosa gástrica dependiendo de su estado inmunológico (Douch *et al.*, 1983). La mucosa, también es importante para facilitar la expulsión del parásito (Miller *et al.*, 1981).

El control de la hemostasis (el control sobre el sangrado y en las lesiones de los vasos sanguíneos) podría ser otro de los mecanismos que contribuirían a la resistencia del ovino a las PGI. El gen PDGFRA codifica una proteína involucrada en la cicatrización de heridas localizado cerca de los marcadores genómicos asociados a la resistencia (Benavides *et al.*, 2015). Genes que codifican proteínas asociadas a la coagulación sanguínea (SPP1 y LRP8) fueron asociados a marcadores de resistencia genética frente a desafíos de *H. contortus* (Robertson *et al.*, 2009).

Una correcta regulación de la hemostasis sería de gran importancia para la resistencia del huésped, determinando el control de la anemia producida por los parásitos hematófagos. La hemostasis del huésped es un proceso importante para el parásito, porque determinaría una posible coagulación, y decaería su suministro de alimento comprometiendo su viabilidad en el huésped (Ledizet *et al.*, 2005).

Comparando marcadores genéticos relevantes para resistencia a PGI encontrados en la literatura en el genoma ovino, sería posible develar algunos genes de significancia biológica para la resistencia a PGI. El hecho de que el genoma ovino aún esté siendo mejorado, buscando su mejor ensamblaje y anotación, añade un reto extra a la identificación de genes y su asociación a la resistencia a PGI.

6 HIPOTESIS

Se plantea la hipótesis de que existe una diferencia en la expresión génica entre ovinos de la raza Corriedale del Uruguay relacionada a que pertenecen a líneas divergentes de resistencia y susceptibilidad a las PGI en nuestras condiciones de infestación naturales.

7 OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

7.1 Objetivos Generales

Contribuir con el presente estudio al entendimiento del sistema de regulación de las parasitosis gastrointestinales (PGI) en ovinos, identificando posibles genes, regiones cromosómicas y/o vías metabólicas responsables de la misma, con perspectivas hacia un apoyo futuro a los programas de mejora genética en ovinos.

7.2 Objetivos Específicos

- ✓ Evaluar e identificar los animales resistentes y susceptibles más extremos en la majada de ovinos de las líneas divergentes a PGI mediante su DEP de HPG
- ✓ Extraer los tejidos seleccionados previamente en las necropsias de los animales para su posterior extracción de ARNm. Evaluación de su calidad en el laboratorio, preparación de las librerías de ARN y secuenciación de las muestras
- ✓ Controles de calidad de la secuencia de cada muestra y análisis bioinformático de la expresión diferencial mediante RNA-Seq.
- ✓ Generar listados de genes/marcadores de expresión diferencial entre ovinos resistentes y susceptibles e interpretar su significado funcional en el fenómeno de resistencia y susceptibilidad.

8 MATERIALES & MÉTODOS

8.1 Población de origen para seleccionar animales

En las instalaciones del Secretariado Uruguayo de la Lana (SUL), estación “Dr. Alejandro Gallinal” ubicada en el departamento de Florida, Uruguay, se encuentra un núcleo de líneas divergentes de ovinos resistentes y susceptibles genéticamente a parásitos gastrointestinales. A partir del año 1998 se comenzó mediante selección por el criterio del DEP de HPG la generación de una población de ovinos resistentes a PGI; y a partir del año 2003 se comenzó la selección que da origen a la línea de ovinos susceptibles. Estas líneas son manejadas juntas en un mismo sistema de pasturas y expuestas a las mismas condiciones, tanto ambientales como en el momento de la desparasitación.

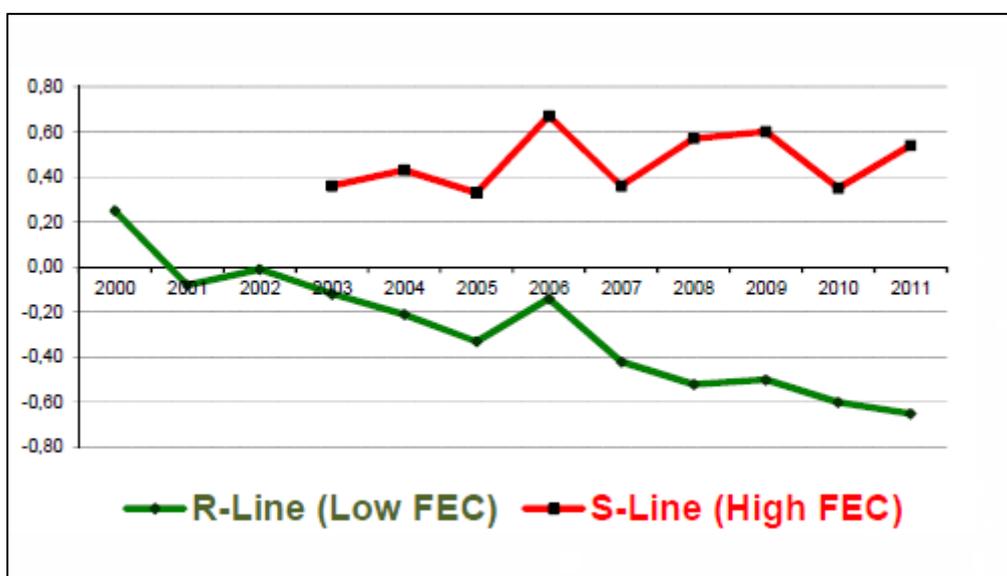


Figura 4: Gráfico donde se observa la evolución de las DEP-HPG de las líneas divergentes en función de los años. En verde la línea resistente y en rojo la línea susceptible. FEC = Faecal Egg Count = HPG (Castells, 2016).

El protocolo utilizado para evaluar el HPG está descrito en el trabajo de Goldberg *et al.*, (2011) donde los corderos son destetados a los 4 meses de edad y son desparasitados con Ivermectina + Levamisol siendo chequeados a los 10 días para determinar el descenso a cero de la carga parasitaria. La población es monitoreada a través de una muestra de 20 animales al azar, hasta que el recuento de huevos de parásito por gramo de materia fecal (HPG) se eleva y alcanza el valor mínimo necesario (500 huevos por gramo) para muestrear todos los corderos. Se realizaron tres muestreos en promedio a los 8, 11 y 13 meses de edad (HPG1, HPG2 y HPG3), respectivamente. Luego de la obtención de cada muestreo de HPG los corderos son desparasitados nuevamente, por lo que cada muestreo correspondió a ciclos parasitarios independientes. La evaluación de la DEP de HPG se realiza según Ciappesoni *et al.*, (2010).

Esporádicamente se realizan cultivos larvarios para la identificación taxonómica de los parásitos que prevalecen en las distintas estaciones del año. En general, las especies parasitarias predominantes en estos muestreos de tejidos son *Haemonchus sp* y *Ostertagia sp* para la mucosa del abomaso y *Trichostrongylus sp* y *Nematodirus sp* para la mucosa del intestino delgado (Castells *et al.*, 2002) existiendo una prevalencia en las pasturas uruguayas donde domina el género *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus columbriformis* (Nari *et al.*, 1977).

8.2 Selección de los animales para el estudio de expresión génica

Se seleccionaron los 4 animales a sacrificar (necropsia de tejidos) mediante una evaluación genética preliminar basada en los conteos de HPG 1 y HPG 2 seleccionando las corderas más resistentes y susceptibles (entre 4 y 8 meses de edad) de la generación 2009. Al momento de la toma del registro del HPG 2 (para toda la generación según se encuentra definido en el protocolo) se realizó un conteo de HPG individual de las posibles candidatas para verificar su grado de infestación al momento previo a la toma de muestras. En la figura 5 se observa el ciclo completo de la carga parasitaria de los ovinos a lo largo del año y el momento de las evaluaciones de HPG.

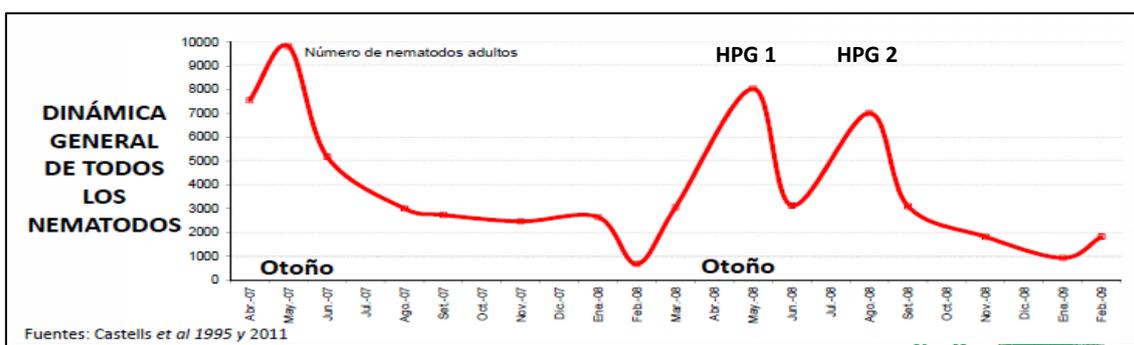


Figura 5: Distribución de la carga parasitaria en los ovinos a lo largo del año (Castells y Gimeno, 2011) observándose dos picos claros en el otoño y en primavera.

El único criterio utilizado para la selección de los animales es siempre el valor de DEP de HGP. Estos serán siempre contrastantes (muy negativos y muy positivos):

1. el conteo de huevos de los animales resistentes debería ser cero o un número muy bajo
2. en el momento del sacrificio, tanto los animales susceptibles como los resistentes continúen manteniendo una alta y baja carga parasitaria respectivamente.

8.3 Extracción de los tejidos seleccionados

Todos los tejidos fueron colectados y preservados en óptimas condiciones hasta su procesamiento final en tubos de 2ml en nitrógeno líquido. La toma de muestras se realizó mediante el sacrificio de animales por personal capacitado en el Secretariado Uruguayo de la Lana (SUL) con las acreditaciones correspondientes por parte de la CNEA (Comisión Nacional de Experimentación Animal).

El método utilizado para la extracción de las mucosas de los diferentes tejidos fue tomado del trabajo de Keane *et al.*, (2007). En nuestro caso, dada la gran bibliografía existente, se escogieron tejidos directamente relacionados a la invasión del parásito como lo son la mucosa interna del abomaso, mucosa interna del duodeno, mucosa interna del yeyuno, mucosa interna del íleon y tejido de los nódulos linfáticos del abomaso (Sutherland & Scott, 2009). Los tejidos fueron extraídos y lavados cuidadosamente con una solución tampón fosfato salino (PBS) para eliminar contaminantes de la materia fecal. Mediante la utilización de un bisturí estéril se retiró la mucosa de los tejidos y se colocaron las muestras en tubos para su conservación en nitrógeno líquido. Se transportó el material hasta su destino final en el laboratorio y se conservaron los tejidos extraídos a -80°C hasta la extracción del ARN.

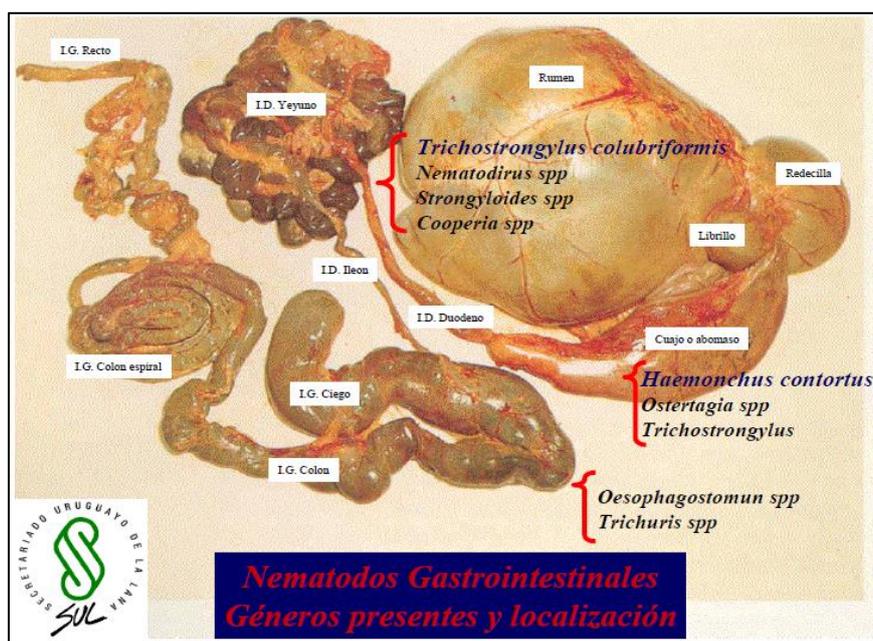


Figura 6: Sitios donde se tomaron muestras del tracto gastrointestinal (Castells *et al.*, 2002).

Previo a la extracción de la mucosa del abomaso, se procedió a lavar el contenido del abomaso en un volumen conocido para estimar la cantidad de parásitos adultos visibles en el interior del abomaso. Por lo general el parásito visible es el parásito adulto de *Haemonchus contortus* y el valor obtenido es en referencia a este parásito. El conteo directo es un indicador de la carga de parásitos adultos en el ovino.

8.4 Extracción de ARN de las muestras, generación de bibliotecas y secuenciación

El método para extraer ARN utilizado fue utilizando Trizol® Invitrogen, Life Science - utilizando las recomendaciones del fabricante. Luego el ARN total extraído fue evaluado en cantidad en un equipo de espectrofotometría Nanodrop 8000 Thermo Scientific en el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria y luego se determinó su integridad y calidad en un equipo de electroforesis Bioanalyzer 2100 de Agilent en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

Una vez obtenido todo el material, se procedió a realizar bibliotecas de cDNA para secuenciar la mucosa del abomaso, el tejido de los nódulos linfáticos y los tejidos de la mucosa intestinal: duodeno, yeyuno e íleon. Utilizamos el kit ARNm-Seq 8-Sample Prep. Kit de Illumina® y el Kit Ovation® de NuGen para la realización de las librerías de cDNA siguiendo las especificaciones del fabricante. Se generaron librerías de un largo total de 450pb, para ser leídas en formato *Pair End* (PE) en ambos sentidos de un largo de 100pb cada extremo. Una vez obtenidas las librerías, se vuelven a evaluar en un Bioanalyzer 2100 de Agilent previo a ser secuenciadas para confirmar una correcta preparación.

8.5 Secuenciación del RNA

La herramienta RNA-Seq utiliza las técnicas de última generación utilizando el secuenciado masivo del transcriptoma para relevar la presencia y la cantidad del ARN en una muestra biológica en un determinado momento. El proceso de secuenciado se realizó en un equipo HiSeq Sequencer Analyzer (Illumina, San Diego, CA) en el centro de secuenciaciones de la universidad de Berkeley, CA, USA.

Se secuenciaron 20 muestras (5 tejidos por animal) pertenecientes a 2 animales resistentes y 2 animales susceptibles. Para la secuenciación se utilizaron 2 carriles de secuenciación, ya que las librerías de ARN se encontraban indexadas. Dentro del chip de secuenciación se colocaron 10 muestras por carril. El carril 1, denominado JFM88 contenía 10 muestras con índices desde A hasta J y el carril 2, denominado JFM89 contenía las otras 10 muestras con índices desde A hasta J. Las secuencias obtenidas fueron descargadas en los servidores de INIA-Las Brujas, Uruguay y en los servidores del laboratorio de Animal Science, UC Davis, CA, USA.

8.6 Herramientas Informáticas Utilizadas

Para los posteriores estudios del análisis de estas secuencias como controles de calidad, gráficos y tablas, RNA-Seq, ensamblados y para la realización de los análisis estadísticos para la obtención de listas de genes de expresión diferencial, hemos utilizado el programa CLC Genomic Workbench 9.5 software (CLC bio, Aarhus, Denmark) (<http://www.clcbio.com/>) del que INIA cuenta con su licencia.

8.7 Genoma de Referencia y anotación

Para este trabajo utilizamos el genoma de referencia ovino (Sheep Genome v3.1 versión 84, mayo 2016) INSDC Assembly GCA_000298735.1, Aug 2012 en su versión 84 (ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-84/genbank/ovis_aries/).

8.8 Ampliación de la anotación por búsqueda de ortólogos en bases de datos

El genoma del ovino fue anotado por generación automática ENSEMBL y se generó con un total de genes de 27.054, donde solamente 18.108 tienen nombre y una función conocida (8.946 aún no tienen función conocida). Trabajando sobre la misma plataforma ENSEMBL, utilizamos la herramienta BioMart para identificar el nombre oficial de estos genes y algunos otros a los que aún no se les conoce función haciendo una búsqueda de genes ortólogos en el genoma humano. De un listado inicial de 8.946 genes de función desconocida, 2.973 lograron ser identificados mediante esta búsqueda y 5.973 aún siguen sin un nombre ni función definida. Este trabajo se realizó pensando en los listados finales de genes, codificados con la nomenclatura ENSEMBL (por ejemplo: ENSOARG000000001) ya que en algunos buscadores o programas esta nomenclatura no funciona correctamente. En total, 21.081 genes fueron correctamente anotados con su nombre oficial en el genoma del ovino.

8.9 Análisis de los datos de mapeo en el genoma ovino generados por RNA-Seq

El análisis de RNA-Seq se realiza mapeando y contando la distribución de las lecturas basándonos en la anotación del genoma de referencia. Estas lecturas se ordenan sobre los genes y los transcritos del genoma de referencia. La aproximación que realiza el software que utilizamos se encuentra descrita en el artículo de Mortazavi *et al.*, (2008) y el cálculo de expresión diferencial se realiza basada en la distribución binomial negativa calculada mediante DESeq (Anders y Huber, 2010).

El análisis de RNA-Seq se realiza en varias instancias. Primero, todas las secuencias de genes son extraídas del genoma de referencia e indexadas. Luego los transcritos anotados son extraídos también. Si existe más de una variante de splicing, todas ellas son extraídas de manera independiente. Luego todas las lecturas generadas por la secuenciación son mapeadas sobre todos los transcritos (además de ser mapeados sobre todo el gen). De este proceso de mapeo, las lecturas son categorizadas y asignadas a determinados genes, y así se comienzan a determinar los valores de expresión de cada gen y de cada transcripto calculando el número de lecturas que es asignado a cada sitio específico.

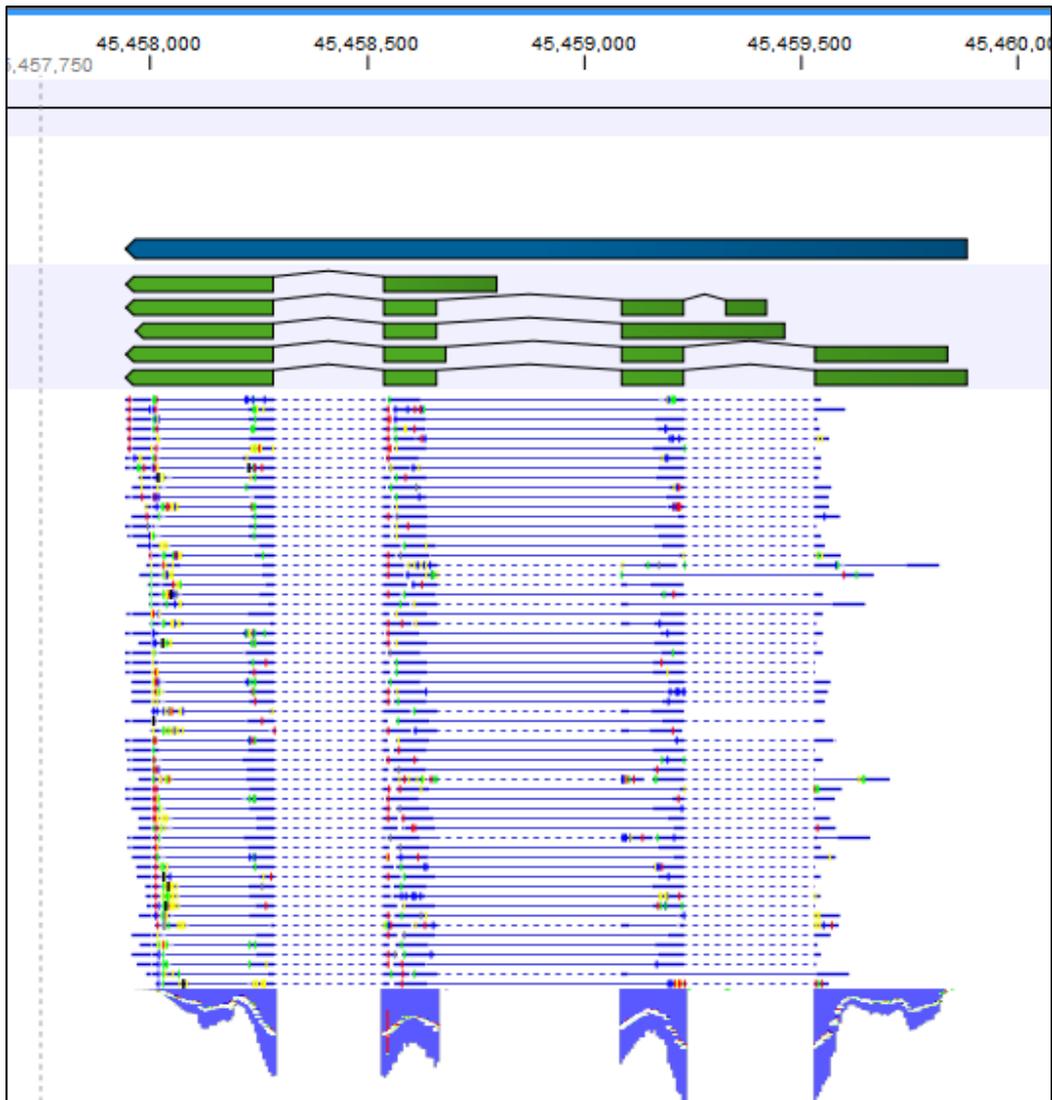


Figura 7: Imagen del mapeo de las lecturas de secuencias sobre la región del gen (en azul) sobre los diferentes exones de un transcripto (en verde).

