

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE CRIOPRESERVAÇÃO PARA
MANUTENÇÃO DE LINHAGEM DE *Haemonchus contortus*
EM LABORATÓRIO**

**Alan Jonathan Pereira Testi
Médico Veterinário**

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE CRIOPRESERVAÇÃO PARA
MANUTENÇÃO DE LINHAGEM DE *Haemonchus contortus*
EM LABORATÓRIO**

Alan Jonathan Pereira Testi

Orientador: Prof. Dr. Estevam Guilherme Lux Hoppe

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestrado em Medicina Veterinária, área de Medicina Veterinária Preventiva.

2015

T344a Testi, Alan Jonathan Pereira
Avaliação das técnicas de criopreservação para manutenção de linhagens de *Haemonchus contortus* em laboratório / Alan Jonathan Pereira Testi. -- Jaboticabal, 2015
xiii, 50 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientador: Estevam Guilherme Lux Hoppe
Banca examinadora: Adjair Antonio do Nascimento, Daniela Pedrassani
Bibliografia

1. *Haemonchus contortus*. 2. Criopreservação. 3. Crioprotetor. 4. Desembainhamento. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:576.85

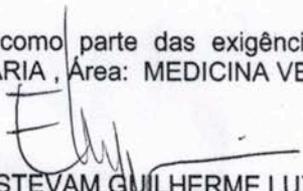
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

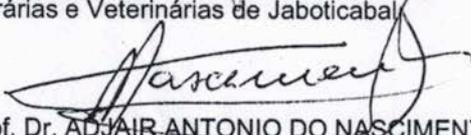
TÍTULO: AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE CRIOPRESERVAÇÃO PARA MANUTENÇÃO DE LINHAGEM DE *Haemonchus contortus* EM LABORATÓRIO

AUTOR: ALAN JONATHAN PEREIRA TESTI

ORIENTADOR: Prof. Dr. ESTEVAM GUILHERME LUX HOPPE

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. ESTEVAM GUILHERME LUX HOPPE
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. ADAIR ANTONIO DO NASCIMENTO
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. DANIELA PEDRASSANI
Universidade do Contestado / Canoinhas/SC

Data da realização: 09 de junho de 2015.

Universidade Estadual Paulista
Câmpus de Jaboticabal
Seção Técnica de Pós-Graduação
CONFERE COM O ORIGINAL

Jaboticabal, 09/06/2015


Mécia Lupiana Nataré dos Santos
Supervisor de Seção Técnica de Pós-Graduação

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ALAN JONATHAN PEREIRA TESTI – Nascido em 17 de outubro de 1986, no município de Ribeirão Preto, SP, filho de Gerson Testi e Rita Aparecida Pereira Testi. Ingressou em março de 2007 no curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista (UNESP), concluindo-o em fevereiro de 2012. Trabalhou na empresa BEA, bem estar animal, entre março e outubro de 2012. Ingressou no mestrado em Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da UNESP, Jaboticabal, SP, em março de 2013, obtendo o título em junho de 2015.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Estevam Guilherme Lux Hoppe**, por ter me aceito como seu aluno, por sua orientação, ensinamentos e pela dedicação a este trabalho.

A todos os funcionários e docentes do **Departamento de Medicina Veterinária Preventiva**.

Aos amigos **José Hairton Tebaldi** e **Hermes Ascari** pela dedicação e empenho reservados a este trabalho.

Aos membros das bancas, **Prof. Dr. Adjair Antônio do Nascimento**, **Profa. Daniela Pedrassani** e o **Prof. Marcos Rogério André**, por aceitarem meu convite, pela disponibilidade em analisar este trabalho e por todas as sugestões feitas.

A todos os amigos do **Laboratório de Doenças Parasitárias**, obrigado pelos bons momentos que compartilhamos nesses anos de trabalho.

À **minha família**, por sempre acreditarem em mim e pelo incentivo na persistência e busca de ideais.

Ao meu pai, **Gerson Testi**, espelho de homem correto, digno e responsável.

À minha mãe, **Rita Testi**, mulher guerreira, a qual dedica cada minuto da sua vida para o bem estar familiar.

Aos meus irmãos, **Andressa Testi** e **Anderson Testi**, pessoas imprescindíveis na minha vida, que de alguma forma me completam e me tornam um ser humano melhor.

À minha noiva, **Mariana Correa de Matos**, parceira de todas as horas, mulher admirável, de caráter ilibado e a grande responsável por mais essa conquista.

À minha segunda família, *Julio, Cláudia, Marina, Julinho, Kibe e Isa* por sempre estarem dispostos em contribuir com a minha vida pessoal e profissional ao longo dos anos.

À *Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo* pela bolsa e financiamento deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE FIGURAS	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	3
3. OBJETIVOS.....	8
3.1. Objetivo Geral.....	8
3.2. Objetivos Específicos.....	8
4. METODOLOGIA.....	9
4.1. Obtenção da Linhagem Pura de <i>Haemonchus contortus</i>	9
4.1.1. Animais.....	9
4.1.2. Linhagem de <i>Haemonchus contortus</i>	9
4.1.3. Infecção e Necropsia dos Animais.....	10
4.1.4. Oviposição in Vitro.....	10
4.2. Avaliação de Protocolos de Desembainhamento.....	11
4.2.1. Delineamento Experimental.....	11
4.2.2. Análise Estatística.....	12
4.3. Criopreservação.....	12
4.3.1. Desembainhamento.....	14
4.3.2. Banho de Etileno Glicol.....	15
4.3.3. Congelamento Ultrarrápido (vitrificação).....	17
4.3.4. Congelamento Lento.....	18
4.3.5. Descongelamento das Larvas.....	18
4.4. Viabilidade das Larvas Pós-Descongelamento.....	18
4.4.1. Análise Estatística.....	19
4.5. Avaliação da Manutenção da Infectividade das Larva.....	20
4.5.1. Animais.....	20
4.5.2. Infecção Experimental.....	20
4.5.3. Análise Estatística.....	21

4.6. Aspectos Éticos.....	21
5. RESULTADOS.....	22
5.1. Obtenção da Linhagem Pura de <i>Haemonchus contortus</i>	22
5.2. Avaliação dos Protocolos de Desembainhamento.....	26
5.3. Criopreservação.....	29
5.4. Desafio In Vivo.....	36
6.CONCLUSÃO.....	42
7. REFERÊNCIAS.....	43

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 013124/13 do trabalho de pesquisa intitulado "Avaliação de técnicas de criopreservação para manutenção de linhagem de *Haemonchus contortus* em laboratório", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Estevam Guilherme Lux Hoppe está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 02 de julho de 2013.

Jaboticabal, 02 de julho de 2013.

Andrigo Barboza De Nardi
Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi
Coordenador - CEUA

25/9/13
Ehup

AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE CRIOPRESERVAÇÃO PARA MANUTENÇÃO DE LINHAGEM DE *Haemonchus contortus* EM LABORATÓRIO

RESUMO – O *Haemonchus contortus* se destaca como a principal verminose dos ovinos. Esse mostra-se mais propenso ao desenvolvimento de resistência aos antihelmínticos, provavelmente, devido ao seu alto potencial biótico e a sua grande variabilidade genética. A criopreservação possibilita a manutenção de linhagens com características desejáveis por um longo período de tempo a um baixo custo, somado a uma redução drástica no número de animais mantidos em laboratórios. O presente estudo visou comparar diferentes técnicas de criopreservação, considerando os melhores resultados quanto à taxa de sobrevivência, motilidade e manutenção da infectividade de larvas L3 de *Haemonchus contortus*. A diferença entre cada técnica se deu através da alternância entre três etapas distintas, a manutenção ou remoção das bainhas das larvas L3 de *Haemonchus contortus* com Hipoclorito de Sódio, a utilização ou não de Etileno Glicol como crioprotetor e a velocidade de congelamento, lento ou ultrarrápido. O estudo identificou etapas estratégicas na criopreservação de larvas L3 de *Haemonchus contortus*, entre essas, a ausência de bainha e o congelamento lento se mostraram imprescindíveis para obtenção de alguma taxa de sobrevivência após o descongelamento. Já o uso do Etileno Glicol como crioprotetor não se mostrou imprescindível, entretanto, apresentou benefícios a técnica, elevando as taxas de sobrevivência e motilidade significativamente para um período maior de congelamento.

Palavras-chave: Crioprotetor, Desembainhamento, Etileno Glicol, Hipoclorito de Sódio, Larvas infectantes, Nematódeo

EVALUATION OF CRYOPRESERVATION TECHNIQUES FOR *Haemonchus contortus* LINEAGE MAINTENANCE IN LABORATORY

ABSTRACT – The *Haemonchus contortus* stands out as the main worms in sheep. This seems to be more likely to the development of resistance to antihelmintics, probably due to its high biotic potential and genetic variability. The cryopreservation allows lineage maintenance with desirable characteristics for a long period of time, added to a drastic decrease in the number of animals kept in laboratories. The present study aimed at comparing different cryopreservation techniques, considering the best results regarding survival rate, motility and infectivity maintenance of *Haemonchus contortus* L3 larvae. The difference between each technique occurred through the alternation between three distinct stages, the conservation or removal of the sheaths of *Haemonchus contortus* L3 larvae with Sodium Hypochlorite, the use or not of Ethylene Glycol as a cryoprotector and the freezing speed, slow or ultrafast. The study identified strategic stages on the cryopreservation of *Haemonchus contortus* L3 larvae, among these, the absence of sheath and slow freezing proved to be essential for obtaining any survival rate after the defrosting. Instead, the use of Ethylene Glycol as cryoprotector was not indispensable, however presented technical benefits, significantly increasing the survival rates and motility for a longer period of freezing.

Key-words: Cryoprotectant, Exsheathed, Ethylene Glycol, Sodium Hypochlorite, Infective larvae, Nematode

LISTA DE TABELAS

	Página
<p>Tabela 1. Médias \pm desvio padrão para os tempos experimentais, em minutos, do teste de desembainhamento. (As letras a, b, c e d, indicam as diferenças estatísticas dos tempos de desembainhamento entre as colunas para as diferentes concentrações.) (Os números 1, 2 e 3, indicam as diferenças estatísticas dos tempos de desembainhamento entre as linhas para mesma concentração.).....</p>	27
<p>Tabela 2. Taxa de sobrevivência dos grupos para o tempo de duas horas aos dois meses pós-congelamento</p>	30
<p>Tabela 3. Análise estatística da viabilidade pós-descongelamento pelo teste T não-paramétrico para os tempos experimentais de 2, 4 e 6 horas aos quatro meses de congelamento.....</p>	33
<p>Tabela 4. Taxa de sobrevivência das amostras do grupo 8 (larvas desembainhadas + congelamento lento) pós-descongelamento.....</p>	36
<p>Tabela 5. Taxa de sobrevivência das amostras do grupo 7 (larvas desembainhadas + crioprotetor + congelamento lento) pós-descongelamento.....</p>	37
<p>Tabela 6. Média de larvas viáveis utilizadas no teste in vivo.....</p>	37

LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>Figura 1. Fluxograma do delineamento experimental para avaliação das técnicas de criopreservação para larvas L3 de <i>Haemonchus contortus</i>.....</p>	13
<p>Figura 2. Materiais para o congelamento das larvas L3 de <i>Haemonchus contortus</i>. (A) Criotubos. (B) Haste de inox para fixação dos criotubos no gargalo do botijão de nitrogênio líquido (-45°C) (congelamento lento). (C e D) Caneca para armazenamento dos criotubos no interior do botijão de nitrogênio líquido (-196°C).....</p>	14
<p>Figura 3. Fluxograma da criopreservação com o uso do crioprotetor Etileno Glicol</p>	16
<p>Figura 4. Etapas do pré-congelamento. (A) Equilíbrio osmótico em estufa D.B.O (Etileno Glicol 10%). (B e C) Centrifugação das amostras. (D) Sobrenadante mais precipitado constituído por larvas</p>	17
<p>Figura 5. Abomaso isolado dos animais necropsiados. (A) Abomaso íntegro. (B e C) Presença de espécimes de <i>Haemonchus contortus</i> no conteúdo gástrico. (D e E) Presença de <i>Haemonchus contortus</i> aderidos à mucosa gástrica</p>	23
<p>Figura 6. Oviposição in vitro em estufa B.O.D. (A e D) Placas de Petri com fêmeas para oviposição. (B e C) Estufa B.O.D em funcionamento a 37°C</p>	24

