UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP CÂMPUS DE JABOTICABAL

DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE HAPLÓTIPOS DA β- GLOBINA OVINA E RESILIÊNCIA À INFECÇÃO POR *HAEMONCHUS CONTORTUS* NAS RAÇAS SANTA INÊS, TEXEL E WHITE DORPER

Rafaela Tami Ikeda Kapritchkoff

Médica Veterinária

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP CÂMPUS DE JABOTICABAL

DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE HAPLÓTIPOS DA β-GLOBINA OVINA E RESILIÊNCIA À INFECÇÃO POR *HAEMONCHUS CONTORTUS* NAS RAÇAS SANTA INÊS, TEXEL E WHITE DORPER

Rafaela Tami Ikeda Kapritchkoff

Orientadora: Profª. Drª. Ana Carolina de Souza Chagas

Coorientadora: Drª. Cintia Hiromi Okino

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (com ênfase em Saúde Única).

2024

K17d

Kapritchkoff, Rafaela Tami Ikeda

Determinação da relação entre haplótipos da -globina ovina e resiliência à infecção por Haemonchus contortus nas raças Santa Inês, Texel e White Dorper / Rafaela Tami Ikeda Kapritchkoff. -- Jaboticabal, 2024

61 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Ana Carolina de Souza Chagas

Coorientadora: Cintia Hiromi Okino

1. Parasitologia Veterinária. 2. Melhoramento genético de animais. 3. Ovinocultura. 4. Haemonchus contortus. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE HAPLÓTIPOS DA β- GLOBINA OVINA E RESILIÊNCIA À INFECÇÃO POR *HAEMONCHUS CONTORTUS* NAS RAÇAS SANTA INÊS, TEXEL E WHITE DORPER

AUTORA: RAFAELA TAMI IKEDA KAPRITCHKOFF
ORIENTADORA: ANA CAROLINA DE SOUZA CHAGAS
COORIENTADORA: CINTIA HIROMI OKINO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências Veterinárias, área: Saúde Única pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
ANA CAROLINA DE SOUZA CHAGAS
Data: 25/04/2024 19:25:46-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Pesquisadora Dra. ANA CAROLINA DE SOUZA CHAGAS (Participaçao Virtual)
Producao Animal e Qualidade do Produto / Embrapa Pecuaria Sudeste - Sao Carlc

Documento assinado digitalmente
CRISTINA SANTOS SOTOMAIOR
Data: 26/04/2024 11:28:58-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. CRISTINA SANTOS SOTOMAIOR (Participaçao Virtual)
Departamento de Ciência Animal / Pontifíca Universidade Católica do Paraná (PUCPR) - Curitiba/PR

Profa. Dra. ANA CLÁUDIA ALEXANDRE DE ALBUQUERQUE (Participaçao Virtual)
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
ANA CLAUDIA ALEXANDRE DE ALBUQUERQUE
Data: 26/04/2024 14:47:12-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Jaboticabal, 25 de abril de 2024

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Rafaela Tami Ikeda Kapritchkoff nasceu em Mogi das Cruzes- São Paulo, no dia 29 de março de 1996. Em fevereiro de 2015 iniciou sua graduação na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/ Universidade Estadual Paulista- Câmpus de Jaboticabal, obtendo o título de Médica Veterinária em fevereiro de 2020. Ao longo dos anos de 2017 e 2018 realizou Iniciação Científica com bolsa fornecida pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, sob a orientação do Prof. Dr. Áureo Evangelista Santana, com a monografia intitulada: “Concentração de proteínas de fase aguda em leporinos submetidos à enterotomia e prevenção de aderências abdominais” e integrou a equipe de trabalho vinculada ao projeto de pesquisa Fapesp (Auxílio Regular à Pesquisa) “Aspectos clínicos, laboratoriais e cirúrgicos de equinos submetidos à enterotomia de cólon descendente com aplicação ou não de biomaterial”. Entre agosto e novembro de 2018 exerceu atividades de Monitoria Remunerada na disciplina "Clínica de Cães e Gatos" do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, sob a supervisão da Profª Drª Marileda Bonafim Carvalho. Em 2021 foi bolsista de Desenvolvimento Tecnológico e Industrial (DTI-C/CNPQ) através da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Pecuária Sudeste) e atuou nos projetos intitulados “Estratégia de tratamento anti-helmíntico seletivo baseado no ganho de peso em cordeiros Morada Nova” e “Desenvolvimento de métodos alternativos para controle de ectoparasitos de interesse veterinário”. Em março de 2022 ingressou no curso de mestrado do programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias (com ênfase em Saúde Única) pela FCAV/UNESP, desenvolvendo a parte experimental de seu projeto na Embrapa Pecuária Sudeste.

EPÍGRAFE

O tamanho dos seus sonhos deve sempre exceder a sua capacidade de alcançá-los. Se os seus sonhos não te assustam, eles não são grandes o suficiente.

Ellen Johnson-Sirleaf

AGRADECIMENTOS

À Deus por me permitir viver essa oportunidade e ter me dado forças nos momentos difíceis longe da minha família.

À toda a minha família, em especial minha mãe Inês Ikeda Kapritchkoff, meu pai Leonardo Kapritchkoff (*in memorian*), minha avó Mishiko Oishi Ikeda, meu tio Silvio Ikeda e meu avô Evgeny Kapritchkoff, que sempre incentivaram os meus sonhos. Sem o apoio e o amor incondicional desde sempre, nada disso teria se concretizado, eles me ajudaram de todas as formas possíveis para que esse sonho se tornasse realidade.

À Drª. Ana Carolina de Souza Chagas primeiramente por ter me dado essa valiosa oportunidade de fazer o mestrado com ela e ter confiado uma parte do seu Projeto Temático em mim. Sua orientação exemplar foi fundamental para o desenvolvimento leve do meu mestrado, proporcionando-me a percepção de minha própria capacidade além do que eu imaginava. Admiro sua inteligência, dedicação e postura, os quais servem como fonte constante de inspiração. Além disso, agradeço sinceramente pela amizade e carinho que demonstrou por mim, especialmente nos momentos difíceis em que recorri a sua sala e fui acolhida com compreensão.

À Dra. Cintia Hiromi Okino, expresso minha profunda gratidão pela excelente coorientação e valiosos ensinamentos transmitidos na área da Biologia Molecular, os quais jamais imaginei que alcançaria. Agradeço imensamente pela confiança em meu trabalho e pelo constante incentivo ao meu aprendizado. Além disso, gostaria de destacar a amizade que cultivamos ao longo desse período. Nos dias difíceis, sua presença na Embrapa trouxe consolo e ânimo, fazendo-me esquecer temporariamente das adversidades. Sem o seu apoio e coorientação, este trabalho não teria sido concluído.

À Drª. Simone Cristina Méo Niciura, que também me orientou. Sua dedicação em me auxiliar, inclusive ao explicar estatística desde o básico, foi fundamental para o desenvolvimento deste estudo e para o meu aprendizado. Sempre disponível e paciente, sua colaboração foi essencial para superar desafios e alcançar os objetivos propostos. Sem ela este trabalho não teria sido possível.

À minha querida amiga e companheira de trabalho Glaucia Roberta Melito, que foi como uma mãe e irmã de São Carlos quando eu estive longe da minha família. Seu apoio inabalável e carinho trouxeram conforto nos momentos mais desafiadores dessa jornada. Sua amizade e suporte foram fundamentais para meu progresso e bem-estar durante o mestrado. Valorizo imensamente seus sábios conselhos e a confortável companhia que sempre me ofereceu. Sua amizade foi, sem dúvida, um dos presentes mais preciosos que o mestrado me proporcionou.

Ao Dr. Sérgio Novita Esteves por todo o suporte oferecido e aos funcionários do campo Rafael Rozendo e Lázaro Tadeu dos Santos, pela paciência e ensinamentos acerca do manejo de ovinos.

Ao Luis Adriano Anholeto, que foi meu primeiro amigo na Embrapa e quem me instruiu com paciência e didática nos princípios básicos da rotina de laboratório, os quais eu não havia tido muito contato anteriormente. Sua orientação foi fundamental para despertar meu interesse em seguir no mestrado.

À Renata Silva Matos, pós-doutoranda da Embrapa, gostaria de expressar minha profunda gratidão por estar ao meu lado desde o início desta jornada. Desenvolvemos um grande vínculo, e sou imensamente grata pelos momentos em que pude desabafar e pelos conselhos sábios que me proporcionou. Sua amizade foi um constante incentivo e trouxe leveza e felicidade aos meus dias.

À Hornblenda Joaquina Silva Bello, pós-doutoranda da Embrapa, pela amizade e valiosos ensinamentos na área da parasitologia veterinária que me proporcionou. Seu apoio, conselhos, paciência e instruções foram essenciais para a execução desse trabalho.

Aos bolsistas e amigos da Embrapa Pecuária Sudeste que ajudaram no meu projeto de mestrado e tornaram o dia-a-dia muito leves e prazerosos, Maria Isabel Mariottini, Juliana de Carvalho Santos, Estevão Camillo da Costa, Amanda Barbério e Amanda Figueiredo.

Aos funcionários da Embrapa Joyce Yumi Inoue Tosi e Carlos Policarpo pela amizade e ajuda em relação à reserva técnica fornecida pela FAPESP. À Flávia Aline Bressani por todo o suporte, amizade e por alegrar meus dias com chocolates.

À funcionária da limpeza Sol, que manteve o nosso ambiente de estudos muito limpo e sempre me recebia com muita alegria e simpatia.

Às moradoras e ex moradoras da república Chá na Brasa, onde residi durante minha graduação em Jaboticabal, expresso o meu agradecimento por me acolherem novamente com muito amor quando retornei à cidade para cursar as disciplinas do mestrado. Meu carinho por elas é eterno, e foi lá que minha trajetória acadêmica teve início.

Aos membros da banca, Drª. Cristina Santos Sotomaior e Drª. Ana Cláudia Alexandre de Albuquerque, que aceitaram o convite e se dispuseram a colaborar e contribuir com a minha dissertação de mestrado.

À minha querida UNESP/FCAV, a qual sinto muito orgulho de fazer parte, primeiramente na graduação e agora na pós-graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de mestrado (processo nº 2022/00776-8).

SUMÁRIO

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS ii
RESUMO iii
ABSTRACT iv
CAPÍTULO 1- Considerações gerais 1
1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO DE LITERATURA 2
2.1 Crescimento da ovinocultura e potencial das raças Santa Inês, Texel e White Dorper 2
2.2 Impacto dos nematódeos gastrintestinais na ovinocultura 5
2.3 Resistência dos nematódeos gastrintestinais aos anti-helmínticos 9
REFERÊNCIAS 20
CAPÍTULO 2- Association of β-globin polymorphisms and tolerance to haemonchosis in ewes and lambs of different sheep breeds 35
Abstract- 35
1 INTRODUCTION 37
2 MATERIAL AND METHODS 39
2.1 Experimental design 39
2.2 Genotyping for identification of β-globin haplotypes in ewes and lambs 40
2.3 Phenotypic data 41
2.6 Statistical analysis 41
3 RESULTS 43
4 DISCUSSION 45
5 CONCLUSION 49
REFERENCES 56
CAPÍTULO 3- Considerações finais 61

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Embrapa
Pecuária Sudeste

CERTIFICADO
CEUA PRT Nº 02/2022

Certificamos que o projeto de Pesquisa intitulado: "Abordagem parasita-hospedeiro-ambiente para controle da resistência anti-helmíntica em rebanhos ovinos", sob responsabilidade da pesquisadora científica Dra. Ana Carolina de Souza Chagas, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Pecuária Sudeste.

(We hereby declare that the research project titled "Parasite-host-environment approach to control anthelmintic resistance in sheep flocks" has been registered under the responsibility of Dra. Ana Carolina de Souza Chagas involving production, management or utilization of animals from phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except humans). The described experimental protocol is in accordance to the Brazilian Federal Law on Animal Experimentation (#11.794, enacted on 8th October 2008), to the Decree 6.899 (enacted on 15th July 2009) and the corresponding rules of National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA), and it was approved by the Committee of Animal Experimentation of Embrapa Southeast Livestock.)

São Carlos, 04 de Março de 2022.

Dr Alexandre Rossetto Garcia
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Embrapa Pecuária Sudeste

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/12/2021 a 31/11/2026
Espécie / Linhagem / Raça	Ovino / Ovis aries / White Dorper, Texel, Santa Inês e Ile de France
Número de Animais	871
Peso / Idade	03 a 40 kg / 01 a 12 meses | 40 a 60 kg / 12 a 60 meses
Sexo	Macho e fêmea
Origem	Embrapa Pecuária Sudeste

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Rod. Washington Luiz, km 234 Caixa Postal 339 13560-970 São Carlos, SP
Telefone (16) 3411-5600
E-mail: cppse.ceua@embrapa.br

DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE HAPLÓTIPOS DA β-GLOBINA OVINA E RESILIÊNCIA À INFECÇÃO POR *HAEMONCHUS CONTORTUS* NAS RAÇAS SANTA INÊS, TEXEL E WHITE DORPER

RESUMO

A seleção de ovinos portadores do alelo Hb-A da β- globina ovina pode ser uma ferramenta de controle das infecções por *Haemonchus contortus,* nematódeo gastrintestinal responsável pela doença hemoncose, visto que animais Hb-AA e Hb-AB sintetizam a β- globina juvenil, que possui maior afinidade pelo oxigênio, em situações de anemia ou hipóxia. O presente estudo foi realizado na Embrapa Pecuária Sudeste e objetivou relacionar o efeito dos diferentes haplótipos da β- globina ovina (Hb- AA, Hb-AB e Hb-BB) com os fenótipos de resistência frente à infecção por *H. contortus*. Foram coletadas amostras sanguíneas de 180 matrizes, sendo 61 da raça White Dorper (DO), 60 Santa Inês (SI) e 59 Texel (TX), além de 123 cordeiros, sendo 28 DO, 42 SI e 53 TX, para a conseguinte extração de DNA e qPCR utilizando sonda de hidrólise para a identificação dos haplótipos da β- globina. Os diferentes haplótipos foram relacionados com a contagem de ovos por grama de fezes (OPG), volume globular (VG), grau FAMACHA e escore corporal em matrizes e cordeiros, assim como ganho de peso em cordeiros. As frequências genotípicas dos haplótipos da β- globina para matrizes e cordeiros foram, respectivamente: 21,7% e 21,4% Hb-AA, 50% e 50% Hb-AB e 28,3% e 28,6% Hb-BB em SI; 0% e 0% Hb-AA, 18,6% e 9,4% Hb-AB e 81,4% e 90,6% Hb-BB em TX; e 0% e 0% de Hb-AA, 13,1% e 0% Hb-AB e 86,9% e 100% de Hb-BB em DO. Nas matrizes, o VG médio diferiu ($p<0,05$) entre os três haplótipos, com VG mais elevado em animais Hb-AA, seguido por Hb-AB e Hb-BB. Ao considerar cada raça separadamente, as matrizes Hb-AA SI apresentaram VG mais elevado ($p<0,05$), destacando que mesmo ao comparar ovinos de uma mesma raça, os animais com haplótipo Hb-AA mostraram desempenho superior. Cordeiros de haplótipo Hb-AA exibiram VG médio mais elevado ($p<0,05$) em comparação aos Hb-AB e Hb-BB, que não diferiram entre si. O mesmo resultado foi encontrado em cordeiros SI ao analisar cada raça separadamente. Não foram observadas associações significativas entre os haplótipos da β-globina e os demais parâmetros fenotípicos. No entanto, dado que a anemia é o principal sinal clínico de hemoncose, os resultados encontrados reforçam que ovinos portadores do haplótipo Hb-AA da β-globina são mais resilientes à hemoncose, contribuindo futuramente como uma ferramenta pioneira de melhoramento genético.

Palavras-chave: Hemoncose, ovinos, volume globular.

DETERMINATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN SHEEP β-GLOBIN HAPLOTYPES AND RESILIENCE TO *HAEMONCHUS CONTORTUS* INFECTION IN SANTA INÊS, TEXEL AND WHITE DORPER BREEDS

ABSTRACT

The selection of sheep carrying the Hb-A allele of ovine β-globin could be a tool for controlling infections by *Haemonchus contortus*, a gastrointestinal nematode responsible for the disease haemonchosis, given that Hb-AA and Hb-AB animals synthesize juvenile β-globin, which has a higher affinity for oxygen under conditions of anemia or hypoxia. This study was conducted at Embrapa Pecuária Sudeste and aimed to relate the effect of different haplotypes of ovine β-globin (Hb-AA, Hb-AB, and Hb-BB) with phenotypes of resistance to *H. contortus* infection. Blood samples were collected from 180 ewes, including 61 White Dorper (DO), 60 Santa Inês (SI), and 59 Texel (TX), as well as 123 lambs, including 28 DO, 42 SI, and 53 TX, for subsequent DNA extraction and qPCR using hydrolysis probes for haplotype identification of β-globin. The different haplotypes were related to egg counts per gram of feces (EPG), packed cell volume (PCV), FAMACHA score, and body condition score in ewes and lambs, as well as weight gain in lambs. The genotypic frequencies of β-globin haplotypes for ewes and lambs were, respectively: 21.7% and 21.4% Hb-AA, 50% and 50% Hb-AB, and 28.3% and 28.6% Hb-BB in SI; 0% and 0% Hb-AA, 18.6% and 9.4% Hb-AB, and 81.4% and 90.6% Hb-BB in TX; and 0% and 0% Hb-AA, 13.1% and 0% Hb-AB, and 86.9% and 100% Hb-BB in DO. In ewes, the mean PCV differed ($p<0.05$) among the three haplotypes, with higher PCV in Hb-AA animals, followed by Hb-AB and Hb-BB. When considering each breed separately, Hb-AA SI ewes had higher PCV ($p<0.05$), highlighting that even within the same breed, animals with the Hb-AA haplotype showed superior performance. Hb-AA lambs exhibited higher mean PCV ($p<0.05$) compared to Hb-AB and Hb-BB, which did not differ from each other. The same result was found in SI lambs when analyzing each breed separately. No significant associations were observed between β-globin haplotypes and other phenotypic parameters. However, since anemia is the main clinical sign of haemonchosis, the results found reinforce that sheep with the Hb-AA β-globin haplotype are more resilient to haemonchosis, potentially contributing as a pioneering tool for genetic improvement in the future.

Keywords: Haemonchosis, sheep, packed cell volume.

Lista de Tabelas

CAPÍTULO 2

Table 1. Overall mean (± standard deviation) of fecal egg count (FEC) (February, March, April, May, July, August, September and October) and packed cell volume (PCV) (February, March and July), and frequency of FAMACHA scores (February, March, September, October and November) and body condition scores (February, March and August) in ewes, according to the combination of sheep breeds (Dorper (DO), Santa Inês (SI) and Texel (TX)) and β-globin haplotypes (Hb-AA, Hb-AB and Hb-BB)……54

Table 2. Overall mean (± standard deviation) of fecal egg count (FEC) and packed cell volume (PCV) (collections on D63, D84, D105, D126, D147, D168, and D189) and weight gain (collections on D0, D21, D42, D63, D84, D105, D126, D147, D168, and D189), and frequency of FAMACHA and body condition score (collections on D84, D105, D126, D147, D168, and D189) in lambs, according to the combination of sheep breeds (Dorper (DO), Santa Inês (SI), and Texel (TX)) and β-globin haplotypes (Hb-AA, Hb-AB, and Hb-BB)……55

Table 3. Frequency of β-globin haplotypes (AA, AB, and BB) and alleles (βA and βB) according to sheep breed and animal category……55

Lista de Figuras

CAPÍTULO 1

Figura 1. Imagens de mórulas (a) e larvas (b) ovos e L_1 (c), L_2 (d), L_3 com bainha (e), L_4 sem bainha (f) e adulto (g) de *Haemonchus contortus* obtidas por microscópio óptico. As setas mostram esôfago em L_2 (d), cauda de L_3 sem bainha (f) e papilas cervicais no adulto (g) de *H. contortus*. Fonte: Costa-Junior et. al. (2020). 7

CAPÍTULO 2

Figure 1. Effect of β-globin haplotypes (Hb-AA, Hb-AB, and Hb-BB) and sheep breeds (Dorper (DO), Santa Inês (SI), and Texel (TX)) on packed cell volume (PCV) in ewes…….50

Figure 2. Effect of β-globin haplotypes (Hb-AA, Hb-AB, and Hb-BB) and condition (0 = not pregnant, 1 = pregnant and raised the lamb and 2 = pregnant, but the lamb was subjected to artificial feeding) on packed cell volume (PCV) in Santa Inês ewes……..51

Figure 3. Effects of β-globin haplotypes (Hb-AA, Hb-AB, and Hb-BB) and sheep breeds (Dorper (DO), Santa Inês (SI), and Texel (TX)) on packed cell volume (PCV) in lambs……52

Figure 4. Effect of β-globin haplotypes (Hb-AA, Hb-AB, and Hb-BB) and artificial feeding (yes = orphan lambs and no = lambs that stayed with their mothers) on packed cell volume (PCV) in Santa Inês lambs……53

CAPÍTULO 1- Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura é praticada em quase todo o mundo, devido ao seu alto poder de adaptação a diferentes climas e sistemas de produção (Bhatt e Abassi, 2021). Atualmente existem 5.073.324 estabelecimentos agropecuários no Brasil, dos quais 525.882 (10,4%) incluem a criação de ovinos como atividade produtiva, totalizando um rebanho de 21.514.274 animais (ovelhas e carneiros), patamar que coloca o país como o 10º maior rebanho do mundo, sendo a Bahia o maior estado produtor (IBGE, 2022).