En la figura 7 se puede observar como las lecturas generadas se ven como “apiladas” una sobre otra por el hecho de mapear sobre el genoma (por homología al genoma). Se muestran como una línea entera y punteada en color celeste. La línea entera corresponde a la porción de la lectura que mapea sobre la secuencia del gen y la línea punteada es una zona del gen (generalmente la zona de un intrón) donde se genera un espacio vacío (*gap*) entre un exón y otro. De esta manera, una lectura única, mapea en 2 sitios. Una zona en un exón y otra zona en otro exón, con un espacio vacío. Esto es propio de la técnica ya que la secuencia generada proviene del ARNm (secuencia sin intrones).

8.10 Extensión de la anotación en el genoma ovino por *Large Gap Read Mapping (LGRM)*

Esta herramienta, dentro del paquete de herramientas del *CLCBio Workbench* (Transcript Discovery Plugin) se utiliza mayormente para la búsqueda de nuevos transcritos ya que permite el mapeo de las secuencias generadas en RNA-Seq al genoma de referencia, sin anotación previa. Básicamente lo que realiza es mapear a todas las lecturas o *reads* generadas sobre el genoma de referencia permitiendo grandes “gaps” para cada lectura, es decir, que la secuencia pueda dividirse y mapear en regiones no continuas. Este proceso se repite iterativamente para cada lectura, de la siguiente manera:

- 1- Se busca el mejor resultado de homología de la lectura al genoma
- 2- Si la similitud es suficiente (de acuerdo a los parámetros que por lo general se ajustan al 95%) la lectura se asigna a esa posición.
- 3- Si existe una región sin alinear con el genoma, de un largo mayor al 10% de la secuencia, esta parte de la lectura se utiliza como input en el punto 1.
- 4- Este proceso continúa hasta que ya no existen más zonas sin alinear.

Como resultado se obtiene el mapeo de todas las lecturas sobre el genoma anotado, y una nueva anotación generada por secuencias que mapean en el genoma pero que éste no contaba con una anotación previa.

8.11 Cálculo de los valores de expresión por RNA-Seq

Los valores de expresión son generados luego del resultado del análisis de RNA-Seq. Los mismos pueden ser expresados tanto en RPKM (*Reads Per Kilobase of transcript per Millon Mapped Reads*) como en TPM (*Transcripts Per Million*). Los cálculos para llegar a estos valores son los siguientes.

$$RPKM = \frac{\text{total de lecturas de secuencia mapeadas en exones}}{\text{lecturas de secuencia mapeadas (en millones) X largo del exon (KB)'}}$$

donde el valor final está expresado en RPKM descrito en el artículo de Mortazavi *et al.*, 2008

TPM = *Transcripts Per Million*. Este cálculo se realiza

$$TPM = \frac{RPKM \cdot 10^6}{\sum RPKM},$$

donde la suma es sobre el valor de todos los RPKM de los genes/transcritos (Wagner *et al.*, 2012).

8.11.1 Diferencias entre los valores RPKM y TPM en los reportes de expresión génica

El valor de expresión TPM se utiliza en recientes trabajos para informar los valores de expresión génica en RNA-Seq dado que TPM puede expresar claramente la proporcionalidad real de las lecturas asignadas a cada gen entre las muestras. Como RNA-Seq realiza una comparación cuantitativa de proporciones relativas de las lecturas de secuencia entre muestras, esta métrica parece más apropiada para medir la expresión génica. La principal diferencia con RPKM es generar un resultado de valores proporcionalmente comparables de lecturas de secuencias totales que mapean a cada gen. La función del cálculo y deducción estadística se describe en el artículo (Wagner *et al.*, 2012).

8.12 Análisis estadístico de la Expresión Diferencial por RNA-Seq

8.12.1 El modelo estadístico utilizado

La Diferencia de Expresión se calcula a partir de los valores de expresión obtenidos por RNA-Seq. Cada valor de expresión génica, es modelado por un modelo estadístico lineal generalizado (GLM). El uso del GLM nos permitiría ajustar curvas a los valores de expresión sin suponer que el error de los valores está normalmente distribuido. De manera similar a los paquetes EdgeR (Robinson *et al.*, 2010) y DESeq (Anders y Huber, 2010), se estima que los recuentos de cada lectura siguen una distribución binomial negativa.

La distribución Binomial Negativa puede ser entendida como una distribución mezcla Gamma-Poisson, es decir, la distribución resultante de una mezcla de distribuciones Poisson, donde el parámetro de Poisson λ es en sí mismo una distribución Gamma. En el contexto de RNA-Seq, esta distribución Gamma está controlada por un parámetro de dispersión, de tal forma que la distribución binomial negativa se reduce a una distribución de Poisson cuando la dispersión es cero.

8.13 Análisis de Componentes Principales (Principal Component Analysis - PCA)

El análisis de componentes principales (o PCA en inglés) es un análisis matemático que identifica y cuantifica las direcciones de la variabilidad en los datos. El análisis de los componentes principales hace posible proyectar un conjunto de datos de alta dimensión (donde en nuestro caso el número de dimensiones es igual al número de genes o transcritos) en un gráfico de dos o tres dimensiones. Esto ayuda a identificar muestras fuera del rango esperado y/o las variaciones de nuestras muestras para el control de calidad dando una imagen gráfica donde se visualizan las causas principales de la variación en un conjunto de datos. El análisis procede transformando un conjunto grande de variables (en este caso, los conteos son para cada gen individual o transcripción) a un conjunto más pequeño de componentes principales ortogonales. El primer componente principal especifica la dirección con mayor variabilidad en

los datos, el segundo componente es la dirección con la segunda mayor variación. En su gráfico, se muestra una proyección de las muestras en un espacio bidimensional, catalogadas o separadas por sus dos principales componentes de la matriz de covarianza detectada. Se espera que muestras pertenecientes a un mismo grupo muestren menos variabilidad en la comparación con las muestras de otros grupos.

8.14 Volcano Plot

Un *Volcano Plot* es una representación gráfica de la relación que existe entre los p-valor provenientes del análisis estadístico y la diferencia de los valores de expresión de las muestras entre grupos, representado como el *Fold Change*. Para normalizar los datos del gráfico, realizamos el \log_2 tanto del p-valor como del *Fold Change* (FC). El $\log_2 FC$ se grafica sobre el eje de las x, mientras que el $-\log_{10}(p)$ se encuentra sobre el eje de las Y. Cuanto más extremos los valores de diferencia de expresión para cada gen, más alejados del 0 se encontrarán los puntos en el eje de las X. La diferencia de significancia para cada gen será a menor p-valor, por lo tanto, en nuestro gráfico, mayor será el $-\log_{10}(p)$. Los valores más interesantes en estas gráficas, son aquellos en las regiones alejadas del eje principal (sobre los vértices superiores del gráfico). Esto muestra, que los genes pertenecientes a esas regiones son estadísticamente significativos, ya que representan los menores valores de p-valor y grandes cambios en su diferencia de expresión.

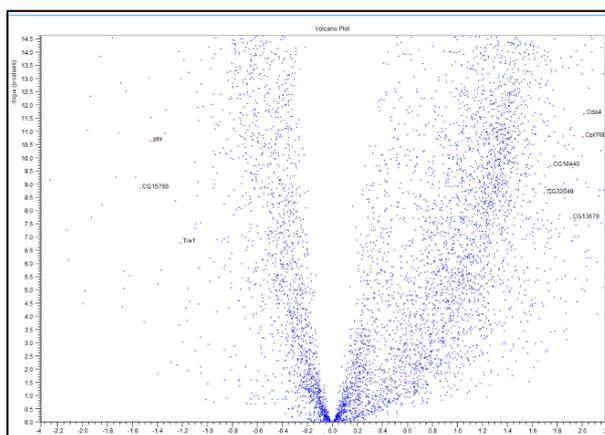


Figura 8: Volcano Plot donde se grafica el $-\log_2$ del *Fold Change* en función del $-\log_{10}$ p-valor.

8.15 Diagrama de Cajas o *BoxPlot*

Diagrama de cajas o (*Boxplot*) es una representación gráfica basada en cuartiles, mediante el cual se visualiza un conjunto de datos que muestra las características principales de una distribución de frecuencias y señala los datos atípicos o extremos. En una primera instancia, se obtienen la media de cada intervalo, y luego la mediana de la tabla de frecuencias en general. Con estos datos utilizamos la fórmula de la media de cada intervalo elevado a la mediana. Para una muestra, la distribución de sus valores se representa por una línea en el centro, una caja representa su media y los “bigotes” representan los extremos de la distribución. Este tipo de diagramas proporcionan una visión general de la simetría de la

distribución de los datos; por ejemplo, si la mediana no está en el centro del rectángulo, la distribución no es simétrica. También son útiles para ver la presencia de valores con una distribución diferente o atípicos (outliers). Los diagramas de cajas pertenecen a las herramientas de la estadística descriptiva, permitiendo observar cómo es la dispersión de los puntos con la mediana, los percentiles 25 y 75 y los valores máximos y mínimos. En la figura 9 se pueden observar ejemplos de distribución luego de la normalización de las distribuciones para continuar con el trabajo de análisis de expresión.

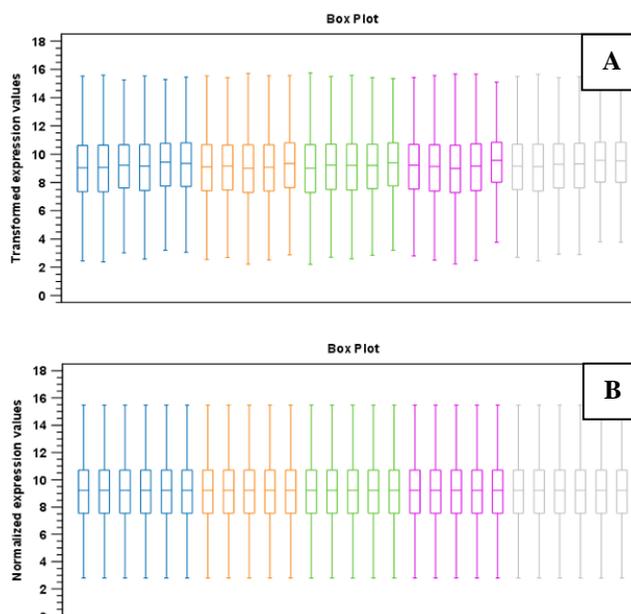


Figura 9: Diagrama de Cajas donde se muestra un experimento de expresión sin normalizar (Diagrama A) y otro donde las muestras ya fueron normalizadas (Diagrama B).

Los valores de expresión, por lo general necesitan ser normalizados para asegurarse que las muestras puedan ser comparadas entre sí (Allison *et al.*, 2006). Estos son requerimientos esenciales para llevar adelante análisis significativos. Los valores crudos de expresión a menudo muestran una fuerte dependencia de la varianza en la media, y puede ser preferible eliminar esto mediante la transformación logarítmica de los datos. Además, los conjuntos de valores de expresión en las diferentes muestras en un experimento pueden presentar diferencias sistemáticas que probablemente se deban a diferencias en la preparación de la muestra y el procesamiento de matrices que enmascaran el resultado de la biología subyacente. Estos efectos de ruido deben eliminarse antes de realizar cualquier análisis estadístico.

8.16 Búsqueda de funcionalidad de los genes obtenidos mediante la expresión diferencial

Para los estudios de anotación funcional se utilizó el software de licencia libre DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) (Huang *et al.*, 2009). Una vez ingresando al programa, se procede con la carga de los listados de expresión diferencial para cada uno de los diferentes tejidos. Estos listados contienen los genes diferencialmente expresados para cada condición. A partir de la información de los genes proporcionados, se conocen las vías funcionales en las que están involucradas con un valor de significancia asociado (p-valor).

8.17 Descubrimiento de variantes de secuencia SNP *Basic Variant Detection (BVD)*

Esta herramienta, dentro del paquete de herramientas del *CLCBio Workbench*, no recae bajo ninguna suposición de los datos y no estima ningún modelo estadístico. Es una herramienta utilizada para cualquier tipo de muestra, donde llamará como variante a la variación de las secuencias de las lecturas generadas por secuenciación al ser mapeadas en el genoma de referencia. La herramienta tiene un solo parámetro que es específico para este estudio; especificar la ploidía de las muestras a analizar. El valor de este parámetro no tiene mayor impacto sobre cuáles de las variantes son detectadas, solamente determinará el contenido de variantes alélicas para cada posición.

Para determinar las variantes de secuencia, se utilizan los archivos de mapeo de RNA-Seq de todas las muestras y se busca mediante la comparación de todas las muestras para cada posición, las variantes de secuencia entre ellas, dependiendo de la condición resistente o susceptible.

9 RESULTADOS

9.1 Selección de los Animales

Dentro de la población de animales del SUL, se seleccionaron 2 animales dentro de la línea resistente (marcados en azul) y 2 animales dentro de la línea susceptible (marcados en rojo) a PGI dentro del total de animales extremos para la población. Estos animales fueron sacrificados para la extracción de los tejidos a analizar y además se les realizó un conteo directo de parásitos adultos presentes en el abomaso. Podemos observar en la tabla 2 la selección de los 4 animales de la línea divergente, entre los 7 animales más extremos seleccionados en el día de la faena.

Tabla 2: Datos de HPG de los ovinos extremos para seleccionar. Para los 4 animales seleccionados se agrega también el dato del conteo directo de parásitos adultos en abomaso.

Línea	Ovino N°	HPG	DEP/HPG	Conteo Directo
Susceptible	33	250	+ 0,40	-
Susceptible	119	1000	+ 0,39	1890
Susceptible	45	650	+ 0,31	280
Resistente	135	300	- 0,54	-
Resistente	21	0	-0,37	-
Resistente	94	0	-0,45	30
Resistente	84	0	-0,53	0

Para la selección de los animales se analizó a la población días antes de la faena para ir relevando su carga parasitaria. Cuando los animales alcanzaron valores cercanos a 500 HPG, se procedió a realizar la faena. Una vez obtenidos los DEP/HPG más extremos se seleccionaron los animales con caravana 119 y 45 de la línea susceptible y los animales con caravana 84 y 94 de la línea resistente.

9.2 Extracción del RNA

Se evaluó la calidad del ARN total extraído (integridad) mediante su valor de RIN (RNA Integrity Number) utilizando el equipo Agilent Bioanalyzer 2100 del IIBCE, Uruguay. En la tabla 3 se detallan los valores de RIN, los cuales se encontraron en el rango de 5.5 a 7.2 y la cantidad de muestra de ARN total obtenida para cada muestra evaluada en un espectrofotómetro Nanodrop 8000. Para la construcción de las librerías se utilizó NuGen Encore® Complete RNA-Seq Library Systems siguiendo el protocolo del fabricante. La selección de este kit se basa en que los valores de RIN no fueron muy altos como para inferir una gran integridad de los ARN posterior a la extracción. Luego de la preparación de las librerías

se realizó una valoración de su correcta preparación, también en un equipo Agilent Bioanalyzer 2100 obteniendo resultados positivos para todas las librerías.

Tabla 3: Resumen de las extracciones de ARN de las muestras con sus valores de RIN.

Tejido	ID Ovino	Grupo	ARN Concentración (ng/ul)	RIN
Abomaso	A 45	S	734,2	6,3
Duodeno	D 45		400,3	5,5
Yeyuno	Y 45		448	7,1
Íleon	I 45		234,5	5,5
Ganglios Linfáticos	G 45		708,3	5,7
Abomaso	A 84	R	350,5	6,9
Duodeno	D 84		120,3	7,1
Yeyuno	Y 84		356,8	6,8
Íleon	I 84		304,1	5,5
Ganglios Linfáticos	G 84		150,5	6,7
Abomaso	A 94	R	186,7	6,7
Duodeno	D 94		232,5	5,6
Yeyuno	Y 94		341,1	6,4
Íleon	I 94		227,3	6,1
Ganglios Linfáticos	G 94		102,9	5,7
Abomaso	A 119	S	158,8	5,9
Duodeno	D 119		106,7	6,5
Yeyuno	Y 119		256	7,2
Íleon	I 119		311,5	6,2
Ganglios Linfáticos	G 119		252,6	6,3

9.3 Control de Calidad de las Secuencias Obtenidas

Un total de 20 muestras fueron secuenciadas para el estudio de RNA-Seq. Se obtuvieron 5 muestras por animal (Abomaso, Duodeno, Yeyuno, Íleon y Ganglios Linfáticos) de un total de 4 animales (2 de la línea resistente y 2 de la línea susceptible). Se realizó un análisis de la calidad de las secuencias según los procedimientos descritos por Cánovas *et al.*, (2013) (**Tabla 4**).

Se obtuvo un promedio de 29.5 millones de lecturas por tejido para cada muestra individual. Los valores de calidad de las secuencias están dentro de los valores normales y esperables. En promedio, la calidad de las secuencias se encontraba en valores *Phred Quality Score* superiores al 99.95% (valores en promedio de 38) tanto en la secuencia general, como para cada posición en la lectura (de la posición 1 a la 100). El

porcentaje %CG promedio para las secuencias se encontró cercano al 45%, siendo el porcentaje esperado. La contribución nucleotídica promedio fue de un 25% para cada base en las posiciones de las secuencias y las bases ambiguas (N) de las lecturas fue menor al 1% para todas. En la tabla 4 se detallan todos estos valores individualmente para cada lectura realizada para cada tejido.

Tabla 4: Parámetros del Control de Calidad de las Secuencias

Tejido	ID	Grupo	Carril	Código	Índice de Barcode	Lecturas (n)	% GC Contenido (media)	Contenido de Bases Ambiguas	Score de Calidad (Gaussian)	Cobertura	Contribución de Nucleótidos	Distribución de los Score de Calidad	
Abomaso	A 45	S	88	A	JFM 88A	1	25,741,348	42	< 1%	Ok (± 40)	Ok	Todos 25%	Ok
Duodeno	D 45			B	JFM 88B	2	25,837,082	40	< 1%	Ok (± 40)	Ok	22% GC 28% AT	Ok
Yeyuno	Y 45			C	JFM 88C	3	26,915,832	40	< 1%	Ok (± 38)	Ok	22% GC 28% AT	Ok
Íleon	I 45			D	JFM 88D	4	37,027,346	42	< 1%	Ok (± 38)	Ok	21% GC 29% AT	Ok
Ganglios Linfáticos	G 45			E	JFM 88E	5	33,946,010	59	< 1%	Ok (± 37)	Ok	27% CG 23% AT	Ok
Abomaso	A 84	R		F	JFM 88F	6	25,127,580	59	< 1%	Ok (± 38)	Ok	Todos 25%	Ok
Duodeno	D 84			G	JFM 88G	7	35,012,230	59	< 1%	Ok (± 38)	Ok	Todos 25%	Ok
Yeyuno	Y 84			H	JFM 88H	8	32,308,404	49	< 1%	Ok (± 38)	Ok	23% GC 27% AT	Ok
Íleon	I 84			I	JFM 88I	9	35,192,486	40	< 1%	Ok (± 38)	Ok	21% GC 29% AT	Ok
Ganglios Linfáticos	G 84			J	JFM 88J	10	28,124,912	40	< 1%	Ok (± 38)	Ok	24% GC 26% AT	Ok
Abomaso	A 94	R	89	A	JFM 89A	7	22,853,818	38	< 1%	Ok (± 37)	Ok	21% GC 29% AT	Ok
Duodeno	D 94			B	JFM 89B	8	40,458,202	41	< 1%	Ok (± 38)	Ok	23% GC 27% AT	Ok
Yeyuno	Y 94			C	JFM 89C	9	35,727,376	41	< 1%	Ok (± 37)	Ok	21% GC 29% AT	Ok
Íleon	I 94			D	JFM 89D	10	31,253,144	40	< 1%	Ok (± 37)	Ok	22% GC 28% AT	Ok
Ganglios Linfáticos	G 94			E	JFM 89E	11	30,656,320	45	< 1%	Ok (± 37)	Ok	24 % GC 26% AT	Ok
Abomaso	A 119	S		F	JFM 89F	12	25,702,764	58	< 1%	Ok (± 37)	Ok	27% CG 23% AT	Ok
Duodeno	D 119			G	JFM 89G	13	27,857,820	40	< 1%	Ok (± 38)	Ok	22% GC 28% AT	Ok
Yeyuno	Y 119			H	JFM 89H	14	28,874,324	40	< 1%	Ok (± 38)	Ok	21% GC 29% AT	Ok
Íleon	I 119			I	JFM 89I	15	23,486,362	39	< 1%	Ok (± 38)	Ok	22% GC 28% AT	Ok
Ganglios Linfáticos	G 119			J	JFM 89J	16	19,038,892	40	< 1%	Ok (± 38)	Ok	22% GC 28% AT	Ok

9.4 Mapeo de las Secuencias sobre el genoma ovino

Como comentamos anteriormente, se logró obtener un promedio de 29.5 millones de lecturas para cada muestra de cada uno de los tejidos secuenciados. Las lecturas fueron mapeadas sobre el genoma de referencia ovino (Sheep Genome v3.1 versión 84, mayo 2016) el cual contiene la anotación de 27,054 genes. Como resultado de este mapeo, el % de lecturas mapeadas sobre el genoma resulta bastante variable, partiendo desde 30% llegando hasta el 60% de las lecturas de cada muestra. La tabla 4 muestra el número de lecturas mapeadas al genoma y este dato traducido al porcentaje de mapeo para cada una de las muestras.

Tabla 5: Estudio de RNA-Seq realizado sobre el genoma ovino (Sheep Genome v3.1 versión 84, mayo 2016).