Figura 7. Oviposição em placas de Petri. (A e B) Presença de ovos e larvas em estágio L1 em placas de Petri vistas em microscópio estereoscópico	25
Figura 8. Coprocultura. (A, B e C) presença de grande quantidade de larvas na parede dos recipientes utilizado para coprocultura ..	25
Figura 9. Inoculação dos doadores. (A e B) Inoculação de 5.000 larvas em cada doador por via oral com auxílio de uma pistola dosadora.....	26
Figura 10. Demonstração no fluxograma dos grupos viáveis após dois meses de congelamento	30
Figura 11. Taxas de sobrevivência do grupo 7 (larvas desembalhadas + crioprotetor + congelamento lento) para os tempos de duas, quatro e seis horas pós-descongelamento, nos períodos de dois, três e quatro meses	32
Figura 12. Taxas de sobrevivência do grupo 8 (larvas desembalhadas + congelamento lento) para os tempos de duas, quatro e seis horas pós-descongelamento, nos períodos de dois, três e quatro meses	33
Figura 13. Classificação do grau de motilidade do grupo 7 (larvas desembalhadas + crioprotetor + congelamento lento) em alto, médio e baixo, para os períodos de dois, três e quatro meses após o congelamento	35

Figura 14. Classificação do grau de motilidade do grupo 8 (larvas desembainhadas + congelamento lento) em alto, médio e baixo, para os períodos de dois, três e quatro meses após o congelamento.....	35
Figura 15. Média dos valores de OPG para cada um dos grupos (H+, H+/C+ e controle) durante o período de infecção experimental	38
Figura 16. Contagem absoluta de helmintos adultos obtidos dos animais do grupo H+/C+ (larvas desembainhadas + crioprotetor + congelamento lento), pós-necropsia	39
Figura 17. Contagem absoluta de helmintos adultos obtidos dos animais do grupo H+ (larvas desembainhadas + congelamento lento), pós-necropsia	39
Figura 18. Contagem absoluta de helmintos adultos obtidos dos animais do grupo controle (larvas frescas), pós-necropsia	40
Figura 19. Porcentagem de vermes adultos recuperados para cada grupo experimentalmente infectado.....	41

1. INTRODUÇÃO

As ovelhas (*Ovis aries*), juntamente com as cabras (*Capra hircus*), foram as primeiras espécies a serem domesticadas (CHESSA et al., 2009). Com o passar do tempo, esses pequenos ruminantes da família dos bóvidos, ganharam papel de destaque na atividade econômica nacional e mundial, principalmente a ovinocultura, onde os maiores rebanhos se encontram na China, Austrália, Índia, Irã, Sudão e Nova Zelândia (FAO, 2007).

O crescimento comercial da ovinocultura sofre com as dificuldades em se controlar os efeitos do parasitismo por nematódeos gastrintestinais, em especial, em países como o Brasil, com clima muito favorável ao desenvolvimento e manutenção desses patógenos (LUX HOPPE; TESTI, 2012). Dentre esses parasitas, o nematódeo *Haemonchus contortus*, distribuído por todo Brasil, se destaca como a principal verminose dos ovinos, resultando em progressiva perda de peso, anemia, hipoproteinemia, entre outras complicações (LUX HOPPE; TESTI, 2012). Esse ainda se destaca como o principal responsável pelo rápido desenvolvimento de resistência aos antihelmínticos nos pequenos ruminantes (SANGSTER, 2001), especialmente, quando o controle químico se faz como o principal recurso empregado pelos produtores, o que leva a uma seleção de linhagens resistentes e consequente entrave ao controle efetivo desse parasita (AMARANTE, 2014).

A criopreservação surge como uma alternativa para a manutenção de linhagens de helmintos com características interessantes, como a resistência ou sensibilidade a determinados fármacos, em adição a uma menor dependência no uso de animais doadores (GILL & REDWIN, 1995). O alto custo de manutenção de um animal doador, estimado em cerca de US\$1200,00 ao ano (CHAGAS et al., 2013), enfatiza a necessidade de desenvolvimento de técnicas de criopreservação mais eficientes. Somado aos benefícios já citados, a criopreservação ainda pode ser útil para manutenção de linhagens de helmintos provenientes de animais selvagens de vida livre.

Atualmente, a ineficácia das técnicas de criopreservação é exemplificada por baixas taxas de viabilidade pós-descongelamento como, por exemplo, o do

nematódeo tricostrongilídeo *Nematodirus*, com viabilidade entre 2,4 e 12%, do oncocercídeo *Brugia*, com viabilidade de 22%, e do trematódeo *Schistosoma mansoni*, que não sobrevive ao referido processo (JAMES, 2004). Com isso, a manutenção de linhagens de helmintos em animais doadores ainda se faz necessária.

Esse processo de manutenção em animais é caro e trabalhoso, além de exigir uma infraestrutura adequada para que sejam atendidas as necessidades mínimas de bem-estar animal (CAMPBELL; THOMSON, 1973; VAN WYK et al., 1977; COLES et al., 1980).

Algumas técnicas de criopreservação já foram descritas (ECKERT, 1988; MULLER, 1991; SMITH, 2002). No entanto, a maioria dessas técnicas é demorada e exige um grande número de larvas, de modo que se possa recuperar um número razoável de parasitas vivos e úteis após o descongelamento. Além disso, a infectividade dos parasitas sobreviventes é geralmente muito baixa após o descongelamento (ECKERT, 1988; MULLER et al., 1991).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Alguns organismos endêmicos de ecossistemas extremos podem apresentar mecanismos ímpares de sobrevivência. Em áreas de temperaturas baixas, algumas espécies desenvolveram mecanismos que resultam em suspensão de suas atividades metabólicas, retomando o funcionamento normal do organismo quando as condições do ambiente voltam a um estado favorável (CROWE, 1971).

São numerosos os relatos de habilidades inerentes a algumas espécies em se manterem vivas após o congelamento. DANKS (1978) e STOREY (1983) já descreviam casos de insetos terrestres capazes desse feito. ANDERSON et al. (1970) também relatou a sobrevivência de larvas de terceiro estágio de *Trichostrongylus colubriformis* a temperaturas abaixo de 0° C em condições naturais. Esses estudos reforçaram os relatos de Werterjuk (1959), que descreve a sobrevivência de larvas dessa espécie, em condições naturais, a temperaturas de -28°C. Essas alegações não ficaram restritas a artrópodes e helmintos, também sendo descritas em alguns anfíbios. Rãs das espécies *Rana sylvatica* e *Hyla versicolor* apresentam tolerância natural ao congelamento como estratégia de sobrevivência ao inverno (KENNETH; JANET, 1984).

A repetição dessa característica em condições controladas de laboratório representa uma excelente alternativa para a preservação de espécies com características desejáveis, como resistência ou sensibilidade a quimioterápicos, diferentes graus de patogenicidade, além de outros materiais biológicos (HUBALEK, 2003).

Algumas dessas características, como a sensibilidade às ivermectinas de baixa concentração (1%), são cada vez mais raras de serem encontradas em nematódeos de vida livre, principalmente em *Haemonchus contortus*, por serem esses mais propensos a desenvolverem resistência, provavelmente, devido ao seu alto potencial biótico (ECHEVARRIA & TRINDADE, 1989) e a sua grande variabilidade genética (BLACKHALL et al., 1998). Somados a alta frequência de tratamentos e de sub-doses de anti-helmínticos (KUMSA, 2009).

A criopreservação ainda contribui para os estudos taxonômicos, uma vez que é capaz de preservar estruturas anatômicas sem o uso de fixadores, em

especial os derivados do formaldeído, os quais, além de serem tóxicos, provocam alterações morfológicas e moleculares (BERALDO; CODOLO, 2014).

Adicionalmente, a eficiência da criopreservação de parasitas em um ponto conveniente do seu ciclo pode contribuir consideravelmente para redução do uso de animais em experimentação, hoje, fundamentais para manutenção de larvas em laboratório. Dessa forma, seria possível estabelecer uma coleção helmintológica viva, sem o uso de animais, como material de referência para diferentes centros de pesquisas (ECKERT, 1987a,b).

A redução do número de animais, por si só, já seria suficiente para justificar maiores investimentos em pesquisas voltadas para a busca de uma maior eficiência no processo de criopreservação. A manutenção de animais, em especial de ruminantes domésticos, é muito exigente quanto à mão-de-obra e instalações (GILL; REDWIN, 1995 e CHAGAS et al., 2013). No entanto, não são somente os custos e o bem-estar animal que dificultam o uso de animais na manutenção de linhagens. Algumas características fenotípicas dos nematódeos podem ser perdidas ao longo do tempo, diferentemente do que acontece na criopreservação, a qual mantém o estado biológico do parasita praticamente inalterado (VAN WYK et al., 2000)

A criobiologia já percorreu um longo caminho desde que Henry Power relatou, em 1664, que espécimes de *Turbatrix acetii*, um nematódeo de vida livre frequentemente associado ao vinagre, congelados devido à exposição a uma geada durante a noite “dançaram e brincaram animados como sempre” após o descongelamento (KEILIN, 1959).

WHARTON (1986) descreve que a capacidade de resistência às baixas temperaturas está intimamente ligada a baixas concentrações de água nos parasitas. Essa observação orientou as pesquisas posteriores, que buscaram empregar técnicas que fazem uso de etapas e substâncias que diminuem a concentração de água intracelular, evitando assim a formação de cristais de gelo. Estes cristais são os grandes responsáveis pela alta mortalidade das larvas verificadas após o descongelamento, ocasionando lesões celulares deletérias (HUBERT et al., 1997). A taxa de viabilidade das larvas é inversa à concentração de água intracelular presente (SMITH, 1990).

Adicionalmente à quantidade de água intracelular, outros fatores como tamanho das células, a forma e o estágio de desenvolvimento larval, a composição do meio de manutenção dos espécimes, a temperatura e a velocidade de congelamento, o período de estocagem e a velocidade de descongelamento também são importantes para o sucesso do procedimento de criopreservação (HUBÁLEK, 2003).

Com o passar do tempo, alguns fatores despontaram-se dentre as técnicas como pontos estratégicos para se alcançar altas taxas de sobrevivência após o descongelamento. Dentre eles, a escolha de larvas de terceiro estágio (L3) para a criopreservação de nematódeos foi um importante passo, uma vez que estas mostraram maior resistência ao processo quando comparadas a outros estágios pré-parasitários (WHARTON et al., 1989). O desembainhamento larval, relatado primeiramente por Campbell et al. (1972), o qual se mostrou fundamental para sobrevivência da maioria das larvas de nematódeos avaliados. E posteriormente demonstrado por Hubert (1996), onde as diferentes espécies de nematódeos, *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Teladorsagia circumcincta* e *Cooperia curticei*, apresentaram 100% de mortalidade quando tiveram suas bainhas preservadas, independentemente da velocidade do congelamento a qual foram expostas.

Os crioprotetores, os quais segundo Hubalek (2003) marcaram o início da modernização das técnicas de criopreservação. Esses variam entre dois grandes grupos, os crioprotetores que agem a nível intracelular, alcoóis (Etileno Glicol, Glicerol, DMSO) e amidas (Acetamida, Lactamida), e os que agem de forma extracelular ou não penetrante, representados por macromoléculas (Glicose, Sacarose, aminoácidos), que atuam por meio de efeito osmótico. Independentemente do grupo, esses devem ser altamente hidrofílicos, o que é decorrente da presença de grupos químicos que se ligam fortemente com as moléculas de água (HUBÁLEK, 2003). Por fim, destaca-se a velocidade de congelamento, a qual influencia de forma distinta as taxas de sobrevivência das diferentes espécies de helmintos e seus estágios de desenvolvimento (JAMES, 2004). Como exemplo dessa variação, citam-se a *Onchocerca spp* e as larvas L3 de *Brugia spp*, com uma viabilidade de 78% após o congelamento ultrarrápido

(vitrificação). Por outro lado, são encontradas taxas totalmente opostas quando olha-se para microfilárias de *Brugia spp* e larvas L3 de *H. contortus*, as quais apenas responderam ao congelamento lento, alcançando índices de 79% de viabilidade.

A partir desse momento, diversas espécies de nematódeos de bovinos, ovinos, cães entre outras espécies, foram congelados e descongelados com relativo sucesso, com boa manutenção da infectividade (CAMPBELL & THOMSON, 1973; CAMPBELL, BLAIR & EGERTON, 1973; KELLY, CAMPBELL & WHITLOCK, 1976; VAN WYK, GERBER & VAN AARDT, 1977).