Todos os sistemas de produção animal estão sujeitos a doenças parasitárias e seus consequentes prejuízos (Bishop, 2012). Na ovinocultura, o grande obstáculo que causa sérias perdas econômicas, é o nematódeo gastrintestinal (NGI) *Haemonchus contortus* (Almeida et al., 2010; Amarante, 2014; Lins et al., 2022), principal espécie que parasita ovinos em regiões tropicais (Amarante, 2014), perfazendo aproximadamente 80% da carga parasitária (Arosema et al., 1999). Com alta patogenicidade, o helminto é responsável pela hemoncose, doença limitante para o desenvolvimento geral do setor de pequenos ruminantes, devido à redução da produtividade, alta mortalidade, morbidade e custo de tratamento (Rahal et al., 2022).

O controle dos NGI dependeu por muitos anos de três classes principais de compostos anti-helmínticos (AH): benzimidazois (BZs), lactonas macrocíclicas (LMs) e imidotiazois (IMs) (Mate et al., 2022) e devido à administração frequente e muitas vezes indiscriminada, resultou em altos níveis de resistência, tornando os nematódeos multirresistentes um problema mundial (Love et al., 2003; Williamson et al., 2011; Lamb et al., 2017; Kotze et al., 2018; Kaplan, 2020). A situação atual de resistência inclui até os medicamentos lançados mais recentemente, como o monepantel (Albuquerque et al., 2017).

Com isso, é imprescindível a busca por métodos de suporte ao controle dos NGI que reduzam a dependência do uso de AH. Opções para o controle integrado das infecções por NGI incluem medidas de manejo como gestão melhorada, boa nutrição,

diagnóstico precoce de doenças e ferramentas de melhoramento genético (Bishop, 2012). Nesse contexto, um método de controle de suporte é a correlação dos diferentes haplótipos da β- globina ovina (Hb- AA, Hb-AB e Hb-BB) com os diferentes fenótipos de resistência e susceptibilidade à infecção por *H. contortus*. Estudos foram realizados a partir da década de 1960, relatando maior resistência a *H. contortus* em animais portadores do alelo βA, compreendendo os haplótipos Hb-AA e Hb-AB, com destaque para o primeiro (Evans et al., 1963; Jilek e Bradley, 1969; Allonby e Urquhart, 1976; Preston e Allonby, 1979; Okino et al.; 2021a; Okino et al., 2021b; Okino et al.,2023), podendo se tornar, no futuro, uma importante ferramenta de melhoramento genético na seleção de ovinos resistentes/resilientes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Crescimento da ovinocultura e potencial das raças Santa Inês, Texel e White Dorper

O registro mais antigo da introdução dos ovinos no Brasil consta na carta de Pero Vaz de Caminha ao Rei de Portugal, tabelião da frota de Pedro Álvares Cabral, citando-os no seguinte trecho “Não cultivam nem criam animais. Nem um boi aqui, ou uma vaca, ou uma cabra, ou uma ovelha, ou uma galinha, ou qualquer outro alimento, que sirva para os homens viverem”. Na colonização, ovinos e caprinos foram trazidos nas embarcações portuguesas para alimentar os passageiros e tripulantes durante as viagens e, os poucos que chegaram ao continente, se tornaram os primeiros rebanhos da região (Guimarães et al., 2022).

Atualmente a região Nordeste concentra 68% dos ovinos brasileiros, a região Sul 20% e a Sudeste 3% (Magalhães et al., 2020). Esses rebanhos apresentam algumas diferenças, considerando os aspectos raciais e sistemas de exploração utilizados. Na região Sul, a ovinocultura baseia-se na produção conjunta de carne e lã, cuja principal finalidade é a subsistência, sendo considerada uma atividade secundária pelos pecuaristas de corte do estado e servindo como alternativa em situações de oscilação do mercado de carne bovina (Matte e Waquil, 2021). No Nordeste, o rebanho ovino é constituído principalmente por animais deslanados,

destinados à ovinocultura de corte e exploração do couro (Marinho et al., 2023), tendo apresentado crescimento significativo, mesmo com precipitações abaixo do esperado na última década (Silva et al., 2021). Já no Sudeste, embora o rebanho ovino não seja tão numeroso, a atividade é mais tecnificada, tendo sua produção voltada à demanda interna de carnes especiais (Zen et al., 2014). Nessa região, novos produtores investem na produção de carne ovina com foco em mercados diferenciados, especialmente para abastecer redes varejistas e restaurantes de grandes centros urbanos, como São Paulo e Rio de Janeiro (Matte e Waquil, 2021).

Existe no Brasil uma grande diversidade na criação de raças ovinas exóticas, tais como Texel, Ile de France, Suffolk e Dorper, bem como de raças nativas deslanadas adaptadas às condições tropicais, como Santa Inês e Morada Nova, sendo estas consideradas mais resistentes à verminose (Amarante et al., 2004, Rocha et al., 2005; Toscano et al., 2020). Em um balanço feito por Bassetto et al. (2024), as principais raças ovinas criadas nas fazendas do estado de São Paulo são Santa Inês, Dorper, Ile de France, Texel, Suffolk, White Dorper e seus cruzamentos.

A raça Santa Inês é encontrada em todas as regiões do Brasil e é considerada patrimônio nativo brasileiro (Landim et al., 2021), possuindo alto valor adaptativo e reprodutivo, destacando-a no cenário da ovinocultura de corte, com o diferencial por apresentar resistência acentuada aos NGI (Neto et al., 2018; Bezerra et al., 2022), especialmente a espécie *H. contortus*, além de possuir elevada habilidade materna, boa prolificidade e rápida maturação reprodutiva (Balaro et al., 2014). É a maior raça ovina deslanada brasileira, sendo a mais numerosa no Nordeste, uma vez que está bem adaptada às condições severas do clima semiárido (Sousa, 2013), o que, adicionalmente, impulsionou sua criação devido ao menor estresse térmico provocado pelas alterações climáticas (Moura et al., 2019).

Os ovinos lanados da raça Texel originaram-se na Holanda e possuem uma série de características desejáveis, incluindo uma longa vida útil, resistência ao frio, precocidade sexual, forte instinto materno, alto percentual de partos múltiplos, rápido crescimento e grande potencial reprodutor para cruzamento com outras raças (Li et al., 2009). Além disso, a raça possui aptidão em produzir cordeiros pesados, com grande proporção de músculo, o que a caracteriza como eminente produtora de carne

(Mendonça et al., 2007). Em relação aos NGI, essa raça possui resistência intermediária a *H. contortus* (Gonçalves et al., 2018).

Exatamente os mesmos padrões de raça são aplicados a Dorper e White Dorper. A diferença entre essas duas raças semi-deslanadas, originárias da África do Sul, se atém unicamente à cor da pelagem: enquanto a Dorper apresenta corpo branco e cabeça completamente preta, a White Dorper é inteiramente branca (Milne, 2000). As raças possuem pele grossa que as protegem das condições climáticas adversas, sendo muito valorizada no mercado internacional, conhecida com o nome de *Cape Glovers* (Otto, 1997). Dispõem também de alta adaptabilidade, taxas de reprodução e crescimento excepcionais (alcançando 36 quilos em três ou quatro meses), tendo um grande potencial para o corte (Barros et al., 2004). Do ponto de vista comportamental, ambas são bastante semelhantes, sendo muito dóceis e de fácil manejo (Cardoso et al., 2008) em relação à Santa Inês. Todavia são altamente suscetíveis à infecção por *H. contortus* (Mugambi et al., 1997; Wanyangu et al., 1997). Estima-se que a verminose causa decréscimo entre 17% e 27% no ganho em peso de cordeiros Dorper, criados em pastagem, mesmo quando os animais são tratados seletivamente com anti-helmíntico (Starling et al., 2019).

Segundo Santos e Borges (2019), a demanda por carnes de caprinos e ovinos em cortes padronizados, bem como por vísceras devidamente processadas, embaladas e comercializadas de forma resfriada ou congelada, vem apresentando crescimento considerável nas grandes cidades do Nordeste e Sudeste do Brasil, principalmente nas áreas onde habitam a população com um maior poder aquisitivo. Em contrapartida, o último censo agropecuário mostra redução de 30% na produção de lã ovina, de 10 para 7 milhões de toneladas, em relação ao levantamento realizado em 2006, mostrando que nos últimos anos o país, incluindo a região Sul, tem direcionado os seus rebanhos para a produção de carne (Guimarães et., al 2022).

A comercialização de animais é um bom indicador da dinâmica do setor. O número de ovinos comercializados expandiu de 2,28 para 3,37 milhões de cabeças vendidas, apresentando uma taxa de crescimento de aproximadamente 50% entre 2006 e 2017, gerando uma movimentação de R$641 milhões (IBGE, 2017). O aumento na comercialização desses animais é um indicativo da profissionalização da

atividade, pois mostra que os ovinos se tornaram uma fonte de renda monetária e não apenas uma atividade de subsistência (Guimarães et al., 2022).

Entretanto, embora a prática da ovinocultura seja crescente, o Brasil possui 21.514.274 de ovinos (IBGE, 2022), número que não é capaz de abastecer o mercado interno, visto que, em 2017, foram importadas 6,5 mil toneladas de carne ovina (Forbes, 2019). Isso demonstra a necessidade permanente de estudos direcionados para a produção e sanidade das principais raças criadas no Brasil, visando avanços que possibilitem gerar um crescimento expressivo da ovinocultura, a fim de reduzir a importação até que, futuramente, o país possa se tornar autossuficiente em carne ovina.

2.2 Impacto dos nematódeos gastrintestinais na ovinocultura

As infecções por NGI são o principal obstáculo à produção ovina (Mederos et al., 2010). No Brasil, as mortes ocasionadas por doenças parasitárias em ovinos podem gerar perdas estimadas em US$ 13 milhões por ano, enquanto a redução no ganho de peso representa um prejuízo de até US$ 94,5 milhões por ano (Chagas,et al., 2022). O gênero *Haemonchus* spp. foi descrito pela primeira vez em 1803 por Karl Rudolph (Soulsby, 1968) e *Haemonchus contortus* é a mais importante espécie de NGI, tendo origem em mamíferos ungulados selvagens da África subsaariana e disseminando-se pelo mundo através da movimentação dos hospedeiros e intervenção humana (Gilleard e Redman, 2016; Sallé et al., 2019). Trata-se de um helminto hematófago parasita de ovinos e caprinos em regiões com clima tropical e subtropical que causa diversos graus de anemia e hipoproteinemia, além de possuir alta prevalência e patogenicidade (Bertagnon et al., 2019). Taxonomicamente pertencente à classe Nematoda, ordem Strongylida, Superfamília Trichostrongyloidea, Família Trichostrongylidae e gênero *Haemonchus* (Vieira e Cavalcante, 1999). Levantamentos realizados revelam que mais de 80% da carga parasitária de caprinos e ovinos é composta por *H. contortus* (Costa e Vieira, 1984; Girão et al., 1982; Arosemena et al., 1999). No estado de São Paulo, Gonçalves et al. (2018) indicaram a maior prevalência para *Haemonchus* spp. (85,6%), seguido por *Trichostrongylus* spp. (10,8%), *Oesophagostomum* spp. (2,9%) e *Cooperia* spp. (0,7%). *H. contortus*

possui ciclo evolutivo direto, com período pré- patente de duas a três semanas (Urquhart et al., 1998). O ciclo inicia-se com a liberação dos ovos nas pastagens, por meio das fezes e posterior eclosão, com desenvolvimento das larvas até o estágio infectante L_3 (Ma et al., 2018). Após a ingestão e o desencapsulamento no rúmen, as larvas sofrem duas mudas, desenvolvendo uma lanceta perfurante bucal para penetrar na mucosa abomasal do hospedeiro e ingerir o sangue, desenvolvendo-se então para o estágio adulto (Urquhart et al., 1998). Devido ao seu baixo metabolismo e reservas energéticas, as larvas conseguem sobreviver por longos períodos a baixas temperaturas (Almeida et al., 2020). Além disso, alguns NGI, como *H. contortus,* desenvolveram o mecanismo denominado anidrobiose, no qual entram em dormência metabólica por desidratação e se tornam ativos novamente após a reidratação (Yang et al., 2015), permitindo sua sobrevivência em ambientes adversos através da manutenção da homeostase das proteínas (Choe e Strange, 2008). A severa anemia causada por esses nematódeos pode levar o animal à morte, mesmo antes do período pré-patente, quando ocorrem infecções com mais de 500 parasitas (Emery et al., 2016). A fêmea adulta é altamente prolífica, produzindo entre 5.000 e 15.000 ovos diariamente (Cain et al., 2024). Esses estágios estão indicados na Figura 1.

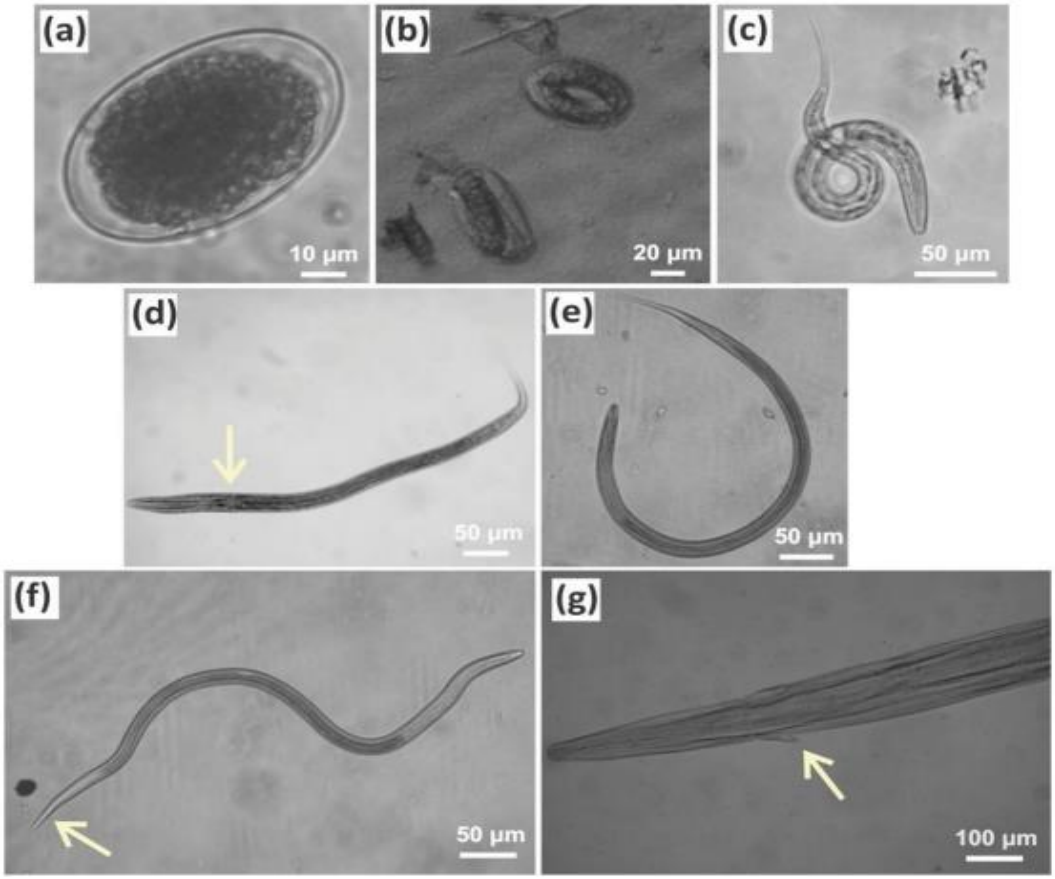

Figura 1. Imagens de mórulas (a) e larvas (b) ovos e L_1 (c), L_2 (d), L_3 com bainha (e), L_4 sem bainha (f) e adulto (g) de *Haemonchus contortus* obtidas por microscópio óptico. As setas mostram esôfago em L_2 (d), cauda de L_3 sem bainha (f) e papilas cervicais no adulto (g) de *H. contortus*. Fonte: Costa-Junior et. al. (2020).

A infecção por essa espécie pode levar à hemoncose, sendo que a magnitude dessa doença depende da carga parasitária, do estágio de desenvolvimento, da idade, e resposta imune dos ovinos infectados (Flay et al., 2022). A patogenia da hemoncose caracteriza-se essencialmente por uma anemia hemorrágica aguda, resultante do comportamento hematófago desse NGI, sendo que um ovino infectado com 5.000 *H. contortus* adultos pode perder aproximadamente 250 mL de sangue por dia (Urquhart et al., 1998).

A hemoncose hiperaguda é mais comum em cordeiros, quando os animais são expostos a altas cargas de *H. contortus* durante um curto período de tempo, ocorrendo morte súbita, sem sinais clínicos prévios, entretanto, pode ser detectada anemia e melena nos animais sobreviventes (Besier et al., 2016). A anemia grave causa uma rápida diminuição do volume sanguíneo circulante e da pressão arterial,

culminando em choque hipovolêmico, onde a perfusão tecidual é insuficiente para sustentar o metabolismo aeróbio (Gutierrez et al., 2004). Entretanto, apenas o abomaso pode apresentar alterações, uma vez que a morte pode ser súbita, de modo que as alterações medulares são mínimas (Urquhart et al., 1998).

Na hemoncose aguda, a carga parasitária é menor, em relação à hiperaguda, resultando numa menor perda de sangue em um período mais prolongado, apresentando sinais clínicos como como letargia, fraqueza, aumento da frequência respiratória e cardíaca e membranas mucosas pálidas (Flay et al., 2022). Há uma redução inicial no volume globular (VG), mas ocorre a eritropoiese compensatória nos primeiros 14 dias de infecção, e a compensação total e a recuperação aparente são observadas em seis semanas após a infecção (Dargie et al., 1975). Entretanto, a hemorragia persistente ao longo de semanas excede a capacidade de reabsorção de ferro pelo intestino, resultando no esgotamento gradual de suas reservas e culminando em um quadro de deficiência de ferro (Dargie et al., 1975). O histórico e a sintomatologia clínica dos animais são suficientes para o diagnóstico da síndrome aguda, especialmente se confirmado pela contagem de ovos por grama de fezes (OPG) (Urquhart et al., 1998).

Já na hemoncose crônica ou subclínica, os animais abrigam uma menor carga parasitária e as infecções podem não ser diagnosticadas (Besier et al., 2016), pois usualmente os animais infectados não apresentam sinais clínicos (Nehra et al., 2019). A infecção pode apresentar redução na produtividade, conversão alimentar, taxa de crescimento ou produção de leite (Cobon e O’ Sullivan, 1992), sendo clinicamente evidente quando a carga parasitária aumenta ou em condições nutricionais inadequadas (Flay et al., 2022). O diagnóstico é mais difícil devido à presença simultânea de subnutrição, e a confirmação pode depender do desaparecimento gradativo da síndrome após o tratamento com AH (Urquhart et al., 1998).

Durante a infecção, a demanda por proteína e energia no trato digestivo aumenta para que haja a reparação do tecido abomasal danificado e o subsequente desenvolvimento da imunidade local e sistêmica. Todavia, esse aumento da demanda prejudica o fornecimento de nutrientes para outros tecidos, representando os custos nutricionais e metabólicos da infecção. Esses custos incluem não apenas o impacto direto do nematódeo (nutrientes necessários para compensar a perda sanguínea e

danos na mucosa do hospedeiro), mas também a resposta do hospedeiro à infecção (Ramos-Bruno et al., 2021).