N	Tejido	ID Ovino	Grupo	Carril	Código	Índice de Barcode	Lecturas (n)	Largo (bp)	Lecturas Mapeadas (en pares)	% de lecturas mapeadas (en pares)	
1	Abomaso	A 45	S	88	A	JFM 88 ^a	1	25,741,348	100	15.125.864	58,76
2	Duodeno	D 45			B	JFM 88B	2	25,837,082	100	16.454.564	63,69
3	Yeyuno	Y 45			C	JFM 88C	3	26,915,832	100	14.705.444	54,63
4	Íleon	I 45			D	JFM 88D	4	37,027,346	100	12.671.720	34,22
5	Ganglios Linfáticos	G 45			E	JFM 88E	5	33,946,010	100	19.921.906	58,69
6	Abomaso	A 84	R		F	JFM 88F	6	25,127,580	100	10.905.350	43,4
7	Duodeno	D 84			G	JFM 88G	7	35,012,230	100	18.894.760	53,97
8	Yeyuno	Y 84			H	JFM 88H	8	32,308,404	100	11.765.084	36,41
9	Íleon	I 84			I	JFM 88I	9	35,192,486	100	16.962.000	48,2
10	Ganglios Linfáticos	G 84			J	JFM 88J	10	28,124,912	100	9.894.116	35,18
11	Abomaso	A 94	R	89	A	JFM 89 ^a	7	22,853,818	100	15.206.696	66,54
12	Duodeno	D 94			B	JFM 89B	8	40,458,202	100	14.356.110	35,48
13	Yeyuno	Y 94			C	JFM 89C	9	35,727,376	100	11.508.036	32,21
14	Íleon	I 94			D	JFM 89D	10	31,253,144	100	11.599.610	33,92
15	Ganglios Linfáticos	G 94			E	JFM 89E	11	30,656,320	100	4.782.456	15,6
16	Abomaso	A 119	S		F	JFM 89F	12	25,702,764	100	12.424.098	48,34
17	Duodeno	D 119			G	JFM 89G	13	27,857,820	100	16.308.356	58,54
18	Yeyuno	Y 119			H	JFM 89H	14	28,874,324	100	9.819.878	34,01
19	Íleon	I 119			I	JFM 89I	15	23,486,362	100	14.381.952	61,24
20	Ganglios Linfáticos	G 119			J	JFM 89J	16	19,038,892	100	10.004.042	52,55

Las secuencias fueron importadas al programa en formato *Pair End* (PE) donde se calcula la distancia entre secuencias (de aproximadamente 250pb, ya que la biblioteca fue de 450pb) y se mapea cada extremo los 100pb teniendo en cuenta el máximo separación entre secuencias. De esta manera, ambas lecturas son reconocidas como una sola. Con el intento de mejorar los porcentajes de mapeo, realizamos en una segunda instancia, una importación de las lecturas, pero como *Single Reads* (SE), o sea, lecturas

simples sin ser importadas de a pares como en *Pair End*. El fin de esto fue visualizar si el mapeo de las lecturas, estaba relacionado al apareamiento en PE de las lecturas.

9.5 Optimización de los resultados de mapeo en el genoma ovino

Las muestras se mapearon sobre el genoma ovino, pero esta vez solamente utilizando la lectura R1 (forward) en lugar del par de secuencias R1 y R2 (forward y reverse). De esta manera, al tratar ambas lecturas como simples, se evita el descartar lecturas que no pudieron ser mapeadas ya que no lograron ser pareadas en el proceso de importación de datos debido a algún problema de secuencia.

La tabla 6 se generó con los nuevos porcentajes de mapeo de las lecturas, tanto para determinar porcentajes de mapeo como la cantidad de lecturas que mapean de manera única en el genoma y compararla con la tabla anterior para comparar los resultados.

Tabla 6: Porcentaje de mapeo mediante importación de lecturas en formato individual (*single reads*).

<u>% Secuencias Mapeadas únicamente en el genoma Ovino:</u>	
14	muestras entre 70% - 90%
5	muestras entre 60% - 70%
1	muestra 23%
<u>Número de Secuencias que mapean una única vez en el genoma (solamente lecturas R1)</u>	
14	muestras entre 10 - 18 millones de lecturas
5	muestras entre 7 - 10 millones de lecturas
1	muestra de 3 millones de lecturas
<u>% de Secuencias que mapean en los exones, pero una única vez en el genoma</u>	
9	muestras entre 11.6% - 33% de las lecturas
5	muestras entre 2.69% - 7.6% de las lecturas
6	muestras entre 0.9 % - 1.2% de las lecturas

Debido a que los porcentajes de mapeo continuaban siendo relativamente bajos, otra de las estrategias elegidas fue la de extender o mejorar la anotación ya existente en el genoma ovino. Esto pudo ser posible debido a la herramienta *Large Gap Read Mapping* (LGRM) incluida en el paquete CLC Bio Genomic Workbench (CLC Bio, Aarhus, Denmark) (<http://www.clcbio.com/>). La herramienta permite mapear las lecturas ya obtenidas y poder inferir nuevas regiones de genes en el genoma, manteniendo además la anotación original. La intención es aumentar el tamaño cubierto sobre el genoma de regiones expresadas para ampliar la anotación (si es posible) y obtener un mayor porcentaje de mapeo en regiones codificantes, utilizando las lecturas de todas las muestras para esto. En la tabla 8, podemos observar los resultados obtenidos del genoma luego del LGRM.

Tabla 7: Resultados de la extensión de la anotación en el genoma ovino por LGRM (*Large Gap Read Mapping*)

Lecturas	Tamaño	Largo (bp)
Todas las muestras	591,142,252 lecturas en pares	100
	Lecturas de secuencias	%
Mapeadas en el genoma	428,840,345	73%
En pares	358,603,718	61%
Simples	70,236,627	12%
No mapeadas	162,301,907	27%
Invalidadas	25,004,658	4%
No mapean	137,297,249	23%
Total de Lecturas	591,142,252	100

Originalmente el genoma de referencia ovino (Sheep Genome v3.1 versión 84, mayo 2016) presenta un total de 20,921 genes y 29,118 transcritos en las bases de datos. Muchos de estos genes son predichos o generados mediante programas de predicciones genómicas. Mediante la herramienta LGRM generamos un total de 14.982 probables genes predichos por el software (quedando un total final de 35.903 genes) y 60.548 transcritos intentando mejorar la anotación anterior del genoma. En la tabla 8 se pueden ver la cantidad de secuencias utilizadas en cada cromosoma, los genes y transcritos determinados para el LGRM.

Los nuevos genes/transcritos generados por este proceso, podrán ser anotados por homología (utilizando algún programa de anotación) si se observan en alguna lista de genes significativamente DE.

Tabla 8: Resultados de la extensión de la anotación en el genoma ovino por LGRM (*Large Gap Read Mapping*)

Cromosoma	Largo	Lecturas utilizadas	Genes	Transcriptos
1	275.612.895	46.832.607	3.754	6.426
2	248.993.846	61.632.489	2.907	4.994
3	224.283.230	42.091.772	3.388	5.745
4	119.255.633	19.038.832	1.455	2.510
5	107.901.688	21.619.630	1.797	2.900
6	117.031.472	21.444.224	1.348	2.256
7	100.079.507	20.543.464	1.432	2.574
8	90.695.168	13.041.113	1.004	1.666
9	94.726.778	22.549.669	1.058	1.816
10	86.447.213	12.296.378	931	1.568
11	62.248.096	22.674.787	1.450	2.443
12	79.100.223	14.468.990	1.073	1.884
13	83.079.144	14.437.042	1.205	2.062
14	62.722.625	13.597.021	1.532	2.473
15	80.923.592	13.845.381	1.401	2.373
16	71.719.816	10.536.788	772	1.363
17	72.286.588	15.642.130	1.027	1.679
18	68.604.602	14.215.583	938	1.514
19	60.464.314	10.755.133	809	1.407
20	51.176.841	17.868.816	972	1.619
21	50.073.674	16.853.204	961	1.528
22	50.832.532	9.201.468	658	1.175
23	62.330.649	9.096.879	650	1.109
24	42.034.648	11.341.112	946	1.566
25	45.367.442	7.398.429	525	919
26	44.077.779	6.132.097	498	780
MT	16.616	13.451.468	n/a	n/a
X	135.437.088	16.086.505	1.412	2.199
Total	2.587.523.699	518.693.011	35.903	60.548

Una vez generado este nuevo genoma, por LGRM, realizamos nuevamente el mapeo de las secuencias de cada tejido sobre éste. Para la mayoría de las muestras, se obtuvo un porcentaje mayor de mapeo de las

lecturas totales sobre el genoma ovino (tabla 9). Por esta razón, definimos utilizar esta “nueva” anotación para los posteriores análisis de expresión.

Tabla 9: Resultados de la cantidad de secuencias mapeadas, y los porcentajes de mapeo luego de la utilización del LGRM.

N	Tejido	ID Ovino	Lecturas (n)	Previo a utilizar LGRM	Luego del LGRM	Previo a utilizar LGRM	Luego del LGRM
				Lecturas Mapeadas (en pares)	Lecturas Mapeadas (en pares)	% de lecturas mapeadas (en pares)	% de lecturas mapeadas (en pares)
1	Abomaso	A 45	25,741,348	15.125.616	17.308.482	58,76	67,24
2	Duodeno	D 45	25,837,082	16.455.638	17.987.776	63,69	69,62
3	Yeyuno	Y 45	26,915,832	14.704.119	16.031.070	54,63	59,56
4	Íleon	I 45	37,027,346	12.670.758	19.894.793	34,22	53,73
5	Ganglios Linfáticos	G 45	33,946,010	19.922.913	23.025.579	58,69	67,83
6	Abomaso	A 84	25,127,580	10.905.370	13.769.914	43,4	54,80
7	Duodeno	D 84	35,012,230	18.896.101	20.202.057	53,97	57,70
8	Yeyuno	Y 84	32,308,404	11.763.490	17.362.536	36,41	53,74
9	Íleon	I 84	35,192,486	16.962.778	20.812.836	48,2	59,14
10	Ganglios Linfáticos	G 84	28,124,912	9.894.344	14.743.079	35,18	52,42
11	Abomaso	A 94	22,853,818	15.206.930	14.729.286	66,54	64,45
12	Duodeno	D 94	40,458,202	14.354.570	21.232.464	35,48	52,48
13	Yeyuno	Y 94	35,727,376	11.507.788	17.974.443	32,21	50,31
14	Íleon	I 94	31,253,144	10.601.066	16.945.455	33,92	54,22
15	Ganglios Linfáticos	G 94	30,656,320	4.782.386	5.496.678	15,6	17,93
16	Abomaso	A 119	25,702,764	12.424.716	13.812.665	48,34	53,74
17	Duodeno	D 119	27,857,820	16.307.968	19.943.413	58,54	71,59
18	Yeyuno	Y 119	28,874,324	9.820.158	15.407.339	34,01	53,36
19	Íleon	I 119	23,486,362	14.383.048	15.566.761	61,24	66,28
20	Ganglios Linfáticos	G 119	19,038,892	10.004.938	12.335.298	52,55	64,79

9.6 Análisis de RNA-Seq

Se adjuntan en anexo 1, las tablas con todos los datos obtenidos de los estudios de RNA-Seq para todas las muestras. En la tabla 10 agregamos la nomenclatura que en las siguientes gráficas y tablas podrán verse asignadas a las diferentes muestras de tejidos y animales de cada línea. Se clasifican los tejidos abomaso, duodeno, yeyuno, íleon y ganglio como Abo, Duo, Yey, Ile y G respectivamente y teniendo en cuenta que los animales de ID 45 y 119 pertenecen a la línea susceptible y los animales de ID 84 y 94 pertenecen a la línea resistente (detalle en la Tabla 10).

Tabla 10: Abreviaciones de las secuencias de los tejidos a lo largo de los análisis

Tejido	Línea	ID Ovino	Abreviatura	Tejido	Línea	ID Ovino	Abreviatura
Abomaso	Resistente	84	Abo-84	Abomaso	Susceptible	119	Abo-119
Duodeno	Resistente	84	Duo-84	Duodeno	Susceptible	119	Duo-119
Yeyuno	Resistente	84	Yey-84	Yeyuno	Susceptible	119	Yey-119
Íleon	Resistente	84	Ile-84	Íleon	Susceptible	119	Ile-119
Ganglios Linfáticos	Resistente	84	G-84	Ganglios Linfáticos	Susceptible	119	G-119
Abomaso	Resistente	94	Abo-94	Abomaso	Susceptible	45	Abo-45
Duodeno	Resistente	94	Duo-94	Duodeno	Susceptible	45	Duo-45
Yeyuno	Resistente	94	Yey-94	Yeyuno	Susceptible	45	Yey-45
Íleon	Resistente	94	Ile-94	Íleon	Susceptible	45	Ile-45
Ganglios Linfáticos	Resistente	94	G-94	Ganglios Linfáticos	Susceptible	45	G-45

9.6.1 Coeficientes de correlación entre muestras

Realizamos una serie de diagramas de dispersión con el fin de visualizar los gráficos y obtener los valores del coeficiente de correlación de Pearson para las réplicas técnicas del trabajo. Para ello, utilizamos los valores de expresión reportados para cada muestra. Este coeficiente es una medida de la relación lineal entre dos variables aleatorias cuantitativas. A diferencia de la covarianza, la correlación de Pearson es independiente de la escala de medida de las variables. Adjuntamos en la tabla 11 los valores de correlación entre muestras.

Tabla 11: Coeficientes de Correlación entre réplicas biológicas

	Abomaso	Duodeno	Yeyuno	Íleon	Ganglio
Resistente	0,94	0,7	0,99	0,28	0,77
Susceptible	0,79	0,68	0,84	0,2	0,55

De los datos obtenidos, obtenemos que las mejores correlaciones se dan entre los tejidos resistentes de abomaso, duodeno, yeyuno y ganglio; y para los tejidos susceptibles de abomaso, duodeno y yeyuno. Las muestras del íleon presentan una baja correlación tanto para resistentes como para susceptibles.

9.6.2 Diagrama de Cajas o Box Plot

Observamos en los datos sin normalizar una mayor dispersión de la expresión en las muestras pertenecientes a la línea resistente que a la línea susceptible. Una vez normalizados los valores de expresión, se continúa con el resto de los análisis de calidad.

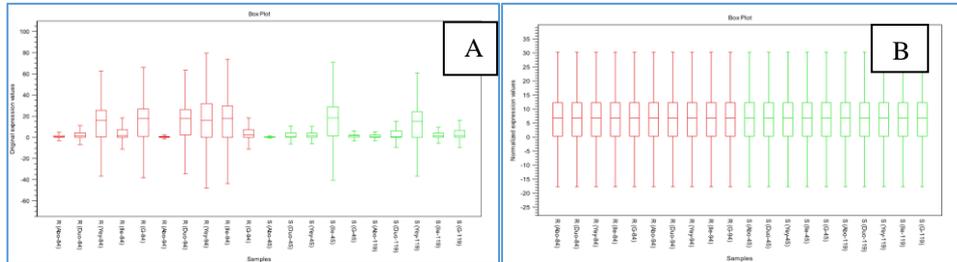


Figura 10 Diagramas de cajas de los valores medios de expresión de cada muestra y la mediana de la frecuencia en general con sus dispersiones (rojo = Resistentes, verde= susceptibles). En el cuadro A se observan la dispersión de los valores originales y en el cuadro B la dispersión de los valores posteriores a la normalización.

En la figura 10 podemos visualizar el diagrama de cajas previo y luego de la normalización de los datos de las secuencias obtenidas para cada tejido. La normalización fue llevada a cabo por el método logarítmico. De esta manera normalizamos la distribución de la dispersión de la expresión entre los tejidos.

9.6.3 Análisis de Componentes Principales (PCA - Principal Component Analysis)

Realizamos un análisis de componentes principales (PCA) intentando identificar y cuantificar las direcciones de variabilidad en los datos.

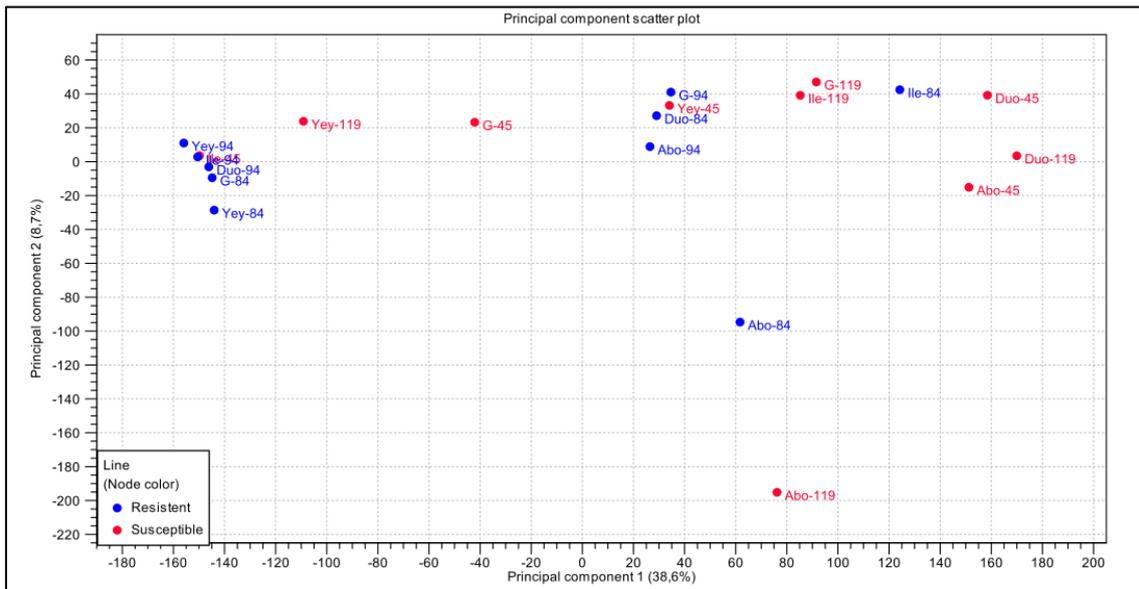


Figura 11: Análisis de Componentes Principales en dos dimensiones para todas las muestras. Se ve en rojo las muestras de la línea susceptible y en azul las muestras de la línea resistente.

En el gráfico de PCA en 2D, se observa que los puntos correspondientes a la expresión de los tejidos tienden a separarse en dos grupos. Existe un intercambio de puntos entre la línea resistente y la

susceptible entre éstos dos grupos que posiblemente sea atribuible a la diferencia de expresión entre los tejidos y no por la condición resistente o susceptible. También realizamos un gráfico de PCA en 3 dimensiones, con el fin de observar si existe un tercer componente que defina los grupos o que participe en la variable. El componente principal número 1 define el 38.6% de la variación entre las muestras mientras que el segundo componente define solo un 8.7% y el tercero un 6.1% de la variación.

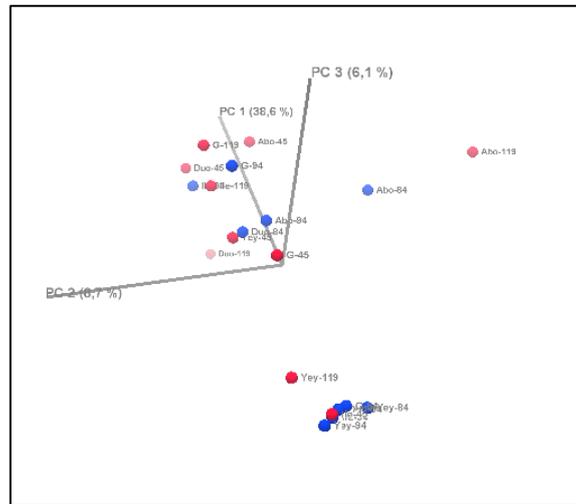


Figura 12: Análisis de Componentes Principales en tres dimensiones (3D) para todas las muestras. Se ve en rojo las muestras de la línea susceptible y en azul las muestras de la línea resistente.

Al realizar un gráfico de PCA para cada uno de los tejidos individualmente, observamos una clara separación debido al primer componente () principal para todos los tejidos.

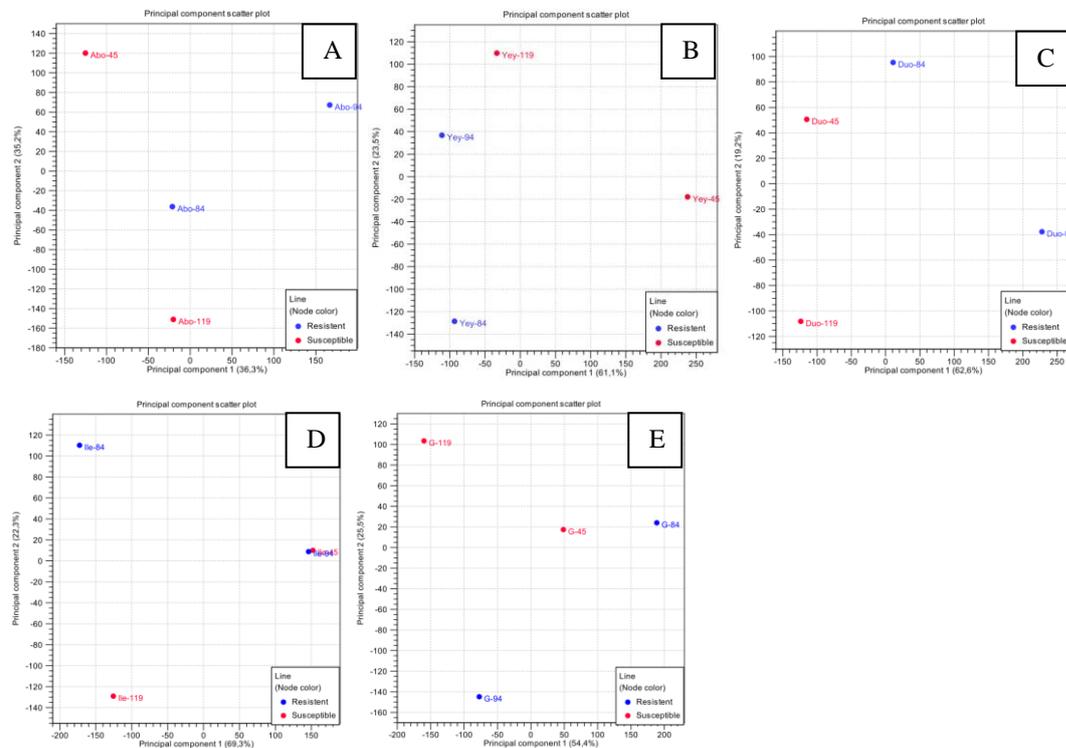


Figura 13: Análisis de Componentes principales para las muestras de: A: Abomaso, B: Duodeno, C: Yeyuno, D: Íleon, E: Ganglio. Se ven en rojo las muestras de la línea susceptible (45 y 119) y en azul las muestras de la línea resistente (84 y 94).