O entendimento parcial dos fatores supra citados trouxeram benefícios consideráveis a eficiência do processo de criopreservação. Como exemplo, a viabilidade próxima a 100% alcançada pelas larvas de *T. colubriformis* após descongelamento (CONDER, 1996). Como outros exemplos, SMITH (1990) relatou que o uso de crioprotetores elevou a sobrevivência e motilidade de alguns parasitas a índices próximos de 80%, após o descongelamento. E por fim, resultados que mostram o quanto a identificação da velocidade ideal de congelamento para o organismo em estudo contribui com a eficiência da técnica de criopreservação. Esse fato fica claro com a variação da viabilidade das larvas com a mudança da velocidade de congelamento, *Brugia spp.* 23% (lento), 78% (ultrarrápido); *Nematodirus spp.* 12% (lento), 31% (ultrarrápido) (JAMES, 2004); *Trichostrongylus colubriformis* 89% (lento), 2% (ultrarrápido); *Cooperia curticei* 84% (lento), 3,5% (ultrarrápido) (HUBERT et al., 1997).

No geral, ainda não há um consenso sobre o procedimento mais adequado para criopreservação de larvas de nematódeos parasitas, visto que as técnicas atuais ainda apresentam inúmeras etapas distintas, como o uso de diferentes crioprotetores, com destaque para a amida, Dimetilformamida, e para os álcoois, Glicerol e Etileno Glicol. Destacam-se ainda as diferentes formas para remoção das bainhas, desde o uso de hipoclorito até a remoção com CO₂, além dos diferentes modos de se chegar ao congelamento, como através de um ultra freezer (-86^oC), com ou sem pré-refrigeração, ou simplesmente uma imersão direta em nitrogênio líquido à -196^oC.

Os resultados encontrados ainda carecem de informações quantitativas e qualitativas a respeito da sobrevivência das larvas de uma forma geral, além da

questão das taxas de sobrevivência no pós-descongelamento variarem de baixa a moderada para a maioria das espécies de nematódeos (JAMES, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente estudo buscou definir metodologia de criopreservação de larvas infectivas de nematódeos parasitas, utilizando-se *Haemonchus contortus* como modelo.

3.2 Objetivos Específicos

- 3.2.1 Obter uma linhagem pura de *Haemonchus contortus*.
- 3.2.2 Avaliar os diferentes protocolos de desembainhamento das larvas de terceiro estágio, levando-se em consideração a concentração de hipoclorito de sódio (NaClO) e o tempo de exposição a esse reagente.
- 3.2.3 Inocular em ovinos, para avaliação da manutenção da infectividade, os grupos considerados mais viáveis em relação as taxas de sobrevivência e motilidade, após o descongelamento.

Considerando o exposto, o presente estudo visa descrever uma técnica de criopreservação de helmintos de simples execução, com garantia de boas taxas de sobrevivência e motilidade das larvas, manutenção de infectividade e baixo custo.

4. METODOLOGIA

4.1. Obtenção de Linhagem Pura de *H. contortus*

4.1.1. Animais

Para esta etapa do trabalho foram utilizados seis ovinos jovens, clinicamente saudáveis, de raças mestiças, machos e fêmeas, com idade inferior a um ano.

Previamente ao início dos procedimentos experimentais, estes foram tratados com anti-helmínticos comerciais à base de monepantel, sulfóxido de albendazol, levamisol e triclorfón para eliminação de infecção parasitária pré-existente, com confirmação da eliminação de infecção por exames coproparasitológicos, contagem de ovos por grama de fezes, em dias alternados.

Durante todo o procedimento, os animais foram mantidos aos pares em gaiolas suspensas, com alimentação composta por silagem de milho adicionada de ração comercial para cordeiros, além de água potável à vontade.

Estes animais foram divididos em dois grupos: quatro animais amplificadores, nos quais foi feita a amplificação da cultura de larva mista de campo e dois animais doadores, infectados já com a linhagem pura.

4.1.2. Linhagem de *H. contortus*

Foi utilizado, para o presente estudo, uma linhagem obtida de uma propriedade de ovinos de Rio Verde, Goiás. Essa linhagem apresenta sensibilidade superior a 80% a lactonas macrocíclicas de baixa concentração (1%), conforme

comprovado em estudos prévios realizados pelo Setor de Enfermidades Parasitárias dos Animais, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, FCAV/Unesp.

As L3 que foram utilizadas para obtenção da cultura pura de *H. contortus*, foram extraídas de acordo com a técnica de Roberts & O'Sullivan (UENO & GONÇALVES, 1998), a partir do material fecal de ovinos localizado em Rio Verde, Goiás, e armazenadas em geladeira a temperatura de 4°C, até a inoculação nos doadores.

4.1.3. Infecção e Necropsia dos Animais

Inóculos com aproximadamente 5.000 larvas foram administradas aos animais doadores por via oral, como preconizado por Wood et al. (1995), com auxílio de pistola dosadora. Uma semana após o estabelecimento do período patente, constatado por meio de exames coproparasitológicos, contagem de ovos por grama, os animais foram abatidos seguindo-se os métodos preconizados pela AVMA (2007) e necropsiados logo em seguida. O abomaso de cada animal foi isolado, removido e aberto em bandeja. Os nematódeos adultos foram removidos manualmente do conteúdo abomasal e colocados em placas de Petri com solução salina para processamento posterior.

4.1.4. Oviposição *In Vitro*

As placas contendo os parasitas foram examinadas em microscópio estereoscópico. As fêmeas adultas de maior motilidade e tamanho foram selecionadas e depositadas em nova placa de Petri com solução salina fisiológica. As placas, cada uma com 100 fêmeas, foram mantidas, por oito horas em estufa B.O.D a 37°C com umidade superior a 80%, para oviposição.

Após esse período, as placas foram lavadas com água destilada, reunindo todos os ovos em um único béquer. Os ovos, suspensos em água destilada, foram concentrados e misturados com fezes de equinos livres de parasitas. As larvas infectantes (L3) foram obtidas a partir dessas culturas fecais de acordo com a técnica de Roberts & O'Sullivan (UENO & GONÇALVES, 1998).

4.2. Avaliação de Protocolos de Desembainhamento

4.2.1. Delineamento Experimental

As larvas necessárias para essa etapa foram obtidas por meio de coprocultura, onde as amostras de fezes foram colhidas ao longo de um período de oito horas dos animais doadores.

Para análise dos diferentes protocolos de desembainhamento das larvas de terceiro estágio, foi levado em consideração a relação entre a concentração de hipoclorito de sódio (NaClO) e o tempo de exposição a esse reagente.

Foram avaliados quatro diferentes protocolos, nos quais a concentração de hipoclorito de sódio variou entre 50ppm, 100ppm, 200ppm e 500ppm.

Para cada uma das concentrações foram feitas 10 repetições, cada qual era constituída de uma gota de 20 μ l da mistura com uma média de 50 larvas. Essa foi então acompanhada no microscópio ininterruptamente, para que assim, fosse determinado em minutos, os tempos experimentais T1(início de desembainhamento), T2 (90% de desembainhamento) e T3 (100% de desembainhamento), para as diferentes concentrações de hipoclorito de sódio.

4.2.2. Análise Estatística

A homogeneidade da contagem de larvas em cada gota foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov a 5%. Posteriormente, as médias em minutos para cada um dos tempos experimentais (T1, T2 e T3) foram comparadas pelo teste de ANOVA com Tukey posterior, após constatação de homocedasticidade dos valores.

4.3. Criopreservação

Cada um dos grupos criopreservados (n=8) foi composto de 15 amostras com cerca de 5.000 L3 de *H. contortus* em cada. Essas foram submetidas a diferentes protocolos de criopreservação, com exceção do grupo controle, formado por larvas frescas (Figura 1). Esse foi usado como parâmetro para a comparabilidade da infectividade entre as larvas criopreservadas e as frescas.

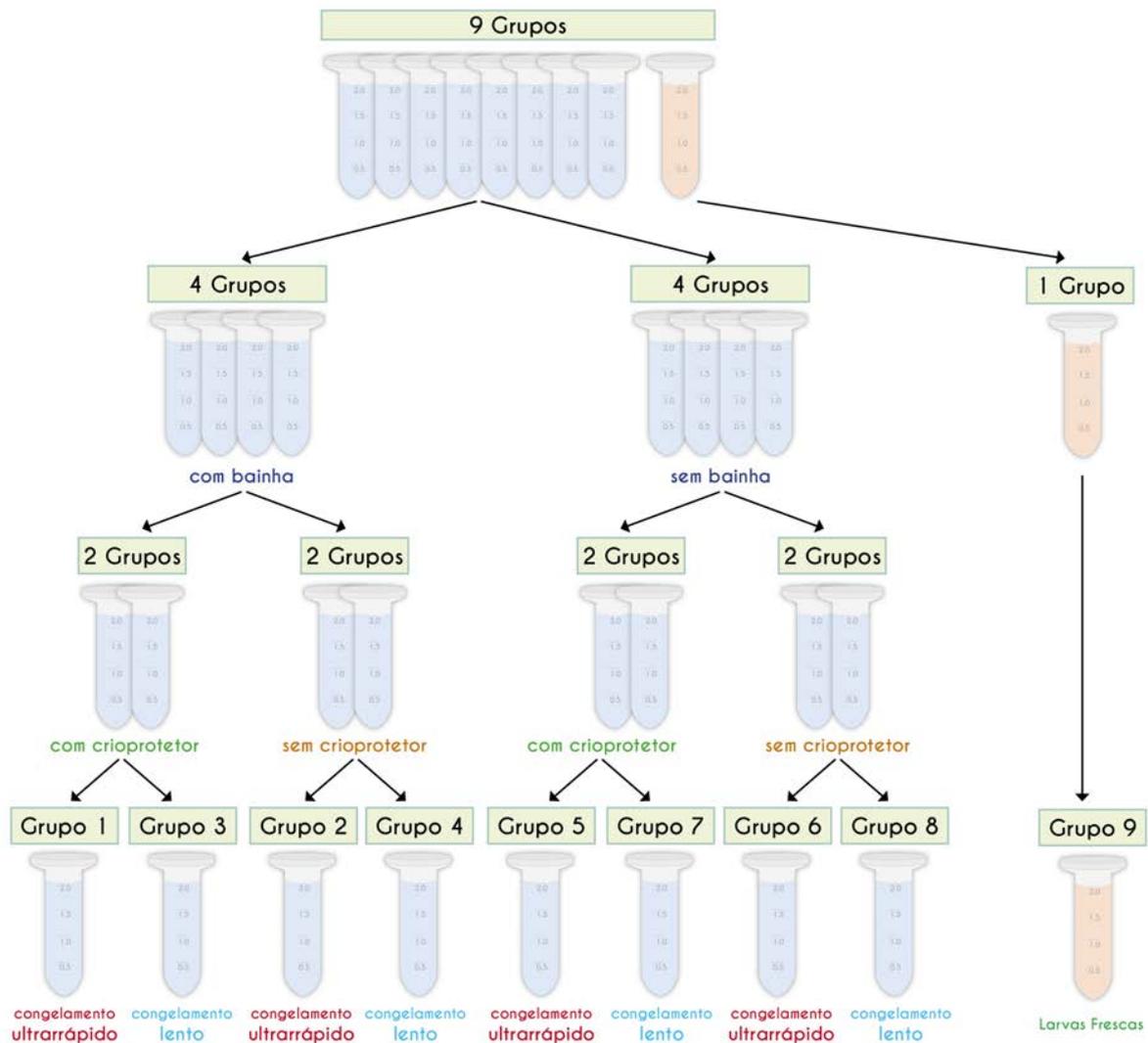


Figura 1. Fluxograma do delineamento experimental para avaliação das técnicas de criopreservação para larvas L3 de *Haemonchus contortus*.

Nessa etapa foram congelados oito dos nove grupos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8), com 15 amostras (criotubos) por grupo. Cada criotubo apresentava um volume de 2mL, o qual foi preenchido com 0,2mL de uma solução contendo 5.000 larvas e 1,8mL de PBS (137mM NaCl; 10mM fosfato; 2,7mM KCl; pH 7,4) (Figura 2A).

As soluções contendo L3 de *H. contortus* utilizadas para cada grupo distinguiam-se entre si. Essas diferenças se mostraram pela combinação de fatores como a presença ou ausência da bainha protetora nas larvas, o uso ou não do etileno glicol como crioprotetor, e por fim, a velocidade com que os grupos foram levados a atingir a temperatura de -196°C .