Somada à elevada patogenicidade, esses helmintos ainda são capazes de completar seu ciclo biológico em espaços de tempo curtos, possuindo alta fertilidade e variabilidade genética, características que facilitam a seleção de linhagens resistentes a anti-helmínticos (AH) (Cavalcante et al., 2009; Gravdal et al., 2023), expondo a necessidade de novas e eficientes medidas de controle.

2.3 Resistência dos nematódeos gastrintestinais aos anti-helmínticos

Nas últimas décadas o controle de NGI tem sido realizado majoritariamente com o uso de AH. Devido ao seu uso inadequado e indiscriminado, há relatos de resistência anti-helmíntica (RA) nas fazendas de todo o mundo (Veríssimo et al., 2012) As condições climáticas que prevalecem na maior parte do Brasil favorecem o desenvolvimento de NGI, tornando o uso sistemático de AH uma prática comum nos rebanhos ovinos, culminando na resistência à maioria das substâncias químicas comerciais (Veríssimo et al., 2012; Cintra et al., 2016; Bassetto et al., 2024).

A RA pode ser definida como “a sobrevivência do parasito ao tratamento e transmissão de genes associados à resistência à sua prole” (Sangster et al., 2018). Durante o tratamento com AH, estima-se que uma pequena parcela de parasitas sobreviva, correspondendo à proporção mais resistente da população. Esses parasitas transmitem o gene de resistência para as gerações subsequentes, levando gradativamente à seleção de indíviduos com RA (Papadopoulos, 2008). Múltiplos fatores como barreiras geográficas, extensa população, diversas espécies de hospedeiros, assim como suas movimentações, podem influenciar na estrutura genética de *H. contortus* (Pitaksakulra et al., 2021). Estudos analisando as sequências de DNA mitocondrial revelaram que há uma diversidade genética nas populações desse nematódeo em países como Brasil (Brasil et al., 2012), China (Yin et al., 2013), Malásia e Iêmen (Gharamah et al., 2012) e Bangladesh (Dey et al., 2019).

A administração incorreta dos AH é o fator que provavelmente mais contribui para o aparecimento de RA, em especial no que diz respeito à subdosagem, em que o cálculo da dose é muitas vezes baseado no peso corporal médio dos ovinos de um

rebanho. Assim animais mais pesados recebem uma dose abaixo da necessária e recomendada pelo fabricante (Ahuir-Baraja et al., 2021). Além disso, em relação aos princípios ativos utilizados, há recomendações controversas (Chagas et al., 2016). Enquanto alguns autores recomendam a rotação dos AHs dentro de um ano ou após cada tratamento (Köse et al., 2007; Dobson et al., 2011), outros sugerem rotacioná-los lentamente ou anualmente (Van Wyk, 2001; Leathwick, 2013) ou ainda utilizar um AH até que ele não seja mais eficaz (Le Jambre et al., 1977; Fleming et al., 2006). Estudos revelam que todas as três estratégias estão sendo adotadas pelos agricultores (Rojo-Vázquez e Hosking, 2013).

Os cordeiros são os mais afetados do rebanho pelos NGI e geralmente o tratamento AH é direcionado a eles (Morgan et al., 2012). Já as ovelhas tornam-se mais susceptíveis à infecção no período de periparto, devido à redução da imunidade causada por alterações metabólicas. Sendo assim, quando não há separação por categorias, as ovelhas periparturientes excretam mais ovos de nematódeos, contaminando a pastagem dos cordeiros em crescimento (Hamer et al., 2019). Nessa conjuntura é comum a utilização de AH no período periparturiente, fator que aumenta o desenvolvimento de RA, uma vez que eleva a prevalência de indivíduos resistentes na população de NGI daquele pasto, que posteriormente infectam seus cordeiros, removendo assim uma importante fonte de parasitas não selecionados para a resistência (Williams et al., 2021).

Na ovinocultura, as principais classes de substâncias utilizadas em AH são: benzimidazois (BZs), imidazotiazois (IMs) e lactonas macrocíclicas (LMs), sendo inicialmente muito eficazes, de modo que o seu uso aumentou rapidamente (Kaplan, 2020). Esse uso em larga escala culminou no surgimento de resistência a essas drogas, com os primeiros casos de resistência a BZ em *H. contortus* relatados na literatura em 1964 (Drudge et al., 1964). Estudos demonstraram que a resistência a essa classe está relacionada a três polimorfismos de nucleotídeos, que dão origem às mutações F167Y (TTC -TAC), E198A (GAA-GCA) e F200Y (TTC -TAC) no gene isótipo 1 β- tubulina de *H. contortus* (Kwa et al., 1994; Ghisi et al., 2007; Baltrusis et al., 2020;).

Já o levamisol, AH imidazotiazol mais utilizado, atua como agonista colinérgico nas membranas musculares de nematódeos e tem sua resistência associada à

reduzida capacidade do levamisol de se ligar aos receptores nicotínicos de acetilcolina (Sangster e Gill, 1999), com os primeiros casos de resistência em NGI descritos na década de 1970 (Martin e Le Jambre, 1979).

A resistência dos NGI às LMs tem sido relatada há mais de 20 anos atrás (Molento et al., 1999; Ranjan et al., 2002). Foram relatadas evidências de múltiplos mecanismos para o desenvolvimento de resistência a essa classe: mutação em um alelo na subunidade α do gene que codifica canais iônicos de cloreto controlados por glutamato (Blachall et al., 1998); mutações dos genes que codificam o receptor do ácido γ-aminobutírico (Blackhall et al., 2003) e também a mutação do resíduo de glicina nos canais a3B do íon cloreto controlado por glutamato expressos em células HEK293 (Lyanagh e Lynch, 2010).

Em 2008 foi anunciado o primeiro AH derivado de aminoacetonitrila, o monepantel, mostrando-se como a solução dos casos de resistência múltipla aos AH dos três grupos clássicos (Kaminsky et al., 2008). Lançado em 2009 na Nova Zelândia, dois anos após sua introdução, já foi confirmada a resistência em *Teladorsagia circumcincta* e *Trichostrongylus colubriformis* em caprinos e ovinos (Scott et al., 2013). Desde então, relatos de resistência ao monepantel em *H. contortus* têm sido descritos em países como Uruguai (Mederos et al., 2014), Holanda (Van den Brom, et al., 2015) e Brasil (Albuquerque et al., 2017; Niciura et al., 2020). Kaminsk et al. (2008) associaram essa RA a mutações nos genes dos receptores nicotínicos de acetilcolina, Hco-des-2H e Hco-acr-23H ou Hco-MPTL-1 (sítios visados pelo monepantel).

Estudos recentes realizados por Kellerova et al. (2020) e Dimunová et al. (2022) revelaram que os resíduos e metabólitos de BZ que circulam no meio ambiente, excretados por animais tratados, bem como o uso dessas fezes como fertilizantes das pastagens, também estão associados à resistência do *H. contortus* aos AH. Uma vez presente nas forrageiras, os metabólitos dos BZ podem ser ingeridos pelos ovinos. Estes, ao se infectarem com as L_3 de *H. contortus*, promovem a exposição dos helmintos a doses subletais dos BZ, aumentando a expressão e atividade dos citocromos P450, UDP-glicosiltransferases, P-glicoproteínas e a capacidade dos nematódeos de desativar esse AH no tratamento subsequente.

Visto que esses helmintos desenvolveram RA às classes de fármacos amplamente utilizados, conforme detalhado anteriormente, existe um claro desafio

para o controle efetivo de infecções por NGI. Por isso, é de suma importância a adoção de medidas alternativas que reduzam a dependência aos AH, uma vez que o número de classes químicas é relativamente restrito. Nessa atual situação de falta de orientação profissional e facilidade de acesso aos AH, que leva ao seu uso frequente e indiscriminado, mesmo que novos princípios ativos surjam, o estabelecimento da RA se estabelece muito rapidamente.

2.4 Resistência e resiliência dos ovinos aos nematódeos gastrintestinais

Hospedeiros resistentes aos NGI são identificados por fatores genéticos baseados em fenótipos como carga parasitária, validado através do OPG (Kim et al., 2014; Berton et al., 2017; Bell et al., 2019) ou pela estimativa do impacto que a infecção acarreta no hospedeiro (Bell et al., 2019), como por exemplo pela mensuração dos níveis de eritrócitos ou glóbulos vermelhos, através do hematócrito (Albers et al., 1990). Por outro lado, existe também a resiliência ou tolerância, definida como a capacidade do hospedeiro de manter o seu desempenho apesar da infecção (Bishop e Stear, 2003). A resiliência é comumente mensurada através do VG e do ganho de peso dos animais infectados (Bisset e Morris, 1996). Enquanto a resistência está associada à capacidade imunológica do indivíduo em apresentar cargas mais baixas de nematódeos e menores valores de OPG, animais resilientes apresentam desempenho satisfatório diante do desafio parasitário, mesmo abrigando uma carga parasitária elevada indicada por OPG altos (Morris et al., 1997). Ovinos resistentes excretam menos ovos, reduzindo a contaminação do ambiente por larvas, beneficiando todos os animais que compartilham o mesmo pasto, independentemente do seu grau de resistência (Bishop, 2012).

O termo "refúgio" foi designado para definir a proporção da população de parasitas que não foi exposta a nenhum método de controle, evitando assim a seleção para a RA (Van Wyk, 2001). No caso dos NGI, a população de parasitas em refúgio compreende principalmente a fração dos estágios de vida livre que não foram expostos aos AH (Besier, 2012). Isso propõe que a diluição de NGI resistentes, que sobrevivem ao tratamento com AH, com a população em refúgio de um

estabelecimento, reduz a pressão de seleção para resistência em uma população, contribuindo para a redução de parasitas resistentes nas gerações subsequentes (Van Wyk, 2001). Assim, o benefício da presença de animais resilientes em um rebanho é a manutenção de refúgios de parasitas, uma vez que sua presença resulta em menos animais identificados como indivíduos que necessitam de tratamentos com agentes AH (Marques et al., 2020).

Mecanismos imunológicos coíbem o estabelecimento e desenvolvimento das larvas dos NGI e diminuem a fecundidade dos adultos (Ahmed et al., 2015), reduzindo a excreção de ovos e a contaminação do ambiente (Greer, 2008). A resposta imune contra as infecções por NGI pode ser influenciada por diversos fatores, como idade, sexo e estado fisiológico (especialmente periparto) (Amarante et al., 2004; Hayward, 2013). Ao se alimentarem do sangue abomasal do hospedeiro, larvas e adultos de *H. contortus* estimulam o sistema imune dos ovinos através do reconhecimento de antígenos (Naeem et al., 2021), levando à ativação de respostas imunológicas humorais e celulares (Emery et al., 2016). Ovinos infectados possuem altas concentrações de células T no abomaso e quando estimuladas pelos antígenos, liberam citocinas mensageiras (Naeem et al., 2021), ativando eosinófilos, mastócitos e leucócitos globulares, tanto no local da infecção, bem como na corrente sanguínea (Robinson et al., 2010). As manifestações da resposta imune incluem a interrupção do desenvolvimento do parasita, redução do tamanho, fecundidade e eliminação de adultos (Shakya et al., 2011, Santos et al., 2014; Balic et al., 2000).

Além disso, as células B quando ativadas pelas citocinas, produzem e liberam anticorpos IgA, IgE e IgG específicos, que estarão presentes no soro, mucosa e saliva, como parte da imunidade adquirida (Hernandez et al., 2016; Escribano et al., 2019). Dessa forma, ovinos resistentes podem apresentar níveis mais elevados desses anticorpos circulantes do que raças suscetíveis (MacKinnon et al., 2010), sendo que o nível de resistência varia entre as diferentes raças e linhagens de ovinos domésticos (Escribano et al., 2019; Toscano et al., 2019). Indivíduos suscetíveis apresentam linfócitos, leucócitos globulares, mastócitos e eosinófilos reduzidos na mucosa do abomaso, além de menor concentração de IgG, IgE e IgA, facilitando o desenvolvimento dos NGI (Albuquerque et al., 2019). Lins et al. (2022) observaram que cordeiros de raças resistentes apresentam linfonodos maiores em relação a raças

suscetíveis, além de aumento da espessura da mucosa associado ao aumento da infiltração de células inflamatórias nos tecidos do abomaso, indicando uma resposta imune inata mais eficiente contra *H. contortus.*

Mecanismos evolutivos, como a deriva genética, promoveram uma série de adaptações nas raças introduzidas no Brasil desde a época do descobrimento. Somado a esse processo, a modernização da agricultura no Brasil culminou na introdução de raças exóticas altamente especializadas (Lobo, 2019; Nunes et al., 2022). Nesse contexto, algumas raças de ovinos demonstram resistência genética contra *H. contortus* (Amarante et al., 2009) e Santa Inês é uma raça reconhecidamente resistente, sobretudo quando associada a uma boa nutrição (Chagas et al., 2013), apresentando elevado índice de eosinófilos no sangue, altos níveis de IgG, OPG reduzido, baixa carga parasitaria, além de demandar menos tratamentos com anti-helmínticos, em comparação com outras raças comerciais (Amarante et al., 2004; Rocha et al., 2011; Albuquerque et al., 2019). Lins et al. (2022) demonstraram ainda que mesmo cordeiros Santa Inês lactentes apresentam elevada resistência à *H. contortus* em comparação aos Ile de France, sendo capazes de desenvolver ampla resposta imune inata nas primeiras semanas de vida. Contrariamente, a resposta imune primária de ovinos da raça Texel, ocorre de maneira lenta (Schallig et al., 1994). Segundo Gonçalvez et al. (2018), ovinos da raça Texel possuem resistência intermediária à *H. contortus*, enquanto indivíduos da raça Dorper possuem baixa resistência.

Essas diferenças entre as raças podem ser resultado da seleção genética com ênfase em diferentes características, ou mesmo da seleção natural de raças originárias em localizações geográficas diversas (Amarante et al., 2009), permitindo o estudo de genes específicos (Stear e Murray, 1994). Segundo Amarante (2014), a resistência aos NGI é hereditária, com isso, é possível incluir essa variável em programas de seleção. Um dos principais benefícios de aumentar a resistência aos NGI através de ferramentas genéticas é o efeito epidemiológico do OPG reduzido (Bishop e Stear, 1999), já que ovinos resistentes liberam menos ovos no ambiente, reduzindo a contaminação do pasto, beneficiando não apenas os geneticamente mais resistentes, mas também todos os outros que compartilham do mesmo pasto (Bishop, 2021). Entretanto, a seleção de animais resistentes em um rebanho deve ser praticada

com cautela para que outras características produtivas desejáveis não sejam comprometidas, tais como o ganho de peso (Naeem et al., 2021).

Além disso, é possível também realizar a seleção de indivíduos resistentes ou resilientes à *H. contortus* em ovinos da mesma raça (Aguerre et al., 2018), já que até em raças consideradas suscetíveis, podem existir ovinos com maior capacidade de desenvolver imunidade contra NGI (Lins et al., 2022). Diversos estudos com marcadores genéticos, como loci de características quantitativas, algoritmos baseados em parâmetros hematológicos, indicadores imunológicos e marcadores moleculares associados à resistência aos NGI em ovinos têm sido realizados e até mesmo um teste genômico que avalia a variação individual da resistência entre ovinos, já é comercializado (Bishop e Morris, 2007; Ali et al., 2019; Von Haehling et al.; 2020, Rawat et al., 2021.; Arsenopoulos et al., 2021). Uma vez que vários genes de um único indivíduo podem contribuir com o fenótipo final de resistência do hospedeiro, estudos que correlacionem os fenótipos de resistência aos NGI com cada polimorfismo de nucleotídeo único, são de extrema relevância (Kalaldeh et al., 2019). Assim, Niciura et al. (2022) realizaram um estudo com marcadores moleculares detectados por GWAS para resistência à *H. contortus* em ovinos da raça Morada Nova e encontraram 37 marcadores significativos.

Por fim, durante a infecção, a resistência do hospedeiro aos parasitas pode levar à troca de alocação de recursos, na qual nutrientes que seriam armazenados nos tecidos são destinados para o sistema imune (Coop e Kyriazakis, 1999). Nesse contexto, no período reprodutivo de fêmeas, sobretudo próximo ao parto, ocorre o relaxamento periparturiente da imunidade, em que há alocação insuficiente de proteína metabolizável, limitando a expressão do sistema imune contra os NGI (Douhard et al., 2022).

Dada a alta prevalência de infecções por NGI e a ineficácia dos AH, a seleção genética de animais resistentes ou resilientes, mesmo em indivíduos da mesma raça, tem se mostrado uma medida de controle eficaz em estudos realizados no Brasil e na África do Sul (Amarante et al., 2014; Snyman e Fisher, 2019). Dessa forma, o tratamento de animais com AH ainda será necessário, porém, restrito a categorias de maior risco, como ovelhas periparturientes e cordeiros em crescimento (Amarante, 2014). Apesar dos poucos relatos sobre a β-globina ovina e sua correlação com a

resistência à infecção por *H. contortus*, acredita-se que ela tenha uso potencial na seleção genética.

2.5 Relaxamento da imunidade periparturiente

Os ovinos tornam-se mais suscetíveis às infecções por NGI durante o período periparturiente das fêmeas (Rocha et al., 2011), que consiste no período de 3 semanas pré-parto a 3 semanas pós-parto, sendo marcado por diversas mudanças nos sistemas endócrino e imunológico, em função da preparação do organismo para a colostrogênese, parto e lactogênese (Aleri et al., 2016). O período periparturiente é caracterizado pela depressão fisiológica da imunidade e aumento dos valores de OPG (Pereira et al., 2020), em que os níveis de eosinófilos circulantes e anticorpos plasmáticos caem no final da gestação e durante a lactação de ovelhas (Garduno et al., 2021) . A intensidade desse relaxamento da imunidade periparturiente pode variar de acordo com a raça ovina (Rocha et al., 2011) e até mesmo entre indivíduos da mesma raça e do mesmo rebanho (Pereira et al., 2020), sendo que os ovinos considerados resistentes aos NGI possuem esse fenômeno menos pronunciado (Rocha et al., 2004). A susceptibilidade aos NGI nesses períodos ocorre já que o hospedeiro tende a priorizar a transmissão de seus genes, a sobrevivência da prole e a produção de leite sobre sua própria imunidade (Hoste et al., 2016), alocando uma considerável percentagem de nutrientes para as funções reprodutivas (Saccareau et al., 2016) e assim, reduzindo a disponibilidade de nutrientes a serem utilizados pelo sistema imunológico no combate aos parasitas (Almeida et al., 2012). Além disso, o último terço gestacional é marcado pelo rápido crescimento do feto, levando ao aumento das necessidades energéticas das ovelhas (Kaçar et al., 2021). Concomitantemente, nesse período a ingestão de matéria seca reduz de 10 a 30% (Hayirli et al., 2002), já que o feto aumenta seu peso em até 70%, ocupando um grande espaço abdominal (Issakowicz et al., 2016). Esse balanço energético negativo, aumenta o risco de toxemia gestacional (Pacheco et al., 2019).

O relaxamento da imunidade periparturiente leva ao aumento da liberação de ovos no ambiente, culminando na contaminação das pastagens em que estão os cordeiros e iniciando o ciclo das infecções, além de aumentar o risco de gastroenterite

parasitária clínica (Hamer et al., 2019). Esse aumento da carga parasitária também está atrelado às alterações hormonais que ocorrem durante o periparto, levando à imunossupressão de origem endócrina (Issakowicz et al., 2016).