Para todos los tejidos cuando se realiza el gráfico de PCA de manera individual se puede observar una separación entre las muestras. Sería de una mejor visualización aumentar el número de muestras de estos trabajos con el fin de lograr una clara tendencia de agrupación. En nuestro caso, al ser solamente 4 animales (2 por condición) la visualización de la separación no es tan clara. En algunos experimentos se observa que la separación de puntos se da de manera más marcada que otros. En el único tejido donde observamos que la separación de puntos se da de manera más marcada que otros. En el único tejido donde obtuvimos un solapamiento entre muestras resistentes y susceptibles en el gráfico fue para el íleon.

9.6.4 Diagramas de *Volcano Plot*

Realizamos una serie de diagramas de *Volcano Plot* para observar la dispersión de los valores de expresión de los genes, graficando el $-\log_{10}$ del p-valor en función de sus valores de *Fold Change*. *Fold Change* = expresión del animal susceptible / expresión animal resistente.

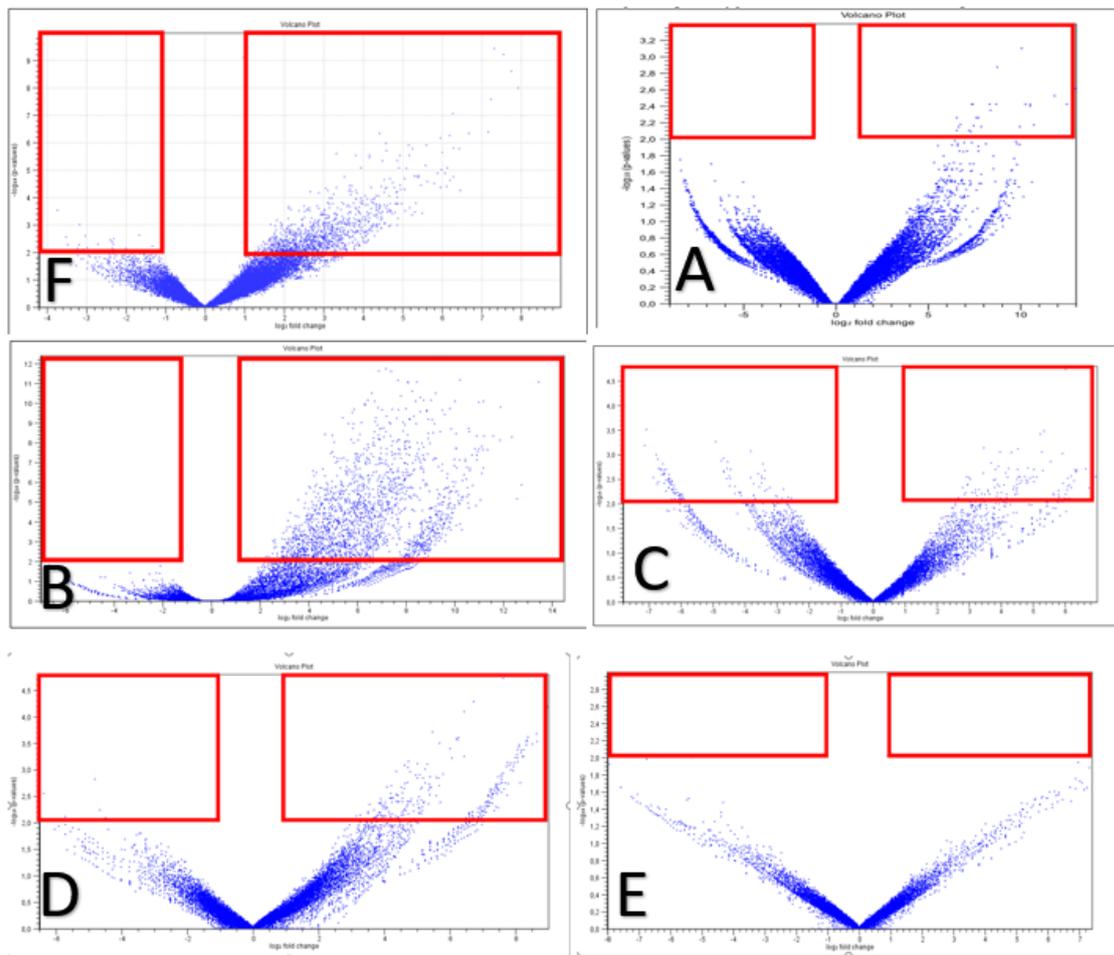


Figura 14: *Volcano Plot* para el análisis de todos los tejidos. Se recuadra en color rojo los puntos seleccionados que se encuentran dentro de los parámetros; p-valor < 0.01 ($-\log_{10}$ p-valor > 2) y FC >|2| que para el caso de los animales susceptibles $\log_2FC > 2$ y para el caso de los animales resistentes $\log_2FC < -2$. A: Abomaso; B: Duodeno; C: Yeyuno; D: Íleon; E: Ganglio F: Todos los tejidos resistentes vs susceptibles.

En la figura 14 se concentran las gráficas de *Volcano Plot* que realizamos para cada tejido individual (A, B, C, D, E) y para la totalidad de los tejidos (F). Se aprecia claramente que la sobreexpresión de genes (recuadros en rojo) en el lado derecho del gráfico es mucho mayor que el izquierdo. Esto corresponde a genes sobreexpresados en la condición susceptible donde el $\log_2FC > 2$ (Fold Change = Expresión Susceptible / Expresión Resistente). Cuando se utiliza la totalidad de los tejidos para realizar el estudio, se observa que ésta característica se conserva. En el único tejido donde no se lograron detectar genes de expresión diferencial que cumplan estas características fue en el tejido del íleon (E).

El número de genes observado bajo las condiciones de estudio y dentro de los parámetros estudiados p-valor < 0.01 y $FC > |2|$ se detalla en las tablas de los capítulos siguientes.

9.7 Estudios de Expresión diferencial entre las muestras Resistentes y Susceptibles

9.7.1 Genes obtenidos por expresión diferencial

Las listas se obtuvieron utilizando el modelo estadístico que usa el software CLC Genomic Workbench 9.5 software (CLC bio, Aarhus, Denmark). Realizamos un listado con el número de genes que logramos identificar utilizando distintos criterios de selección (*Fold Change*, p-valor, *False Discovery Rate*).

Tabla 12: Número de genes DE en cada tejido determinados mediante la utilización de los parámetros p-valor, FDR y *Fold Change*.

Genes de Expresión diferencial animales resistentes vs susceptibles						
Tejidos	Todas las muestras	Abomaso	Ganglios	Duodeno	Yeyuno	Íleon
FDR<0,01 + p-valor < 0,01 + FC > 2 	34	0	0	29	0	0
p-valor < 0,01 + FC > 2 *1	1110	268	307	1997	3583	1
p-valor < 0,05 + FC > 2 	3158	1491	1357	6053	4429	128 *2

*1: de aquí en más, nos referiremos a las listas generadas con estas condiciones de p-valor y FC para realizar los análisis de ontología genética (tanto para los genes DE en el tejido, como para solamente los genes regulados positivamente y negativamente (*upregulated* y *downregulated*)). *2: En Íleon se utilizó el listado generado con p-valor = 0.05, ya que con p-valor = 0.01 se obtuvo solamente 1 gen DE.

9.8 Análisis de las listas de genes de expresión diferencial obtenidas

En los anexos 2, 3, 4, 5, 6 y 7 se encuentran los listados completos de genes de expresión diferencial generados para cada tejido, como también para el análisis del total de las muestras (todos los tejidos resistentes vs todos los tejidos susceptibles). Dentro de cada archivo están diferenciados por *Fold Change*

los genes que cambian de expresión, regulándose positivamente para el resistente (sobreexpresados en los animales resistentes) y regulados negativamente para el resistente (sobreexpresados en los animales susceptibles).

Una vez obtenidas las listas de genes de expresión diferencial para el total de las muestras (todos los tejidos resistentes vs todos los tejidos susceptibles) y para cada tejido en particular, realizamos un análisis de anotación funcional. Las condiciones de selección de los genes fueron: p-valor <0.01 y *Fold Change* > |2| tanto para los genes regulados positivamente (*up regulated*) como los regulados negativamente (*down regulated*). Solamente en el tejido del Íleon no se encontraron genes que cumplan con este criterio, por lo que el p-valor se bajó hasta un valor de 0.05 para obtener un listado para trabajar

9.8.1 Análisis de los genes de expresión diferencial utilizando todos los tejidos resistentes y susceptibles (20 tejidos en total) y su anotación funcional

Para el análisis global del trabajo utilizamos el listado final de 1110 genes (tabla 12), todos con p-valor < 0.01 y $FC > |2|$. En la tabla 13 se puede observar un listado de los genes con los valores más extremos para cada condición (R y S), donde además de sus valores de significancia, se pueden observar sus valores medios de expresión (valores expresados en TPM).

Mediante la utilización de la herramienta DAVID v6.8 logramos además identificar listas de vías funcionales utilizando los listados de genes generados a partir de los datos de expresión. Nuestro primer análisis fue trabajar con los datos de todos los tejidos resistentes y susceptibles para observar el panorama general.

Tabla 13: Listado de los genes DE más extremos en el total de tejidos resistentes vs susceptibles con mayor nivel de significancia.

Gene Symbol	Fold Change	P-valor	Media Resistente	Media Susceptible	Regulación de Genes
APOA4	159,94	3,84E-10	10,09	274,39	Sobreexpresado en la condición Susceptible
ASAH2	188,47	6,24E-10	3,29	246,68	Sobreexpresado en la condición Susceptible
APOC3	501,02	1,41E-09	1,09	195,61	Sobreexpresado en la condición Susceptible
APOA1	216,35	2,58E-09	15,9	1.269,80	Sobreexpresado en la condición Susceptible
NPC1L1	244,22	1,01E-08	0,1	9,56	Sobreexpresado en la condición Susceptible
ANGPTL3	151	2,67E-08	1,19	34,02	Sobreexpresado en la condición Susceptible
LCT	144,21	4,09E-07	8,33E-03	5,5	Sobreexpresado en la condición Susceptible
SLC5A12	102,32	4,52E-07	0,45	20,4	Sobreexpresado en la condición Susceptible
PHF5A	77,98	1,63E-06	0	18,99	Sobreexpresado en la condición Susceptible
ABCC2	86,12	1,68E-06	0,64	36,37	Sobreexpresado en la condición Susceptible
ALPI	78,24	1,82E-05	0,24	5	Sobreexpresado en la condición Susceptible
F13B	88,6	5,53E-05	0	2,79	Sobreexpresado en la condición Susceptible
ENSOARG00000005549	-17,76	8,32E-06	440,26	29,11	Sobreexpresado en la condición Resistente
OR10V1	-13,25	2,91E-04	15,82	0,57	Sobreexpresado en la condición Resistente
ITLN1	-8,19	2,52E-03	15,29	4,14	Sobreexpresado en la condición Resistente
ENSOARG00000018584	-5,27	3,57E-03	11,92	1,88	Sobreexpresado en la condición Resistente

FSTL4	-6,58	5,00E-03	5,36	0,3	Sobreexpresado en la condición Resistente
ENSOARG00000008077	-9,09	5,46E-03	36,3	0,44	Sobreexpresado en la condición Resistente
SYNPO2L	-7,89	7,01E-03	12,32	0,13	Sobreexpresado en la condición Resistente
MAGEA3	-5,07	7,22E-03	19,42	2,03	Sobreexpresado en la condición Resistente
ZCCHC5	-9,37	7,32E-03	5,74	0,00	Sobreexpresado en la condición Resistente
ENSOARG00000000628	-5,54	8,37E-03	8,68	0,79	Sobreexpresado en la condición Resistente
VAT1L	-5,47	9,41E-03	6,92	0,72	Sobreexpresado en la condición Resistente
GTSF1L	-8,82	9,97E-03	16,04	0	Sobreexpresado en la condición Resistente

En las tablas 14 y 15 se pueden observar además las diferentes vías obtenidas para la condición resistente y para la condición susceptible.

Tabla 14: Principales vías metabólicas detectadas mediante la utilización de los genes regulados negativamente en los animales resistentes cuando se trabaja con todas las muestras resistentes y todas las muestras susceptibles. Los genes de las listas presentaban p-valor < 0.01 y FC > |2|.

Vía Metabólica KEGG	Genes	%	p-valor
Digestión y Absorción de Vitaminas	7	4.4	9.5E-8
Digestión y Absorción de Grasas	7	4.4	2.0E-5
Rutas metabólicas	30	18.8	5.5E-5
Ruta de señalización PPAR	7	4.4	1.1E-4

De las vías descritas, la ruta de señalización PPAR nos parece interesante destacar y que más adelante comentaremos ya que esta vía vuelve a aparecer cuando se analizan otros tejidos.

Tabla 15: Principales vías metabólicas detectadas mediante la utilización de los genes regulados positivamente en los animales resistentes cuando se trabaja con todas las muestras resistentes y todas las muestras susceptibles. Los genes de las listas presentaban p-valor < 0.01 y FC > |2|.

Vía Metabólica KEGG	Genes	%	p-valor
Metabolismo del piruvato	3	2.7	2.4E-2
Metabolismo del carbono	4	3.5	3.1E-2
Biosíntesis de antibióticos	5	4.4	4.2E-2
Carcinoma de células renales	3	2.7	5.8E-2
Vías metabólicas	13	11.5	6.7E-2
Biosíntesis de aminoácidos	3	2.7	7.1E-2

En el cuadro anterior se observa como los genes sobreexpresados en los animales resistentes permiten identificar vías de expresión, pero el p-valor de las mismas no fue significativo. Además, observese que el número de genes pertenecientes a dichas vías no son demasiados.

Utilizamos también la herramienta IPA - Ingenuity Pathway Analysis QIAGEN® (versión de prueba) para la búsqueda de las funciones de estos genes y de su interacción, con el fin de obtener más resultados. En las tablas 15, 16 y 17 se observan los resultados obtenidos con éste programa. A diferencia del uso de DAVID, este software tiene actualizaciones interesantes en el tema de la salud animal, por lo que nos parece muy interesante observar las salidas que se puedan generar con este programa. En la tabla 16, donde se detallan las vías metabólicas más interesantes, se observa a la vía de activación LXR/RXR y de

FXR/RXR, responsables de metabolismos lipídicos, inflamación y de LPS/IL1 como componente importante del desarrollo de la respuesta inmune innata.

Tabla 16: Vías metabólicas destacadas en el estudio global de resistentes y susceptibles (IPA - QIAGEN).

Vías metabólicas más significativas	p-valor
Mitochondrial Dysfunction	7.49E-08
FXR/RXR Activation	1.26E-07
Oxidative Phosphorylation	6.69E-07
LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function	3.88E-06
LXR/RXR Activation	1.24E-05

En la tabla 17, se puede observar cómo se determinó también a los genes reguladores del sistema global, a los genes del receptor nuclear de activación de proliferación de peroxisomas (PPAR α y γ) quien está relacionado a la regulación de la expresión de varios genes involucrados tanto en diferenciación celular como en metabolismo de lípidos y proteínas. También se detectó como regulador al gen HNF4 α quien juega un importante rol en el desarrollo del hígado y el intestino.

Tabla 17: Genes reguladores destacados en el estudio global de principales vías encontradas entre animales resistentes y susceptibles (IPA-QIAGEN).

Genes Reguladores Positivos	p-valor
HNF4 α	3.24E-16
PPAR α	3.24E-15
RXRA	2.45E-11
Dexamethasona	2.89E-11
PPAR γ	1.94E-10

Se detalla en la tabla 17, una lista de enfermedades y patologías que son generadas a partir de la lista de genes de expresión diferencial que obtuvimos al comienzo de los análisis. Los resultados son interesantes ya que lo que se plantea es que existen enfermedades hematológicas, enfermedades metabólicas y enfermedades gastrointestinales. Estos resultados confirman que las listas de genes obtenidas en una primera instancia son fieles a la problemática que estamos estudiando.

Tabla 18: Enfermedades y desórdenes asociados en el estudio global de resistentes y susceptibles (IPA – QIAGEN).

Enfermedades y Desórdenes *		
Nombres	# Genes	p-valor
Enfermedades Hematológicas	49	2.00E-06
Enfermedades Metabólicas	87	2.00E-06
Enfermedades Cardiovasculares	51	5.87E-06
Daño y anomalías en el organismo	461	5.87E-06
Enfermedades Gastrointestinales	97	6.60E-06

*Para este estudio, se utilizó un listado de 1110 genes, seleccionados bajo las condiciones de p-valor < 0.01 y FC >|2|.

Una vez obtenido este panorama general que se nos permitió realizar con la versión de prueba de la herramienta de genómica funcional IPA y con la herramienta DAVID v6.8 Beta (Huang *et al.*, 2009), realizamos el mismo trabajo sobre los listados de genes de expresión diferencial para cada tejido en particular.

9.8.2 Análisis de los genes de expresión diferencial para abomaso y su anotación funcional

Para el análisis del abomaso, utilizamos el listado de 268 genes DE, generados en el punto 8.9.1, para confeccionar la tabla 12. Todos los genes fueron seleccionados por su p-valor < 0.01 y $FC > |2|$. En la siguiente tabla se detallan los principales genes con mayor nivel de significancia, diferencialmente expresados para la condición resistente y susceptible.

Tabla 19: Listado de los genes DE en abomaso con mayor nivel de significancia para cada condición.

Nombre del Gen	Fold Change	P-valor	Media Resistente	Media Susceptible	Regulación de Genes
PFN1	64,95	1,81E-05	0,53	20,03	Sobreexpresado en la condición susceptible
BLK	40,57	3,32E-04	0,03	1,37	Sobreexpresado en la condición susceptible
LGALS9B	37,6	3,85E-04	0,05	2,07	Sobreexpresado en la condición susceptible
HLA-A	11,02	7,25E-04	2,63	36,89	Sobreexpresado en la condición susceptible
RALB	23,16	7,70E-04	0,05	1,27	Sobreexpresado en la condición susceptible
ALDH4A1	15,7	8,91E-04	0,6	8,1	Sobreexpresado en la condición susceptible
ENSOARG00000026999	38,95	8,91E-04	9,43	505,58	Sobreexpresado en la condición susceptible
PON2	20,12	9,07E-04	0,68	9,39	Sobreexpresado en la condición susceptible
ZBTB42	60,46	9,46E-04	1,62	188,88	Sobreexpresado en la condición susceptible
SERINC1	28,63	1,85E-03	0,15	4,17	Sobreexpresado en la condición susceptible
MUC3A	100,27	1,96E-03	0,04	0,45	Sobreexpresado en la condición susceptible
SH2D4B	-135,53	3,07E-04	1,86	0,03	Sobreexpresado en la condición resistente
CEP68	-97,44	2,04E-03	0,97	0,05	Sobreexpresado en la condición resistente
CBL	-25,08	2,28E-03	4,24	0,33	Sobreexpresado en la condición resistente
ENSOARG00000025330	-82,89	2,56E-03	1,5	0,64	Sobreexpresado en la condición resistente
ENSOARG00000025630	-22,52	2,77E-03	0,85	0,07	Sobreexpresado en la condición resistente
PDIA5	-13,99	2,93E-03	3,75	0,15	Sobreexpresado en la condición resistente
ENSOARG00000005549	-21,93	3,06E-03	121,6	3,72	Sobreexpresado en la condición resistente
TMEM200C	-81,98	3,13E-03	0,77	0,01	Sobreexpresado en la condición resistente
U6	-11,06	3,74E-03	1,8	0,22	Sobreexpresado en la condición resistente
ITLN1	-11,73	4,50E-03	26,96	1,31	Sobreexpresado en la condición resistente

En esta lista, se destacan sobreexpresados algunos genes de interés como la Intelectina 1 (ITLN1) en los animales resistentes, y el gen de la mucina intestinal (MUC3) y del Complejo mayor de Histocompatibilidad de clase I, (HLA-A) en los animales susceptibles.

Utilizando los listados de genes descritos para la regulación positiva en el abomaso de los animales resistentes no se logró la verificación de vías funcionales significativas ya que el número de genes era demasiado bajo. Si logró realizarse para la regulación negativa de animales resistentes, aunque tampoco se evidenciaron vías metabólicas significativas (tabla 20).

Tabla 20: Principales vías metabólicas detectadas mediante la utilización de los genes regulados negativamente para la condición resistente en Abomaso. Los genes de las listas presentaban p-valor < 0.01 y FC > |2|.

Vía Metabólica KEGG	Genes	p-valor
Enfermedad de Alzheimer (disfunción mitocondrial)	5	4.5E-1
Actividad Ribosomal	3	8.8E-1

9.8.3 Análisis de los genes de expresión diferencial para duodeno y su anotación funcional

Para el análisis del duodeno, utilizamos el listado de 1997 genes DE, generados en el punto 8.9.1, para confeccionar la tabla 12. En la tabla 21 se detallan los principales genes con mayor nivel de significancia (todos con p-valor < 0.01 y FC > |2|), diferencialmente expresados para la condición resistente y susceptible.