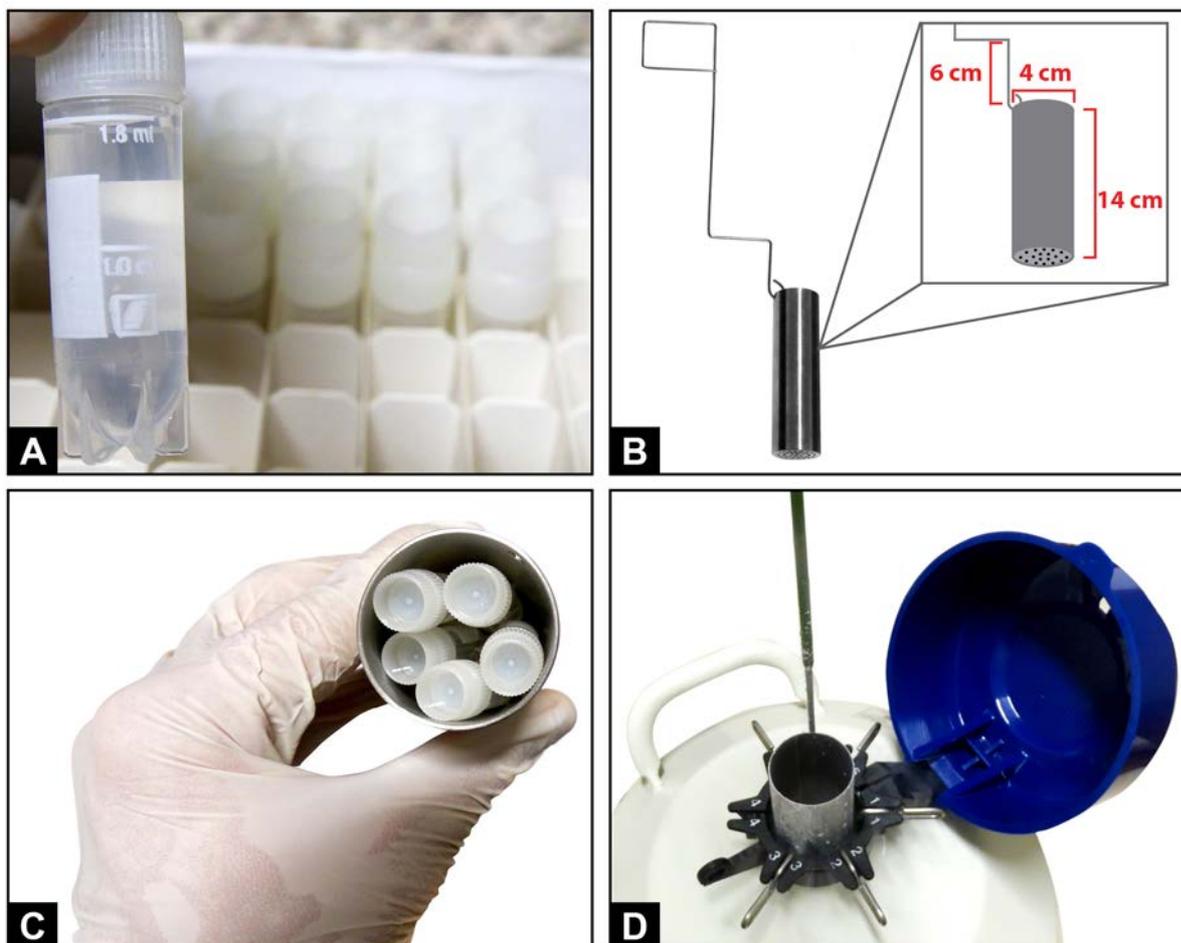


Figura 2. Materiais para o congelamento das larvas L3 de *Haemonchus contortus*. (A) Criotubos. (B) Haste de inox para fixação dos criotubos no gargalo do botijão de nitrogênio líquido (-45°C) (congelamento lento). (C e D) Caneca para armazenamento dos criotubos no interior do botijão de nitrogênio líquido (-196°C).

4.3.1. Desembainhamento

Os grupos 5, 6, 7, 8, os quais passaram pela etapa de remoção da bainha, foram submetidos a um banho de hipoclorito de sódio a 0,02% (200ppm). Tal concentração foi alcançada a partir de uma solução de 2% de hipoclorito de sódio (0,2mL NaClO + 9,8mL H₂O + 10mL da cultura).

Após adição de hipoclorito de sódio, na diluição supracitada, às suspensões de larvas, alíquotas de 20 μL dessas suspensões foram avaliadas em microscópio de

luz, com aumento de 20 vezes para acompanhamento da evolução do desembainhamento.

Como medida para frear essa exposição ao hipoclorito, após 90% das larvas terem perdido sua bainha, a mistura contendo larvas foi dividida em tubos cônicos e lavada sob centrifugação (1500rpm por três minutos), retirando-se o sobrenadante e adicionando PBS (137mM NaCl; 10mM fosfato; 2,7mM KCl; pH 7,4) após cada lavagem. Esse processo foi repetido por três vezes na tentativa de eliminar qualquer resíduo de hipoclorito de sódio.

4.3.2. Banho de Etileno Glicol

Quatro grupos (1, 3, 5, 7), totalizando 60 amostras, foram submetidos a um banho de Etileno Glicol (Figura 3). Essa substância é responsável, primeiramente, pela manutenção de um equilíbrio osmótico, quando utilizado na concentração de 10%, (1mL $C_2H_6O_2$ + 3mL H_2O + 6mL de cultura) a $37^{\circ}C$ em estufa B.O.D (Figura 4A), e posteriormente, responsável por uma desidratação. Essa segunda fase inicia-se com a adição de 6mL $C_2H_6O_2$ + 4mL de H_2O à mistura, transformando-a em uma solução a 35% de Etileno Glicol, e em seguida, levada ao freezer ($-5^{\circ}C$) por 45 minutos, o que resulta em um menor armazenamento de água intracelular. As concentrações utilizadas nessa etapa foram obtidas a partir de uma solução 100% de Etileno Glicol.

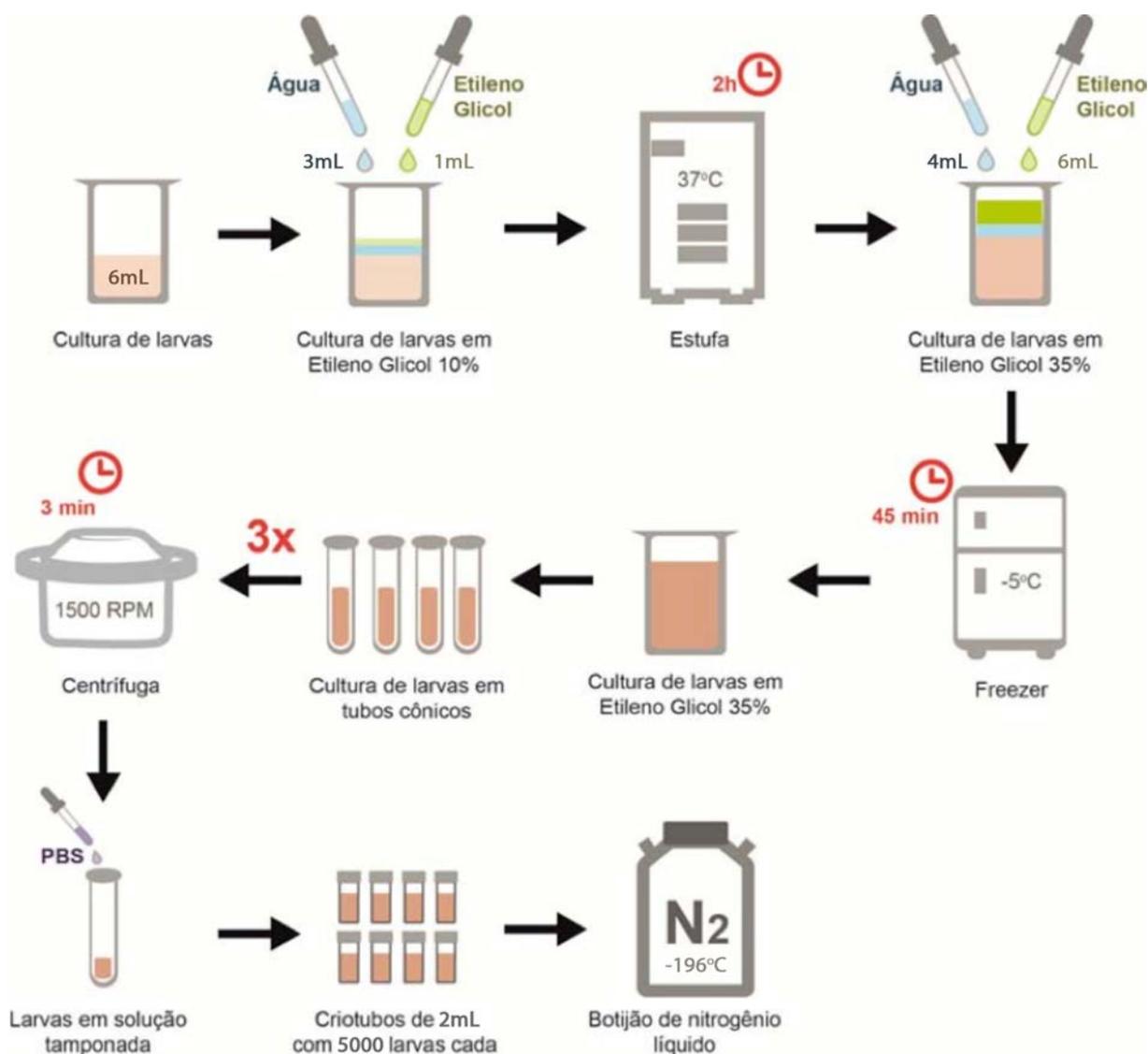


Figura 3. Fluxograma da criopreservação com o uso do crioprotetor Etileno Glicol

O volume resultante das etapas anteriores foi dividido em quatro tubos cônicos de 15mL e centrifugados a 1500rpm por três minutos (Figura 4B e 4C). O sobrenadante foi removido, evitando a dissolução das larvas precipitadas, e adicionado solução salina tamponada (Figura 4D). Esse processo se repetiu por três vezes consecutivas.

Após a lavagem em centrifugação o volume total foi reduzido e armazenado em criotubos de 2mL, como aproximadamente 5.000 larvas por tubo.

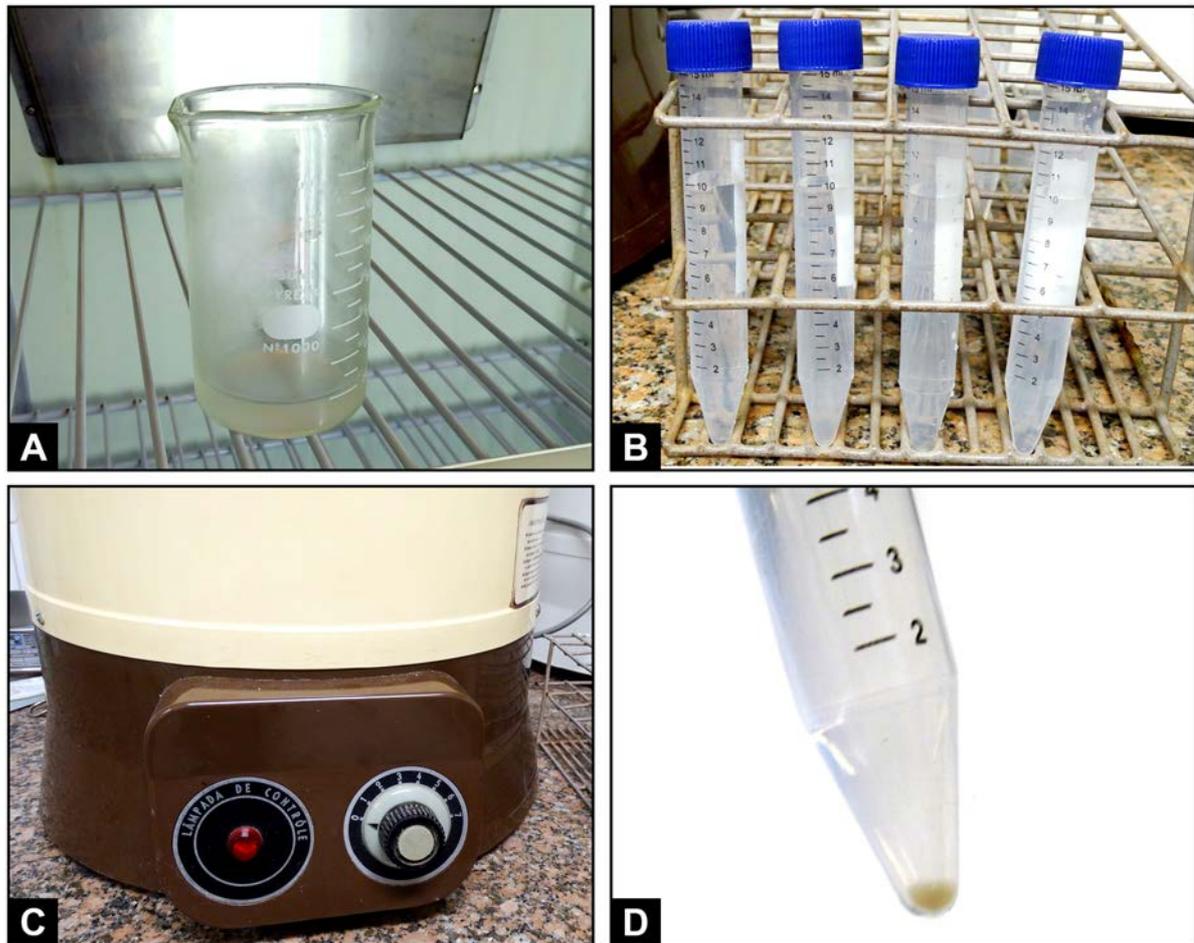


Figura 4. Etapas do pré-congelamento. (A) Equilíbrio osmótico em estufa D.B.O (Etileno Glicol 10%). (B e C) Centrifugação das amostras. (D) Sobrenadante mais precipitado constituído por larvas.