A colostrogênese é um processo fisiológico essencial que ocorre durante o período periparturiente e implica na transferência de imunoglobulinas (Ig) da circulação materna para as secreções mamárias, formando o colostro (Aleri et al., 2016). A principal Ig transferida para a secreção mamária é a IgG1 (Kacskovics, 2004) e a capacidade reduzida de repor essa Ig na circulação materna pode levar à imunossupressão durante o período periparturiente (Aleri et al., 2016)

A prolactina é o hormônio peptídico responsável pelo início e manutenção da lactação e sua concentração na corrente sanguínea eleva a partir do 115º ao 135º dia de gestação das ovelhas (Banchero et al., 2006). Esse aumento dos níveis de prolactina coincide com a redução de eosinófilos circulantes e títulos de anticorpos totais e IgG (Fthenakis et al., 2015), favorecendo o crescimento dos NGI e a fertilidade das fêmeas (Garduno et al., 2021). Já a leptina está associada à hematopoiese e à indução de inflamação através da ativação de linfócitos T, produção de citocinas Th1 e supressão da produção de citocinas Th2, tendo os seus níveis aumentados na gestação e reduzidos gradualmente próximo ao parto e início da lactação (Ingvartsen e Boisclair, 2001), coincidindo com maiores valores de OPG (Rocha et al., 2011). O cortisol é um glicocorticóide liberado em situações de estresse, como no parto (Caropresse et al., 2010). O aumento nos níveis circulantes de cortisol em torno do parto desempenha um papel crítico na imunossupressão da fêmea gestante, já que esse hormônio inibe diretamente a proliferação e desenvolvimento de células T, modificando a ação das moléculas do complemento e interferindo na função da imunoglobulina, além estimular a produção de citocinas anti-inflamatórias e inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias como interferon gama (IFN-γ), fator de necrose tumoral (TNF-α) e interleucina-12 (IL-12) (Aleri et al., 2016). Os glicocorticoides também reduzem a atividade de neutrófilos e linfócitos no período periparturiente (Preisler et al., 2000), sendo que os neutrófilos são responsáveis, principalmente, por fagocitar e destruir patógenos e os linfócitos desempenham um importante papel na resposta imune adaptativa mediada por células e anticorpos (Aleri et al., 2016). Além disso, ovelhas que não são suplementadas a partir de duas

semanas antes do parto e durante a lactação com dietas ricas em proteínas, têm as concentrações de albumina e ureia reduzidas, favorecendo a proliferação dos NGI (Garduno et al., 2021).

Com isso, como uma estratégia de longo prazo destinada a melhorar a saúde, bem-estar e produtividade de ovinos de diferentes raças, a seleção de animais resistentes aos NGI, mesmo no período periparturiente, é de extrema importância.

2.6 β-globina ovina e resistência à infecção por *Haemonchus contortus*

A espécie ovina apresenta dois tipos de β-globina adulta: a A (Hb-A) e a B (Hb-B), determinadas por variações no locus gênico da β-globina. O locus da β-globina compreende um complexo gênico localizado no cromossomo OAR 15 e é composta por um conjunto básico de quatro genes (ε-ε-ψβ-β). Em animais com haplótipo Hb-A, esse conjunto é triplicado, formado por três diferentes β-globinas: a βF (fetal), βC (juvenil) e βA (adulta), diferencialmente expressos ao longo da vida do animal, e é composto por 12 genes (5'-εI-εIIψβX-βC-εIII-εIV-ψβZ-βA-εV-εVI-ψβY-βF-3') (Huisman e Kitchens, 1968; Jiang et al., 2015). Em situações de anemia ou hipóxia, ovinos desse haplótipo voltam a expressar a β-globina juvenil, que possui maior afinidade por oxigênio. Por outro lado, o haplótipo B é composto por dois conjuntos de quatro genes (5'-εI-εII-ψβ1-βB-εIII-εIV-ψβ2- βF-3'), sendo que essa diferença no número de gene é devida à uma deleção gênica, a qual engloba o gene codificador da βC-globina (Garner e Lingrel, 1989). Sua ausência tem potencial efeito deletério, como uma menor resistência desses animais a estados anêmicos em comparação aos haplótipos Hb-AA ou Hb-AB (Huisman e Kitchens, 1968). Nosso grupo de pesquisa desenvolveu dois ensaios moleculares para identificação dos haplótipos da β-globina ovina a partir de amostras de sangue, e, tendo em vista a inexistência prévia de ensaios rápidos para essa finalidade, ambos se provaram altamente específicos (Okino et al., 2021a, 2021b).

Em se tratando especificamente das infecções por NGI, pesquisas foram realizadas a partir da década de 1960, relatando maior resistência a *H. contortus* em animais portadores do alelo βA, compreendendo os haplótipos Hb-AA e Hb-AB, com destaque para o primeiro (Evans et al., 1963; Jilek e Bradley, 1969; Allonby e Urquhart,

1976; Preston e Allonby, 1979). Recentemente, foi demonstrada associação entre o haplótipo AA da β-globina ovina e a resistência aumentada à infecção por *H. contortus* em ovinos da raça Morada Nova submetidos a desafios parasitários experimentais, verificada por menores valores de OPG, maiores valores de VG, além de maior peso ao nascimento (Okino et al., 2021a). Vale salientar que essa raça é conhecida por maior resistência/resiliência à infecção por esse parasita e por isso tem sido alvo de vários estudos que buscam esclarecer essa característica de grande interesse para os sistemas de produção (Toscano et al., 2020; Von Haehling et al., 2020; Okino et al., 2021a; Von Haehling et al., 2021: estudos de nosso grupo de pesquisa na Embrapa obtidos por meio dos projetos regulares FAPESP 2017/01626-1 e 2019/02929-3). Além disso, um estudo conduzido por Okino et al. (2023) demonstrou que ovinos da raça Morada Nova de haplótipo Hb-AA, infectados naturalmente por *H.contortus*, apresentaram maior resposta imune no abomaso, local primário da infecção, caracterizada por eosinofilia aumentada, perfil Th2 mais pronunciado e maiores níveis de mucina e lectina, enquanto que animais Hb-BB expressaram resposta inflamatória mais intensa.

Estudos realizados no Brasil indicaram baixa frequência genotípica para ovinos de alelo A da β-globina, com frequências de Hb-AA, Hb-AB e Hb-BB respectivamente de 15,03% (n = 43), 33,22% (n = 95) e 51,75% (n total = 148), em ovinos da raça Morada Nova (Okino et al., 2021a), e de 2,84% (n = 4), 17,02% (n = 24) e 80,14% (n total = 141), em ovinos mestiços da raça Suffolk (Sotomaior e Soccol, 1998). Evans et al. (1958) relataram que a Hb-A tem vantagem seletiva em ovinos provenientes de altitudes mais elevadas, constituindo o alelo mais comum em raças que habitam em países como Inglaterra e Escócia. Embora ovinos de haplótipo Hb-BB estejam em desvantagem em situações de anemia ou hipóxia, esses animais podem ser mais bem sucedidos reprodutivamente do que aqueles com os haplótipos Hb-AA e Hb-AB (Dally et al., 1980), sugerindo que ambos os alelos podem ser, ou foram, de importância adaptativa, seja através da seleção natural, seja através da preferência dos criadores por um tipo particular de ovino considerado bem adaptado ao ambiente local (Jiang et al., 2015).

Considerando a escassez de estudos correlacionando os haplótipos da β-globina aos fenótipos de resistência/resiliência à infecção natural por *H. contortus* em

ovinos de diferentes raças (Okino et al., 2023), o presente projeto objetivou realizar a caracterização da frequência alélica desse gene nessas raças e verificar sua associação com a resistência/resiliência à infecção por esse parasita, que poderá constituir em uma pioneira ferramenta de melhoramento genético para a seleção de animais mais resistentes à hemoncose. Tal ferramenta poderá levar à redução da utilização de AH, à diminuição dos impactos ambientais provocados por AH, ao aumento da segurança alimentar e da longevidade dos AH, propiciando sustentabilidade e potencial de crescimento para a cadeia produtiva de pequenos ruminantes. Vale ressaltar que é de extrema importância que os mecanismos genéticos sejam compreendidos, uma vez que estão intrinsecamente associados à resistência e resiliência do hospedeiro a esse parasita.

REFERÊNCIAS

Aguerre s, Jacquiet P, Brodier H, Bournazzel JP, Grisez C, Prévot F, Michot L, Fidelle FAstruc JM, Moreno CR (2018) Resistance to gastrointestinal nematodes in dairy sheep: Genetic variability and relevance of artificial infection of nucleus rams to select for resistant ewes on farms. **Veterinary Parasitology** 256:16-23.

Ahmed AM, Sebastiano SR, Sweeney T, Hanrahan JP, Glynn A, Keane OM, Mukhopadhya A, Thornton K, Good B (2015) Breed differences in humoral and cellular responses of lambs to experimental infection with the gastrointestinal nematode *Teladorsagia circumcincta.* **Veterinary Research** 46.

Ahuir- Baraja AE, Cibot F, Llobat L, Garrijo MM (2021) Anthelmintic resistance: is a solution possible? **Experimental Parasitology** 230:108169.

Albers GAA, Gray GD, Le Jambre LF, Barger, IA, Barker JSF (1990) The effect of Haemonchus contortus infection on haematological parameters in Young Merino sheep and its significance for productivity. **Animal Production** 50: 99-109.

Albuquerque ACA, Basseto CC, Almeida FA, Amarante AFT (2017) Development of *Haemonchus contortus* resistance in sheep under suppressive or targeted selective treatment with monepantel. **Veterinary Parasitology** 246: 112-117.

Albuquerque ACA, Basseto CC, Almeida FA, Hildersley KA, McNeilly TN, Britton C, Amarante AFT (2019) Differences in immune responses to *Haemonchus contortus* infection in the susceptible Ile de France and the resistant Santa Ines sheep under different anthelmintic treatments regimens. **Veterinary Research** 50:104.

Aleri JW, Hine BC, Pyman MF, Mansell PD, Wales WJ, Mallard B, Fisher AD (2016) Periparturient immunosuppression and strategies to improve dairy cow health during the periparturient period. **Research in Veterinary Science** 108:8-17.

Ali AOA, Murphy L, Stear A, Fairlie-Clarke K, Brujeni GN, Donskow-Lysoniewska k, Groth D, Buitkamp J, Stear MJ (2019) Association of MHC class II haplotypes with reduced faecal nematode egg count and IgA activity in British Texel sheep. **Parasite Immunology** 41:12626.

Allonby EW, Urquhary GM (1976) A possible relationship between haemonchosis and haemoglobin polymorphism in merino sheep in Kenya. **Research in Veterinary Science** 20:212–214.

Almeida FA, Albuquerque ACA, Basseto CC, Starling RZC, Lins GG (2020) Long spelling periods are required for pasture to become free of contamination by infective larvae of *Haemonchus contortus* in a humid subtropical climate of São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology** 279:109060.

Almeida FA, Garcia KCOD, Torgerson PR, Amarante AFT (2010) Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology International** 59: 622–625.

Almeida DFA, Sobrinho DAGS, Endo V, Lima NLL, Columbeli AC, Zeola NMBL, Barbosa JC (2012) Gastrointestinal nematodes infection of primiparous and multiparous ewe in different reproductive stages. **Journal of Animal Production Advances** 2:373-378.

Amarante AFT, Susin I, Rocha RA, Silva MB, Mendes CQ, Pires AV (2009) Resistance of Santa Ines and crossbred ewes to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology** 165:273-280.

Amarante AFT, Bricarello pa, Rocha RA, Gennari SM (2004) Resistance of Santa Inês, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology** 120: 91-106.

Amarante AFT (2014) Sustainable worm control practices in South America. **Small Ruminant Research** 118:56–62.

Arosemena NAE, Bevilaqua CML, Melo ACFL, Girao MD (199) Seasonal variations of gastrointestinal nematodes in sheep and goats from semiarid area in Brazil. **Revue de Medecine Veterinaire**, 150:873-876.

Arsenopoulos KV, Fthenakis GC, Katsarou EI, Papadopoulos E (2021) Haemonchosis: A Challenging Parasitic Infection of Sheep and Goats. **Animals**, 11:363.

Balaro MFA, Fonseca JFF, Oba E, Cardoso EC, Brandão FZ (2014) Is the Santa Inês sheep a typical non-seasonal breeder in the Brazilian Southeast? **Tropical animal health and production**, 46:1533-1537.

Balic A, Bowles VM, Meeusen ENT (2000) Cellular profiles in the abomasal mucosa and lymph node during primary infection with *Haemonchus contortus* in sheep. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 75:109-120.

Baltrusis P, Johan-Hoglund PH (2020) Utilization of droplet digital PCR to survey resistance associated polymorphisms in the β tubulin gene of Haemonchus contortus in sheep flocks in Sweden. **Veterinary Parasitology** 288:109278.

Banchero GE, Clariget RP, Bencini R, Lindsay DR, Milton JTB, Martin GB (2006) Endocrine and metabolic factors involved in the effect of nutrition on the production of colostrum in female sheep. **Reprotuction, nutrition, development** 46:447-460.

Barros NN, Rodrigues de Vasconcelos V, Lobo, RNB (2004) Características de crescimento de cordeiros F1 para abate, no Semi- Árido do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**39:809- 814.

Basseto CC, Albuquerque ACA, Lins JGG, Silva NMM, Chacobar MLE, Bello HJS, Mena MO, Niciura SCM, Amarante AFT, Chagas ACS (2024) Revisiting anthelmintic resistance in sheep flocks from São Paulo State, Brazil. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance** 24: 100527.

Bauer C, Jung HD (1975) A comparison of respiratory properties of sheep haemoglobin A and B**. Journal of Comparative Physiology** 102:167-72.

Bazil V, Horejsí V, Baudys M, Kristofová H, Strominger JL, Kostka W, Hilgert I (1986) Biochemical characterization of a soluble form of the 53-kDa monocyte surface antigen. **European Journal of Immunology** 16: 1583-1589.

Bell A, McNally J, Smith DV, Rahman A, Hunt P, Kotze AC, Sonja D, Ingham A (2019) Quantification of differences in resistance to gastrointestinal nematode infections in sheep using a multivariate blood parameter. **Veterinary Parasitology** 270:31-39.

Bertagnon HG, Pontarolo DV, Reck AM, Nascimento YTH, Coneglian MM, Seki MC, Mayer A (2019) Efeito do parasitismo por *Haemonchus contortus* sobre o metabolismo oxidativo de leucócitos de ovinos. **Ciência Animal Brasileira** 20:1-8.

Berton, MP, Silva RMO et al (2017) Genomic regions and pathways associated with gastrointestinal parasites resistance in Santa Inês breed adapted to tropical climate. **Journal of Animal Science and Biotechnology** 8:73.

Besier RB, Kahn LP, Sargison, Van Wyk JA (2016) Chapter Six - Diagnosis, Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants. **Advances in Parasitology** 93:181-238.

Besier RB (2012) Refugia-based strategies for sustainable worm control: Factors affecting the acceptability to sheep and goat owners. **Veterinary Parasitology** 186: 2-9.

Bezerra AS, Santos MAS, Lourenço-Júnior JB (2022) Technologies Used in Production Systems for Santa Inês Sheep: A Systematic Review. **Frontiers in Veterinary Science** 9.

Bhatt A, Abassi B (2021) Review of environmental performance of sheep farming using life cycle assessment. **Journal of Cleaner Production** 293:126192.

Bishop SC (2012) Possibilities to breed for resistance to nematode parasite infections in small ruminants in tropical production systems. **Animal** 6: 741-747.

Bishop SC, Morris, CA (2007) Genetics of disease resistance in sheep and goats. **Small Ruminant Research** 70:48-59.

Bishop SC, Stear MJ (1999) Genetic and epidemiological relationships between productivity and disease resistance: gastrointestinal parasite infection in growing lambs. **Animal Science** 69:515-525.

Bishop SC, Stear MJ (2003) Modeling of host genetics and resistance to infectious diseases: understanding and controlling nematode infections. **Veterinary Parasitology** 115:147-166.

Bisset SA, Morris CA (1996) Feasibility and implications of breeding sheep for resilience to nematode challenge. **International Journal for Parasitology** 26:857–868.

Blackhall WJ, Pichard RK, Beech RN (2003) Selection at a γ-aminobutyric acid receptor gene in *Haemonchus contortus* resistant to avermectins/milbemycins. **Molecular and Biochemical Parasitology** 131:137-145.

Blackhall WJ, Pouliot, JF, Prichard RK, Beech, RN (1998) *Haemonchus contortus:* Seleção em um gene de canal de cloreto controlado por glutamato em cepas selecionadas de ivermectina e moxidectina. **Experimental Parasitololy** 90:42-48.

Brasil BSAF, Nunes RL, Bastianetto E, Drummond MG, Carvalho DC, Leite RC, Molento MB, Oliveira DAA (2012) Genetic diversity patterns of Haemonchus placei and Haemonchus contortus populations isolated from domestic ruminants in Brazil. **International Journal for Parasitology** 42:469-479.

Cain JL, Gianechini LS, Vetter A, Davis SM, Britton LN, Myka JL, Slusarewicz (2024). Rapid, automated quantification of *Haemonchus contortus* ova in sheep faecal samples**. International Journal for Parasitology** 54:47-53.

Cardoso MV, Lara MCCSH et al. (2008) Determinação da condição sanitária de rebanhos caprinos e ovinos na região sudoeste do Estado de São Paulo, Brasil. **35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária** Gramado, RS. Gramado: CONBRAVET.

Caroprese M, Albenzio M, Marzano A, Schena L, Annicchiarico G, Sevi A (2010) Relationship between cortisol response to stress and behavior, immune profile, and production performance of dairy ewes. **Journal of dairy Science** 93: 2395-2403.

Chagas ACS, Domingues LF, Gaínza YA, Barioni- Júnior W, Esteves SN, Niciura SCM (2016) Target selected treatment with levamisole to control the development of anthelmintic resistance in a sheep flock. **Parasitology Research** 115: 1131-1139.

Chagas ACS, Katiki LM, Silva IC, Giglioti R, Esteves SV, Oliveira MC, Barioni Junior W (2013) *Haemonchus contortus*: A multiple-resistant Brazilian isolate and the costs for its characterization and maintenance for research use. **Parasitology International** 62:1-6.

Chagas ACS, Tupy O, Santos IB, Esteves SN (2022) Economic impact of gastrointestinal nematodes in Morada Nova sheep in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology** 32: e008722.

Chacobar MIE, Bello HJS, Basseto, CC, Silva-Marinho NM, Sato LMN, Sperg C, Chagas ACS, Amarante AFT (2023) Biotic potential and pathogenicity of a *Haemonchus contortus* susceptible laboratory isolate compared to a resistant field isolate in Brazil. **Small Ruminant Research** 227:107063.

Cintra MCR, Teixeira VN, Nascimento LV, Sotomaior CS (2016) Lack of efficacy of monepantel against Trichostrongylus colubriformis in sheep in Brazil. **Veterinary Parasitology** 216:4–6.

Choe KP, Strange K (2008) Genome-wide RNAi screen and in vivo protein aggregation reporters identify degradation of damaged proteins as an essential hypertonic stress response. **American Journal of Physiology** 295:C1488-C1498.

Cobon DH, O' Sullivan BM (1992) Effect of *Haemonchus contortus* on productivity of ewes, lambs and weaners in a semi-arid environment. **The Journal of Agricultural Science**, 118:245-248.

Coop RL, Kyriazakis I (199) Nutrition-parasite interaction**. Veterinary Parasitology,** 84:187-204.

Costa CAF, Vieira LS (1984) **Controle de nematódeos gastrintestinais de caprinos e ovinos do estado do Ceará.** Sobral. Embrapa-CNPC, 6p. (EMBRAPA – CNPC. Comunicado Técnico, 13).

Costa-Junior LM, Silva C, Soares AMS, Menezes AS, Silva MRL, Amarante AFT, Costa EF, Alencar LMR (2020) Assessment of biophysical properties of *Haemonchus contortus* from different life cycle stages with atomic force microscopy. **Ultramicroscopy**. 209:112862.

Dally MR, Hohenboken W, Thomas DL, Craig AM (1980) Relationships between hemoglobin type and reproduction, lamb, wool and milk production and health-related traits in crossbred ewes. **Journal of Animal Science 50**: 418-27.

Dargie JD, Allonby (1975) Pathophysiology of single and challenge infections of *Haemonchus contortus* in Merino sheep: Studies on red cell kinetics and the "self-cure" phenomenon. **International Journal for Parasitology** 5:147-157.

Dey AR (2019) Genetic diversity patterns of *Haemonchus contortus* isolated from sheep and goats in Bangladesh. **Infection, Genetics and Evolution** 68:177- 184.

Dimunová D, Matouskova P, Navratilová M, Nguyen LT, Ambroz M, Vokral I, Szotakova B, Skalova (2022) Environmental circulation of the anthelmintic drug albendazole affects expression and activity of resistance-related genes in the parasitic nematode Haemonchus contortus. **Science of the Total Environment** 822: 153527.

Dobson RJ, Hosking BC, Besier RB, Love S, Larsen JWA, Rolfe PF, Bailey JN (2011) Minimising the development of anthelmintic resistance, and optimising the use of the novel anthelmintic monepantel, for the sustainable control of nematode parasites in Australian sheep grazing systems. **Australian Veterinary Journal** 89:160–166

Douhard F, Doeschl-Wilson AB et al. (2022) The cost of host genetic resistance on body condition: Evidence from divergently selected sheep. **Evolutionary Applications** 15: 1374–1389.

Drudge JH, Szanto J, Wyant ZN, Elam G (1964) Field studies on parasite control in sheep: Comparision of thiabensazole, ruelene and phenothiazine. **American journal of veterinary research** 25:1512-1518.