Tabla 21: Listado de los genes DE en duodeno con mayor nivel de significancia para cada condición

Nombre	Fold Change	P-valor	Media Resistente	Media Susceptible	Regulación
ANGPTL3	2325,93	2,2E-08	0,1	128,44	Sobreexpresado en la condición Susceptible
IL22RA1	4415,45	3,4E-08	0,1	155,07	Sobreexpresado en la condición Susceptible
POGZ	2076,14	3,4E-08	0,1	37,86	Sobreexpresado en la condición Susceptible
SLC37A2	1072,18	8,8E-08	1,22	324,3	Sobreexpresado en la condición Susceptible
DGAT2	425,99	1,9E-07	1,38	112,35	Sobreexpresado en la condición Susceptible
APOC3	8068,53	4,1E-07	0,1	858,29	Sobreexpresado en la condición Susceptible
SAR1B	3772,1	5,8E-07	0,1	155,62	Sobreexpresado en la condición Susceptible
MUC3A	5824,01	1,0E-06	0,73	1743,57	Sobreexpresado en la condición Susceptible
TWF1	327,32	1,0E-06	2,35	215,62	Sobreexpresado en la condición Susceptible
FRK	1493,47	1,2E-06	0,1	63,87	Sobreexpresado en la condición Susceptible
ANKMY2	169,38	1,3E-06	2,14	107,11	Sobreexpresado en la condición Susceptible
PEAK1	165,7	1,4E-06	0,48	24,81	Sobreexpresado en la condición Susceptible
TACC2	1255,53	1,4E-06	0,1	10,11	Sobreexpresado en la condición Susceptible
MYADM	-32,01	9,7E-05	26,1	0,22	Sobreexpresado en la condición Resistente
ENSOARG00000026716	-295,82	1,0E-04	13,7	0,1	Sobreexpresado en la condición Resistente
ENSOARG00000026262	-254,22	1,7E-04	16,16	0,1	Sobreexpresado en la condición Resistente
OR6B1	-260,83	1,8E-04	12,7	0,1	Sobreexpresado en la condición Resistente
SNORD88	-250,69	1,9E-04	15,53	0,1	Sobreexpresado en la condición Resistente
U6	-243,18	2,0E-04	15,32	0,1	Sobreexpresado en la condición Resistente
ENSOARG00000027021	-21,98	2,7E-04	17,53	0,32	Sobreexpresado en la condición Resistente
OR10G9	-71,15	3,3E-04	18,94	0,04	Sobreexpresado en la condición Resistente
ENSOARG00000025790	-208,15	3,5E-04	17,02	0,1	Sobreexpresado en la condición Resistente
OR1F1	-205,58	3,7E-04	13,78	0,1	Sobreexpresado en la condición Resistente
U6	-231,5	4,1E-04	33,16	0,1	Sobreexpresado en la condición Resistente
ENSOARG00000025768	-215,74	5,2E-04	17,25	0,1	Sobreexpresado en la condición Resistente

En la tabla 22 se pueden observar las vías funcionales detectadas, más significativas. Entre ellas se destaca la vía de activación PPAR por su alto valor de significancia. Para regulación positiva de Duodeno no se logró determinar una vía funcional clara, ya que no eran suficientes para determinar una vía metabólica.

Tabla 22: Principales vías metabólicas detectadas mediante la utilización de los genes regulados positivamente en los animales susceptibles para Duodeno. Los genes de las listas presentaban p-valor < 0.01 y FC > |2|.

Vía Metabólica KEGG	Genes	p-valor
<u>PPAR signaling pathway</u>	18	4.5E-7
Arginina y metabolismo de la prolina	11	1.2E-3
Metabolismo de los ácidos grasos	9	2.0E-3
Vía de señalización p53	11	4.2E-3
Metabolismo del ascorbato y aldarato	5	6.9E-3
Degradación de valina, leucina e isoleucina	8	1.8E-2
<u>mTOR signaling pathway</u>	8	3.8E-2

9.8.4 Análisis de los genes de expresión diferencial para yeyuno y su anotación funcional

Para el análisis del Yeyuno, utilizamos el listado de 3583 genes DE, generados en el punto 8.9.1, para confeccionar la tabla 12. En la tabla 23 se detallan los principales genes con mayor nivel de significancia (todos con p-valor < 0.01 y FC > |2|), diferencialmente expresados para la condición resistente y susceptible.

Tabla 23: Listado de los genes DE en yeyuno con mayor nivel de significancia para cada condición.

Nombre	Fold Change	P-valor	Media de Resistentes	Media de Susceptibles	Regulación de Genes
IRF1	285,90	1,11E-16	0,89	111,35	Sobreexpresado en la condición Susceptible
CLSTN1	291,05	1,11E-16	2,63	302,27	Sobreexpresado en la condición Susceptible
AUTS2	351,29	1,11E-16	3,6	426,98	Sobreexpresado en la condición Susceptible
MYL6	611,81	1,11E-16	6,34	1.091,63	Sobreexpresado en la condición Susceptible
NET1	1.076,98	1,11E-16	1,35	404,31	Sobreexpresado en la condición Susceptible
BCLAF1	690,41	1,11E-16	1,27	212,47	Sobreexpresado en la condición Susceptible
MUC3A	17.055,26	1,11E-16	0,1	333,22	Sobreexpresado en la condición Susceptible
MYH14	144,95	4,44E-16	3,64	151,26	Sobreexpresado en la condición Susceptible
LMO7	118,58	6,66E-16	4,5	160,25	Sobreexpresado en la condición Susceptible
MYH11	169,47	7,77E-16	3,05	140,5	Sobreexpresado en la condición Susceptible
EIF5	1.189,64	2,22E-15	3,21	1.051,11	Sobreexpresado en la condición Susceptible
EZR	203,96	2,66E-15	12,09	608,75	Sobreexpresado en la condición Susceptible
MYH9	268,34	3,33E-15	2,95	239,84	Sobreexpresado en la condición Susceptible
U6	-4,29	1,11E-03	855,64	78,49	Sobreexpresado en la condición Resistente
RHOBTB2	-4,77	2,91E-03	116,63	13,45	Sobreexpresado en la condición Resistente
ENSOARG00000025536	-10,14	3,04E-03	68,04	3,32	Sobreexpresado en la condición Resistente
MSLNL	-23,34	5,49E-03	56,99	0,32	Sobreexpresado en la condición Resistente
ALOXE3	-20,72	5,81E-03	23,3	0,59	Sobreexpresado en la condición Resistente
U6	-6,84	7,96E-03	5,16	0,23	Sobreexpresado en la condición Resistente
CD163L1	-6,91	9,34E-03	78,89	6,12	Sobreexpresado en la condición Resistente
ENSOARG00000000628	-60,35	9,84E-03	30	0,1	Sobreexpresado en la condición Resistente

En la tabla 24 se pueden observar las vías funcionales detectadas, más significativas. Entre ellas se destaca la vía mTOR por su alto nivel de significancia, y también en el listado aparece la vía de

activación PPAR. Para regulación positiva de Yeyuno no se determinaron vías funcionales utilizando los listados de genes ya que no eran suficientes para determinar una vía metabólica.

Tabla 24: Principales vías metabólicas detectadas mediante la utilización de los genes regulados negativamente en los animales resistentes para Yeyuno. Los genes de las listas presentaban p-valor < 0.01 y FC > |2|.

Vía Metabólica KEGG	Genes	p-valor
<u>mTOR signaling pathway</u>	25	7.2E-6
Actividad Ribosomal	33	7.1E-5
Endocitosis	56	2.1E-4
Proteosoma	20	5.4E-4
Infección Escherichia coli patógena	22	1.2E-3
Vía de señalización del receptor de células T	35	1.2E-3
ErbB signaling pathway	26	1.1E-3
Metabolismo de los ácidos grasos	14	1.1E-3
<u>PPAR signaling pathway</u>	19	1.1E-3

9.8.5 Análisis de los genes de expresión diferencial para íleon y su anotación funcional

Para el análisis del Íleon, utilizamos el listado de 128 genes DE, generados en el punto 8.9.1, para confeccionar la tabla 12. En la tabla 23 se detallan los principales genes con mayor nivel de significancia (todos con p-valor < 0.05 y FC > |2|), diferencialmente expresados para la condición resistente y susceptible. Aquí utilizamos el listado generado mediante el criterio de selección p-valor < 0.05 en lugar de 0.01. Con el criterio que se venía seleccionado, en íleon solamente se obtuvo 1 solo gen. Por lo que realizamos el trabajo con otro listado, aunque sin resultados concluyentes ya que el número de genes no era suficiente.

Tabla 25: Listado de los genes DE en Íleon con mayor nivel de significancia para cada condición.

Nombre	Fold Change	P-valor	Media de Resistentes	Media de Susceptibles	Regulación
MRPL21	74,27	0,02	0,1	9,65	Negativa para Resistente
SGPP2	74,27	0,02	0,1	6,64	Negativa para Resistente
TMEM67	104,21	0,02	0,1	4,29	Negativa para Resistente
PQLC3	117,76	0,02	0,1	15,62	Negativa para Resistente
MICA	118,17	0,02	0,1	11,88	Negativa para Resistente
CYP7B1	135,85	0,02	0,1	1,9	Negativa para Resistente
RHNO1	142,19	0,02	0,1	3,88	Negativa para Resistente
PI3	151,12	0,02	0,1	19,77	Negativa para Resistente
FRAS1	35,98	0,03	0,42	2,13	Negativa para Resistente
PLA2G4B	40,42	0,03	0,1	5,61	Negativa para Resistente
DDX51	47,5	0,03	0,1	5,04	Negativa para Resistente
FAM105A	47,5	0,03	0,1	7,93	Negativa para Resistente
HSPA13	-245,63	0,01	21,44	0,1	Positiva para Resistente

ENSOARG00000005549	-108,67	0,01	1.557,33	55,16	Positiva para Resistente
ERO1B	-191,03	0,02	17,73	0,1	Positiva para Resistente
RPRD1A	-150,14	0,03	3,46	0,1	Positiva para Resistente
THUMPD2	-150,14	0,03	12,59	0,1	Positiva para Resistente
C1orf228	-146,04	0,03	8,63	0,1	Positiva para Resistente
CD34	-133,74	0,03	14,67	0,1	Positiva para Resistente
R3HCC1L	-131,88	0,03	7,65	0,1	Positiva para Resistente
CYP3A7	-125,54	0,03	9,62	0,1	Positiva para Resistente
RNF141	-44,25	0,03	42,42	0,51	Positiva para Resistente
KITLG	-42,66	0,03	45,38	0,56	Positiva para Resistente
TGDS	-19,97	0,03	69,26	7,21	Positiva para Resistente

De igual manera a lo realizado para los tejidos anteriores, el listado de genes diferencialmente expresados es muy escaso y los niveles de significancia no permitían trabajar con ellos. Por este motivo, para el tejido de íleon no se logró identificar más que 2 genes interesantes vinculados a las parasitosis. Uno fue el gen MICA (MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A) sobreexpresado en los animales susceptibles y el gen KITL (Tyrosine-Protein Kinase Kit Ligand) sobreexpresado para los animales resistentes, ambos genes descritos por Benavides *et al.*, (2016) reportados como cercanos a zonas QTL en el genoma del ovino relacionadas a PGI.

Con las condiciones de estos listados de genes, ninguna vía metabólica tanto para los regulados positivamente como para los regulados negativamente fue detectado utilizando los programas de análisis funcional.

9.8.6 Análisis de los genes de expresión diferencial para ganglio y su anotación funcional

Para el análisis del Ganglio, utilizamos el listado de 307 genes DE, generados en el punto 8.9.1, para confeccionar la tabla 12. En la tabla 26 se detallan los principales genes con mayor nivel de significancia, (p -valor < 0.01 y $FC > |2|$), diferencialmente expresados para la condición resistente y susceptible.

Tabla 26: Listado de los genes DE en Ganglio con mayor nivel de significancia para cada condición.

Nombre Oficial	Fold Change	P-valor	Media de Resistentes	Media de Susceptibles	Regulación
HMG20A	197,83	1,90E-05	0,2	10,92	Regulado Negativamente en Resistente
ENSOARG00000011986	105,36	5,24E-05	9,42	296,37	Regulado Negativamente en Resistente
TNPO3	497,68	6,13E-05	0,1	16,84	Regulado Negativamente en Resistente
DNMT3B	502,36	6,64E-05	0,1	19,34	Regulado Negativamente en Resistente
HIST3H2BB	86,25	8,11E-05	7,92	163,36	Regulado Negativamente en Resistente
UTP11L	44,25	1,93E-04	5,89	55,11	Regulado Negativamente en Resistente
EAF2	396,81	2,12E-04	0,1	52,85	Regulado Negativamente en Resistente
ZKSCAN8	335,81	2,40E-04	0,1	18,41	Regulado Negativamente en Resistente
BNIP2	77,1	2,47E-04	1,54	32,38	Regulado Negativamente en Resistente
CPSF2	73,31	2,60E-04	1,23	31,6	Regulado Negativamente en Resistente
CLN5	75,05	2,74E-04	2,49	51,61	Regulado Negativamente en Resistente
SMAP1	324,5	2,82E-04	0,1	22,54	Regulado Negativamente en Resistente
ENSOARG00000025956	-83,15	2,81E-03	22,42	0,1	Regulado Positivamente en Resistente
ENSOARG00000011294	-25,24	5,82E-03	58,96	0,82	Regulado Positivamente en Resistente
ENSOARG00000008077	-65,78	0,01	121,31	0,1	Regulado Positivamente en Resistente

FBXL16	-60,37	0,01	18,3	0,1	Regulado Positivamente en Resistente
ENSOARG00000015938	-47,4	0,01	16,53	0,1	Regulado Positivamente en Resistente

En la tabla 27 se puede observar el listado obtenido de vías funcionales determinadas con el listado de genes regulados negativamente para resistentes.

Tabla 27: Principales vías metabólicas detectadas mediante la utilización de los genes regulados negativamente en los animales resistentes para Ganglío. Los genes de las listas presentaban p-valor < 0.01 y FC > |2|.

Vía Metabólica KEGG	Genes	p-valor
Proteasoma	11	1.6E-4
Fosforilación oxidativa	18	1.3E-3
Ciclo celular	17	1.9E-3
Metabolismo de la pirimidina	14	2.1E-3
Lisosoma	15	5.6E-3
Reparación de la escisión de nucleótidos	8	8.6E-3
Actividad Ribosomal	12	9.0E-3

Los genes obtenidos de las listas no nos aportaron mayor información. Para el caso de los genes regulados positivamente en resistentes no se evidenciaron vías funcionales significativas,

9.9 Búsqueda de variantes SNP (Single Nucleotide Polymorphism) en regiones codificantes utilizando los datos de secuenciación del RNA-Seq

Se determinaron diferentes variantes dentro de las secuencias, basándonos en los mapeos obtenidos por RNA-Seq. La idea es realizar un estudio (prospectivo debido al bajo número de muestras del proyecto) de sesgo alélico debido a la expresión, observando que alelos se expresan significativamente diferente para la línea resistente o en la línea susceptible.

Se generó un único archivo de mapeo sobre el genoma utilizando todas las secuencias de los 20 tejidos. Una vez generado el mapeo, se estableció el origen de cada muestra mapeada determinando la condición (resistente o susceptible) a la que pertenece cada una. Se adjunta en el Anexo 8, las tablas completas extraídas de las variantes de encontradas.

Tabla 28: Variantes de secuencia detectadas en el genoma de ovinos mediante la utilización de las secuencias de RNA-Seq. p-valor < 0.01 y un MAF > 0.01 (>1%)

Variantes de Secuencia Detectadas	Número
SNP (Variaciones de Nucleótido Simple)	137
MNP (Variaciones de Múltiples Nucleótidos –Indels)	11
Inserciones (de una sola base)	5
Deleciones (de una sola base)	11
Total	164

Se puede observar en la tabla 28, el número de variantes alélicas obtenidas diferenciales entre las condiciones resistentes y susceptibles. Una vez generado este archivo de variantes, con sus respectivos valores de significancia (p-valor) se procedió a utilizar una herramienta de análisis para volver a mapear

éstos SNP sobre el genoma del ovino y detectar a qué regiones o genes pertenecen. Para esto utilizamos la herramienta SNP & Variation Suite v8.x (Golden Helix, Inc., Bozeman, MT, www.goldenhelix.com).

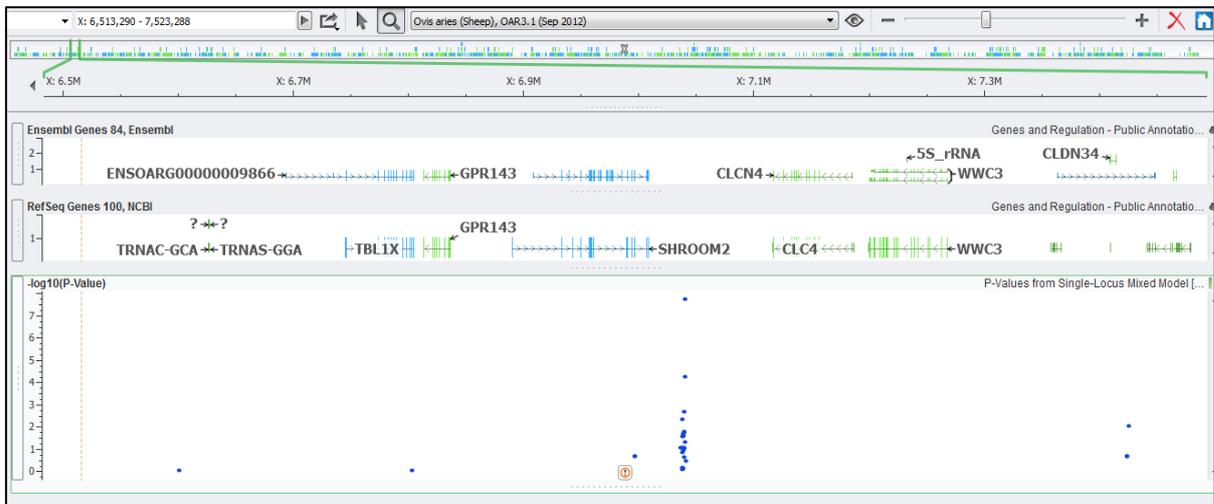


Figura 15: Visualización del estudio de asociación entre los SNP con su p-valor obtenido mediante el mapeo de las secuencias, insertado en la anotación del genoma del ovino. En esta imagen se observa como algunas variantes se visualizan con un p-valor alto para el gen SROOM2.

Una vez obtenido el listado de las variantes de secuencia mapeadas en el genoma ovino, procedimos a listarlos junto a los genes o regiones donde pertenecen estos SNP detectados. En la tabla 29 se pueden observar los genes de mayor significancia que se asocian a estos SNP y su descripción, su posición en el cromosoma, su cambio de expresión como *Fold Change*. También al final de la tabla se asocian los valores de expresión (en TPM) para estos genes tanto en la condición resistente como en la condición susceptible (utilizando el listado generado con la totalidad de los tejidos).

Tabla 29: Genes a los que pertenecen los SNP de mayor significancia detectados entre las secuencias de RNA-Seq.

Código ENSEMBL	Nombre del Gen Asociado	Descripción del Gen	Crom.	Pos. Inicio	Pos. Final	<i>Fold Change</i>	Resistente – Media	Susceptible - Media
ENSOARG00000015627	Uncharacterized protein	Uncharacterized protein	2	111764195	111792248	-19,60	19,46	0,99
ENSOARG00000010121	SHROOM2	Shroom family member 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:630]	X	6925794	7070917	-5,83	8626,33	1480,44
ENSOARG00000003782	B2M	Beta-2-microglobulin [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:914]	7	99939421	99947652	-1,05	3838,63	3668,92
ENSOARG00000010766	DUX4	Double homeobox 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:50800]	9	7954	24038	-1,40	152,61	108,74
ENSOARG00000010873	DDX43	DEAD-box helicase 43 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:18677]	9	487377	602563	-6,52	13,24	2,03
ENSOARG00000010766	DUX4	double homeobox 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:50800]	9	14041	171717	-2,60	73,74	28,35
ENSOARG00000010254	CLCN4	chloride voltage-gated channel 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2022]	X	7107708	7358494	-3,42	2,83	0,83
ENSOARG00000012569	PRAME	preferentially expressed antigen in melanoma [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9336]	17	70303134	70312601	0,29	0,09	0,54
ENSOARG00000012537	IGLV9-49	[IMMUNOGLOBULIN LAMBDA LIGHT CHAIN VARIABLE REGION FRAGMENT	17	70230300	70231114	27,36	5,37	146,92
ENSOARG00000014519	Uncharacterized protein	Uncharacterized protein	3	106488075	106495744	1,34	0,44	0,59

10 DISCUSIÓN

En nuestro diseño experimental, dado los costos del sacrificio de los animales de líneas divergentes, trabajamos solamente con 2 réplicas biológicas (4 animales). Dado que la técnica de RNA-Seq permite la detección cuantitativa y de gran resolución de la expresión génica de un tejido, la utilización de 2 animales para cada condición, no fue en detrimento de la calidad de resultados como hemos visto en el trabajo. En un estudio *Power Analysis* (calculadora de potencia de Poisson) realizado por el Dr. Gonzalo Rincón con sus estudios previos (comunicación personal) compara el número de réplicas biológicas necesarias para observar un cambio en la expresión de genes de baja y alta abundancia en un experimento.