4.3.3. Congelamento Ultrarrápido (Vitrificação)

No congelamento ultrarrápido os criotubos pertencentes aos grupos 1, 2, 5 e 6 foram imersos diretamente no nitrogênio líquido, estando esses fixados em bastões de alumínio (Figuras 2C e 2D). O decaimento da temperatura nesse caso acontece com uma velocidade de cerca de 5.100°C por minuto (JAMES, 1985), permanecendo os criotubos conservados a -196°C dentro do botijão de nitrogênio líquido.

4.3.4. Congelamento Lento

Nessa etapa, os grupos 3, 4, 7 e 8 foram submetidos à refrigeração em geladeira (4^oC), a partir da temperatura ambiente, até que se atingisse 4^oC (± quatro horas). Então foram retirados do refrigerador e resfriados durante 2 horas e meia, presos no gargalo do recipiente contendo nitrogênio líquido utilizando-se de uma haste moldada de aço inoxidado elaborado para o experimento (Figura 2B). A taxa de arrefecimento da fase gasosa é 1^oC por minuto segundo Smith et al. (1990). Depois os grupos foram colocados em bastões de alumínio e imersos no nitrogênio líquido para conservação (Figura 2C e 2D).

4.3.5. Descongelamento das Larvas

As amostras foram descongeladas com dois (18/07/2014), três (18/08/2014) e quatro meses (18/09/2014) após a data de congelamento (18/05/2014).

Os criotubos foram primeiramente transferidos para uma estufa B.O.D por 20 minutos a 30 °C. Posteriormente, para que se concluísse o descongelamento, essa temperatura foi reduzida para 20^oC e as larvas mantidas por mais 1h e 40min, totalizando um tempo de no mínimo duas horas dentro da B.O.D., para só assim, serem submetidas às análises de viabilidade, sobrevida e motilidade.

4.4. Viabilidade das Larvas Pós-Descongelamento

A viabilidade da criopreservação dos grupos foi realizada primeiramente através da taxa de sobrevida das larvas após o descongelamento. Essa avaliação foi obtida através da leitura de uma fração, 40µL, da suspensão homogeneizada de larvas presentes nos microtubos, após 2h do descongelamento. Com a confirmação

de alguma taxa de sobrevivência na amostra, uma fração dessa era coletada e destinada à placa de Petri para leitura. Cada leitura foi feita com seis repetições de 40µl, buscando uma média de 100 larvas por repetição, para os tempos de duas, quatro e seis horas após o descongelamento.

Essa avaliação foi realizada em microscópio estereoscópico, onde foram efetuadas as análises quantitativa e qualitativa. Essa segunda, relacionada com características morfológicas e com a motilidade larval, a qual é classificada em alta, tendo como base larvas recém extraídas, média e baixa, ao ser observada comparativamente. Diferença fácil de ser notada diante do microscópio estereoscópico.

4.4.1. Análise Estatística

As amostras foram classificadas primeiramente em relação à sobrevivência, de acordo com sua mobilidade, para os tempos de duas, quatro e seis horas pós-descongelamento.

Na última análise efetuada na amostra, que ocorreu seis horas pós-descongelamento, foi realizado além da avaliação quantitativa de sobrevivência, uma análise qualitativa em relação à motilidade larval, como já citado anteriormente.

Os valores, previamente à análise estatística, foram avaliados quanto à normalidade de distribuição pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A distribuição não-normal dos dados relativos ao 18/jul (dois meses) orientou a comparação das médias de larvas viáveis entre os grupos e tempos amostrais pelo teste não-paramétrico Mann-Whitney.

Os demais dias, 18 de agosto (três meses) e 18 de setembro (quatro meses), apresentaram distribuição normal, permitindo a comparação estatística pelo teste T não-pareado.

4.5. Avaliação da Manutenção da Infectividade das Larvas

4.5.1. Animais

Para esta etapa foram utilizados 16 ovinos jovens, com idade inferior a um ano, de raças mestiças e livres de parasitas. Estes foram tratados com anti-helmínticos comerciais à base de monepantel, albendazol e/ou levamisol como em outras etapas citadas anteriormente. O *status* parasitário foi então determinado por meio de análise coproparasitológica, com três exames negativos consecutivos.

Os animais foram mantidos em gaiolas suspensas, com alimentação composta por silagem de milho adicionado de ração comercial para cordeiros, além de água potável oferecida *ad libitum*.

Os animais foram divididos em três grupos distintos, de acordo com os resultados encontrados no pós-descongelamento.

Dois desses grupos foram formados com cinco animais e um com seis, com peso, sexo e idade equivalentes. A quantidade de animais do grupo 8 permaneceu inferior devido a resultados anormais constatado no pós-descongelamento de três criotubos. Nesse caso o teste in vivo do grupo 8 ficou com cinco animais enquanto o grupo 7 manteve o número de seis indivíduos. Isso para que fosse respeitado ao máximo, o número de larvas por animal recomendado por Wood et al. (1995).

4.5.2. Infecção Experimental

Os grupos experimentais foram H+, com animais infectados por larvas congeladas após desembainhamento (grupo 8 dos testes in vitro), H+/C+, com animais infectados por larvas desembainhadas e tratadas com crioprotetor (grupo 7, dos testes in vitro) e C, grupo controle, infectado com larvas frescas.

As amostras selecionadas para infectarem os animais foram retiradas apenas de duas técnicas, as quais se mostraram mais eficientes em relação à motilidade e sobrevivência das larvas. Tal procedimento foi realizado para eliminar a possibilidade de técnicas ineficazes, ou seja, com baixas taxas de sobrevivência das larvas, ou mesmo com reduzida motilidade, o que inviabilizaria uma futura manutenção dessas larvas em laboratório e a realização de uma possível infecção no pós-descongelamento.

4.5.3. Análise Estatística

Após a necropsia e recuperação dos vermes adultos, a distribuição de normalidade das amostras foi verificada pelo teste Anova, com posterior teste de Tukey para constatação de possíveis diferenças estatísticas.

4.6. Aspectos Éticos

Todos os procedimentos adotados nesse experimento estão em acordo com os princípios de bem-estar animal e foram autorizados pela CEUA (Protocolo nº 013124/13)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção da Linhagem Pura de *H. contortus*

Após infecção dos animais amplificadores com a cultura mista proveniente de Rio Verde, Goiás, observou-se o estabelecimento do período patente ao 28º dia pós-infecção.

A necropsia dos animais revelou a presença de infecção maciça, com intensidade parasitária em torno de 8.000 helmintos adultos (Figura 5). Uma amostra de 1.000 fêmeas foi dividida de forma equivalente em 10 placas de Petri contendo solução fisiológica e colocadas para incubação em estufa BOD (Figura 6). A oviposição e viabilidade das larvas nas condições experimentais foram consideradas ótimas, uma vez que a eclosão dos ovos foi observada antes de 24h de incubação e agrupamentos de incontáveis larvas infectivas puderam ser observados nas paredes dos frascos de coprocultura (Figuras 7 e 8).

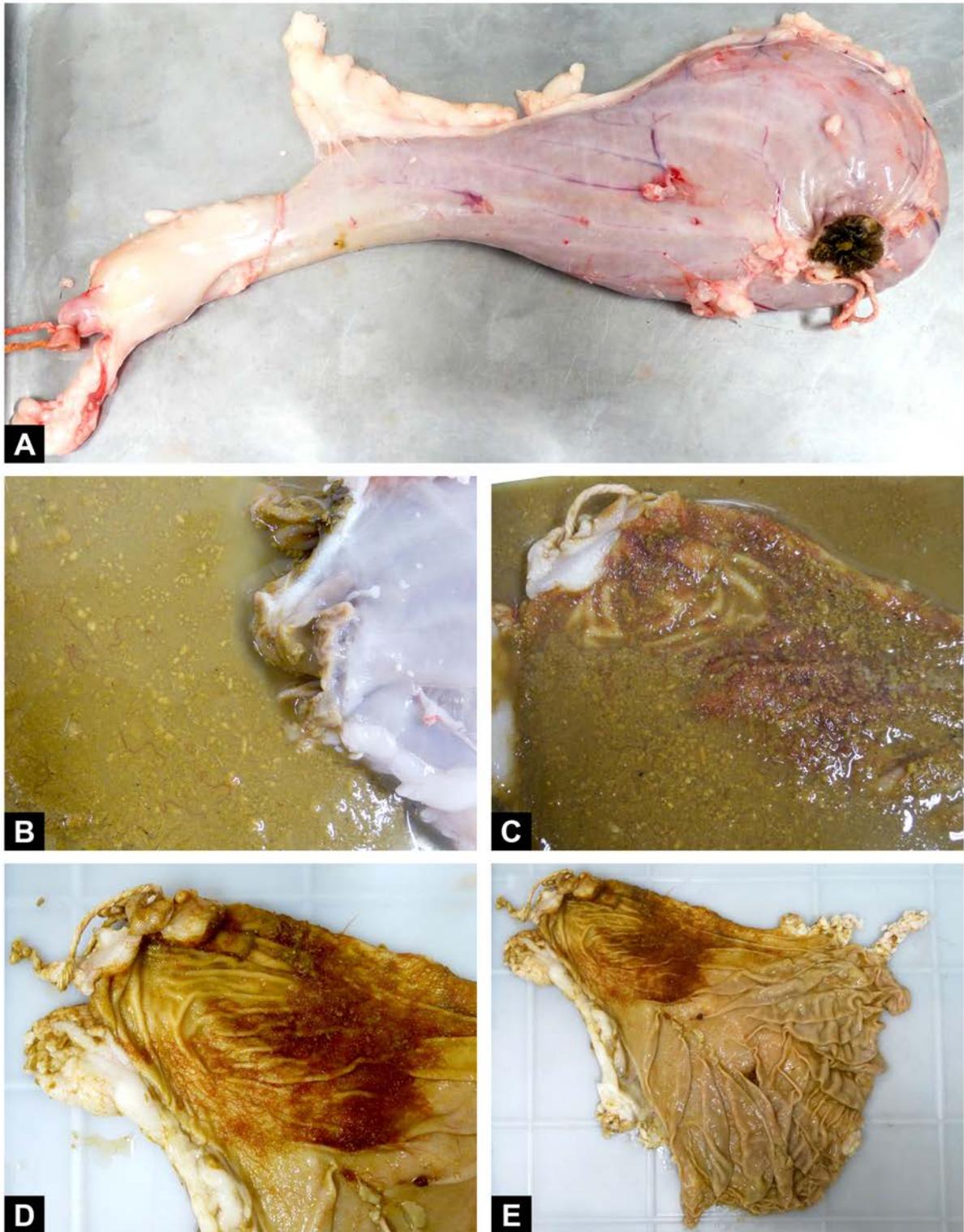


Figura 5. Abomaso isolado dos animais necropsiados. (A) Abomaso íntegro. (B e C) Presença de espécimes de *Haemonchus contortus* no conteúdo gástrico. (D e E) Presença de *Haemonchus contortus* aderidos à mucosa gástrica.