Echevarria FAM, Armour JL, Duncan JL (1991) Efficacy of some anthelmintics on an ivermectin-resistant strain of *Haemonchus contortus* in sheep. **Veterinary Parasitology** 39:79– 284.

Emery DL, Hunt PW, Le Jambre LF (2016) *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here?. **International Journal for Parasitology** 46:755-769.

Escribano C, Saravia A, Costa M, Castells D, Ciappesoni G, Riet-Correa F, Freire T (2019) Resistance to *Haemonchus contortus* in Corriedale sheep is associated to high parasite-specific IgA titer and a systemic Th2 immune response. **Scientific reports** 9: 19579.

Evans JV, Harris H, Warren FL (1958) The distribution of haemoglobin and blood potassium types in British breeds of sheep. **Proceedings of the Royal Society of London. Series Biological Sciences**149:249-62.

Evans JV, Blunt MH, Scouthcott WH (1963) The effects of infection with *Haemonchus contortus* on the sodium and potassium concentrations in erythrocytes and plasma, in sheep of different haemoglobin types. **Australian Journal of Agricultural Research** 14:549–558.

Flay KJ, Hill F, Muguiro DH (2022) A Review: *Haemonchus contortus* Infection in Pasture-Based Sheep Production Systems, with a Focus on the Pathogenesis of Anaemia and Changes in Haematological Parameters. Animals 12:1238.

Fleming SA, Craig T, Kaplan RM, Miller JE, Navarre C, Rings M (2006) Anthelmintic resistance of gastrointestinal parasites in small ruminants. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 20:435–444.

Fonseca ZAA, Bezerra ACA, Avelino DB, Nascimento JO, Marques ASC, Vieira LS, Ahid MM (2011) Relação sexual do parasitismo por *Haemonchus contortus* em Caprinos (Capra hircus). **Pubvet** 5:1200.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2019. Datos. Ganaderia.

Forbes A (2019) Refugia: what are they and how can they be managed? **Livestock** 24:144–148.

Fthenakis GC, Mavrogianni VS, Gallidis E, Papadopoulos E (2015) Interactions between parasitic infections and reproductive efficiency in sheep. **Veterinary Parasitology** 208:56-66.

Garner J, Lingrel JB (1989) A comparison of the β A e β B -globin gene clusters of sheep. **Journal of Molecular Evolution** 28:175-84.

Garduno RG, García JA, Hernández GT (2021) Physiological, Immunological and Genetic Factors in the Resistance and Susceptibility to Gastrointestinal Nematodes of Sheep in the Peripartum Period: A Review. **Helminthologia** 58:134-151.

Gharamah AA (2012) Genetic variation of *Haemonchus contortus* (Trichostrongylidae) in sheep and goats from Malaysia and Yemen. **Veterinary Parasitology** 188: 268-276.

Ghisi M, Kaminsky R, Maser P (2007) Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. **Veterinary Parasitology** 144:313–320.

Gilleard JS, Redman E (2016) Genetic Diversity and Population Structure of Haemonchus contortus. **Advances in Parasitology** 93:31-68.

Girão ES, Medeiros LP, Girão RN (1982) Ocorrência e distribuição estacional de helmintos gastrintestinais de caprinos no município de Teresina, Piauí. **Ciência Rural** 22:197-202.

Gonçalves TC, Alencar MM, Giglioti R, Bilhassi TB, Oliveira HN, Rabelo MD, Esteves SN, Oliveira MCS (2018) Resistance of sheep from different genetic groups to gastrointestinal nematodes in the state of São Paulo, Brazil. **Small Ruminant Research** 166:7-11.

Gravdal M, Woolsey ID, Robertson LJ, Hoglund J, Chartier C, Stuen S (2023) Benzimidazole-resistance associated mutation in *Haemonchus contortus* in Norwegian sheep, as detected by droplet digital PCR. **Veterinary Parasitology: Regional Studies** and Reports 46: 100938.

Greer AW (2008) Trade-offs and benefits: implications of promoting a strong immunity to gastrointestinal parasites in sheep. **Parasite Immunology** 30:123-132.

Guimarães VP, Lucena CC, Facó O, Bomfim MAD, Laranjeira FF, Dubeuf JP (2022) The future of small ruminants in Brazil: Lessons from the recent period and scenarios for the next decade. **Small Ruminant Research** 209:106651.

Gutierrez G, Reines HD, Wulf-Gutierrez ME (2008) Clinical Review: Hemorrhagic Shock. **Critical care** 8: 373–381.

Hayirli A, Grummer RR, Nordheim EV, Crump PM (2002) Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in Holsteins. **Journal of Dairy Science** 85:3430-3443.

Hamer K, McIntyre J, Morrison AA, Jennings A, Kelly RF, Leeson S, Bartley DJ, Chaudhry U, Busin V, Sargison N (2019) The dynamics of ovine gastrointestinal nematode infections within ewe and lamb cohorts on three Scottish sheep farms. **Preventive Veterinary Medicine** 171, 104752.

Hayward AD (2013) Causes and consequences of intra- and inter-host heterogeneity in defence against nematodes. **Parasite Immunology** 35:362-373.

Hermuche PM, Maranhão RLA, Guimarães RF, Carvalho Júnior OS, Gomes RAT, Paiva SR, McManus C (2013). Dynamics of Sheep Production in Brazil. **International Journal of Geo-Information** 2:665–679.

Hernandez JN, Hernandez A, Stear MJ, Conde-Felipe M, Rodríguez E, Piedrafita D, González JF (2016) Potential role for mucosal IgA in modulating *Haemonchus contortus* adult worm infection in sheep. **Veterinary Parasitology** 223:153-158.

Hoste H, Torres-Acosta JFJ, Quijada J, Chan-Perez I, Dakheel MM, Kommuru DS, Mueller-Harvey I, Terril TH (2016) Chapter Seven - Interactions Between Nutrition and Infections With *Haemonchus contortus* and Related Gastrointestinal Nematodes in Small Ruminants. **Advances in Parasitology** 93:239-351.

Huisman T, Kitchens J (1968) Oxygen equilibria studies of the hemoglobins from normal and anemic sheep and goats. **American Journal of Physiology** 215:140–146.

Ingvartsen KL, Boisclair YR (2001) Leptin and the regulation of food intake, energy homeostasis and immunity with special focus on periparturient ruminants. **Domestic animal endocrinology** 21:215-250.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2019. Censo Agropecuário 2017. IBGE, Rio de Janeiro.

Issakowicz J, Issakowica ACKS, Bueno MS, Costa RLD, Katiki LM, Geraldo AT, Abdalla AL, McManus C, Louvandini H (2016) Parasitic infection, reproductive and productive performance from Santa Inês and Morada Nova ewes. Small Ruminant Research 136:96-103.

Jiang Y, Wang X, Kijas JW, Dalrymple BP (2015). Beta-globin gene evolution in the ruminants: evidence for an ancient origin of sheep haplotype B. **Animal Genetics** 46: 506–514.

Jilek AF, Bradley RE (1969) Haemoglobin types and resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. **American Journal Veterinary Research** 30:1773-1778.

Kacskovics I (2004) Fc receptors in livestock species. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 102:351-362.

Kaçar C, Kaya S, Kuru M, Erkiliç EE, Ogun M, Oral H, Demir MC (2021) Determination of natural antibodies, beta-hydroxybutyric acid, and non-esterified fatty acid levels in the serum of peripartum Tuj and Hemşin sheep. **Veterinary World** 14:1002-1006.

Kalaldeh MA, Gibson J, Lee SH, Gondro C, Werf JHJ (2019) Detection of genomic regions underlying resistance to gastrointestinal parasites in Australian sheep. **Genetics Selection Evolution** 51:37.

Kaminsky, R et al. (2008) A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. **Nature** 452:176-180.

Kaplan, RM (2020) Biology, Epidemiology, Diagnosis, and Management of Anthelmintic Resistance in Gastrointestinal Nematodes of Livestock. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice** 36:17-30.

Kellerová P, Stuchilikova LR, Matouskova P, Sterbova K, Lamka J, Navratilova M, Vokral I, Szotakova B, Skalova L (2020) Sub-lethal doses of albendazole induce drug metabolizing enzymes and increase albendazole deactivation in *Haemonchus contortus* adults. **Veterinary Research** 51:94.

Kim ES, Sonstegard TS, Silva MVGB, Gasbarre LC, Tassel CPV (2014) Identification of quantitative trait loci affecting gastrointestinal parasite resistance in an experimental Angus population. **Animal genetics** 45:117-121.

Kotze AC, Ruffel A, Lamb J, Elliot TP (2018) Response of drug-susceptible and -resistant *Haemonchus contortus* larvae to monepantel and abamectin alone or in combination *in vitro*. **Veterinary Parasitology** 249:57-62.

Köse M, Kozan E, Sevimli FK, Eser M (2007) The resistance of nematode parasites in sheep against anthelmintic drugs widely used in Western Turkey. **Parasitology Research** 101:563–567

Kwa MSG, Veenstra JG, Ross MH (1994) Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in β-tubulin isotype 1. **Molecular and Biochemical Parasitology** 63:299-303.

Lamb J, Elliot T, Chambres M, Chick B (2017) Broad spectrum anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* in Northern NSW of Australia. **Veterinary Parasitology** 241: 48-51.

Landim AV, Roriz ND, Silveira RMF, Veja WHO, Costa HHA, Sousa LCO, Alves GC, Ferreira J, Mourão GB (2021) Sheep meat production in the Brazilian semi-arid region: crossing between indigenous breeds. **Tropical Animal Health and Production** 53.

Leathwick DM (2013) Managing anthelmintic resistance—parasite fitness, drug use strategy and the potential for reversion towards susceptibility. **Veterinary Parasitology** 198:145–153.

Le Jambre LF, Southcott WH, Dash KM (1977) Resistance of selected lines of Ostertagia circumcincta to thiabendazole, morantel tartrate and levamisole. **International Journal of Parasitology** 7:473–479.

Li LF, Guan WJ, Li H, Zhou XZZ, Bai XJ, Ma YH (2009) Establishment and characterization of a fibroblast cell line derived from Texel sheep. **Biochemistry and Cell Biology** 87:485-492.

Lins JGG, Almeida FA, Albuquerque ACA, Britton C, Amarante AFT (2022) Early-onset immune response to *Haemonchus contortus* infection in resistant Santa Ines suckling lambs compared with susceptible Ile de France. **Veterinary Parasitology**, Available online 27 May 2022, 109734.

Lobo RNB (2019) Opportunities for investment into small ruminant breeding programmes in Brazil. **Journal of Animal Breeding and Genetics** 136:313-318.

Love SCJ, Neilson FJA, McKinnon R, Biddle AJ (2003) Moxidectin-resistant Haemonchus contortus in sheep in northern New South Wales. **Australian Veterinary Journal** 81:359-360.

Lynagh T, Lynch JW (2010) A glycine residue essential for high ivermectin sensitivity in Cys-loop ion channel receptors. **International Journal for Parasitology** 40: 1477-1481.

MacKinnon KM, Zajac AM, Kooyman FNJ, Notter DR (2010) Differences in immune parameters are associated with resistance to *Haemonchus contortus* in Caribbean hair sheep. **Parasite Immunology** 32:484-493.

Magalhães KA, et al. Caprinos e ovinos no Brasil: análise da Produção da Pecuária Municipal. **Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos**. Boletim Nº 11, 2020.

Ma G, Wang T, Korhonen PK, Ang CS, Williamson NA, Young ND, Stroehlein AJ, Hall RS, Koehler AV, Hofmann A, Gasser RB (2018) Molecular alterations during larval development of *Haemonchus contortus* in vitro are under tight post-transcriptional control. **International Journal for Parasitology** 48: 763-772.

Marinho GTB, Pandorfi H, Silva MV, Montenegro AAA, Sousa LB, Desenzi R, Silva JLB, Oliveira-Júnior JF, Mesquita M, Almeida GLP, Guiselini C, Jardim AMRF, Silva TGF (2023) Bioclimatic Zoning for Sheep Farming through Geostatistical Modeling in the State of Pernambuco, Brazil. **Animals** 13:1124.

Marques CB, Goldberg V, Ciappesoni G (2020) Genetic parameters for production traits, resistance and resilience to Nematode parasites under different worm burden challenges in Corriedale sheep. **Veterinary Parasitology** 287: 109272.

Martin PJ, Le Jambre LF (1979). Larval paralysis as an in vitro assay of levamisole and morantel tartrate resistance in Ostertagia. **Vet. Sd. Communic**. 3:159-164.

Mate M, Ballent M, Cantón C, Lanusse C, Cabellos L, Alvarez LI, Liron JP (2022) ABC-transporter gene expression in ivermectin-susceptible and resistant *Haemonchus contortus* isolates. **Veterinary Parasitology** 302, 109647.

Matte A, Waquil PD (2021) Changes in markets for lamb in livestock family farming in Brazil. Small Ruminant Research 205: 106535.

Mederos AE, Ramos Z, Banchero G (2014) First report of monepantel Haemonchus contortus resistance on sheep farms in Uruguay. **Parasites and vectors** 7:598.

Mederos A, Fernandez S, VanLeeuwen J, Peregrine AS, Klelton D, Menzies P, LeBouef A, Martin R (2010) Prevalence and distribution of gastrointestinal nematodes on 32 organic and conventional commercial sheep farms in Ontario and Quebec, Canada (2006– 2008). **Veterinary Parasitology** 170:244–252.

Mendonça G, Osório JCD, Osório MTM, Wiegand MM, Esteves RMG, Pedroso CES, Araújo O (2007) Avaliação da época de nascimento sobre o desenvolvimento corporal e os rendimentos pós-abate de cordeiros da raça Texel. **Revista Brasileira de Zootecnia** 36:1119- 1125.

Milne C (2000) The history of the Dorper sheep. **Small Ruminant Research** 36: 99-102.

Molento MB, Wang GT, Prichard RK (1999) Decreased ivermectin and moxidectin sensitivity in *Haemonchus contortus* selected with moxidectin over 14 generations. **Veterinary Parasitology** 86:77-81.

Morgan ER, Hosking BC, Burston S, Carder KM, Hyslop AC, Prichard LJ, Whitmarsh AK, Coles GC (20120 A survey of helminth control practices on sheep farms in Great Britain and Ireland. **The Veterinary Journal** 192:390-397.

Morris CA, Vlassoff A, Bisset AS, Baker RL, West CJ (1997) Responses of romney sheep to selection for resistance or susceptibility to nematode infection. **Animal Science** 64:319-329.

Moura ABB, Brandão FZ, Esteves SN, Souza GN, Fonseca JF, Pantoja MH, Romanello N, Botta D, Giro A, Garcia AR (2019) Differences in the thermal sensitivity and seminal quality of distinct ovine genotypes raised in tropical conditions. **Theriogenology** 123: 123-131.

Mugambi JM, Bain RK, Wanyangu SW, Ihiga MA, Duncan JL, Murray M, Stear MJ (1997) Resistance of four sheep breeds to natural and subsequent artificial *Haemonchus contortus* infection. **Veterinary Parasitology** 69:265-273.

Naeem M, Iqbal Z, Roohi N (2021) Ovine haemonchosis: a review. **Tropical Animal Helth and Production** 53:19.

Nehra AK, Gowane GR, Kuriyal A, Chaurasiya A, Kumar R, Bhinsara DB, Parthasarathi BC, Bhawana K, Khare RK, Prasada A, Chandra D, Sankar M (2019) Immune response against subclinical haemonchosis in Himalayan hill goats. **Veterinary Parasitology** 267: 47-53.

Neto AAR, Sarmento JLR, Santos NPS, Campelo JEG, Sena LS, Biagiotti D, Santos GV (2018) Population genetic structure of Santa Inês sheep in Brazil. **Tropical Animal Health and Production** 50:503-508.

Niciura SCM, Cruvinel GG, Moraes CV, Chagas ACS, Esteves SN, Benavides MV, Amarante AFT (2020) In vivo selection for *Haemonchus contortus* resistance to monepantel. **Journal of Helminthology** 94:e46.

Niciura SCM, Benavides MV, Okino CH, Ibelli AMG, Minho AP, Esteves SN, Chagas ACS (2022) Genome-Wide Association Study for *Haemonchus contortus* Resistance in Morada Nova Sheep. **Pathogens** 11:939.

Nogueira Filho A, Figueiredo Júnior CA, Yamamoto A (2010) Mercado de carne, leite e pele de caprinos e ovinos no Nordeste. **Banco do Nordeste do Brasil. Série Documentos do Etene Nº 27.**

Nunes SF, Ferreira J, Paiva SR, Faria DA, Sousa JER, Soares CE, Silveira RMF, Mourão GB, Façanha DAE (2022) Fine genetic structure of Brazilian white Morada Nova hair sheep breed from semi-arid region. **Small Ruminant Research**, 211: 106694.

Okino CH, Caminotto LCF, Kapritchkoff RTI, Niciura SCM, Esteves SN, Santos IB, Toscano JHB, Oliveira MCS, Chagas ACS (2021)b Comparison of ovine β-globin haplotype sequences and a new multiplex PCR for identification. **Veterinary Parasitology**, 300:109592.

Okino CH, Niciura SCM, Giaretta PR, Melito GR, Kapritchkoff RTI, Santos IB, Rech RR, Minho AP, Esteves SN, Chagas ACS (2023) Enhanced mucosal response in sheep harbouring βA beta-globin against haemonchosis. **Parasite Immunology** 45: e13003.

Okino CH, Niciura SCM, Toscano JHB, Esteves SN, Santos IB, Haehling MB, Figueiredo A, Oliveira MCS, Chagas ACS (2021)a Ovine β-globin gene: A new qPCR for rapid haplotype identification and association with susceptibility to *Haemonchus contortus* infection. **Veterinary Parasitology**, 294:109434.

Otto C et al. (1997) Estudo econômico da terminação de cordeiros à pasto e em confinamento **Revista do Setor de Ciências Agrárias** 16:223-227.

Pacheco JLP, Molina AH, Rovira LT, Fernández MVS, Contreras CG, Gómez MV, Feyjoo P, Cáceres E, Mateo MF, Hernández F, Ros PM, Martin JVG, Bulnes AG, Astiz S (2019) Influence of Maternal Factors (Weight, Body Condition, Parity, and Pregnancy Rank) on Plasma Metabolites of Dairy Ewes and Their Lambs. **Animals** 9:122.

Pereira FC, Longo C, Castilho C, Leme DN, Seugling J, Basseto CC, Amarante AFT, Bricarello PA (2020) Peripartum Phenomenon in Crioula Lanada Sheep Susceptible and Resistant to Gastrointestinal Nematodes**. Frontiers in Veterinary Science** 7:598.

Pitaksakulrat O, Chaiyasaeng M, Artchayasawat, Eamudomkarn C, Boonmars T, Kopolrat KY, Prasopdee S, Petney TN, Blair D, Sithithaworn P (2021) Genetic diversity and population structure of Haemonchus contortus in goats from Thailand. **Infection, Genetics and Evolution** 95:105021.

Preston JM, Allonby EW (1979) The influence of haemoglobin phenotype on the susceptibility of sheep to *Haemonchus contortus* infection in Kenya. **Research in Veterinary Science** 26:140-144.

Rahal A, Sharma DK, Kumar A, Sharma N, Dayal D (2022) In silico to in vivo development of a polyherbal against Haemonchus contortus. **Heliyon**, 8:e8789.

Ramos-Bruno E, Torres-Acosta JFJ, Sarmiento-Franco LA, Sandoval-Castro CA (2021) Metabolizable energy balance in hair sheep lambs artificially infected with *Haemonchus contortus.* **Veterinary Parasitology** 300:109620.

Ranjan S, Wang GT, Simkins KL (2002) Selection for resistance to macrocyclic lactones by *Haemonchus contortus* in sheep. **Veterinary Parasitology** 103:109-117.

Rawat K, Pal A, Banerjee S, Pal A, Mandal SC, Batabyal S (2021) Ovine CD14- an Immune Response Gene Has a Role Against Gastrointestinal Nematode *Haemonchus contortus*—A Novel Report. **Frontiers in Immunology** 12: 664877.

Reinemeyer CR, Nielsen MK (2013) Handbook of equine parasite control. Chichester: John Wiley & Sons.

Robinson N, Piedrafita D, Snibson K, Harrison P, Meeusen EM (2010) Immune cell kinetics in the ovine abomasal mucosa following hyperimmunization and challenge with *Haemonchus contortus*. **Veterinary research** 41:37.