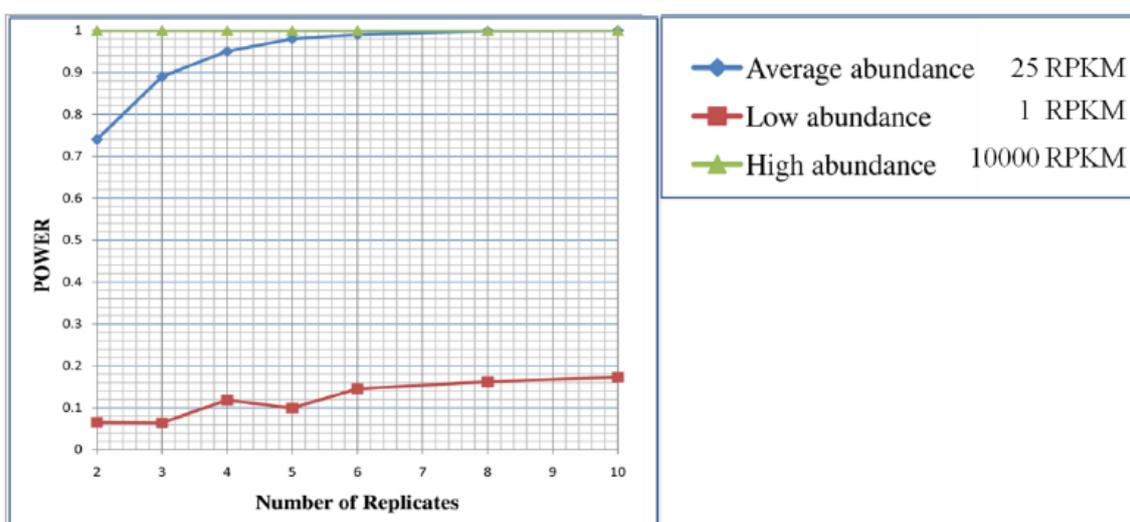


Figura 16: Poder de detección del valor *Fold Change* en 1.4 en relación al número de réplicas biológicas utilizadas.

Los datos de conteo, como los obtenidos por RNA-Seq, se aproximan a una distribución de Poisson. Es decir, la varianza de la expresión de la transcripción depende directamente de la abundancia de la transcripción. Al cuantificar la expresión génica por RPKM (Mortazavi *et al.*, 2008), la expresión de transcripción promedio en los datos generados por RNA-seq del equipo del Dr. Medrano, (2010), fue de ~ 25 RPKM (Medrano *et al.*, 2010). Utilizando una calculadora de potencia de Poisson (Lenth, 2007), tres replicas biológicas (N=3) proporcionan 89% de potencia para detectar un efecto de 1,4 veces el cambio en la transcripción (*Fold Change*). Para los valores de expresión, de genes de alta abundancia (>10000 RPKM) son perfectamente detectables incluso con una población de dos réplicas biológicas (N=2). Para transcritos de baja abundancia (<=1 RPKM), con tres repeticiones (N=3) sólo proporcionan suficiente potencia para detectar tamaños de efecto >3 y mas (*Fold Change*). Para detectar un pequeño cambio, como un cambio de 1,4 veces, en un transcripto de baja abundancia (<1RPKM), el número de réplicas biológicas necesarias para lograr una potencia adecuada (>=0,80) sería excesivamente alto contando con una población de sesenta y una réplicas (N=61) para esta propuesta. Como cuestión práctica, tres repeticiones para cada período de muestreo, proporcionarían la mayor cantidad de información para el menor número de animales y el costo asociado. En comparación con el número de muestras utilizadas en

el diseño de nuestro experimento, podemos verificar que el poder de resolución con el que contamos es suficiente para determinar diferencias en la expresión para genes tanto de expresión alta como de expresión media. Dada la gran variación observada en la expresión entre tejidos, sería muy útil poder utilizar un número mayor de muestras para lograr aumentar la precisión con la que logramos detectar estos genes. Si quisiéramos incluir un mayor número de animales para evidenciar genes expresados de manera poco abundante, deberíamos utilizar un número excesivamente elevado de animales para el trabajo. Debido a ello, sería de gran utilidad encontrar herramientas, como biopsias o fistulas animales, que permitan la obtención de suficiente material de calidad, como los utilizados en la presente tesis, sin perjuicio de la salud de los animales del experimento y que no interfiera con el mantenimiento de las líneas de ovinos divergentes a PGI.

El momento de la extracción de los tejidos de los animales (9-11 meses de edad) se realizó en un período en el cual su sistema inmunitario ya está lo suficientemente desarrollado como para lograr observar una adecuada respuesta a las PGI. En nuestras líneas divergentes, los procesos de infestación de los animales se dan de manera natural en el campo. Al observar los resultados, y en particular como se ha visto una sobreexpresión en los animales susceptibles y no en los animales resistentes, nos hace reflexionar sobre el modo de realizar este trabajo en un futuro, diseñando un sistema de infestación artificial tanto a los animales resistentes como a los susceptibles. La manera natural de infestación de los animales, pudo haber influenciado al momento de la colecta de los tejidos, los animales resistentes no habían sido desafiados con la carga parasitaria suficiente como para inducir una respuesta, similar a la generada por los animales susceptibles. Por este motivo suponemos que la diferencia de expresión en genes regulados positivamente en animales resistentes fue muy baja en varios tejidos. Es por ello que sería interesante para nuestras investigaciones futuras, no solo realizar los trabajos de extracción de tejidos en los picos de parasitismo utilizando infestaciones artificiales, sino también realizar la colecta de tejidos a lo largo de todo el proceso de infestación, con el fin de obtener una definición más clara del desarrollo de esa respuesta del ovino a lo largo del período.

Los tejidos fueron inicialmente seleccionados debido a que son órganos directamente vinculados a las parasitosis ya que son los primeros en presentar una respuesta a la infestación. Los datos de correlación entre las réplicas biológicas fueron altos, menos para el tejido del íleon. Suponemos que, en este caso, posiblemente se daba a algún tipo de contaminación en el sitio de extracción del tejido produciendo la baja correlación entre las expresiones de los tejidos del íleon tanto para los animales resistentes como para los animales susceptibles.

De 4 animales se obtuvieron un total de 20 muestras de diferentes tejidos (abomaso, duodeno, yeyuno, íleon y ganglios) se obtuvieron como resultado 20 archivos individuales con las secuencias del transcriptoma de cada tejido. Todas las secuencias generadas para los distintos tejidos evidenciaron una buena calidad, tanto en los valores de su estructura como de la información de secuencia. Los porcentajes de mapeo de las secuencias generadas para cada tejido sobre el genoma ovino fueron variables. Los motivos por los que la totalidad de las secuencias no lograron ser mapeadas en el genoma ovino pueden

deberse a problemas tanto en el ensamblaje del genoma ovino, como en la anotación de sus secuencias génicas, como también a algún pequeño problema de contaminación por material del parásito.

Al principio de los estudios creímos que la calidad de las secuencias, debido a que no se obtuvieron valores de RIN lo suficientemente altos, podrían ser la causa del bajo porcentaje de mapeo. Posteriormente, esa posibilidad fue descartada, ya que el porcentaje de mapeo para todas las secuencias se encontraban en el entorno del 90% en el genoma y de un 40% mapeada sobre la anotación. Al ser todos los porcentajes de mapeo bastante similares entre secuencias, no creemos sea causa de los valores de calidad del ARN previo a ser secuenciado.

En un intento por verificar estos porcentajes de mapeo, se descargaron secuencias de otros proyectos de RNA-Seq de ovinos de repositorios públicos (EMBL-EBI y SRA-NCBI) y se realizaron los mismos procesos y parámetros de mapeo sobre el genoma ovino. Se concluyó positivamente en que la calidad de las secuencias era el esperado ya que los porcentajes de mapeo fueron similares entre las muestras.

Para el mapeo sobre el genoma ovino, utilizamos una herramienta (LGRM) para mejorar los sitios de anotación ovinos. Un gran porcentaje de las lecturas mapean tanto en intrones como en regiones intergénicas. Realizamos un mapeo de las lecturas, tanto pareadas como no pareadas, y en la comparación final se evidenció solamente una muy leve variación en los porcentajes de mapeo. Por ese motivo no continuamos con este trabajo de importación de lecturas sin ser pareadas y utilizamos las secuencias en el formato que se generaron las librerías en secuenciación *Pair End*.

Un dato que nos resultó interesante, pero en el que no profundizamos en esta tesis, fue que para la realización de una anotación mejorada del genoma en el que utilizamos todas las secuencias, encontramos un total de 137,297,249 lecturas (aproximadamente unas 6: de secuencias por tejido) que no mapearon en el genoma ovino (Tabla 7). Sería muy interesante trabajar con este archivo de secuencias y observar si parte de éstas pertenecen a genomas de parásito(s), a cuáles y si estas secuencias pertenecen a algún tipo de genes de importancia para la sobrevivencia del parásito en el huésped, como también observar si es un porcentaje interesante de contaminación al utilizar muestras de intestino. También, sería interesante mapear estas secuencias, en genomas de otros mamíferos con el fin de lograr detectar genes no anotados aún en el genoma del ovino.

Entrando en los análisis estadísticos, realizamos un estudio de componentes principales (Figura 11) donde se observa a todas las muestras del estudio. Tanto las muestras pertenecientes a animales resistentes como las muestras susceptibles, se aprecia una separación no muy acentuada. Existe una leve segregación de los datos a formar 2 regiones diferentes, donde el primer componente explicaría un 38,6% de la variación por la que se separarían las muestras. Esto puede deberse al perfil muy diferente de expresión de cada tejido, aunque es de esperar que con un número mayor de muestras éstas logran acentuar aún más la concentración de los puntos en las 2 regiones de la gráfica. La marcada diferencia de expresión entre tejidos y la diferencia entre resistentes y susceptibles puede estar generando un sesgo para visualizar grupos en el diagrama de componentes principales. De cualquier manera, es posible evidenciar la

tendencia a formar 2 grupos entre las muestras, en donde nuestra explicación para esta tendencia es debida a los grupos de resistencia y susceptibilidad.

Realizamos también un pequeño análisis prospectivo que no incluimos en la tesis, de agrupación de muestras dependientes del perfil de expresión de los genes (Clusters - HeatMap) (Anexo 15). Este resultado evidenció que el perfil de expresión propio de cada tejido marca mayores diferencias de expresión que la sutil diferencia entre resistencia o susceptibilidad. Solo era posible evidenciar o agrupar entre resistentes y susceptibles cuando se realizaba el agrupamiento para cada tejido individualmente. Se puede apreciar en la Figura 22 que el comportamiento de la expresión génica de Duodeno, Yeyuno e Íleon fue bastante similar entre sí, al compararla con los perfiles de expresión de Ganglio y Abomaso. Pudimos ver una tendencia a que el perfil de expresión de las distintas porciones de intestino, es muy similar entre ellos. Tanto en el intestino como en el abomaso, el material de partida era la mucosa. Es por eso que, al agrupar todas las muestras, los ganglios se encuentran en una zona más distante, luego vienen los abomasos y a continuación el resto de los tejidos intestinales. Abomaso e intestinos son más cercanos en su perfil de expresión de genes (el material de partida en ambos tejidos fue la mucosa) en comparación con el ganglio (de donde se retiró tejido del centro del nódulo). Esto es una tendencia, debería de ser comprobable con un número mayor de muestras.

Se realizaron también gráficos del estilo *Volcano Plot* donde básicamente se utilizan para interpretar visualmente los resultados de los valores que se obtienen del diferencial de expresión de los genes y su significancia. Con estos gráficos también observamos si la distribución de genes es uniforme entre muestras. Para la mayoría de los tejidos, como se observa en la figura 14, se observa una sobreexpresión de genes mucho más acentuada en los tejidos susceptibles. Como hemos comentado, inferimos esta sobreexpresión en los animales susceptibles, debido a una menor respuesta en los animales resistentes. En el íleon no se observa sobreexpresión en ninguna de las líneas, ya que la disposición de los puntos no permite una visualización clara. Esto se condice con los resultados posteriores, observando las listas de genes de expresión diferencial donde no se encontraron genes con valores significativos (solamente se observó un gen de valor significativo sin ningún tipo de vinculación a las PGI).

10.1 Análisis funcional de los genes con expresión diferencial

Muchos de los genes descritos al realizar el análisis de expresión diferencial con la totalidad de las secuencias utilizando todos los tejidos resistentes y todos los tejidos susceptibles, presentan interés ya que han sido reportados en estudios previos en relación las infecciones parasitarias en ovinos y bovinos. También es de destacar que no todos los genes observados en las líneas de expresión diferencial fueron reportados y que también fue una tarea muy interesante estudiar gen a gen la vinculación con el desarrollo de la respuesta a la infestación a parásitos. Muchos de los genes detectados (tabla 13), tanto para el estudio global como para el estudio individual de cada tejido, mostraron regiones donde hay genes hipotéticos, genes creados por programas o genes recientemente descubiertos, pero sin función conocida hasta el momento (ENSOARG00000005549, ENSOARG00000018584, ENSOARG00000008077,

ENSOARG0000000628, etc.). Muchos de estos genes corresponden a lincRNA o novel genes, genes que aún no tienen función conocida o descrita. Realizamos la tarea de buscar por homología estos genes, pero tampoco logramos una identificación de estas secuencias.

En nuestro trabajo, la regulación positiva de la ITLN1 se da en los animales de la línea resistente. Se encontraron genes que sí se identifican a una función conocida, y entre ellos se encuentra el gen de la Intelectina 1 (ITLN1). Varias líneas de investigación sugieren que las intelectinas reconocen agentes externos y pueden funcionar como una proteína de defensa en la inmunidad innata (Datta *et al.*, 2005). Distintos grupos han reportado las ITLN (French *et al.*, 2007; Athanasiadou *et al.*, 2011) donde se postulan hipótesis relacionadas a un posible rol antimicrobiano mediante una alteración del mucus del intestino en ovinos, produciendo la expulsión del parásito. Lo cual podría sugerir que siempre está sobreexpresado esperando la infección o podría ser un efecto posterior como mecanismo de defensa. En la interfase de la zona entre el mucus y el tejido, las lectinas secretadas tales como galectina-15 e ITLNs se localizan idealmente en esos sitios para influir en las propiedades del moco. Estas moléculas requieren estudios adicionales para dilucidar si desempeñan un papel protector en las infecciones parasitarias en las ovejas y si también alterando el carácter del moco pueden perjudicar las condiciones alérgicas (French *et al.*, 2008).

Es interesante que otra lectina LGALS9B sea detectada también en abundancia en el mucus del abomaso luego de la infestación parasitaria ya que Dunphy *et al.*, (2000) sugieren que esta proteína también altera las propiedades y actividades de la mucosa. En el abomaso, para el caso de los animales susceptibles, encontramos sobreexpresado el gen LGALS9B (Galectine 9B) donde está descrito en el trabajo de Preston *et al.*, (2015) que, al momento de la invasión del parásito, esta proteína está siendo secretada en la mucosa, siendo reconocida cada vez más como importante mediador inmunológico de la homeostasis y la regulación de enfermedades. Las galectinas son producidas tanto por el parásito como por el huésped y parecen estar íntimamente implicadas en el establecimiento del parásito, así como dirigir el curso de la infección y la respuesta inmune. También se ha demostrado que las galectinas huésped son participantes activos en el reclutamiento de células a sitios de inflamación y que modulan la función efectora de mastocitos, neutrófilos y eosinófilos además de inducir la expresión diferencial de genes de citoquinas en leucocitos sugiriendo que son capaces de dirigir la naturaleza de una respuesta inmune adaptativa (Young & Meeusen, 2002).

Para el caso de la línea susceptible hemos observado una sobreexpresión interesante de genes del metabolismo lipídico como algunos genes de la familia de las apolipoproteínas APOA1, APOA3 y APOA4 y el gen ASAH2. Éste último es un regulador de los niveles de esfingolípidos bioactivos en el tracto intestinal o el gen Niemann–Pick type C1-like 1 (NPC1L1) transportador de colesterol, todos sobreexpresados en la condición susceptible. Esta evidencia de genes involucrados en el metabolismo lipídico fue reportada también por diferentes autores (Li & Gasberre, 2009; Benavides *et al.*, 2016) como responsables de la una disminución de la internalización del colesterol a los enterocitos, dando lugar a una baja tasa de crecimiento de los parásitos. Se sugiere por autores como Coppens, (2013) que se evidencia una alta expresión del gen de la Fosfatasa Alkalina intestinal (ALPI) de los animales susceptibles. En el trabajo de Bordoloi *et al.*, (2012) se concluye que la condición de infestación parasitaria del animal causa

un daño severo en la mucosa intestinal, resultando en una mayor actividad enzimática por lo que coincidiría con el aumento de ALPI observado para esta condición.

Para el listado obtenido en abomaso (tabla 19), otro de los genes detectados, es el complejo mayor de Histocompatibilidad de clase I, A (HLA-A), en la que existe abundante bibliografía donde se reporta a este gen como uno de los genes candidatos por excelencia para determinar en sus variantes la condición de resistencia o susceptibilidad a PGI (Hulme *et al.*, 1993). Estos genes, al igual que en otros vertebrados, son altamente polimórficos, jugando un papel importante en la presentación de antígenos a los linfocitos T, causando su activación y posterior cascada que construirá la inmunidad del ovino (Hong *et al.*, 2005). El gen de la mucina (MUC3) también ha sido ampliamente estudiado. Este gen codifica las glicoproteínas que componen el mucus en la superficie de los tejidos epiteliales, actuando como barrera física contra los parásitos, debilitando su motilidad y obstaculizando la alimentación de las larvas en el intestino (Benavides *et al.*, 2015). Diferentes trabajos apuntan a una asociación entre la sobreproducción de mucosas y a la resistencia a parásitos (Miller, 1987). En este caso, la expresión de este gen debería verse sobreexpresada en los animales resistentes. Sin embargo, se estaría dando al revés de lo que plantea la bibliografía. Más adelante vamos a poder observar que en el tejido de duodeno, también se evidencia una alta expresión de MUC3 de los animales resistentes. Una de las posibles hipótesis para este caso sería una expresión que no estaría siendo eficaz a la hora de la expulsión del parásito, conllevando a una sobreproducción de la proteína sin ningún efecto sobre la infección. Otra hipótesis también podría deberse a que en los animales resistentes el nivel de expresión de mucinas es muy bajo debido a una baja carga parasitaria que no permite una buena respuesta por parte de los ovinos, y que eso lleve a un sesgo en el cálculo de este gen diferencialmente expresado para ambas condiciones.

Para el tejido del duodeno (tabla 20), observamos para los animales susceptibles un aumento de la expresión del gen MUC3 al igual que en el tejido de abomaso y de algunos genes del metabolismo lipídico (APOC3 y DGAT). Se destaca también al gen del receptor a la interleuquina 22 (IL22RA1) sobreexpresado en los animales susceptibles, donde en los trabajos de Laurence *et al.*, (2008) se explica cómo esta citoquina, que potencialmente protege desordenes inflamatorios, regula la respuesta inmune innata del huésped en las mucosas del intestino y en la reparación del tejido. Es interesante ver que el valor de la media de expresión en los animales resistentes es 0,1, mientras que la media en los animales susceptibles pasa a ser de 155,07. Bajo la condición de susceptibilidad, el animal experimenta una producción importante de IL-22, quien desencadena una respuesta inflamatoria. En los estudios de Knight *et al.*, (2010) se evidencia una respuesta similar ante una infestación del parásito cuando se da el desarrollo de la respuesta inmune a *T. columbriformis* donde la expresión de este gen se encuentra regulada negativamente. Podemos observar que, en los animales resistentes, la expresión del gen se presenta en un muy bajo nivel de expresión, posiblemente debido a que allí se esté dando (o ya se haya desarrollado) una respuesta a la infestación al parásito.

Para los genes sobreexpresados en los tejidos de duodeno de animales resistentes, no hemos encontrado una clara asociación entre éstos y las parasitosis. Lo que sí hemos notado, es una gran cantidad de genes lincRNA (*long intergenic non coding RNA*). Muchos de ellos no están anotados aún en el genoma ovino, sin una función claramente definida. Éstos lincRNA son ARN largos, ubicados en regiones intergénicas

que no codifican para una proteína. En general, muchas de las funciones que cumplen no están descritas, pero aparentemente contribuyen al control de la diferenciación celular y al mantenimiento de la identidad celular (Lupski, 2010). Es muy probable que tengan una función reguladora importante para la condición de resistencia genética.

Al igual que en el tejido del duodeno, vemos en el tejido del yeyuno (tabla 21) en los animales susceptibles que el gen MUC3 está sobreexpresado, APOC3 y DGAT. Otro gen es el IRF1 (Interferon regulatory factor-1), caracterizado por Mangano *et al.*, (2008) donde los polimorfismos de este gen son asociados al control de parásitos en malaria. También se ven sobreexpresados varios genes de cadenas pesada (MYH9, MYH11, MYH14) y liviana (MYL6) de la miosina reportados como genes pertenecientes a regiones genómicas de interés para QTLs relacionados a parásitos gastrointestinales (Benavides *et al.*, 2016). Sería interesante evaluar funcionalmente si existe algún indicio de expresión de genes de reconstrucción tisular como los anteriormente comentados.

También en yeyuno, BCLAF tiene asociado como factor de transcripción a BCL2. Este un gen regulador que, en condiciones de sobreexpresión, genera la apoptosis siendo reprimido por BCL2. En estudios de expresión diferencial se ha detectado que este gen se encuentra sobreexpresado en condiciones de parasitosis. Hemos observado también que, tanto en el tejido de duodeno como en el tejido del yeyuno, en los animales resistentes se observa un aumento en la expresión de los genes U6 (*spliceosomal RNA*). Este snRNA, es esencial para el proceso del splicing de los genes, para la generación de los transcritos necesarios a partir de la transcripción del gen.