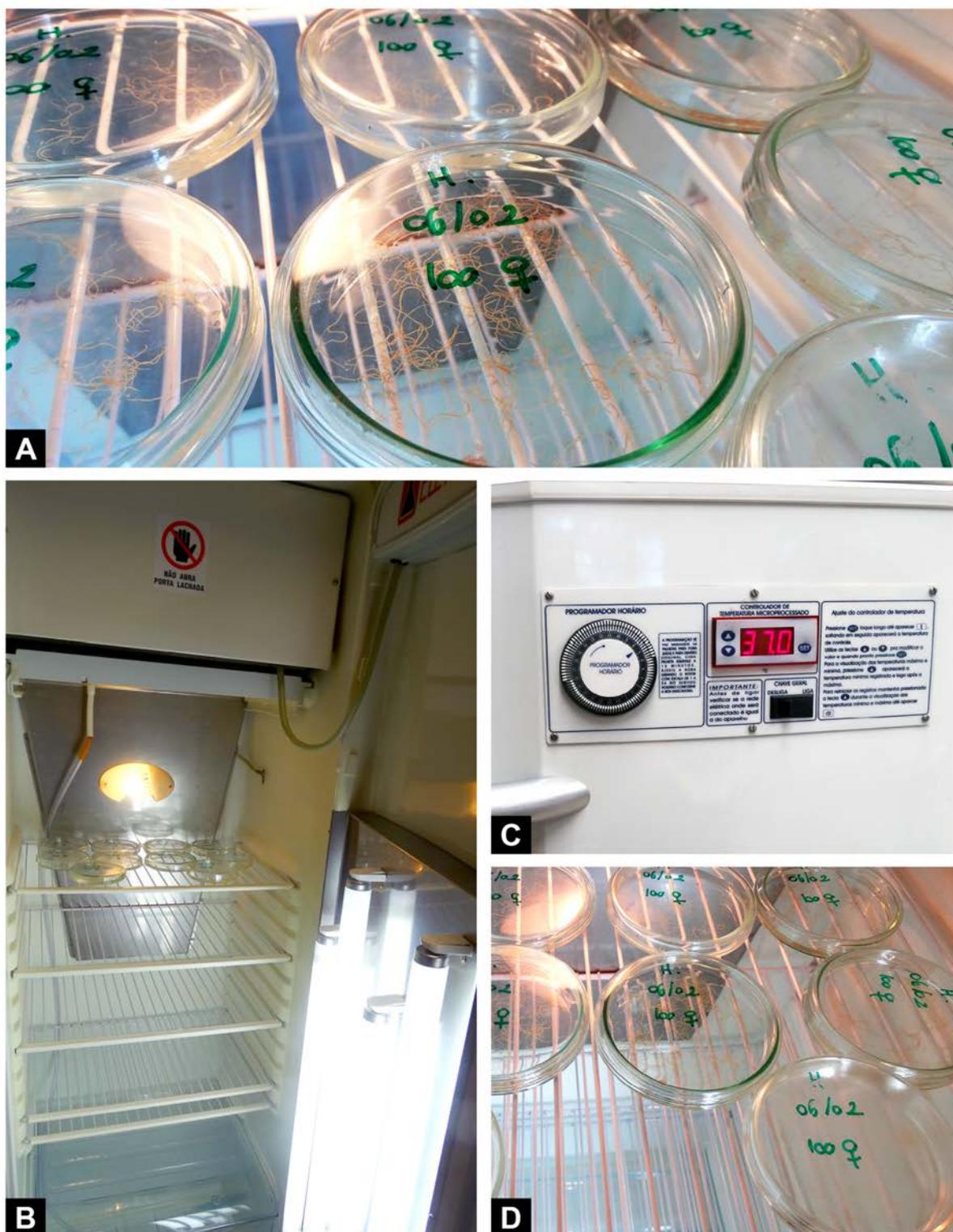


Figura 6. Oviposição in vitro em estufa B.O.D. (A e D) Placas de Petri com fêmeas para oviposição. (B e C) Estufa B.O.D em funcionamento a 37^oC.

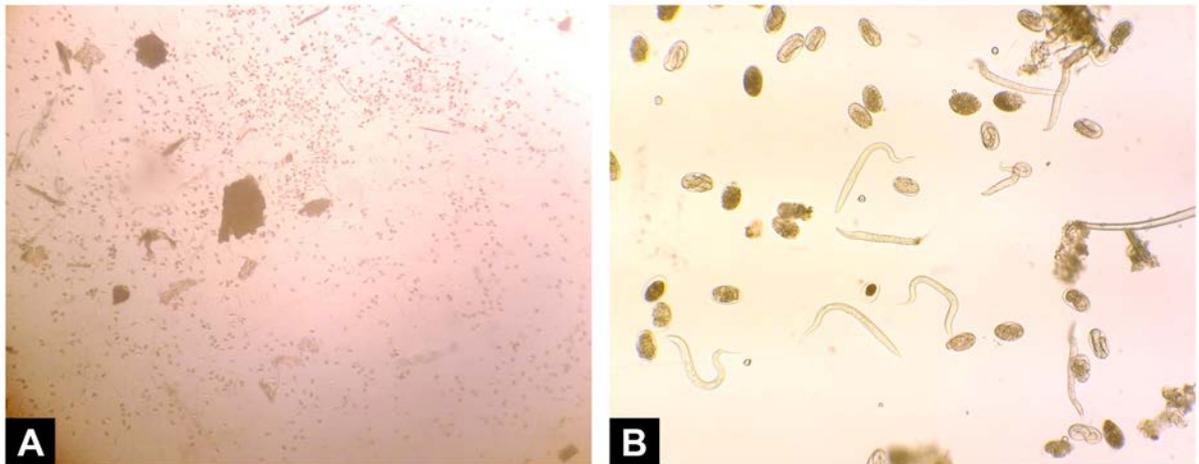


Figura 7. Oviposição em placas de Petri. (A e B) Presença de ovos e larvas em estágio L1 em placas de Petri vistas em microscópio estereoscópico.

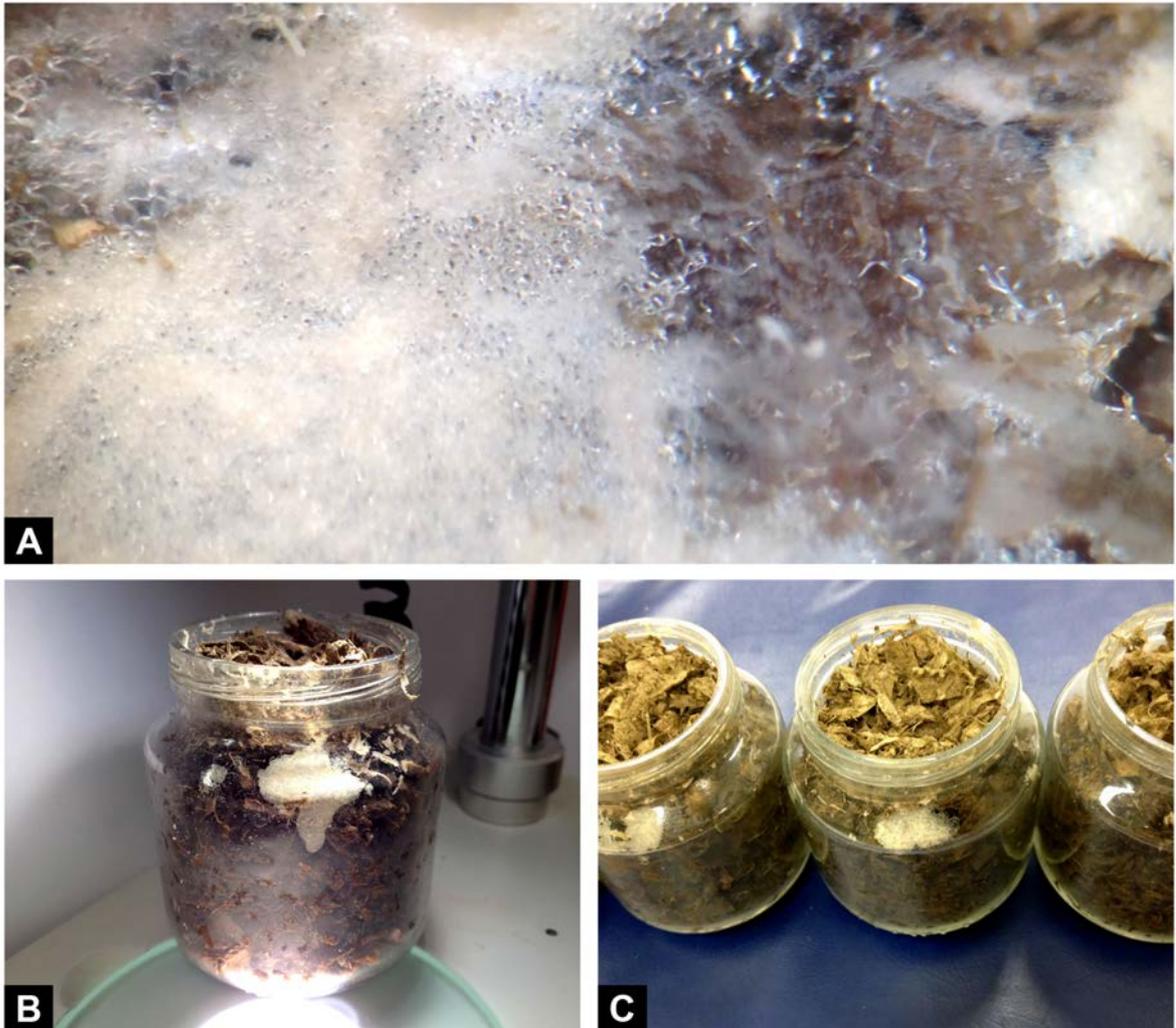


Figura 8. Coprocultura. (A, B e C) Presença de grande quantidade de larvas nas paredes dos recipientes utilizado para coprocultura.

As larvas obtidas das culturas após incubação por uma semana apresentaram motilidade bastante elevada, com raras larvas imóveis. A inoculação nos doadores foi feita sem intercorrências relevantes como espirros, engasgos ou eliminação do inóculo, que poderiam resultar em perda de parte das larvas (Figura 9).

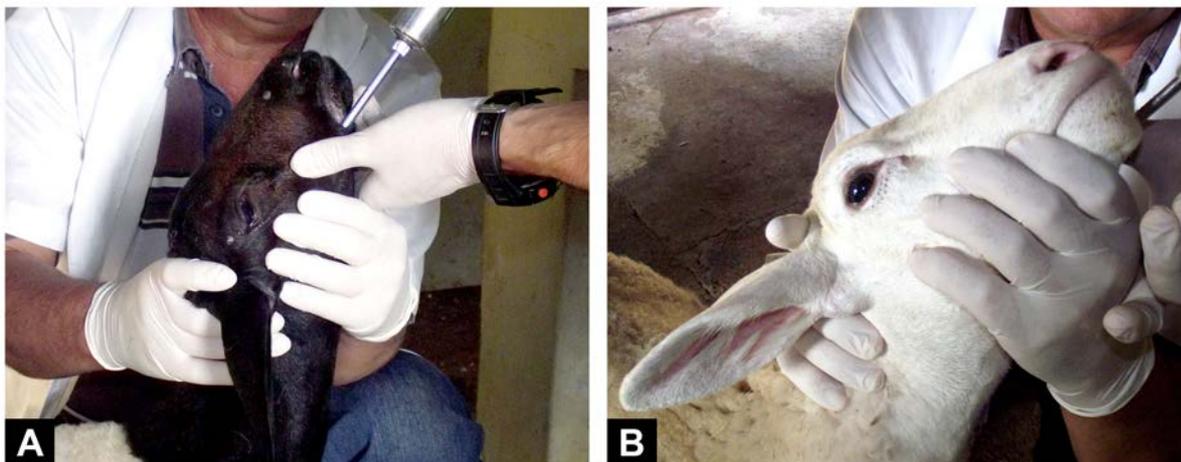


Figura 9. Inoculação dos doadores. (A e B) Inoculação de 5.000 larvas em cada doador por via oral com auxílio de uma pistola dosadora.

A partir do material fecal desses doadores, os quais desempenharam o papel de multiplicadores de parasitas, cerca de 60.000 larvas foram extraídas para as demais etapas do estudo.

5.2. Avaliação dos Protocolos de Desembainhamento

Para cada grupo foram feitas 10 repetições, onde cada uma era constituída de uma gota de 20 μ L da solução, com uma média de 31,27 \pm 2,86 larvas por gota. As contagens de larvas mostraram-se equivalentes estatisticamente, quando comparados pelo teste de ANOVA com Tukey posterior para um P de 5%, comprovando a homogeneidade dos grupos.

Foram evidenciadas diferenças significativas entre todos os grupos experimentais nos três diferentes tempos. As médias dos tempos de desembainhamento das larvas, nas diferentes concentrações (50ppm, 100ppm, 200ppm e 500ppm), estão mostradas na Tabela 1.