Rocha RA, Amarante AFT, Bricarello PA (2004) Comparison of the susceptibility of Santa Inês and Ile de France ewes to nematode parasitism around parturition and during lactation. **Small Ruminant Research** 55:65-75.

Rocha RA, Amarante AFT, Bricarello PA (2005) Resistance of Santa Inês and Ile de France suckling lambs to gastrointestinal nematode infections. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 14:17-20.

Rocha RA, Bicarello PA, Silva MB, Houdijk JGM, Almeida FA, Cardia DFF, Amarante AFT (2011) Influence of protein supplementation during late pregnancy and lactation on the resistance of Santa Ines and Ile de France ewes to *Haemonchus contortus.* **Veterinary Parasitology** 181:229-238.

Rojo-Vázquez FA, Hosking BC (2013) A telephone survey of internal parasite control practices on sheep farms in Spain. **Veterinary Parasitology** 192: 166–172.

Saccareau M, Moreno CR, Kyriazakis I, Faivre R, Bishop SC (2016) Modelling gastrointestinal parasitism infection in a sheep flock over two reproductive seasons: *in silico* exploration and sensitivity analysis. **Parasitology** 143:1509-1531.

Sallé G, Doyle SR, Cortet J, Cabaret J, Berriman M, Holroyd N, Cotton JA (2019) The global diversity of *Haemonchus contortus* is shaped by human intervention and climate. **Nature communications** 10: 4811.

Sangster NC, Cowling A, Woodgate RG (2018) Ten Events That Defined Anthelmintic Resistance Research. **Trends in Parasitology**, 34:553-563.

Sangster NC, Gill J (1999) Pharmacology of Anthelmintic Resistance. **Parasitology Today** 15:141-146.

Santa Rosa J (1996) Enfermidades em Caprinos: diagnóstico, patogenia, terapêutica e controle – Embrapa Caprinos- Brasília – SPI/ Sobral: Embrapa – CNPC.101- 105p.

Santos LL, Borges GR (2019) Fatores que influenciam no consumo de carne ovina. **Consumer Behavior Review** 3:42-46.

Santos MC, Xavier JK, Amarante MRV, Basseto CC, Amarante AFT (2014) Immune response to *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei* in sheep and its role on parasite specificity. **Veterinary Parasitology** 203:127-138.

Shakya KP, Miller JE, Horohov DW (2009) A Th2 type of immune response is associated with increased resistance to *Haemonchus contortus* in naturally infected Gulf Coast Native lambs. **Veterinary Parasitology** 163:57-66.

Schallig HDFH, Van Leeuwen MAW, Bernadina WE, Hendrikx WML (1994) Serum antibody responses of Texel sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus.* **Research in Veterinary Science** 57:63-68.

Scott I, Pomroy WE, Kenyon PR, Smith G, Adlington B, Moss A (2013) Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology** 198:166-171.

Silva JD, Viana MP, Calado LGLP, Lima AMC, Alves FSF, Pinheiro RR, Costa DF, Silva GCP, Azevedo SS, Alves CJ (2021) Cross-sectional survey for sheep leptospirosis in the northeast region of Brazil. **Preventive Veterinary Medicine** 197:105525.

Snyman MA, Fisher AD (2019) Genetic parameters for traits associated with resistance to *Haemonchus contortus* in a South African Dohne Merino sheep flock. **Small Ruminant Research** 176:76-88.

Sotomaior CS, Soccol VT (1998) Estudo do tipo de hemoglobina como auxiliar na seleção de ovinos resistentes e susceptíveis aos helmintos gastrintestinais. **Archives of Veterinary Science** 3:51-55.

Soulsby, EJL (1968) Helminths, Arthropods and Protozoa of Domestic Animals, 7th ed.; Bailliere Tindall: London, UK.

Souza DA, Selaive-Villarroel AB, Pereira EC, Osório JCS, Teixeira A (2013) Growth performance, feed efficiency and carcass characteristics of lambs produced from Dorper sheep crossed with Santa Inês or Brazilian Somali sheep. **Small Ruminant Research** 114:51-55.

Souza AAS, Lopes MA, Demeu FA (2008) Panorama da Ovinocultura no Estado de São Paulo. **Revista Ceres** 55:384-388.

Starling RZC, Almeida FA, Viana MVG, Castilhos AM, Amarante AFT (2019) Losses caused by gastrointestinal nematode infections in Dorper lambs under two nutritional status. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 28:652-660.

Stear MJ, Murray M (1994) Genetic resistance to parasitic disease: particularly of resistance in ruminants to gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology** 54:161-176.

Sutherland IA, Leathwick DM (2011) Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle – a global issue? **Trends in Parasitoly** 27:176-181.

Torres-Acosta JFJ, Hoste H (2008) Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. **Small Ruminant Research** 77:159-173.

Toscano JHB, Okino CH, Santos IB, Giraldelo LA, Von Haehling MB, Esteves SN, Chagas ACS (2019) Innate Immune Responses Associated with Resistance against *Haemonchus contortus* in Morada Nova Sheep. **Journal of Immunology Research** 2019: 3562672.

Toscano JHB, Okino CH, Santos IB, Giraldelo LA, Von Haehling MB, Esteves SN, Basseto CC, Amarante AFT, Chagas ACS (2020) Local and systemic immune mediators of Morada Nova lambs with divergent *Haemonchus contortus* resistance phenotypes. **Parasite Immunology** 42:e12790.

Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Jennings FW (1998) Parasitologia veterinária. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Van den Brom, Moll L, Kappert C, Vallema P (2015) *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. **Veterinary Parasitology** 209:278-280.

Van Wyk JA (2001) Refugia-overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research** 68: 55-67.

Veríssimo CJ (2012) Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state**. Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, 187:209-216.

Vieira LS (2008) Métodos alternativos de controle de nematóides gastrintestinais em caprinos e ovinos**. Revista Ciência y Tecnologia. Agropecuária** 2:28-31.

Vieira LS, Cavalcante ACR (1999) Resistência anti-helmíntica em rebanhos caprinos no Estado do Ceará. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 19:99-103.

Von Haeling MB, Cruvinel GG, Toscano JHB, Giraldelo LA, Santos IB, Esteves SN, Benavides MV, Bariori Júnir W, Niciura SCM, Chagas ACS (2020) Four single nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with resistance and resilience to *Haemoncus contortus* in Brazilian Morada Nova sheep. **Veterinary Parasitology**, 279:109053.

Von Haeling MB, Toscano JHB, Giraldelo LA, Santos IB, Esteves SN, Benavides MV, Tholon P, Chagas ACS (2021) Is selection for resistance and resilience to *Haemonchus contortus* possible in Morada Nova sheep? **Small Ruminants Research**, 201:106447.

Waller PJ (1999) International approaches to the concept of integrated control of nematode parasites of livestock. **International Journal for Parasitology** 29:155-164.

Wanyangu SW, Mugambi JM, Bain RK, Duncan JL, Murray M, Stear (1997) Response to artificial and subsequent natural infection with *Haemonchus contortus* in Red Maasai and Dorper ewes. **Veterinary Parasitology** 69:275-282.

Williams EG, Broophy PM, Williams HW, Davies N, Jones RA (2021) Gastrointestinal nematode control practices in ewes: Identification of factors associated with application of control methods known to influence anthelmintic resistance development. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports** 24:100562.

Williamson SM, Storey B, Howell S, Harper KM, Kaplan RM, Wolstenholme AJ (2011) Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequence polymorphisms in a triple-resistant field isolate of *Haemonchus contortus*. **Molecular and Biochemical Parasitology** 180:99-105.

Yang Y, Ma Y, Chen X, Guo X, Yan B, Du A (2015) Screening and analysis of Hc-ubq and Hc-gst related to desiccation survival of infective *Haemonchus contortus* larvae. **Veterinary Parasitology** 210:179-185.

Yin F (2013) Genetic variability within and among *Haemonchus contortus* isolates from goats and sheep in China. **Parasites & Vectors** 6:279.

Zajac AM, Garza J (2020) Biology, epidemiology, and control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice** 36:73-87.

Zen S, Santos MC, Monteiro CM (2014) Evolução da caprino e ovinocultura. **Boletim Ativos da Pecuária de Caprino e Ovinocultura** 9:1-3.

CAPÍTULO 2- Association of β-globin polymorphisms and tolerance to haemonchosis in ewes and lambs of different sheep breeds[1]

[1] Este capítulo corresponde ao artigo científico publicado na revista científica Veterinary Parasitology https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2024.110163

ABSTRACT- Gastrointestinal nematodes (GIN), especially *Haemonchus contortus*, represent a significant challenge for sheep production. Given the global concern about GIN anthelmintic resistance, alternative control methods able to reduce the dependence on these drugs are highly advisable. Since previous studies have shown that sheep carrying the Hb-A allele of β-globin are more resistant to *H. contortus*, this study aimed to investigate the relationship between the different haplotypes (Hb-AA, Hb-AB and Hb-BB) and phenotypes in Santa Inês (SI), Texel (TX) and White Dorper (DO) breeds infected with *H. contortus*. Blood samples were collected from 180 ewes and 123 lambs of the three breeds for DNA extraction followed by qPCR using a hydrolysis probe to identify the β-globin haplotypes. Phenotypic data, including fecal egg count (FEC), packed cell volume (PCV), FAMACHA score and body condition score for ewes and lambs, as well as weight gain for lambs, were collected. The genotypic frequencies of β-globin for ewes and lambs were, respectively: 21.7% and 21.4% Hb-AA, 50% and 50% Hb-AB and 28.3% and 28.6% Hb-BB in SI; 0% and 0% Hb-AA, 18.6% and 9.4% Hb-AB and 81.4% and 90.6% Hb-BB in TX; and 0% and 0% Hb-AA, 13.1% and 0% Hb-AB and 86.9% and 100% Hb-BB in DO. In ewes, mean PCV differed ($p<0.05$) between the three haplotypes, with higher PCV in Hb-AA animals, followed by Hb-AB and Hb-BB. When considering each breed separately, SI Hb-AA ewes presented higher PCV ($p<0.05$), highlighting that even in a breed already considered resistant, animals with Hb-AA haplotype showed superior performance. Lambs with the Hb-AA haplotype exhibited a higher ($p<0.05$) mean PCV compared to those with Hb-AB and Hb-BB. The same pattern was found in SI when analyzing each breed separately. No significant association was found between β-globin haplotypes and FEC, FAMACHA score, body condition score, or weight gain. Nevertheless, given that anemia is the major clinical sign of haemonchosis, our findings on PCV reinforce that sheep carrying the Hb-A allele of β-globin are more tolerant to haemonchosis. This

study may support the development of a valuable tool, targeting genetic selection for GIN control, reducing the dependence on anthelmintics and boosting sheep production worldwide.

Keywords: *Haemonchus contortus*, parasite tolerance, anemia, haplotypes, genotyping, ovine, resilience.

1 INTRODUCTION

Gastrointestinal nematodes (GIN) represent the primary bottleneck in sheep production (Mcrae et al., 2015; Chagas et al., 2022), with *Haemonchus contortus* being the most significant species affecting the productivity of sheep flocks in Brazil and worldwide (Waller, 2006; Chagas et al., 2008; Penago et al., 2021). Responsible for the disease haemonchosis, this parasite leads to a significant reduction in production in infected animals, including decreased growth in lambs, reduced milk production in lactating dams, decreased wool production and deaths, resulting in substantial economic losses (Fthenakis and Papadopoulos, 2018; Chagas et al., 2022). During more vulnerable periods, such as the peripartum period, ewes become even more susceptible to helminth infections (Basseto et al., 2018), with an increase in fecal egg counts (FEC) being common during this period (Pereira et al., 2020).

The most common practice for controlling GIN is the use of anthelmintics (AH). Unfortunately, their frequent and indiscriminate administration has led to the emergence of AH resistance in parasites to all drug classes, making them multidrug-resistant (Kotze and Prichard, 2016; Arsenopoulos et al., 2021). As a consequence, the annual cost of AH treatments is estimated at tens of billions of dollars worldwide (Ali et al., 2021), highlighting the need to seek support methods for *H. contortus* control.

The selection of sheep breeds naturally resistant to GIN is a tool to control *H. contortus* infections, based on phenotypic and genotypic characteristics (Cruz-Tamayo et al., 2021). The ability to resist GIN is strictly related to the existence of genetic variation among animals, making it possible, from the identification, to select the most resistant and resilient animals (Bishop, 2012). FEC is the most common method for the identification of resistant animals; however, there are other methods, such as the GIN worm count, the degree of anemia, the frequency of treatments and the immune response to parasitism (Salgado et al., 2022).

Studies have progressively focused on investigating molecular polymorphisms that can be used in strategies for selecting resistant animals. In this context, two different chromosomal arrangements of β-globin have given rise to two distinct haplotypes in domestic sheep: Hb-A and Hb-B (Garner and Lingrel, 1989). In Hb-A, the β-globin locus consists of 12 genes, organized as a set of four genes that are triplicated and expressed during development (fetal β^F, juvenile β^C and adult β^A), while

in Hb-B, this arrangement of four genes is duplicated (fetal β^F and adult β^B) (Pieragostini et al., 2010). Sheep with Hb-A synthesize β^C (juvenile), which has a higher oxygen affinity not only at birth but also in adulthood under anemic conditions. In contrast, sheep with Hb-B, as they do not synthesize β^C, continue to produce β^B (adult) even in anemic circumstances (Pieragostini et al., 2010). Since *H. contortus* is a hematophagous GIN, consuming blood directly from the hosts' abomasum and leading to anemia (Andrews, 1942), studies have shown that animals with the β^A allele, including the Hb-AA and Hb-AB haplotypes, especially the former, are more resistant to infection by this GIN (Evans et al., 1963; Jilek and Bradley, 1969; Allonby and Urquhart, 1976; Preston and Allonby, 1979; Okino et al., 2021a; Okino et al., 2021b; Okino et al., 2023).

Therefore, the main purpose of this study was to investigate the relationship between different β-globin haplotypes (Hb-AA, Hb-AB and Hb-BB) and phenotypes related to resistance to haemonchosis in ewes and lambs of the Santa Inês (SI), Texel (TX) and White Dorper (DO) breeds. We aimed to provide an alternative approach for the control of *H. contortus* through genetic selection, using this polymorphism with the intention of reducing dependency on the frequent use of AH agents.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Experimental design

The study was performed at the experimental farm of Embrapa Pecuária Sudeste (CPPSE), located in São Carlos, SP, Brazil (21°57’ S, 47°50’ W, 860 m) from February 2022 to March 2023). The climate is classified as Cwa (Köppen) with two well defined seasons: dry season (April to September) and rainy season (October to March). The average temperatures, humidity, and rainfall were 19.6°C, 66.5%, and 44.4 mm, respectively, during the dry season and 22.2°C, 81.1%, and 249.3 mm during the rainy season. These data were collected at the CPPSE meteorological station.

A total of 180 ewes, with an average age of 5 years, were utilized. Among them, 60 belonged to the Santa Inês (SI) breed, with an average weight of 62.7 kg, 59 were Texel (TX), with an average weight of 66.7 kg, and 61 were White Dorper (DO), with an average weight of 71.2 kg.

The natural mating season took place between March 23 and May 6, 2022. In brief, there were three rams for each breed. Thus, the ratio was one ram mating with approximately 20 ewes of the same breed, in separate and controlled paddocks, until all 60 SI, 59 TX, and 61 DO were covered. On ultrasound examinations, 133 (40 SI, 54 TX and 39 DO) out of 180 ewes were identified as pregnant. The lambing season occurred between August 21 and October 13, 2022, resulting in a total of 144 live-born lambs, comprising 50 SI, 57 TX and 37 DO. Of these, 126 lambs (42 SI, 54 TX and 30 DO) were followed in the current experiment.

The ewes were kept throughout the experimental period on pasture (*Panicum maximum* cv. Tanzânia, *ad libtum*), and during the dry period, they received supplementation with corn silage (4 kg/ewe/day) and concentrated feed (0.4 kg/ewe/day) in the morning. All animals received mineral salt and water *ad libitum*. During the pre-partum (30 days) and early lactation (45 days) periods, the ewes were supplemented similarly. The lambs were kept with their mothers on pasture and supplemented with concentrated feed (up to 0.3 kg/animal/day) in the morning. The weaning began in November 2022, when the lambs were about 84 days old. Some conditions, such as mastitis, insufficient milk production, rejection by the dam or weak

lambs, impaired natural suckling. Thus, 16 lambs (2 SI AA, 4 SI AB, 3 SI BB, 3 TX BB, and 4 DO BB) were transferred to stalls and subjected to artificial feeding, including sheep colostrum administration at birth, followed by cow milk and concentrated feed (from the 10th day of life) until weaning, when they were moved to pasture (average age of 42 days).

The ewes and lambs were monitored daily by a veterinarian, who also assessed the clinical results of the tests. In necessary cases, the animals received medication or vitamin supplementation to accomplish their needs.

2.2 Genotyping for identification of β-globin haplotypes in ewes and lambs

The blood was collected through jugular venipuncture into an EDTA vacutainer tube and stored at -20ºC until processing. DNA extraction was performed with the Easy DNA kit (Invitrogen, Cat. K180001), following the manufacturer's recommendations. The concentration and purity of the isolated DNA were estimated by absorbance at 260 nm and the 260/280 nm ratio in spectrophotometer (Nanodrop | 2000, Thermo Scientific). DNA was stored at -20ºC until processing and individually adjusted to a final concentration of 2.5 ng/µL.

qPCR assays for the identification of the ovine β-globin haplotype were performed as described by Okino et al. (2021a). The reactions contained 5 ng DNA, 1x Mastermix Solution (Solis Biodyne, Tartu, Estonia), 5 pmol forward and reverse primers and 2 pmol of each probe, in a final volume of 10 µL.

Amplification was performed in a CFX 96 (BioRad) thermocycler including a pre-incubation step at 95ºC for 5 minutes, followed by 40 cycles of 95ºC for 15 seconds and 60ºC for 30 seconds. In each run, a negative control and three positive controls (samples of Hb-AA, Hb-BB and Hb-AB of β-globin haplotypes; confirmed by DNA sequencing) were included.

Hardy-Weinberg equilibrium of allele frequencies was investigated on https://gene-calc.pl/hardy-weinberg-page at a significance level of 0.05.

2.3 Phenotypic data

In ewes, fecal samples were collected directly from the rectal ampoule in the months preceding parturition (February, March, April, May and July) and during the peripartum period (August, September and October). Individual fecal egg count (FEC) x 50 (adapted from Gordon and Whitlock, 1939) and fecal culture in an incubator (± 27°C, RH >80%) for 7 days, followed by infective larvae (L_3) identification (Van Wyk et al., 2004), were performed. In February (the beginning of the experiment), March (the rainy season) and July (after mating), the packed cell volume (PCV) was determined by micro-hematocrit; in February, March, September, October and November, the score of ocular conjunctiva FAMACHA was measured (Van Wyk and Bath, 2002), while in February body score was estimated (Russell, 1984).

The phenotypic data of the lambs were collected every 21 days, from D0 (birth) to D189. To minimize age differences, the lambs were evaluated in two lots (Lot 1 - lambs born from 18 Aug to 7 Sep and Lot 2 – lambs born from 8 Sep and to 10 Oct) and the collection dates were adjusted according to the average age. On D0 and D42, only weight was measured, while on D63, weighing, FEC and PCV were performed. From D84 (average weaning age) to D189, complete phenotyping was performed, including body and FAMACHA scores. Weight gain was calculated and adjusted for the interval of 21 days between collections.

The animals were individually evaluated, and selective treatment with AH was administered according to the assessment of the responsible veterinarian indicating the need.

2.6 Statistical analysis

Prior to the analysis, data from one Texel lamb (deceased before D189) and two Dorper lambs (the only DO with the AB β-globin haplotype and the only offspring of a sire) were removed. Thus, a database containing 180 ewes and 123 lambs was used.

Analyses were performed in R (version 4.2.3). For normalization, FEC data were transformed by cubic root (tFEC). The quantitative phenotypic data (tFEC, PCV and weight gain) were analyzed in a mixed linear model with the lmer() function of the lme4 package (Bates et al., 2015) and maximum likelihood optimization. Pearson's correlation among quantitative variables was estimated using the chart. Correlation function of the Performance Analytics package (Peterson and Carl, 2020). Categorical data (FAMACHA score and body condition score) were analyzed in a mixed multinomial regression model with the mclogit package (Elff, 2023).