En el íleon (tabla 22) no pudimos realizar ningún análisis de vías metabólicas porque los valores de significancia obtenidos para los genes DE no fueron óptimos para el estudio. Del listado de genes que obtuvimos, el gen MICA (MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A) fue reportado por varios autores, (Benavides *et al.*, 2015) asociando regiones genómicas del gen MHC Clase I a la resistencia parasitaria.

Para los tejidos del ganglio (tabla 23), los genes regulados positivamente en la condición resistente, al igual que en otros de los tejidos de la misma condición, encontramos muchos genes categorizados como *long intergenic non coding RNA* (lincRNA).

Un trabajo interesante que sería bueno hacer a futuro, es mapear las secuencias sobre los genomas de los parásitos una vez los ensamblajes estén en su versión definitiva. Esto con el fin de limpiar las secuencias y que éstas no se contaminen con secuencias de parásito que generen un cierto sesgo en nuestros datos finales.

Con esta interpretación de los resultados obtenidos, podríamos inferir que en las porciones del tracto intestinal como duodeno y yeyuno se logra observar una diferencia de expresión significativa. No fue así para el caso del Íleon, donde no se pudo apreciar una diferencia de expresión suficiente para observar la variación de expresión en ese sitio de acción. Focalizaríamos más la atención en la porción inicial del tracto intestinal, sin descartar el Íleon como sitio de búsqueda de expresión diferencial, pero si teniendo en cuenta estos datos para focalizarnos en otras zonas.

Como parte del trabajo de interpretación de los genes de expresión diferencial el equipo de Benavides *et al.*, (2016) realizó un cuadro en el cual resume los mecanismos propuestos para la resistencia del huésped para una infección con *H. contortus* (figura 17), demostrando la implicancia de la inmunidad adquirida e innata y sus interacciones (Benavides *et al.*, 2016). En éste mismo trabajo, también se comentan varios de los genes que hemos podido detectar debido a su expresión diferencial.

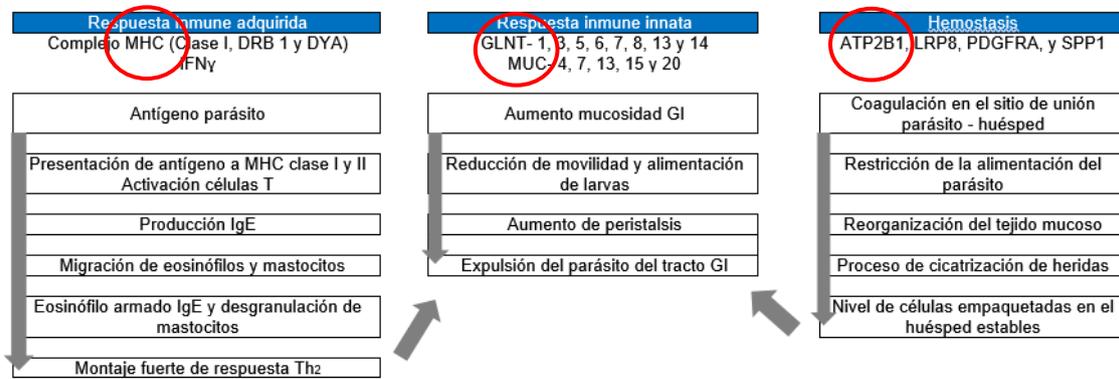


Figura 17: Mecanismos propuestos para la resistencia a la infestación a parásitos (Benavides *et al.*, 2016) Las flechas indican el flujo de interacción entre las vías y las proteínas. Se marcan los genes que fueron reportados en el trabajo.

Observamos que muchos de los genes que se remarcan como diferencialmente expresados en nuestro trabajo fueron reportados por varios equipos y tienen un rol más que interesante dentro de la respuesta que generan post infestación. Profundizar en estos genes y en las vías de las que forman parte sería un trabajo interesante de encarar a futuro.

10.2 Análisis funcional para los listados de genes de expresión diferencial

Con el fin de identificar y relacionar los listados de genes para cada tejido, realizamos estudios de genómica funcional con ese fin. Se observa en los diferentes estudios de ontología genética realizados en el presente trabajo, una similitud importante con algunas vías de acción descritas en la bibliografía. Al realizar los estudios de expresión diferencial tomando en cuenta la expresión de todos los tejidos resistentes versus todos los tejidos susceptibles, se pueden encontrar diferencias más marcadas entre las diferencias de expresión génica que las que existen cuando se realizan entre tejidos específicos.

Al realizar los estudios de genómica funcional para los diferentes listados de genes, muchas de las vías observadas tienen una relación directa con distintos tipos de metabolismo como el lipídico y también relacionadas a la respuesta inmunológica.

Los tejidos de los que se obtuvo un listado de genes DE que arrojaron una mayor significancia en la obtención de vías metabólicas, fueron el tejido del duodeno y el yeyuno. Ambos tejidos comparten ciertos genes de expresión diferencial por lo que, a la hora de realizar estos estudios, también compartieron

algunas vías metabólicas. Una de las vías que comparten, que llamó nuestra atención, y sobre la que decidimos focalizar la atención, fue la vía de expresión PPAR (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor* o Receptores de Activación y Proliferación de los Peroxisomas). PPAR es una vía de receptores nucleares de activación y proliferación de peroxisomas, quienes tienen un rol esencial en el metabolismo lipídico y que funcionan como factores de transcripción, regulando la expresión de varios genes con implicancia en inflamación e inmunidad (Hong *et al.*, 2005).

Existen 3 vías de PPAR descritas hasta el momento: α (alfa), β (beta) y γ (gama) y su distribución es la siguiente:

- α : Expresada en hígado, riñón, corazón, músculo, tejido adiposo y otros
- β : Expresada en cerebro, piel y tejido adiposo
- γ : Aunque transcrito por el mismo gen, por splicing alternativo se expresa en 3 formas:
 - $\gamma 1$: Expresada en corazón, músculo, colon y páncreas
 - $\gamma 2$: Expresada en tejidos adiposos
 - $\gamma 3$: Expresada en macrófagos, intestino y tejido adiposo
 - $\gamma 4$: Expresada en células endoteliales

En los listados completos de genes de expresión diferencial para el caso del duodeno (Anexo 3), se pudo visualizar, no solo distintos genes que participan en la vía, sino también se observó sobreexpresado el gen del factor de transcripción PPAR γ .

Se conocen las propiedades inmuno moduladoras de los lípidos y de algunas células del sistema inmune utilizan lípidos tanto intra- como extra-celularmente como mediadores de la expresión génica. Muchos de estos lípidos, mayoritariamente los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) funcionan como ligandos para PPAR. Esta mediación conlleva a una potenciación de la producción de varias citoquinas pro inflamatorias, como por ejemplo distintas interleuquinas. Las proteínas PPAR se dimerizan con el receptor RXR (*Retinoid X Receptor*) y se unen a regiones específicas dentro del DNA (Tyagi *et al.*, 2011). En nuestro caso, tanto PPAR γ , FXR y RXR aparecen como genes regulados positivamente en los animales susceptibles (Tabla 17). Una respuesta similar a la observada por nosotros fue descrita por Li & Gasberre, (2009) donde también detalló a estos receptores como diferencialmente expresados en animales desafiados a parásitos. Muchas veces, los parásitos en estas condiciones intentan mitigar la acción del sistema inmune mediante la activación de citoquinas de tipo 2 y ácidos grasos libres del metabolismo del ácido araquidónico. La activación de PPAR favorece el desarrollo de macrófagos, por lo que controlaría la inflamación para que el huésped no sea destruido (Daynes & Jones, 2002). Posiblemente estos factores nucleares desempeñen un papel clave en el establecimiento de una infección crónica mediante un equilibrio delicado de los mecanismos de señalización antiinflamatorios. Se podría suponer que la utilización de estos ligandos como agentes terapéuticos combinados entre sí, podrían limitar la patología del huésped (Chan *et al.*, 2010).

Esta vía de expresión apareció en casi todos los tejidos, pero con mayores niveles de significancia en los tejidos del Duodeno y Yeyuno. La vía de activación PPAR produce efectos anti inflamatorios jugando un rol importante en el mantenimiento de la integridad de la mucosa en el intestino (Dubuquoy *et al.*, 2002). Dentro de la vía, vemos que no todos los genes son activos para cada tejido. De un total de 71 genes que componen la vía PPAR, menos de la mitad se encuentran dentro de los listados de expresión diferencial. Es posible que muchos de ellos se expresen en niveles muy bajos, y no hayan podido ser captados por la técnica y la cantidad de réplicas biológicas.

Al observar en detalle los genes involucrados, vemos que esta vía se encuentra sobreexpresada solamente en los animales susceptibles. Al quitar la variación de datos de expresión de otros tejidos, solo en Duodeno se evidencian 22 genes de la vía de los PPAR y 19 genes en el Yeyuno y algunos de ellos son compartidos entre tejidos (Tabla 30). Es de esperar que el resto de los genes involucrados en esta vía sean de baja abundancia y no hayan podido ser detectados en este análisis.

PPAR γ juega un rol importante en la regulación de genes altamente expresados en el intestino de los animales más susceptibles. Este factor de transcripción, tiene un papel importante en la regulación de estos genes relacionados a la susceptibilidad a parásitos la que podría potencialmente ser examinada mediante el tratamiento de los animales con agonistas de PPAR γ para modular la respuesta de la activación de la vía y observar los resultados (Keane *et al.*, 2006) y de esta manera determinar la incidencia de esta vía en las parasitosis.

Tabla 30: Genes pertenecientes a la vía PPAR expresados en los animales susceptibles. En azul los genes que tienen un perfil de expresión similar entre los diferentes tejidos

Listado de los genes de la vía PPAR expresados en los tejidos susceptibles	Análisis realizado con las muestras de Duodeno Resistentes vs Susceptibles	Análisis realizado con las muestras de Yeyuno Resistentes vs Susceptibles	Análisis realizado con todas las muestras Resistentes vs Susceptibles
	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 (mitochondrial)	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	acyl-CoA dehydrogenase, long chain(ACADL)
	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1(ACSL1)
	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	apolipoprotein C-III(APOC3)
	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1(ACSL1)	acyl-CoA synthetase long-chain family member 5	aquaporin 7(AQP7)
	acyl-CoA synthetase long-chain family member 5	acyl-CoA dehydrogenase, long chain(ACADL)	fatty acid binding protein 1, liver(FABP1)
	acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	fatty acid binding protein 2, intestinal(FABP2)
	acyl-Coenzyme A oxidase 2, branched chain	acyl-Coenzyme A oxidase 3, pristanoyl	fatty acid binding protein 3, muscle and heart(FABP3)
	apolipoprotein A-I	apolipoprotein A-I	integrin linked kinase(ILK)
	apolipoprotein C-III(APOC3)	apolipoprotein C-III(APOC3)	nuclear receptor subfamily 1 group H member 3(NR1H3)
	aquaporin 7(AQP7)	diazepam binding inhibitor (GABA receptor modulator, acyl-Coenzyme A binding protein)	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)(PCK2)
	enoyl-Coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase	enoyl-Coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2(SLC27A2)
	fatty acid binding protein 1, liver(FABP1)	fatty acid binding protein 1, liver(FABP1)	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 4(SLC27A4)
	fatty acid binding protein 2, intestinal(FABP2)	fatty acid binding protein 2, intestinal(FABP2)	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 5(SLC27A5)
	glycerol kinase 3 pseudogene; glycerol kinase	fatty acid desaturase 2	sterol carrier protein 2(SCP2)
	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	integrin linked kinase(ILK)	
	nuclear receptor subfamily 1 group H member 3(NR1H3)	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	
	peroxisome proliferator-activated receptor gamma PPAR gamma	similar to Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 3 (Long-chain acyl-CoA synthetase 3) (LACS 3)	
	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)(PCK2)	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2(SLC27A2)	
	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2(SLC27A2)	sterol carrier protein 2(SCP2)	
solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 4(SLC27A4)			
sorbin and SH3 domain containing 1			

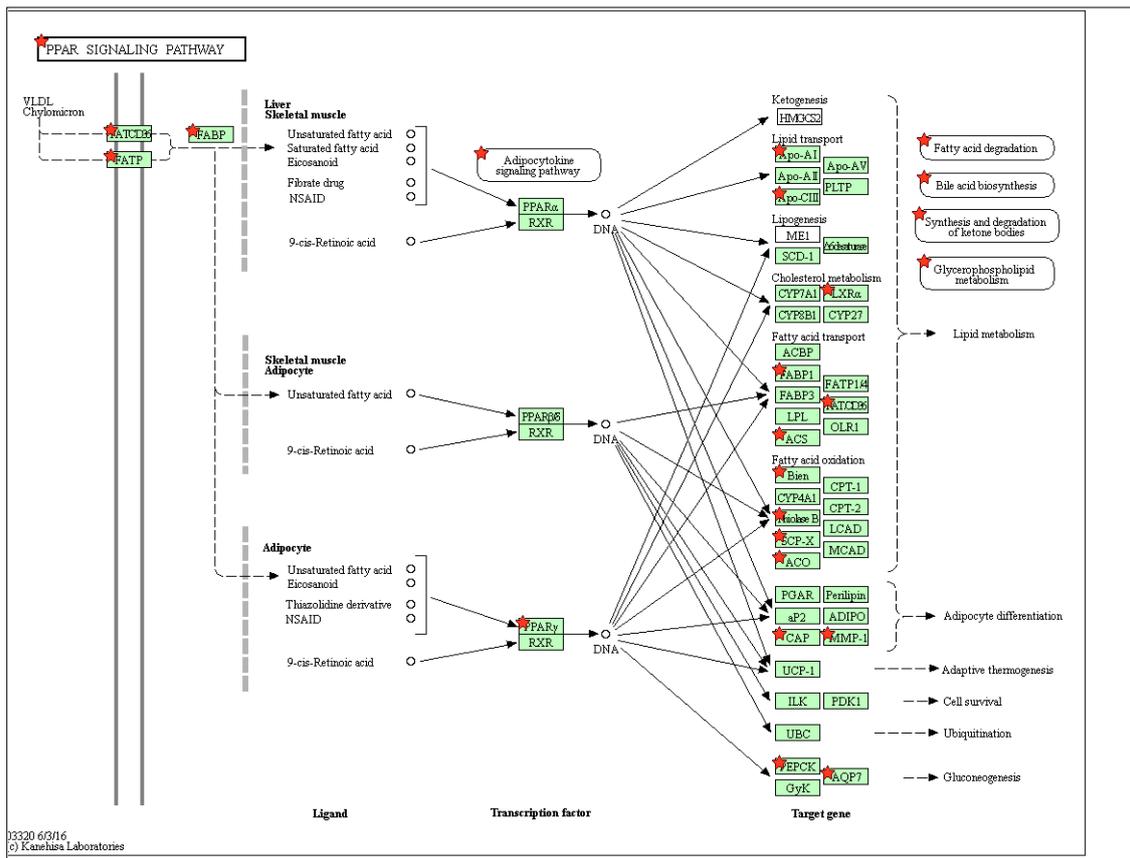


Figura 18: Ruta metabólica de señalización de PPAR (Peroxisomal Proliferator Activated Receptor) donde se encuentran marcados con una estrella roja los genes que fueron detectados en nuestro trabajo determinados por expresión diferencial para el análisis del tejido del Duodeno (KEGG Pathways - Kaneisha & Goto, 2000)

Otra de las vías que observamos sobreexpresadas utilizando las listas de genes de los animales susceptibles, fue la vía mTOR (mammalian/mechanistic target of rapamycin). Esta vía también se observó en los tejidos de Duodeno y Yeyuno (parte alta y media del tracto intestinal) al igual que la vía PPAR. La vía mTOR detecta e integra una variedad de señales que regulan el crecimiento y la homeostasis de los organismos (Laplante & Sabatini, 2012). Esta vía regula muchos procesos principales de la célula y su alteración, está implicada en el desarrollo de diversas patologías. Estudios de Leishmaniasis (Jaramillo *et al.*, 2011) demuestran que una proteína del parásito, activa la vía mTOR promoviendo a la proliferación del parásito. Una delección en algún punto de la vía, induce a un aumento en la replicación del parásito. Se ha demostrado que la vía mTOR y otra ruta del fosfatidil inositol, actúan en conjunto para regular la activación de PPAR γ mediante la disponibilidad de nutrientes y otras señales (Kim & Chen, 2004). En este mismo trabajo, se realizó un trabajo con el fármaco tiazolidindiona invirtiendo los efectos de la rampamicina y por ende la activación de PPAR.

La relación directa entre las PGI y mTOR no está tan estudiada aún en ovinos, por lo que la bibliografía sobre el tema no fue suficiente. Sin embargo, en nuestros muestreos fue una vía en la que se evidenciaron diferentes genes que se encuentran sobreexpresando mTOR en los animales susceptibles (y al igual que PPAR solamente en animales susceptibles).

Como conclusión, podemos decir que hemos obtenido los listados de expresión génica en razas de ovinos del Uruguay y que han sido de gran utilidad para examinar la expresión génica diferencial en tejidos de animales genéticamente resistentes y susceptibles a las PGI.

10.3 Potencial desarrollo en la generación de un panel de baja densidad de SNP a partir de marcadores seleccionados en poblaciones susceptibles y resistentes a PGI para una futura validación de los resultados.

Queremos también incluir en nuestra discusión, la generación de una posible herramienta, no solo para la validación del presente trabajo, sino también para la asistencia a los programas de control de las PGI. Con este trabajo, existe el potencial para diseñar un panel de marcadores SNP obtenidos del proyecto de expresión génica, con el fin de realizar una selección temprana de animales resistentes o susceptibles a las PGI.

De la totalidad de variantes de secuencia seleccionadas, elegimos las de mayores niveles de significancia (Tabla 28). Dichos SNP, se encuentran posicionados en genes que podrían funcionar como regiones candidatas. Dados los genes y vías metabólicas determinadas mediante la expresión diferencial, se podrían escoger dichas regiones cromosómicas donde también se encuentren asociados otros genes. Algunos de los genes candidatos que se seleccionaron en el estudio como la Intelectina (ITLN) o la mucina (MUC3A) o del gen del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (HLA-A) incluyen variantes SNP que también podrían incorporarse al panel por estar relacionados a la resistencia a las PGI descritos en la bibliografía como genes candidatos.

Nuestra propuesta de trabajo sería la de seleccionar variantes SNP para incluir en el panel de baja densidad:

- que pertenezcan a genes que interaccionen en las vías metabólicas seleccionadas (nuestro caso PPAR y mTOR) (27 genes, que incluyen más de 150 SNP)
- que pertenezcan a genes DE seleccionados por expresión diferencial en nuestro trabajo y apoyados por bibliografía (MUC, HLA, ITLNL, IL22RA)

Sería bueno incluir también los SNP determinados por nuestras secuencias de RNA-Seq, aunque el listado generado es solamente prospectivo. Con solamente 4 animales, seleccionar SNP sería algo aventurado. Esperaríamos a realizar nuevos estudios de transcriptomas de ARNm para obtener SNP de regiones codificantes más confiables. Con nuestros datos, los genes asociados a los marcadores SNP detectados no mostraron mayores niveles de significancia en su p-valor. Algunos de ellos si mostraron datos significativos en su valor de Fold Change, pero en esos casos, o sus valores de probabilidad eran muy bajos o sus datos de expresión también lo eran. La asociación entre estos alelos, mayoritariamente expresados en una condición u otra creemos que debería de realizarse con un n mayor. El número de animales necesario para realizar un estudio de asociación de estos marcadores a las condiciones de

resistencia y susceptibilidad, sería menor a un estudio de asociación simplemente por genotipado, ya que los alelos están asociados directamente a los valores de expresión.

Para el diseño de las placas de SNP, se seleccionarían sondas de ADN tomando en cuenta la actual anotación del ovino (a partir de la variante SNP o marcador seleccionado se tomarían 150pb hacia 5' y 3') y la actual secuencia generada por el transcripto. Muchas veces los genomas de referencia se realizan con diferentes razas de animales, generando algunas variantes en la secuencia.

Nuestra propuesta de proyecto sería escoger un número de marcadores (aproximadamente 50-200) para realizar una futura validación del trabajo en poblaciones comerciales/experimentales y continuar con más estudios funcionales de resistencia genética a parásitos en las líneas divergentes.

11 CONCLUSIONES

A continuación, se detallan las principales conclusiones extraídas de los resultados presentados en este trabajo:

El procedimiento de selección de los animales se realizó de manera correcta, y el tiempo de realización de las extracciones de tejidos y luego del ARN fue óptimo. Los valores de calidad del ARN fueron intermedios, debido a la calidad del material con el que se trabajó. Tomando en cuenta que nuestro material de partida fue muestra de intestino, consideramos que los resultados que se obtuvieron fueron muy satisfactorios.

La preparación de las librerías y la secuenciación tuvieron muy buenos resultados, dada la cobertura de las secuencias en el genoma y a la posibilidad de poder identificar genes vinculados a vías metabólicas que podrían estar activamente vinculadas a la resistencia a parásitos gastrointestinales.

Dentro de cada tejido, se obtuvo un listado de genes DE, donde también se identificaron algunos con el potencial de ser candidatos de la respuesta a PGI como: ITLN, MUC3A, HLA-A, MYH asociados a PGI por (Benavides *et al.*, 2016) y nos detuvimos brevemente en las vías funcionales: PPAR y mTOR (Kim & Chen, 2004) y (Chan *et al.*, 2010).

Hemos evidenciado una respuesta más clara en los animales de la condición susceptibles que en la condición resistente. Esto podría deberse a un tema asociado al diseño experimental como se comentó en la discusión (momento del muestreo y/o infestación natural).

Con el fin de tener una aproximación a los resultados de expresión génica diferencial en ovinos, evaluamos los resultados del presente trabajo como satisfactorios en cuanto al proceso de obtención de resultados. Se lograron realizar todos los objetivos específicos planteados para el trabajo, abriendo la posibilidad de realizar nuevas investigaciones que complementen la información generada. El trabajo permitió ahondar en el conocimiento de la resistencia y susceptibilidad a parásitos gastrointestinales en ovinos, desde el punto de vista de la interpretación de la expresión génica.