Tabela 1. Médias (\pm desvio padrão) para os tempos experimentais, em minutos, do teste de desembainhamento. (As letras a, b, c e d, indicam as diferenças estatísticas dos tempos de desembainhamento entre as colunas para as diferentes concentrações.) (Os números 1, 2 e 3, indicam as diferenças estatísticas dos tempos de desembainhamento entre as linhas para a mesma concentração)

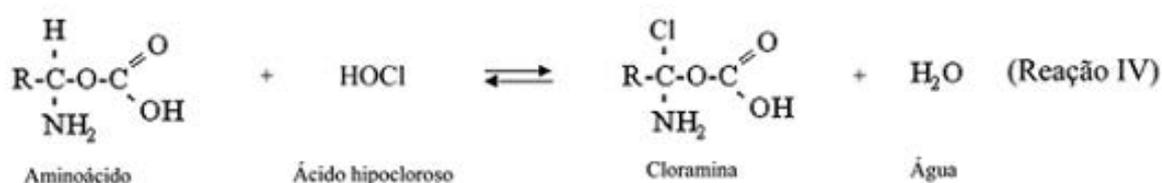
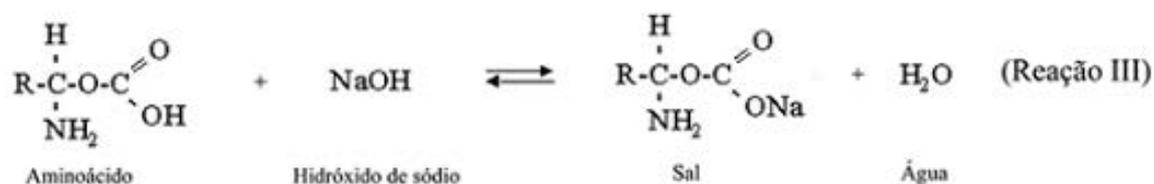
TEMPO EXPERIMENTAL	CONCENTRAÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO			
	500ppm	200ppm	100ppm	50ppm
T1 (início)	4,4 \pm 1,019 ^{a,1}	11,35 \pm 2,191 ^{b,1}	20,5 \pm 3,413 ^{c,1}	38,2 \pm 7,440 ^{d,1}
T2 (90%)	8,9 \pm 2,165 ^{a,2}	18,9 \pm 3,611 ^{b,2}	32,6 \pm 3,8 ^{c,2}	54,8 \pm 9,130 ^{d,2}
T3 (100%)	10,2 \pm 2,441 ^{a,3}	23,3 \pm 2,638 ^{b,3}	38,6 \pm 4,651 ^{c,3}	62,9 \pm 6,139 ^{d,3}

Assim como relatado por Van Wyk (1998), as larvas em 0,02% de NaClO levaram por volta de 20min para que mais de 90% delas tivessem sua bainha removida.

Dado o sucesso do grupo tratado com 200ppm, optou-se por utilizar essa concentração para o experimento de congelamento. Uma vez que essa concentração proporciona uma velocidade intermediária de desembainhamento, o que resulta em um alto controle dessa etapa sem que haja uma demora excessiva. Dessa forma, evita-se as elevadas concentrações de hipoclorito ou/e o elevado tempo de exposição a esse, responsáveis por danos teciduais visíveis e irreversíveis (VAN WYK, 1998).

O hipoclorito de sódio em solução aquosa, como usado no atual trabalho, encontra-se em um equilíbrio químico dinâmico. Esse se apresenta de duas formas, como um sal não dissociado ($\text{NaOCl} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{NaOH} + \text{HOCl}$), ou totalmente dissociado ($\text{NaOCl} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Na}^+ + \text{OH}^- + \text{H}^+ + \text{OCl}^-$) (PÉCORA, 2004)

As reações químicas entre os componentes da bainha e as substâncias presentes na solução de hipoclorito de sódio possivelmente são as responsáveis pelo processo de dissolução tecidual e conseqüente desembainhamento. Uma vez que a bainha é de origem glicoproteica.



O hipoclorito, de forma distinta, provoca o mesmo que naturalmente ocorre no rúmex do hospedeiro, quando esse estimula a secreção de um fluido de desembainhamento entre as cutículas, o que dá início ao processo de desembainhamento (SOMMERVILLE, 1957).

Apesar da presença da bainha ser um fator determinante na sobrevivência das L3 quando expostas a condições desfavoráveis, essa influencia negativamente na criopreservação, conforme os resultados de sobrevivência apresentados no pós-descongelamento.

Esses dados reafirmam a importância da remoção da bainha das larvas infectantes para a criopreservação. Essa informação vai ao encontro de trabalhos realizados para espécies distintas de parasitas (VAN WYK, 1998).

A cutícula impede a dessecação das larvas, tendo aquela à função de permitir que essas sobrevivam nas pastagens nos períodos de seca (JAMES, 1986). Tal particularidade, traz consigo conseqüências para criopreservação, como a manutenção de altas concentrações de água nos tecidos larvais. Resultando na formação de cristais de gelo no interior da célula, responsáveis por ocasionarem lesões e morte celular.

Uma vez sem bainha, a larva lida com o aumento da permeabilidade tecidual, fato que proporciona uma diminuição gradual de água presente nas larvas, elevando-se assim, as chances de sobrevivência desses parasitas ao congelamento (HUBERT; KERBOEUF, 1997).

5.3. Criopreservação

Nessa etapa, apenas duas das amostras manifestaram uma resposta adequada e dentro do esperado (Figura 10). Essas demonstraram ser capazes de evitar ou superar os efeitos adversos a que foram expostas, devido as mudanças na temperatura. Como formação de cristais de gelo, injúrias oxidativas, alterações na membrana, lesões no DNA e estresse osmótico (BALL & VO, 2001).

Os grupos que passaram pelo congelamento ultrarrápido, por meio da imersão direta no nitrogênio líquido sem qualquer tipo de resfriamento prévio, e todos aqueles que não passaram pela etapa de remoção da bainha, por meio de banho de Hipoclorito de Sódio, de alguma forma não foram capazes de superar as alterações a que foram expostos, e assim apresentaram uma taxa de sobrevivência de 0% no descongelamento aos dois meses (Tabela 2).

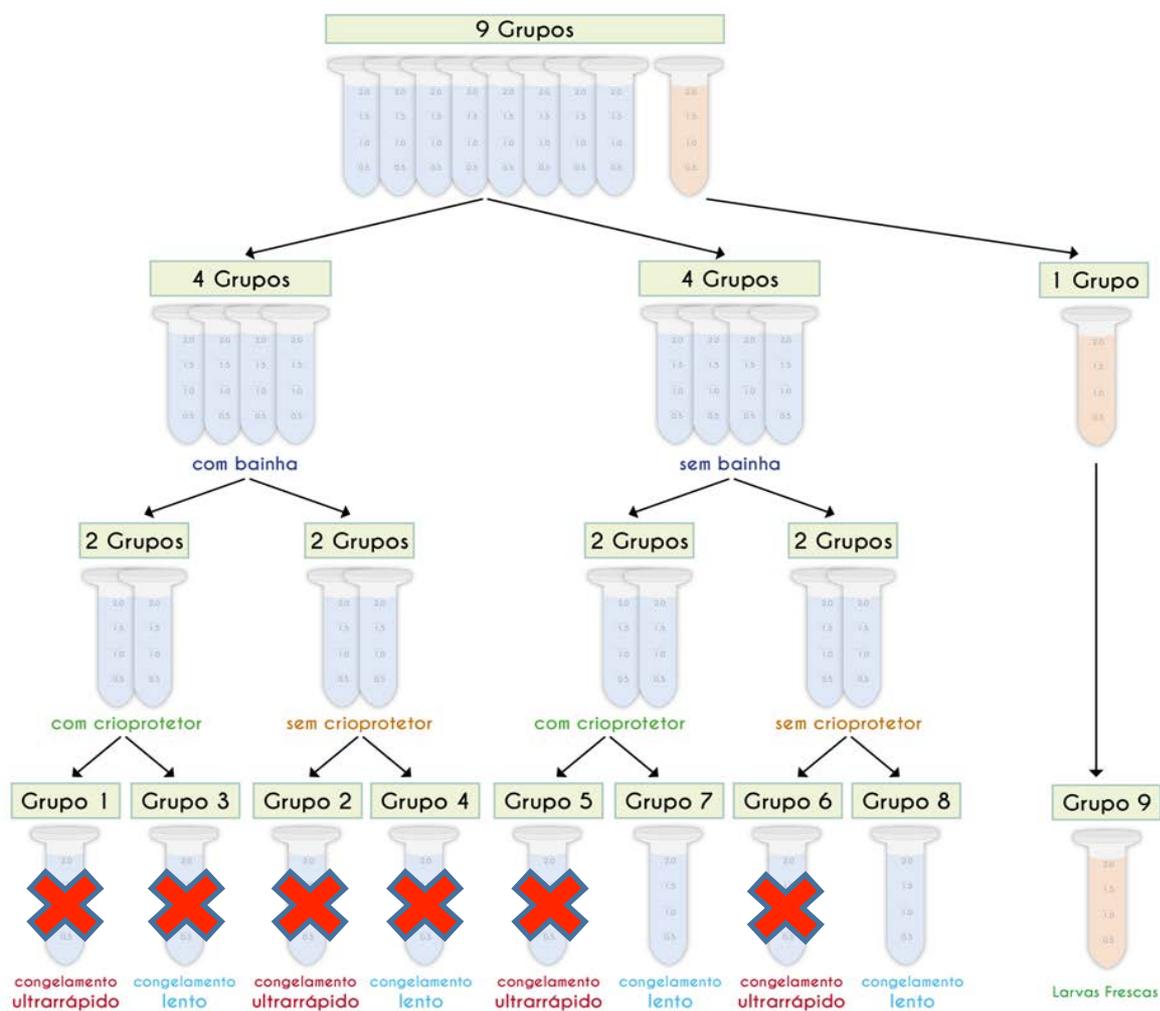


Figura 10. Demonstração no fluxograma dos grupos viáveis após dois meses de congelamento.

Tabela 2. Taxa de sobrevivência dos grupos para o tempo de duas horas aos dois meses pós-congelamento

Grupos	Média do número de larvas	Média de sobrevivência (%)
1	90,83	0
2	101,00	0
3	97,50	0
4	100,00	0
5	103,16	0
6	105,00	0
7	83,33	40
8	111,33	26,65

Os resultados encontrados (grupos 1, 2, 5, 6) ratificam a importância da velocidade de congelamento no processo de criogenia de *Haemonchus contortus*.

Outros parasitas já haviam apresentado certa intolerância em relação ao congelamento ultrarrápido como proposto por Van Wyk et al. (1977), contrariando as suposições de James (2004) que menciona que o congelamento rápido evitaria a formação de cristais de gelo e, conseqüentemente, resultaria em elevada taxa de sobrevivência das larvas. No entanto, os dados do presente estudo indicam o contrário, uma vez que todos os grupos submetidos ao congelamento rápido não sobreviveram ao procedimento.

Dependendo da velocidade de refrigeração, a água é capaz de se mover através da membrana e se unir à fase congelada no meio extracelular. Provavelmente, no caso dos grupos expostos ao congelamento ultrarrápido, ocorreu a formação de cristais de gelo no próprio interior da célula, o que na maioria dos casos as tornam osmoticamente inativas ou lisadas devido à perda da integridade da membrana celular (DENVIREDDY et al., 2002).

Observa-se que uma velocidade reduzida nem sempre é sinônimo de bons resultados. Quando o processo de congelação é muito lento ocorre a congelação da água extracelular com a conseqüente concentração de soluto, colocando a célula momentaneamente em um meio hipertônico e determinando perda rápida da água, o que leva à desidratação celular e ao aumento da concentração de soluto extracelular, expondo essas a um estresse osmótico (MAZUR, 1985). O mais indicado é o equilíbrio. Uma curva adequada de congelamento minimiza efeitos indesejáveis (SQUIRES, 1999).

Os grupos 7 e 8, que apresentaram taxa de sobrevivência adequada aos dois, três e cinco meses pós-congelamento, passaram pelo banho de hipoclorito de sódio e pelo congelamento lento. A única diferença entre esses grupos é a adição de Etileno Glicol ao grupo 7. O emprego do criopreservante mostrou-se vantajoso ao longo do tempo.

Para um curto período de arrefecimento, as taxas de sobrevivência mostraram pouca variação em relação aos grupos. Nos dias 18 de julho (dois meses) e 18 de agosto (três meses), primeiro e segundo descongelamento, apesar das diferenças numéricas, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas entre os

grupos. Com exceção para as 6 horas pós-descongelamento do dia 18 de julho ($H+$, $53,5 \pm 3,82$; $H+/C+$, $78,6 \pm 31,77$; $P=0,0301$; $U=4,0$).

No entanto, com o passar do tempo os grupos citados anteriormente passaram a apresentar uma diferenciação estatística para os tempos do último descongelamento, 18 setembro (quatro meses), tanto em relação às taxas de sobrevivência (Figura 11 e 12), como na diferenciação do grau de motilidade apresentado pelas larvas (Figura 13 e 14), sendo esse classificado em alto, médio ou baixo, como já mencionado na metodologia.

