

Padronização de co-cultivo *in vitro* de *Haemonchus contortus* com células abomasais ovinas

Alessandra da Silva Nucci^{1*}; Luciana Aparecida Giraldele¹; Isabella Barbosa dos Santos²;
Yousmel Alemán Gainza²; Simone Cristina Méo Niciura³

¹Aluna de graduação em Medicina Veterinária, Centro Universitário Central Paulista - UNICEP, São Carlos, SP. Bolsista PIBIC/CNPq, Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP;

*alenucci.medvet@gmail.com.

²Aluno de doutorado em Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

³Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP.

A criação de ovinos vem apresentando crescimento significativo, no entanto, a parasitose é um fator a ser tratado com atenção. Dentre os parasitas de pequenos ruminantes, destaca-se o nematoide *Haemonchus contortus*, que apresenta acentuada patogenia e alta prevalência. Aliado a isso, o aumento progressivo da resistência aos anti-helmínticos é um agravante para o seu controle. Para estudos da resistência anti-helmíntica e desenvolvimento de novos terapêuticos, tanto no que tange aos marcadores moleculares, quanto à necessidade de utilização contínua de parasitas viáveis, faz-se necessária a obtenção de elevada quantidade de parasitas. Assim, o cultivo *in vitro* apresenta-se como ferramenta alternativa para a disponibilização de parasitas para experimentação e de maneira a minimizar a utilização de ovinos hospedeiros doadores. Com isso em mente, buscamos desenvolver uma metodologia para cultivo *in vitro* de *H. contortus* até a fase adulta, a partir de amostras de ovos embrionados, larvas L1 e larvas L3 (infectantes), em co-cultivo com células abomasais ovinas. Para a recuperação de ovos embrionados, procedeu-se a lavagem das fezes em peneiras com malhas de tamanhos consecutivos; para a recuperação de larvas L1, foi realizada a manutenção dos ovos embrionados *overnight* a 27°C; e para a recuperação de larvas L3, foi realizada a coprocultura por 7 dias. A obtenção de células abomasais para cultivo foi feita por raspagem da mucosa interna do abomaso de ovinos recém abatidos e recuperação das células por centrifugação. Para o cultivo *in vitro*, as larvas L3 foram submetidas à remoção da cutícula e lavadas diversas vezes por centrifugação. Em seguida, 500 larvas L3 foram depositadas em garrafas de cultivo de 25 cm² contendo meio MEM com 10% de SFB, 1% de antibiótico-antimicótico e 2,5% de reagente de Fields, pH 6,4, e cultivadas a 38,5°C com atmosfera com 5% CO₂ em ar. A cada três dias, o desenvolvimento dos parasitas foi observado sob microscópio estereoscópico e 50% do meio de cultivo foi substituído por meio recém-preparado. Foi possível cultivar, com sucesso, *H. contortus* por 6 dias. Entretanto, após esse período, houve contaminação do cultivo levando à necessidade de adaptação dos protocolos experimentais. Em relação às células abomasais, também houve dificuldade no estabelecimento do cultivo celular devido à contaminação, mas uma amostra apresentou-se viável e foi criopreservada para posterior utilização. Os experimentos tiveram que ser interrompidos devido às medidas tomadas para enfrentamento da pandemia do COVID-19 e serão retomados após o início do trabalho presencial.

Apoio financeiro: PIBIC/CNPq (Processo no: 123034/2019-1); FAPESP (Processo no: 2019/02967-2)

Área: Ciências Agrárias

Palavras-chave: cultivo *in vitro*; nematoides gastrintestinais; pequenos ruminantes

Número Cadastro SisGen: A43C096