Esperamos, que este trabajo sea insumo de futuros estudios para continuar dentro del Instituto de Nacional de Investigación Agropecuaria la línea de resistencia a parásitos gastrointestinales en rumiantes. Este tipo de estudios permitirá en un futuro, generar una nueva práctica de la cría animal al detectar en el genoma aquellos marcadores responsables o vinculados a una diferencia entre los fenotipos de resistencia o susceptibilidad a PGI, y que éstos puedan ser utilizados estas herramientas en un programa de cría.

12 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFIAS

- Allison, D. B., Cui, X., Page, G. P., & Sabripour, M. (2006). Microarray data analysis: from disarray to consolidation and consensus. *Nature reviews genetics*, 7(1), 55-65.
- Anders, S., & Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome biology*, 11(10), R106.
- Anderson, T. J., Blouin, M. S., & Beech, R. N. (1998). Population biology of parasitic nematodes: applications of genetic markers. *Advances in parasitology*, 41, 219-283.
- Athanasiadou, S., Jones, L. A., Burgess, S. T., Kyriazakis, I., Pemberton, A. D., Houdijk, J. G., & Huntley, J. F. (2011). Genome-wide transcriptomic analysis of intestinal tissue to assess the impact of nutrition and a secondary nematode challenge in lactating rats. *PLoS one*, 6(6), e20771.
- Balic, A., Bowles, V. M., & Meeusen, E. N. T. (2000). Cellular profiles in the abomasal mucosa and lymph node during primary infection with *Haemonchus contortus* in sheep. *Veterinary immunology and immunopathology*, 75(1), 109-120.
- Bainbridge, M. N., Warren, R. L., Hirst, M., Romanuik, T., Zeng, T., Go, A., ... & Mardis, E. R. (2006). Analysis of the prostate cancer cell line LNCaP transcriptome using a sequencing-by-synthesis approach. *BMC genomics*, 7(1), 1.
- Barger, I.A. (1989) Genetic resistance of hosts and its influence on epidemiology, *Veterinary Parasitology*, Volume 32, Issue 1, 21-35.
- Bartley, D. J., Devin, L., Nath, M., & Morrison, A. A. (2015). Selection and characterisation of monepantel resistance in *Teladorsagia circumcincta* isolates. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 5(2), 69-76.
- Beh, K. J., Hulme, D. J., Callaghan, M. J., Leish, Z., Lenane, I., Windon, R. G., & Maddox, J. F. (2002). A genome scan for quantitative trait loci affecting resistance to *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Animal Genetics*, 33(2), 97-106.
- Benavides, M. V., Weimer, T. A., Borba, M. F. S., Berne, M. E. A., & Sacco, A. M. S. (2009). Genetic analyses of polymorphisms on ovine chromosomes 5 and 20 and their effect on resistance to internal parasites. *Small Ruminant Research*, 83(1), 67-73.
- Benavides, M. V., Sonstegard, T. S., Kemp, S., Mugambi, J. M., Gibson, J. P., Baker, R. L., ... & Van Tassell, C. (2015). Identification of novel loci associated with gastrointestinal parasite resistance in a Red Maasai x Dorper backcross population. *PLoS one*, 10(4), e0122797.

- Benavides, M. V., Sonstegard, T. S., & Van Tassell, C. (2016). Genomic Regions Associated with Sheep Resistance to Gastrointestinal Nematodes. *Trends in parasitology*, 32(6), 470-480.
- Beraldi, D., McRae, A. F., Gratten, J., Pilkington, J. G., Slate, J., Visscher, P. M., & Pemberton, J. M. (2007). Quantitative trait loci (QTL) mapping of resistance to strongyles and coccidia in the free-living Soay sheep (*Ovis aries*). *International journal for parasitology*, 37(1), 121-129.
- Beuzen, N. D., Stear, M. J., & Chang, K. C. (2000). Molecular markers and their use in animal breeding. *The Veterinary Journal*, 160(1), 42-52.
- Bishop S.C.; Bairden K.; McKellar Q.A.; Park M. and Stear M.J. (1996). Genetic parameters for faecal egg count following mixed, natural, predominantly *Ostertagia circumcincta* infection and relationships with live weight in young lambs. *Animal Science*, 63, 423-428.
- Blaxter, M.L. (2000) Genes and genomes of *Necator Americanus* and related hook-worms. *International Journal of Parasitology*, 30, 347-355.
- Blaxter, M.L. (2003) Nematoda: Genes, Genomes and the evolution of parasitism. *Advances in Parasitology*, 54, 101-195.
- Bordoloi, G., Jas, R., & Ghosh, J. D. (2012). Changes in the haemato-biochemical pattern due to experimentally induced haemonchosis in Sahabadi sheep. *Journal of Parasitic Diseases*, 36(1), 101-105.
- Cánovas, A., Rincon, G., Islas-Trejo, A., Jimenez-Flores, R., Laubscher, A., & Medrano, J. F. (2013). RNA sequencing to study gene expression and single nucleotide polymorphism variation associated with citrate content in cow milk. *Journal of dairy science*, 96(4), 2637-2648.
- Cantacessi, C., Mitreva, M., Campbell, B.E., (2010) First transcriptomic analysis of the economically important parasitic nematode, *Trichostrongylus colubriformis*, using a next-generation sequencing approach, *Infection, Genetics and Evolution*, 10, 8, 1199-1207.
- Castells, D., Nari, A., Rizzo, E., Mármol, E., & Acosta, D. (1991). Efecto de los nematodos gastrointestinales sobre diversos parámetros productivos del ovino en la etapa de recría. *Año II*, 17-32.
- Castells, D., Mederos, A., Lorenzelli, E., & Macchi, I. (2002). Diagnosticos de resistencia antihelmintica de *Haemonchus* spp. a las ivermectinas en el Uruguay. *FAO Animal Production and Health Paper (FAO)*.
- Castells, D. & Gimeno, D. (2011) Abstract: Selection of Corriedale sheep for resistance or susceptibility to nematode infection in Uruguay. In Proceedings: *23rd International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. (WAVVP)*; Buenos Aires, Argentina.
- Castells, D. (2016) Presentación en el Seminario 50 años del SUL, Montevideo, Uruguay

- Castro, E., & Trenchi, H. (1954). Fauna parasitológica comprobada en el Uruguay. *Rev. Med. Vet. Uruguay*, 7(54), 1-77.
- Chan, M. M., Evans, K. W., Moore, A. R., & Fong, D. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR): balance for survival in parasitic infections. *BioMed Research International*, 2010.
- Ciappesoni, G., Gimeno, D., & Ravagnolo, O. (2010). Genetic relationships between faecal worm egg count and production traits in Merino sheep of Uruguay. In *Proceedings of 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*.
- Coronel, F. (1999) Evaluación de carneros en Centrales de Prueba de Progenie. Anuario Sociedad de Criadores de Corriedale del Uruguay, N° 56, pp. 129-143.
- Coppens, I. (2013). Targeting lipid biosynthesis and salvage in apicomplexan parasites for improved chemotherapies. *Nature Reviews Microbiology*, 11(12), 823-835.
- Datta, R., Hedeler, C., Paton, N. W., Brass, A. M., & Else, K. J. (2005). Identification of novel genes in intestinal tissue that are regulated after infection with an intestinal nematode parasite. *Infection and immunity*, 73(7), 4025-4033.
- Daynes, R. A., & Jones, D. C. (2002). Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology*, 2(10), 748-759.
- Douch, P. G. C., Harrison, G. B. L., Buchanan, L. L., & Greer, K. S. (1983). In vitro bioassay of sheep gastrointestinal mucus for nematode paralyzing activity mediated by substances with some properties characteristic of SRS-A. *International Journal for Parasitology*, 13(2), 207-212.
- Dubuquoy, L., Dharancy, S., Nutten, S., Pettersson, S., Auwerx, J., & Desreumaux, P. (2002). Role of peroxisome proliferator-activated receptor γ and retinoid X receptor heterodimer in hepatogastroenterological diseases. *The Lancet*, 360(9343), 1410-1418.
- Dunphy, J. L., Balic, A., Barcham, G. J., Horvath, A. J., Nash, A. D., & Meeusen, E. N. (2000). Isolation and characterization of a novel inducible mammalian galectin. *Journal of Biological Chemistry*, 275(41), 32106-32113.
- French, A. T., Bethune, J. A., Knight, P. A., McNeilly, T. N., Wattegedera, S., Rhind, S., ... & Pemberton, A. D. (2007). The expression of intelectin in sheep goblet cells and upregulation by interleukin-4. *Veterinary immunology and immunopathology*, 120(1), 41-46.
- French, A. T., Knight, P. A., Smith, W. D., Brown, J. K., Craig, N. M., Pate, J. A., ... & Pemberton, A. D. (2008). Up-regulation of intelectin in sheep after infection with *Teladorsagia circumcincta*. *International journal for parasitology*, 38(3), 467-475.

- Goldberg, V., Ciappesoni, G., DeBarbieri, I., Rodríguez, A., & Montossi, F. (2011). Factores no genéticos que afectan la resistencia a parásitos gastrointestinales en Merino uruguayo. *Prod. Ovina*, 21, 1-11.
- González, Y. B., Gil, B. G., de la Fuente Crespo, L. F., Tirados, F. S. P., El Zarei, M. F., Castelo, L. Á., ... & Vázquez, F. A. R. (2004). Búsqueda de regiones genómicas con influencia sobre la resistencia a las tricostrogilidosis en el ganado ovino de raza churra. ITEA. *Producción animal*, 100(3), 197-201.
- Good, B., Hanrahan, J.P., Crowley, B.A., Mulcahy, G. (2006) Texel sheep are more resistant to natural nematode challenge than Suffolk sheep based on faecal egg count and nematode burden, *Veterinary Parasitology*, Volume 136, Issues 3–4, 31, 317-327.
- Grasso, A. N., Goldberg, V., Navajas, E. A., Iriarte, W., Gimeno, D., Aguilar, I., ... & Ciappesoni, G. (2014). Genomic variation and population structure detected by single nucleotide polymorphism arrays in Corriedale, Merino and Creole sheep. *Genetics and molecular biology*, 37(2), 389-395.
- Grillo, V., Jackson, F., Cabaret, J. & Gilleard, J.S. (2007) Population Genetic analysis of the ovine parasitic nematode *Teladorsagia circumcincta* and evidence for a cryptic species. *International Journal of Parasitology*, 37, 435-447.
- Gruner, L. (1991). Breeding for helminth resistance in sheep and goats. *Breeding for disease resistance in farm animals*. Wallingford, UK, CAB International, 187-200.
- Gutiérrez-Gil, B., Pérez, J., Álvarez, L., Martínez-Valladares, M., de la Fuente, L. F., Bayón, Y., ... & Arranz, J. J. (2009). Quantitative trait loci for resistance to trichostrongylid infection in Spanish Churra sheep. *Genetics Selection Evolution*, 41(1), 1.
- Hasnain, S. Z., Gallagher, A. L., Grecis, R. K., & Thornton, D. J. (2013). A new role for mucins in immunity: insights from gastrointestinal nematode infection. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45(2), 364-374.
- Hong, J. H., Hwang, E. S., McManus, M. T., Amsterdam, A., Tian, Y., Kalmukova, R., ... & Hopkins, N. (2005). TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science*, 309(5737), 1074-1078.
- Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*, 4(1), 44-57.
- Hulme, D. J., Nicholas, F. W., Windon, R. G., Brown, S. C., & Beh, K. J. (1993). The MHC class II region and resistance to an intestinal parasite in sheep. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 110(1-6), 459-472.
- Hwang, D. (2000). Fatty acids and immune responses-a new perspective in searching for clues to mechanism. *Annual review of nutrition*, 20(1), 431-456.

Jäger, M., Ott, C. E., Grünhagen, J., Hecht, J., Schell, H., Mundlos, S., ... & Lienau, J. (2011). Composite transcriptome assembly of RNA-seq data in a sheep model for delayed bone healing. *BMC genomics*, 12(1), 1

Jaramillo, M., Gomez, M. A., Larsson, O., Shio, M. T., Topisirovic, I., Contreras, I., ... & Olivier, M. (2011). Leishmania repression of host translation through mTOR cleavage is required for parasite survival and infection. *Cell host & microbe*, 9(4), 331-341.

Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, 28(1), 27-30.

Kaminsky, R; N. Gauvry, S. Schorderet Weber, T. Skripsky, J. Bouvier, A. Wenger, F. Schroeder, Y. Desaulles, R. Hotz, T. Goebel, B. C. Hosking, F. Pautrat, S. Wieland-Berghausen, P. Ducray (2008) Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate *Parasitology Research*, 103, Issue 4, pp 931-939

Kadarmideen, H. N., von Rohr, P., & Janss, L. L. (2006). From genetical genomics to systems genetics: potential applications in quantitative genomics and animal breeding. *Mammalian Genome*, 17(6), 548-564.

Keane, O. M., Zadissa, A., Wilson, T., Hyndman, D. L., Greer, G. J., Baird, D. B., ... & McEwan, J. C. (2006). Gene expression profiling of naive sheep genetically resistant and susceptible to gastrointestinal nematodes. *BMC genomics*, 7(1), 1.

Keane, O.M., Dodds, K.G., Crawford, A.M., McEwan, J.C. (2007) Transcriptional profiling of *Ovis aries* identifies *Ovar-DQA1* allele frequency differences between nematode-resistant and susceptible selection lines. *Physiological Genomics*, 30(3):253–261.

Kim, J. E., & Chen, J. (2004). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis. *Diabetes*, 53(11), 2748-2756.

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.

Krawczyk, A., Słota, E. (2009) Genetic markers to gastrointestinal nematode resistance in sheep: a review *Helminthologia*, 46, 1: 3 – 8.

Lapage, G (1982a) Phylum Nematelminthes. Capítulo 4. En: *Parasitología Veterinaria*. Compañía Editorial Continental. 1a Edición, pp. 49-57.

- Lapage, G (1982b) Clase Nematoda. Capítulo 8. En: *Parasitología Veterinaria*. Compañía Editorial Continental. 1a Edición, pp. 121-142.
- Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, *149*(2), 274-293.
- Lara, D. M. (2003). Resistencia a los antihelmínticos: origen, desarrollo y control. *Revista Corpoica: Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, *4*(1), 55-71.
- Laing, R., Kikuchi, T., Martinelli, A., Tsai, I. J., Beech, R. N., Redman, E., ... & Curran, D. (2013). The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. *Genome biology*, *14*(8), R88.
- Laurence, A., O'Shea, J. J., & Watford, W. T. (2008). Interleukin-22: a sheep in wolf's clothing. *Nature medicine*, *14*(3), 247-249.
- Ledizet, M., Harrison, L. M., Koski, R. A., & Cappello, M. (2005). Discovery and pre-clinical development of antithrombotics from hematophagous invertebrates. *Current Medicinal Chemistry-Cardiovascular & Hematological Agents*, *3*(1), 1-10.
- Lenth, R. V. (2007). Statistical power calculations. *Journal of animal science*, *85*(13_suppl), E24-E29.
- Li, R. W., & Gasbarre, L. C. (2009). A temporal shift in regulatory networks and pathways in the bovine small intestine during *Cooperia oncophora* infection. *International journal for parasitology*, *39*(7), 813-824.
- Lupski, J. R. (2010). New mutations and intellectual function. *Nature genetics*, *42*(12).
- McKenna, P. B. (1981). The diagnostic value and interpretation of faecal egg counts in sheep. *New Zealand veterinary journal*, *29*(8), 129-132.
- MacKinnon, K. M., Bowdridge, S. A., Kanevsky-Mullarky, I., Zajac, A. M., & Notter, D. R. (2015). Gene expression profiles of hair and wool sheep reveal importance of Th2 immune mechanisms for increased resistance to. *Journal of animal science*, *93*(5), 2074-2082.
- Mangano, V. D., Luoni, G., Rockett, K. A., Sirima, B. S., Konaté, A., Forton, J., ... & Modiano, D. (2008). Interferon regulatory factor-1 polymorphisms are associated with the control of *Plasmodium falciparum* infection. *Genes and immunity*, *9*(2), 122-129.
- Medrano, J. F., Rincon, G., & Islas-Trejo, A. (2010). Comparative analysis of bovine milk and mammary gland transcriptome using RNA-Seq. In *9th World congress on genetics applied to livestock production, Leipzig, Germany*.

- Mederos, A. E., Ramos, Z., & Banchero, G. E. (2014). First report of monepantel *Haemonchus contortus* resistance on sheep farms in Uruguay. *Parasites & vectors*, 7(1), 1.
- Miller, H. R., Huntley, J. F., & Wallace, G. R. (1981). Immune exclusion and mucus trapping during the rapid expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* from primed rats. *Immunology*, 44(2), 419.
- Miller, H. R. P. (1987). Gastrointestinal mucus, a medium for survival and for elimination of parasitic nematodes and protozoa. *Parasitology*, 94(S1), S77-S100.
- Moncada, D. M., Kammanadiminti, S. J., & Chadee, K. (2003). Mucin and Toll-like receptors in host defense against intestinal parasites. *Trends in parasitology*, 19(7), 305-311.
- Montossi, F., De Barbieri, I., Ciappesoni, G., Ravagnolo, O., De Mattos, D., Pérez Jones, J., ... & Soares de Lima, M. (2005). Núcleo fundacional de merino fino y superfino de la unidad experimental "GLENCOE"-INIA Uruguay: una experiencia innovadora de mejoramiento genético asociativo y participativo. *Agrociencia*, 9(1-2), 609-616.
- Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L., & Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature methods*, 5(7), 621-628.
- Nagalakshmi, U., Wang, Z., Waern, K., Shou, C., Raha, D., Gerstein, M., & Snyder, M. (2008). The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science*, 320(5881), 1344-1349.
- Nagaraj, S.H., Reverter, A., Menzies, M., Andronicos, N., Ingham, A. (2009). On the expression profile of candidate genes conferring resistance to Gastrointestinal Nematodes in Sheep. [Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics](#), 18: 283-286.
- Nari, A., Cardozo, H., & Berdié, J. (1977). Dinámica de población para nemátodos gastrointestinales de ovinos en Uruguay [*Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp., *Ostertagia* spp., *Oesophagostomum* spp., *Cooperia* spp., *Nematodirus* spp., *Trichuris* spp.]: [Population dynamics of gastrointestinal nematodes of sheep in Uruguay [*Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp., *Ostertagia* spp., *Oesophagostomum* spp., *Cooperia* spp., *Nematodirus* spp., *Trichuris* spp.]]. *Veterinaria (Uruguay)*.(Dic, 14(66), 11-24.
- Outteridge, P. M., Windon, R. G., & Dineen, J. K. (1985). An association between a lymphocyte antigen in sheep and the response to vaccination against the parasite *Trichostrongylus colubriformis*. *International journal for parasitology*, 15(2), 121-127.
- Preston, S., Dunphy, J., Beddoe, T., Meeusen, E., & Young, A. (2015). Evaluation of the role of galectins in parasite immunity. *Galectins: Methods and Protocols*, 371-395.
- Prichard, R.K. (2001) Genetic Variability following selection of *H. contortus* with anthelmintics. *Trends in Parasitology*, 17, 445-453.

- Robertson, J. O., Li, W., Silverstein, R. L., Topol, E. J., & Smith, J. D. (2009). Deficiency of LRP8 in mice is associated with altered platelet function and prolonged time for in vivo thrombosis. *Thrombosis research*, 123(4), 644-652.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140.
- Shendure, J., & Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology*, 26(10), 1135-1145.
- Sutherland, I., & Scott, I. (2009). *Gastrointestinal nematodes of sheep and cattle: biology and control*. John Wiley & Sons.
- Stewart M. A., Miller R. F. & Douglas J. R. (1937). Resistance of sheep of different breeds to infestation by *Ostertagia circumcincta*. *Journal of Agricultural Research* 55: 920-923.
- Sommer, S. (2005). The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Frontiers in zoology*, 2(1), 16.
- Taylor, M. A., Coop, R. L., & Wall, R. L. (2007). Parasites of laboratory animals. *Veterinary Parasitology*. 3rd edition. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd, 622-623.
- Tyagi, S., Gupta, P., Saini, A. S., Kaushal, C., & Sharma, S. (2011). The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 2(4), 236.
- Varga, T., Czimmerer, Z., & Nagy, L. (2011). PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1812(8), 1007-1022.
- Wagner, G. P., Kin, K., & Lynch, V. J. (2012). Measurement of mRNA abundance using RNA-seq data: RPKM measure is inconsistent among samples. *Theory in Biosciences*, 131(4), 281-285.
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics*, 10(1), 57-63.
- Warwick B. L., Berry R. O., Turk R. D. & Morgan C. O. (1949). Selection of sheep and goats for resistance to stomach worms, *Haemonchus contortus*. *Journal of Animal Science*, 8: 609-610.
- Weston, R.H. (2002) Constrains on Feed Intake by Grazing Sheep. In Sheep Nutrition. Collingwood: CAB international/CSIRO Publishing.
- Wickramasinghe, S., Cánovas, A., Rincón, G., & Medrano, J. F. (2014). RNA-sequencing: a tool to explore new frontiers in animal genetics. *Livestock Science*, 166, 206-216.

Wiggans, G. R., VanRaden, P. M., & Cooper, T. A. (2011). The genomic evaluation system in the United States: Past, present, future. *Journal of dairy science*, 94(6), 3202-3211.

Wilhelm, B. T., & Landry, J. R. (2009). RNA-Seq—quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing. *Methods*, 48(3), 249-257.

Young, A. R., & Meeusen, E. N. (2002). Galectins in parasite infection and allergic inflammation. *Glycoconjugate journal*, 19(7), 601-606.