Mixed models considered repeated measures (collection dates) and nested variables (sire within dam) as random effects. Breed and β-globin haplotype were tested as a fixed effect for both ewes and lambs. Additionally for the lambs, group (from another ongoing study on parasitic replacement; manuscript under development), average environmental temperature, humidity and precipitation, AH treatment 21 days before collection, sex (male or female), type of birth (single or twin), birth weight, maternal age (in years), weaning's age (in days), artificial feeding (yes = orphan lambs and no = lambs that stayed with their mothers) and lot (1 and 2) were investigated as covariates. For ewes, condition (0 = not pregnant, 1 = pregnant and raised the lamb and 2 = pregnant, but the lamb was subjected to artificial feeding) and prolificacy (single or twin pregnancy) were tested as fixed effects. The analysis was performed initially for the entire dataset comprised of all three sheep breeds and subsequently, due to the lack of all β-globin haplotypes in all breeds, data was analyzed separately by breed.

After inclusion, one by one, of random and fixed effects and test of all relevant first order interactions between fixed effects, the best fitted model was selected based on the Akaike Information Criterion (AIC) and non-significant ($P>0.05$) terms were removed. The LMERConvenienceFunctions package (Tremblay et al., 2020) was employed for model assumption assessment, outlier removal, analysis of variance and post-hoc tests. The Mumin package (Bartoń, 2023) extracted the R^2 of the models.

3 RESULTS

Descriptive statistics of all phenotypes are presented for ewes (Table 1) and lambs (Table 2) grouped by breed and β-globin haplotype.

In fecal cultures, *Haemonchus*, *Trichostrongylus* spp. and *Oesophagostomum* spp. were identified, but *Haemonchus* was the predominant genus in all collection dates from ewes (92% to 96%) and lambs (92% to 99%).

Blood samples from all ewes (60 SI, 59 TX and 61 DO) and lambs (42 SI, 54 TX and 30 DO) were genotyped for β-globin, and allelic and genotypic frequencies were calculated (Table 3). Only SI presented the Hb-AA haplotype, and the Hb-AB haplotype was the most frequent in SI, while Hb-BB was the most common in TX and DO. All β-globin haplotype frequencies were under Hardy-Weinberg equilibrium, indicating that the β-globin alleles were not under selective pressure in the experimental animals.

Regardless of the breed, the genotypic frequencies for the β-globin were: 7.2% Hb-AA (13/180), 27.2% Hb-AB (49/180) and 65.6% Hb-BB (118/180) in ewes; and 7% Hb-AA (9/123), 21% Hb-AB (26/123) and 72% Hb-BB (88/123) in lambs.

In lambs, tFEC was negatively correlated ($p<0.05$) to both PCV (-0.50) and weight gain (-0.16), and PCV was positively correlated ($p<0.05$) to weight gain (0.38).

An association ($p<0.05$) of β-globin haplotypes to mean PCV was detected in both ewes and lambs. In ewes, considering the three breeds altogether, the best fitted model (AIC=2080.1 and R^2=0.27) was significant ($p<0.05$) for collection date as a random effect and breed and β-globin haplotypes as fixed effects. Higher ($p<0.05$) PCV was detected in SI and in the Hb-AA β-globin haplotype, which was followed by Hb-AB and Hb-BB (Figure 1).

When considering ewes of each breed separately, collection date as a random effect and β-globin haplotypes and condition as fixed effects improved the model adjustment for SI (AIC=600.8 and R^2=0.38), with higher ($p<0.05$) PCV in animals Hb-AA and in conditions 0 and 2 (Figure 2). No significant effects were observed for PCV in TX, and β-globin haplotypes were not associated ($p>0.05$) with PCV in DO.

In lambs, random effects of sire/dam and collection date and fixed effects of β-globin haplotype, breed, sex, maternal age, mean precipitation, AH treatment, artificial

feeding and lot, and interactions between group and AH treatment and between maternal age and artificial feeding improved the model adjustment (AIC=4823.0 and R^2=0.57). For β-globin, lambs with the Hb-AA haplotype showed higher ($p<0.05$) PCV than Hb-AB and Hb-BB, and for breed, SI presented higher ($p<0.05$) PCV than DO and TX (Figure 3).

For lambs, when considering each breed individually, significant effect of the β-globin haplotype on PCV was detected only in SI, where Hb-AA animals and lambs that stayed with their mothers showed higher ($p>0.05$) PCV (Figure 4). For SI, random effects of dam and collection date, and fixed effects of β-globin haplotype, artificial feeding and mean precipitation and interaction between mean precipitation and mean humidity contributed to the model fitting (AIC=1510.1 and R^2=0.60).

There was no significant association ($p>0.05$) of β-globin haplotypes to the other parasite resistance phenotypes (FEC, weight gain, FAMACHA score and body composition score) evaluated in ewes and lambs from all three sheep breeds.

4 DISCUSSION

SI was the only breed with Hb-AA individuals, whereas the TX and DO breeds presented a higher frequency of Hb-BB individuals and no Hb-AA. Jiang et al. (2015) also characterized the different β-globin alleles in 70 domestic sheep of 42 breeds and the Hb-B haplotype also presented the highest allele frequency (71.4%). In addition, as in the present study, Jiang et al. (2015) did not find Hb-AA in TX and DO breeds, but it was detected in SI. Based on the sample size used in the present research, we hypothesized that the allelic frequency of β-globin in sheep is dependent on the breed and, consequently, on its origin and evolutionary processes through natural selection. SI possibly descends from a sheep breed submitted to natural selection for a long period, until they become tolerant to *H. contortus* infections (Amarante et al., 1997). Evans et al. (1958) reported that Hb-A has a selective advantage in sheep at higher altitudes, constituting the most common allele in land breeds with high altitudes, as in England and Scotland. Thus, the population sampled in this study has a higher frequency for Hb-BB, suggesting its adjustment to lower altitudes, as is the case for the geographic location of Brazil, where the samples were derived. Additionally, for this study, it was challenging to find Hb-AA breeding stock available for purchase.

In the present study, *H. contortus* infection impaired the performance of the lambs. The stronger negative correlation showed that increased tFEC resulted in a reduction in PCV, while the weaker correlation suggested a decrease in weight gain with increased tFEC. On the other hand, the positive correlation between PCV and weight gain indicated that the increase in PCV also led to higher weight gain. Sheep highly infected with GIN have lower PCV compared to less infected animals (Coop et al., 1977). In addition, dewormed animals can have weight gain approximately twice as high as untreated ones (Keegan et al., 2018).

The ewes and lambs of the Hb-AA haplotype presented significantly better PCV in relation to the Hb-AB and Hb-BB haplotypes. Even when comparing within the same breed, as was the case with SI, a breed considered resistant (Chagas et al., 2013) and the only one that had animals of all three haplotypes, it was observed that Hb-AA ewes and lambs had a higher PCV than Hb-AB and HB-BB. This highlights the hypothesis that animals carrying the A allele (especially Hb-AA) are more tolerant to

haemonchosis, as the main clinical sign of this disease is anemia (Bertagnon et al., 2019). This is due to the fact that Hb-A allele animals have the coding gene for β^C-globin, which has a greater affinity for oxygen, being expressed in situations of anemia or hypoxia as a compensatory mechanism (Hammerberg et al., 1974), while there is a deletion in the gene encoding β^C globin in Hb-BB (Garner and Lingrel, 1988), causing a lower resistance of these animals to anemia (Huisman and Kitchens, 1968). We believe that this mechanism has the potential to mitigate disease severity, as sheep infected with *H. contortus* can lose up to 30 µL of blood per day per adult worm (Emery et al., 2016). Since FEC levels were elevated and similar in the three breeds and haplotypes, we can infer that individuals of Hb-AA haplotype of the ovine β-globin demonstrate tolerance to haemonchosis. This is due to the fact that the tolerance of an animal is intrinsically related to its ability to maintain performance and remain asymptomatic, even when they harbor a substantial quantity of L_3 (Bishop, 2012; Hine et al., 2022). On the other hand, animals carrying the Hb-BB haplotype may be more susceptible to haemonchosis, since, according to Freitas et al. (2023), susceptible sheep are those that house GIN and manifest severe clinical signs, such as anemia, and whose production is affected.

Previous studies conducted by our research group, involving Morada Nova lambs, corroborated the current results regarding PCV (Okino et al., 2021; Okino et al., 2023). In the first study, 286 lambs were artificially infected with 4,000 third-stage larvae of *H. contortus*, where, in addition to the Hb-AA animals showing significantly higher PCV values ($p<0.05$), they also exhibited lower FEC and higher birth weight (Okino et al., 2021). In the second study, which shared a similar sample size with the current study and involved natural infection, no significant differences were observed ($p>0.07$) for FEC, which is in line with the results of this study. Okino et al. (2023), explained that the reduced sample size, the high variability of FEC and its susceptibility to climatic and nutritional influences may contribute to the less pronounced differences between the haplotypes. Furthermore, in natural infection, the parasite loads ingested by each animal vary and there is no control over the amount ingested by each one, unlike artificial infection, where standardized parasite loads are administered to each individual. Okino et al. (2023) observed an improved abomasum local response in Hb-AA lambs, with an increase in the Th2 response, mucin and lectin, demonstrating that

animals of this haplotype are able to develop an improved response in the primary site of *H. contortus* infection.

In the current study, orphan lambs subjected to artificial feeding exhibited lower PCV compared to those under natural suckling. Further investigations are needed; however, it is suspected that this may be due to nutritional deficiency, rather than infection by *H. contortus*, since FEC and weight gain were lower (data not shown). Cow's milk may not adequately meet the nutritional needs of lambs (Kanwal et al., 2004) and artificial feeding, even with fresh sheep's milk, may impair the growth, health and emotional wellbeing of lambs (Mialon et al., 2021). Male lambs also exhibited lower PCV compared to females. This disparity can be attributed to greater parasitic susceptibility associated with androgen hormones in males, while females show the stimulatory effects of estrogen on immune responses (Urquhart et al., 1996). Additionally, in males, compared to females, there is increased competition for dietary protein to meet both growth and immune function requirements (Houdjik et al., 2001). Furthermore, lambs treated with AH showed higher PCV, as AH treatment tends to decrease FEC, consequently increasing PCV.

The body condition score of 3 emerged as the most prevalent category, both among ewes and lambs, revealing remarkable uniformity, with the absence of statistically significant differences between different haplotypes. This homogeneity can be attributed to the practice of dietary supplementation with concentrated feed, which was equally provided to all animals. As noted by Nechifor et al. (2022), dietary supplementation, particularly in reproductive ewes, represents an effective means to enhance the body condition score of animals.

The results of FAMACHA with the prevalence of degree 1 (indicating the absence of anemia), did not corroborate with those of PCV, showing no significant differences between the haplotypes. Given that this diagnostic method is categorical (with only five degrees, ranging from 1 to 5) and was performed by different evaluators in the context of this study, the observations became more susceptible to subjectivity. Dahorou et al. (2021) investigated the accuracy of the FAMACHA test and also identified a low agreement between the FAMACHA scores and PCV. A study conducted by Cintra et al. (2018) found that the FAMACHA method has low sensitivity

in young lambs, indicating that it should not be employed alone for the control of haemonchosis in these animals.

Genetic strategies aiming to promote tolerance/resistance in sheep of different breeds and ages have the potential not only to increase the profitability of producers by reducing the need for AH treatment and animal mortality, but also to contribute to the mitigation of environmental impacts resulting from contamination caused by the use of these agents. In this sense, increasing the population of individuals of haplotype Hb-AA in a flock, through genetic selection, may become an effective support tool for the control of *H. contortus* and haemonchosis in the future, since strong evidence suggests that *H. contortus* does not adapt to long-term exposure to sheep that are genetically resistant to GIN infections (Amarante et al., 2009).

5 CONCLUSION

Since the reduction of PCV is the main consequence of haemonchosis, our results suggest that ewes and lambs of Hb-AA haplotype may be more tolerant to haemonchosis, presenting milder clinical signs of anemia despite a predominant infection with *H. contortus*. Further studies are still required, but the selection of β-globin A animals could be applied for genetic improvement, to select animals that are naturally more resilient to *H. contortus*.

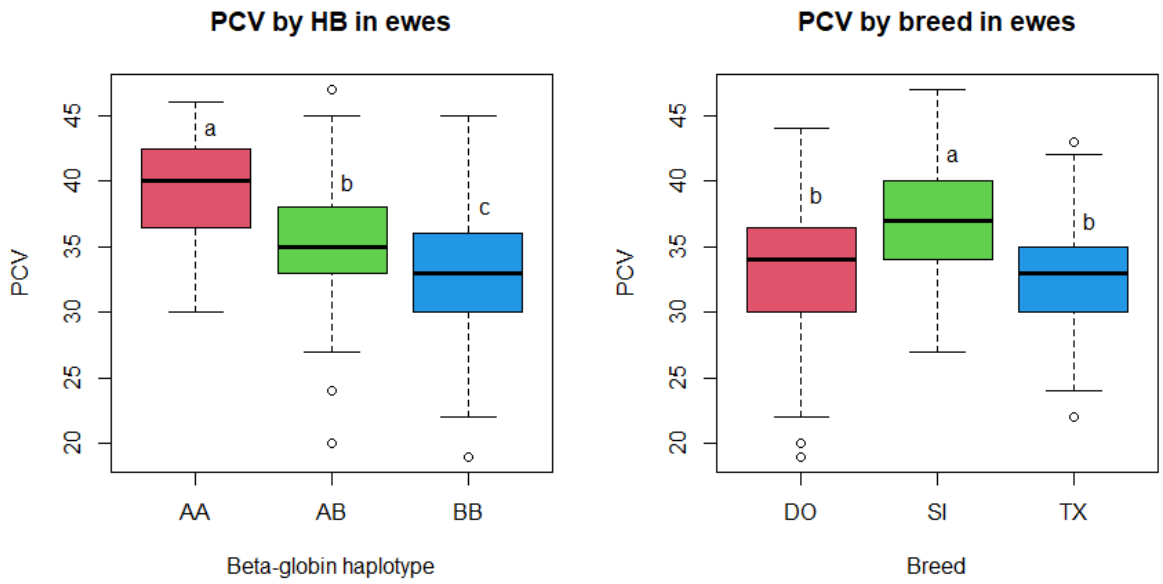

Figure 1. Effect of β-globin haplotypes (Hb-AA, Hb-AB, and Hb-BB) and sheep breeds (Dorper (DO), Santa Inês (SI), and Texel (TX)) on packed cell volume (PCV) in ewes. abc Different letters indicate significant differences (p<05). Box plots showing median (central line), first and third quartiles (box), minimum and maximum values (whiskers), and outliers (circles) of PCV data collected on February, March and July.

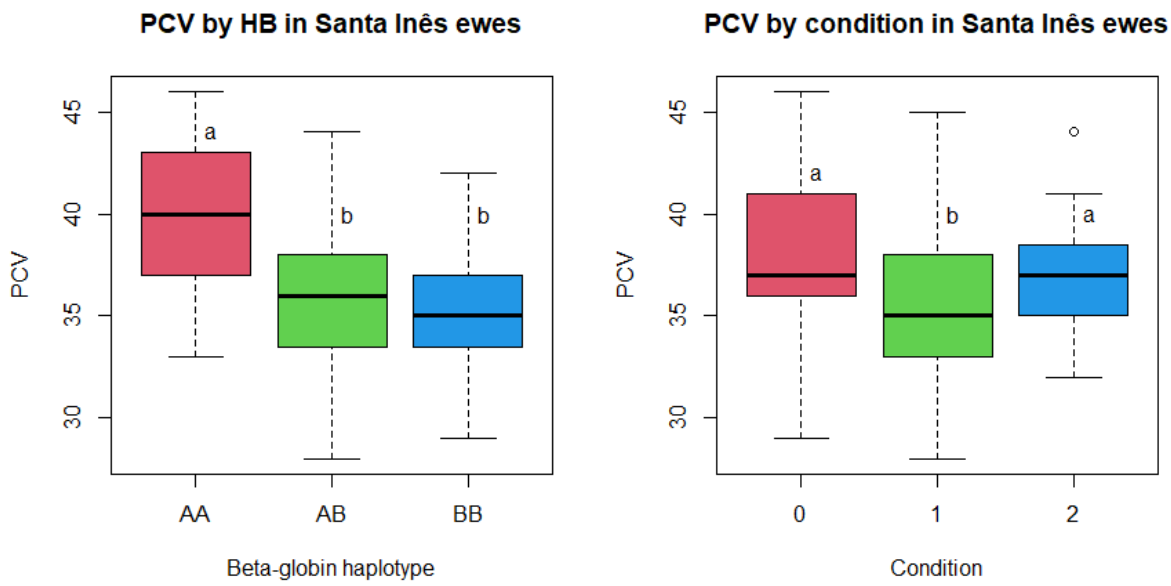

Figure 2. Effect of β-globin haplotypes (Hb-AA, Hb-AB, and Hb-BB) and condition (0 = not pregnant, 1 = pregnant and raised the lamb and 2 = pregnant, but the lamb was subjected to artificial feeding) on packed cell volume (PCV) in Santa Inês ewes. abc Different letters indicate significant differences (p<05). Box plots showing median (central line), first and third quartiles (box), minimum and maximum values (whiskers), and outliers (circles) of PCV data collected on February, March and July.

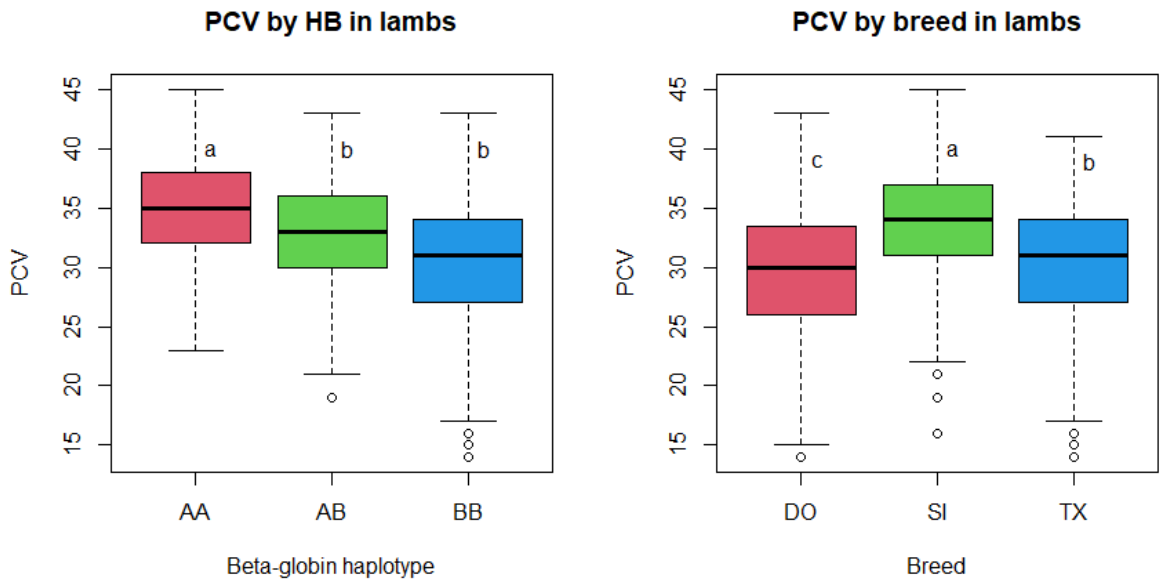

Figure 3. Effects of β-globin haplotypes (Hb-AA, Hb-AB, and Hb-BB) and sheep breeds (Dorper (DO), Santa Inês (SI), and Texel (TX)) on packed cell volume (PCV) in lambs.

abc Different letters indicate significant differences ($p<0.05$). Box plots showing median (central line), first and third quartiles (box), minimum and maximum values (whiskers), and outliers (circles) of PCV data collected on D63, D84, D105, D126, D147, D168, and D189.

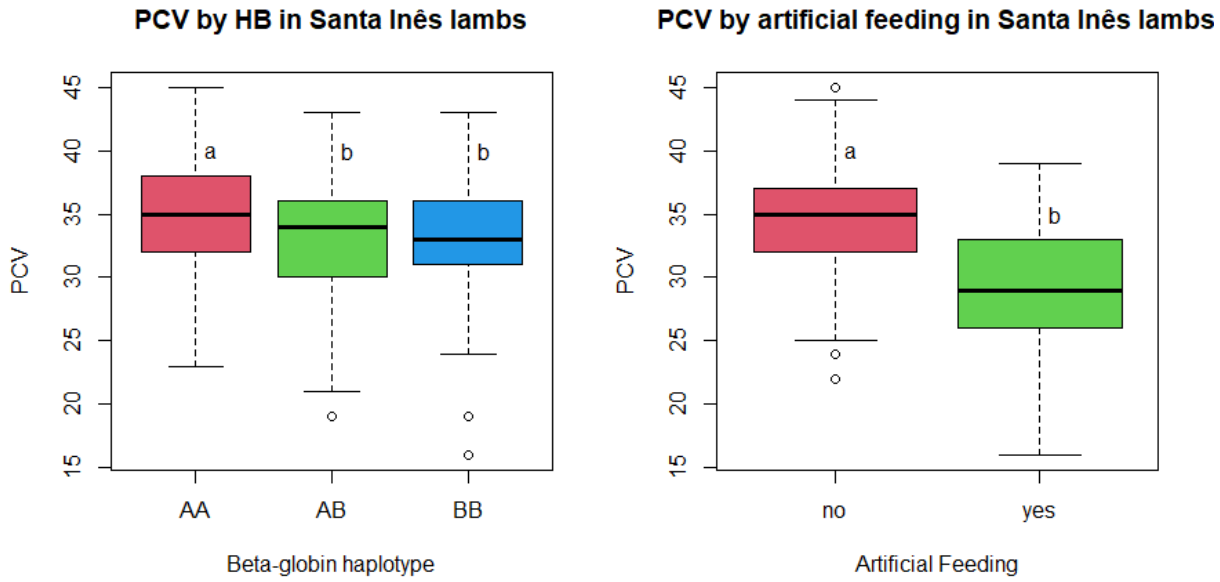

Figure 4. Effect of β-globin haplotypes (Hb-AA, Hb-AB, and Hb-BB) and artificial feeding (yes = orphan lambs and no = lambs that stayed with their mothers) on packed cell volume (PCV) in Santa Inês lambs.
abc Different letters indicate significant differences (p<05). Box plots showing median (central line), first and third quartiles (box), minimum and maximum values (whiskers), and outliers (circles) of PCV data collected on D63, D84, D105, D126, D147, D168, and D189.

Table 1. Overall mean (± standard deviation) of fecal egg count (FEC) (February, March, April, May, July, August, September and October) and packed cell volume (PCV) (February, March and July), and frequency of FAMACHA scores (February, March, September, October and November) and body condition scores (February, March and August) in ewes, according to the combination of sheep breeds (Dorper (DO), Santa Inês (SI) and Texel (TX)) and β-globin haplotypes (Hb-AA, Hb-AB and Hb-BB).

	n	FEC	PCV	Famacha				Body condition			
			(%)	1	2	3	4	1	2	3	4
DO_AB	8	1225 ± 2044	35.0 ± 5.5	91%	9%	0%	0%	0%	0%	80%	20%
DO_BB	53	1155 ± 1715	33.0 ± 4.6	73%	22%	3%	2%	0%	9%	76%	15%
SI_AA	13	1253 ± 2300	39.2 ± 3.9	72%	28%	0%	0%	0%	11%	67%	22%
SI_AB	30	1172 ± 1971	36.8 ± 3.9	82%	15%	3%	0%	0%	11%	89%	0%
SI_BB	17	830 ± 1882	35.2 ± 3.9	77%	23%	0%	0%	0%	11%	78%	11%
TX_AB	11	1218 ± 3280	33.5 ± 3.0	76%	24%	0%	0%	0%	0%	100%	0%
TX_BB	48	1646 ± 4348	32.7 ± 4.1	69%	27%	4%	0%	0%	12%	81%	7%

Table 2. Overall mean (± standard deviation) of fecal egg count (FEC) and packed cell volume (PCV) (collections on D63, D84, D105, D126, D147, D168, and D189) and weight gain (collections on D0, D21, D42, D63, D84, D105, D126, D147, D168, and D189), and frequency of FAMACHA and body condition score (collections on D84, D105, D126, D147, D168, and D189) in lambs, according to the combination of sheep breeds (Dorper (DO), Santa Inês (SI), and Texel (TX)) and β-globin haplotypes (Hb-AA, Hb-AB, and Hb-BB).

	n	FEC	PCV (%)	Weight gain* (kg)	Famacha			Body condition			
					1	2	3	1	2	3	4
DO_BB	28	5901 ± 7494	29.1 ± 5.92	2.90 ± 2.21	66%	23%	11%	1%	30%	68%	1%
SI_AA	9	4030 ± 5139	34.8 ± 4.19	3.37 ± 1.96	74%	24%	2%	2%	57%	39%	2%
SI_AB	21	3153 ± 4119	32.7 ± 5.66	2.75 ± 1.89	67%	29%	4%	7%	68%	25%	0%
SI_BB	12	1854 ± 2130	32.9 ± 4.81	2.79 ± 1.87	67%	25%	8%	7%	58%	33%	2%
TX_AB	5	3221 ± 3686	31.6 ± 3.97	3.32 ± 2.43	70%	23%	7%	1%	36%	61%	2%
TX_BB	48	5272 ± 9126	29.6 ± 5.60	3.10 ± 2.30	64%	25%	11%	0%	33%	67%	0%

Table 3. Frequency of β-globin haplotypes (AA, AB, and BB) and alleles (βA and βB) according to sheep breed and animal category.

	Santa Inês					Texel				White Dorper			
Category(n)	Hb-AA	Hb-AB	Hb-BB	βA	βB	Hb-AB	Hb-BB	βA	βB	Hb-AB	Hb-BB	βA	βB
Ewes (n=180)	21.67%	50%	28.33%	0.38	0.62	18.64%	81.36%	0.09	0.91	13.11%	86.89%	0.07	0.93
Lambs (n=126)	21.43%	50%	28.57%	0,38	0,62	9.26%	90.74%	0,05	0,95	3,33%	96,67%	0,02	0,98

Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP- Process n° 2022/00776-8, 2021/02535-5, 2022/07720-8 and 2021/0975-0) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq- Process nº 128581/2022-0)

REFERENCES

Ali, R., Roomann, M., Mussarat, S., Norin, S., Ali S., Adnan, M., Khan, S.N., 2021. A Systematic Review on Comparative Analysis, Toxicology, and Pharmacology of Medicinal Plants Against *Haemonchus contortus.* Front. pharmacol**.** 12, 644027.

Allonby, E.W., Urquhart, G.M., 1976. A possible relationship between haemonchosis and haemoglobin polymorphism in Merino sheep in Kenya. Res. Vet. Sci. 20, 212-214.

Almeida, F.A., Albuquerque, A.C.A., Bassetto, C.C., Starling, R.Z.C., Lins, J.G.G., Amarante, A.F.T., 2020. Long spelling periods are required for pasture to become free of contamination by infective larvae of *Haemonchus contortus* in a humid subtropical climate of São Paulo state, Brazil, Vet. Parasitol. 279, 109060.

Amarante, A.F.T., Bagnola, Jr, J, Amarante, M.R.V., Barbosa, M.A., 1997. Host specificity of sheep and cattle nematodes in Sao Paulo state, Brazil. Vet. Parasitol. 73, 89-104.

Amarante, A.F.T., Susin, I., Rocha, R.A., Silva, M.B., Mendes, C.Q., Pires, A.V., 2009. Resistance of Santa Ines and crossbred ewes to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. Vet. Parasitol. 165, 273-280.

Andrews, J. S., 1942. Stomach worm (*Haemonchus contortus*) infection in lambs and its relation to gastric hemorrhage and general pathology. J. Agr. Res. 65.

Arsenopoulos, K.V., Fthenakis, G.C., Katsarou, E.I., Papadopoulos, E., 2021. Haemonchosis: A Challenging Parasitic Infection of Sheep and Goats. Animals 11, 363.

Bartoń K., 2023. _MuMIn: Multi-Model Inference_. R package version 1.47.5, <https://CRAN.R-project.org/package=MuMIn>.

Bassetto, C.C., Almeida, F.A., Newlands, G.F.J., Smith, W.D., Castilho, A.M., Fernandes, S., Siqueira, E.R., Amarante, A.F.T., 2018. Trials with the *Haemonchus* vaccine, Barbervax®, in ewes and lambs in a tropical environment: Nutrient supplementation improves protection in periparturient ewes. Vet. Parasitol. 264, 52-57.

Bates, D., Bolker, M.M.B., Walker S., 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. J. Stat. Softw. 67, 1-48.

Bertagnon, H.G., Pontarolo, D.V., Reck, A.M., Nascimento, Y.T.H., Coneglian, M.M., Seki, M.C., Mayer, A., 2019. Efeito do parasitismo por *Haemonchus contortus* sobre o metabolismo oxidativo de leucócitos de ovinos. Cienc. Anim. Bras. 20, 1-8.

Bishop, S.C., 2012. Possibilities to breed for resistance to nematode parasite infections in small ruminants in tropical production systems. Animal 6, 741-747.

Chagas, A.C.S., Domingues, L. F., Gaínza, Y.A.; Barioni-Júnior, W., Esteves, S.N., Niciura, S.C.M., 2016. Target selected treatment with levamisole to control the development of anthelmintic resistance in a sheep flock. Parasitol. Res. 115, 1131-1139.

Chagas, A.C.S., Katiki, L.M., Silva, I.C., Giglioti, R., Esteves, S.N., Oliveira, M.C.S., Barioni-Júnior, W., 2013. *Haemonchus contortus*: A multiple-resistant Brazilian isolate and the costs for its characterization and maintenance for research use. Parasitol. Int., 62, 1-6.

Chagas, A.C.S., Oliveira, M.C.S., Esteves, S.N., Oliveira, H.N.., Giglioti, R, Giglioti, C., Carvalho C., Ferrezini, J.., Schiavone, DC., 2008. Gastrointestinal nematode parasitism in ewes and lambs raised in São Carlos, São Paulo. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 17, 126-132.

Chagas, A.C.S., Tupy, O., Santos, I.B., Esteves, S.N., 2022. Economic impact of gastrointestinal nematodes in Morada Nova sheep in Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 31, e008722.

Cintra, M.C.R., Ollhoff, R.D., Sotomaior, C.S., 2018. Sensitivity and specificity of the FAMACHA© system in growing lambs. Vet. Parasitol. 251, 106-111.

Coop, R.L., Sykes, A.R., Angus, K.W., 1977. The effect of a daily intake of *Ostertagia circumcincta* larvae on body weight, food intake and concentration of serum constituents in sheep. Res. Vet. Sci. 23, 76-83.

Cruz- Tamayo, A.A., Arelllano, M.E.L., Garduno, R.G., Hernandez, G.T., Valle, A.M., Perez, C.B., Mendo, O.H., Bribiesca, E.R., Cab, M.H., 2021. *Haemonchus contortus* infection induces a variable immune response in resistant and susceptible Pelibuey sheep. Vet. Immunol. Immunopathol. 234, 110218.

Dahourou, L.D., Konaté, A., Tapsoba, A.S.R., Dicko, A., Sanou, M., Tamboura, H.H., Bayala, B., Salissou, I., Traoré, A., Logan, L.L., Tembely, S., 2021. Epidemiology and spatio-temporal distribution of gastrointestinal parasites infection and accuracy of FAMACHA test in sheep in traditional farming systems in Burkina Faso. Trop. Anim. Health Prod. 53, 392.

Echevarria, F. M. A., Armour, J., Duncan, J. L., 1991. Efficacy of some anthelmintics on an ivermectin-resistant strain of *Haemonchus contortus* in sheep. Vet. Parasitol. 39, 279-284.

Elff, M., 2023. _mclogit: Multinomial Logit Models, with or without Random Effects or Overdispersion_. http://mclogit.elff.eu,https://github.com/melff/mclogit/.

Emery D. L., Hunt, P.W., Jambre, L.F.L., 2016. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? Int. J. Parasitol. 46, 755-769.

Evans, J.V., Blunt, M.H., Southcott, W.H., 1963. The effects of infection with *Haemonchus contortus* on the sodium and potassium concentrations in erythrocytes and plasma, in sheep of different haemoglobin types. Aust. J. Agric. Res. 14, 549-558.

Evans, J.V., Harris, H., Warren, F.L., 1958. The distribution of haemoglobin and blood potassium types in British breeds of sheep. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 149, 249-262.

Freitas, L.A., Savegnago, R.P., Alves, A.A.C., Costa, R.L.D., Munari, D.P.M., Stafuzza, N.B., Rosa, G.J.M., Paz, C.C.P., 2023. Classification Performance of Machine Learning Methods for Identifying Resistance, Resilience, and Susceptibility to Haemonchus contortus Infections in Sheep. Animals 13,374.

Fthenakis, G.C., Papadopoulos, E., 2018. Impact of parasitism in goat production. Small Rumin. Res. 163, 21-23.

Garner, K.J., Lingrel, J.B., 1988. Structural organization of the beta-globin locus of B-haplotype sheep. Mol. Biol. Evol. 5, 134-40.

Garner, K.J, Lingrel, J.B., 1989. A comparison of the beta A-and beta B-globin gene clusters of sheep. J. Mol. Evol. 28, 175-184.

Gordon, H. M., Whitlock, H. V., 1939. A new techinique for couting nematode eggs in sheeps faeces. J. Counc. Sci. Ind. Res. 12, 50-52.

Hammerberg, B., Brett, I., Kitchen, H., 1974. Ontogeny of hemoglobins in sheep. Ann. N. Y. Acad. Sci. 241, 672-682.

Hine, B.C., Acton, G.A., Elkes, D.J., Niemeyer, D.D.O., Bell, A.M., Colditz, I.G., Ingjam, A.B., Smith, J.L., 2022. Targeting improved resilience in Merino sheep – Correlations between immune competence and health and fitness traits. Animal 16- 100544.

Houdjik, J.G.M., Jessop, N.S., Kyriazakis., I., 2001. Nutrient partitioning between reproductive and immune functions in animals. Proc. Nutr. Soc. 60, 515-525.

Huisman, T.H., Kitchens, J., 1968. Oxygen equilibria studies of the hemoglobins from normal and anemic sheep and goats. Am. J. Physiol. 215, 140-6.

Jiang, Y., Wang, X., Kijas, J.W., Dalrymple, B.P., 2015. Beta-globin gene evolution in the ruminants: evidence for an ancient origin of sheep haplotype B. Anim. Genet. 40,506-514.

Jilek, A.F., Bradley, R.E., 1969. Haemoglobin types and resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. Am. J. Vet. Res. 30, 1773-1778.

Kanwal, R., Ahmed, T., Mirza, B., 2004. Comparative analysis of quality of milk collected from buffalo, cow, goat and sheep of Rawalpindi/Islamabad region in Pakistan. Asian J Plant Sci. 3, 300-305.

Keegan, J.D., Good, B., Hanrahan, J.P., Lynch, C., Waal, T., Keane, O.M., 2018. Live weight as a basis for targeted selective treatment of lambs post-weaning. Vet. Parasitol. 258, 8-13.

Kotze, A.C., Prichard, R.K., 2016. Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*: History, Mechanisms and Diagnosis. Adv. Parasitol. 93, 397-428.

Mcrae, K.M., Stear, M.J., Good, B., Keane, O.M., 2015. The host immune response to gastrointestinal nematode infection in sheep. Parasite Immunol. 37, 605-613.

Mialon, M.M., Boivin, X., Durand, D., Boissy, A., Delval, E., Bage, A.S., Clanet, C., Cornilleau, F., Parias, C., Foury, A., Moisan, M.P., Fassier, T., Marcon, D., Guilloteau, L.A., Nowak, R., 2021. Short- and mid-term effects on performance, health and qualitative behavioural assessment of Romane lambs in different milk feeding conditions. Animal 15, 100157.

Nechifor, I., Florea, M.A., Rusu, R.M.R., Pascal, C., 2022. Influence of Supplemental Feeding on Body Condition Score and Reproductive Performance Dynamics in Botosani Karakul Sheep. Agriculture 12, 2006.

Okino, C. H., Niciura, S.C.M., Giaretta, P.R., Melito, G.R., Kapritchkoff, R.T.I., Santos I.B., Rech R.R., Minho A.P, Esteves, N.E., Chagas A.C.S., 2023. Enhanced mucosal response in sheep harbouring βA beta-globin against haemonchosis. Parasite Immunol. 45, e13003.

Okino, C.H., Caminotto, L.C.F.., Kapritchkoff, R.T.I., Niciura, S.C.M., Esteves, S.N., Santos, I.B., Toscano, J.H.B., Oliveira, M.C.S., Chagas, A.C.S., 2021b. Comparison of ovine β-globin haplotype sequences and a new multiplex PCR for identification. Vet. Parasitol. 300-109592.

Okino, C.H., Niciura, S.C.M., Toscano, J.H.B., Esteves, S.N., Santos, I.B., von Haehling, M.B., Figueiredo, A., Oliveira, M.C.S., Chagas, A.C.S. 2021a. Ovine β-globin gene: A new qPCR for rapid haplotype identification and association with susceptibility to *Haemonchus contortus* infection. Vet. Parasitol. 294, 109434.

Penago, G.J., Mendo, O.H., Garduno, R.G., Hernandez, G.T., Chable, O.M.T., Simán, E.M.., 2021. Mean corpuscular haemoglobin concentration as haematological marker to detect changes in red blood cells in sheep infected with *Haemonchus contortus.* Vet. Res. Commun. 45, 189-197.

Pereira, F.C., Longo, C., Castilho, C., Leme, D.P., Seugling, J., Bassetto, C.C., Amarante, A.F.T., Bicarello, P.A., 2020. Peripartum Phenomenon in Crioula Lanada Sheep Susceptible and Resistant to Gastrointestinal Nematodes. Front. Vet. Sci. 7, 598.

Pieragostini, E., Alloggio, I., Petazzi, F., 2010. Insights into Hemoglobin Polymorphism and Related Functional Effects on Hematological Pattern in Mediterranean Cattle, Goat and Sheep. Diversity 2, 679-700.

Preston, J.M., Allonby, E.W., 1979. The influence of haemoglobin phenotype on the susceptibility of sheep to *Haemonchus contortus* infection in Kenya. Res. Vet. Sci. 26, 140-144.

Russel, A., 1984. Body condition scoring of sheep. In Pract. 6, 91–93.

Salgado, J.A., Santos, S.K., Biz, J.F.F., Carvalho, M.B., Rigo, F., Beirão, B.C.B., Amarante, A.F.T., Costa, L.B, Sotomaior, C.S., 2022. Salivary, serum, and abomasal mucus IgA as an immune correlate of protection against *Haemonchus contortus* infection in naturally infected lambs. Res. Vet. Sci. 144, 82-91.

Tremblay A., Canada S., Ransijn, J., Copenhagen U.O., 2020. _LMERConvenienceFunctions: Model Selection and Post-Hoc Analysis for (G)LMER

Models_. R package version 3.0, https://CRAN.R-project.org/package=LMERConvenienceFunctions

Urquhart, G.M., Jarrett, W.F., Jennings, F.W., McIntyre, W.I., Mulligan, W., Sharp, N.C., 1996. Immunity to *Haemonchus contortus* infection: Failure of X-irradiated larvae to immunize young lambs. Am. J. Vet. Res. 27, 1641-1643.

Van Wyk, J.A., Bath, G.F., 2002. The FAMACHA© system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. Vet. Res. 33, 509-529.

Van Wyk, J.A., Cabaret, J., Michael, L.M., 2004. Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. Vet. Parasitol. 119, 277-306.

Waller, P.J., 2006. From discovery to development: current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. Vet. Parasitol. 139, 1-14.

CAPÍTULO 3- Considerações finais

A investigação realizada neste estudo buscou explorar a relação entre os haplótipos da β-globina ovina e a resistência/resiliência à infecção por *Haemonchus contortus* em diferentes raças ovinas, uma vez que os estudos sobre esse tema são escassos. A seleção de ovinos resilientes como ferramenta de controle da hemoncose é de suma importância, considerando os desafios enfrentados pela ovinocultura e a problemática da resistência anti-helmintica.

Os resultados obtidos oferecem informações valiosos sobre a associação entre os haplótipos da β-globina e o volume globular de ovelhas e cordeiros infectados *por H. contortus*, visto que a redução do volume globular é a principal consequência da hemoncose. A identificação de indivíduos portadores do haplótipo Hb-AA pode ser fundamental para programas de melhoramento genético voltados à resistência/resiliência a *H. contortus*, contribuindo assim para a sustentabilidade e produtividade da ovinocultura.

A crescente preocupação com a resistência anti-helmíntica requer abordagens inovadoras e esse estudo desempenha um papel crucial ao representar uma possível ferramenta de suporte ao controle da hemoncose, reduzindo a dependência do uso de anti-helmínticos.

Mais estudos são necessários, porém, espera-se que este trabalho contribua para a promoção da saúde e bem-estar dos rebanhos ovinos e para o avanço do conhecimento científico na área da parasitologia veterinária.