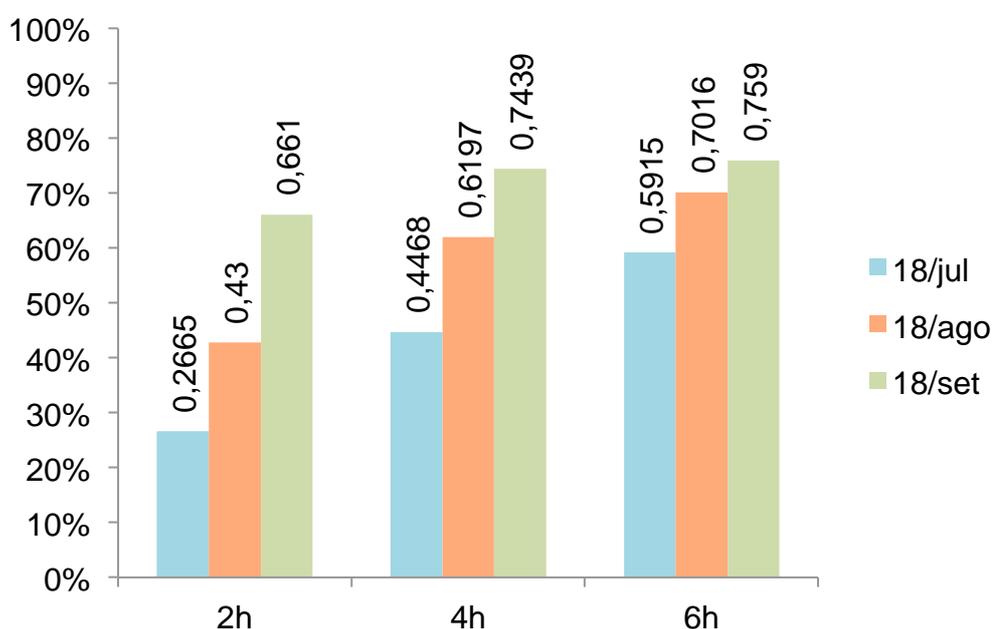


Figura 11. Taxas de sobrevivência do grupo 7 (larvas desembainhadas + crioprotetor + congelamento lento) para os tempos de duas, quatro e seis horas pós-descongelamento, nos períodos de dois, três e quatro meses.

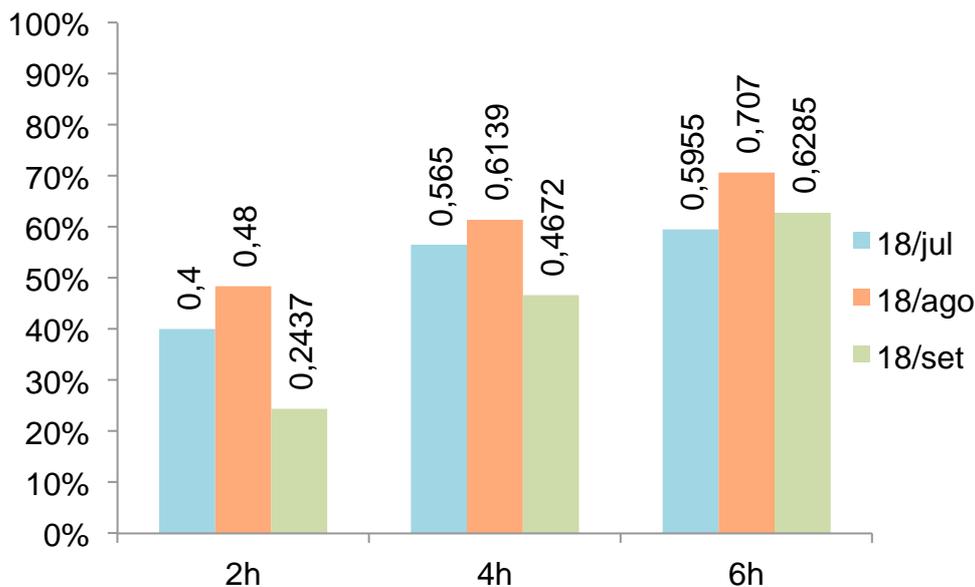


Figura 12. Taxas de sobrevivência do grupo 8 (larvas desembainhadas + congelamento lento) para os tempos de duas, quatro e seis horas pós-descongelamento, nos períodos de dois, três e quatro meses.

Conforme visualização gráfica, a técnica de criopreservação referente ao grupo 7, mostrou-se mais eficaz estatisticamente quando comparado com a técnica do grupo 8 para um período maior de arrefecimento. A primeira mostrou-se superior para todos os tempos, 2, 4 e 6 horas aos quatro meses, pós-descongelamento (Tabela 3).

Tabela 3. Análise estatística da viabilidade pós-descongelamento pelo teste T não-paramétrico (Mann-Whitney) para os tempos experimentais de 2, 4 e 6 horas aos quatro meses de congelamento.

	Média±Desv. Padrão		T	P
	Grupo 8	Grupo 7		
2h	25,83±11,47	71,83±8,75	T=7,806	P<0,0001
4h	47,5±7,76	86,16±13,25	T=6,164	P=0,0001
6h	74,16±9,70	95±9,75	T=3,708	P=0,0041

A superioridade do grupo 7 é decorrente do uso de Etilenoglicol, crioprotetor, utilizado anteriormente ao processo de criogenia. Crioprotetor é a nomenclatura dada a qualquer substância que ofereça, mesmo que temporariamente, energia, proteção aos danos ocasionados pela redução de temperatura e manutenção de ambiente favorável à sobrevivência da célula armazenada (PURDY, 2006).

O Etilenoglicol (monoetileno glicol; etano-1, 2-diol) é um álcool com dois grupos-OH, um composto químico largamente utilizado como anticongelante automotivo. Na sua forma pura é um composto inodoro, incolor, xaroposo líquido, de sabor doce e com massa molecular 62 g/mol (FERNANDES et al., 2002)

Esse crioprotetor age de forma intracelular, uma vez que seu baixo peso molecular possibilita a penetração celular por meio de difusão passiva, permanecendo na membrana e no citoplasma. Essa penetração na célula ocasiona substituição parcial da água intracelular, tornando-se essencial na prevenção dos cristais de gelo, através do aumento da viscosidade celular e consequente diminuição do ponto de congelamento (PURDY, 2006). Além de evitar a ocorrência de danos tóxicos e osmóticos (KASAI, 2002).

Os resultados demonstram que essas características do Etileno Glicol influenciaram diretamente na superioridade apresentada pelo grupo 7 em relação ao grupo 8. Ham (1985) já havia sugerido que larvas infectantes de nematódeos de animais domésticos expostas no ambiente a temperaturas de congelamento, sobreviveram melhor por conseguirem retardar suas taxas de arrefecimento, provavelmente por síntese de crioprotetores naturais.

Em adição aos benefícios desse álcool, já demonstrados anteriormente, os resultados posteriores exemplificam as influências positivas que esse também apresenta sobre o grau de motilidade das larvas no pós-descongelamento (Figuras 13 e 14).

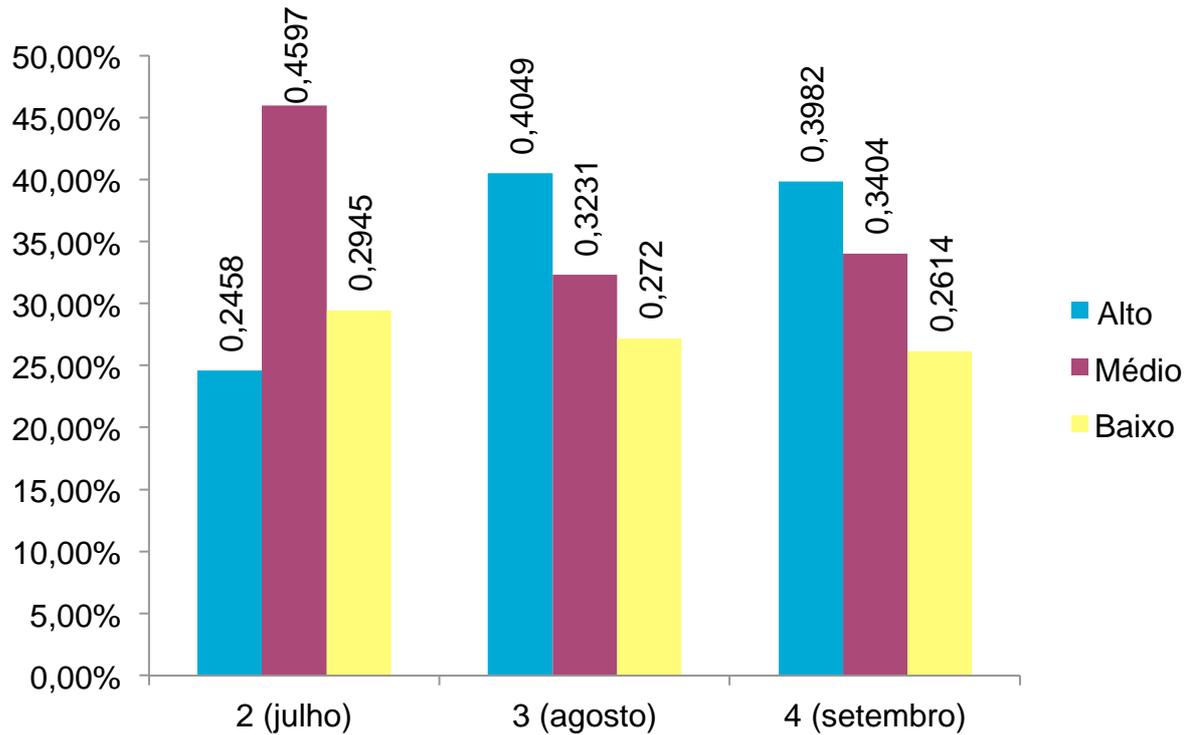


Figura 13. Classificação do grau de motilidade do grupo 7 (larvas desembainhadas + crioprotetor + congelamento lento) em alto, médio e baixo, para os períodos de dois, três e quatro meses após o congelamento

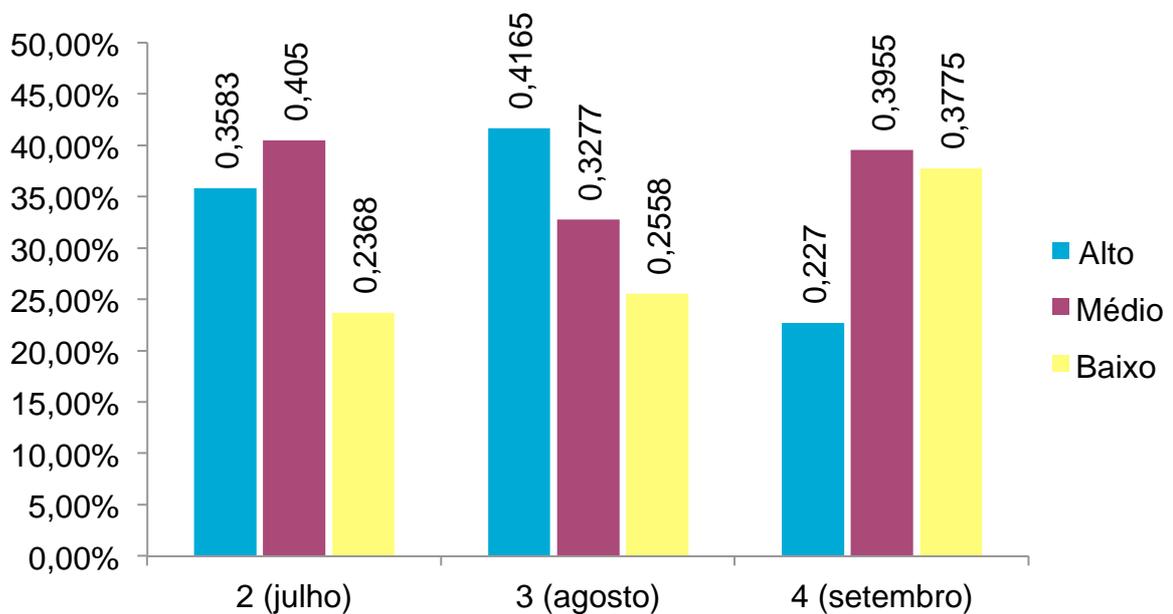


Figura 14. Classificação do grau de motilidade do grupo 8 (larvas desembainhadas + congelamento lento) em alto, médio e baixo, para os períodos de dois, três e quatro meses após o congelamento

5.4. Desafio In Vivo

O desafio in vivo se deu após oito meses de congelamento das larvas, com os dois únicos grupos, 7 e 8, que manifestaram elevadas taxas de sobrevivência e motilidade, conforme verificado anteriormente.

A partir disso, cada grupo teve 10 criotubos descongelados, respeitando a técnica preconizada no item 4.5.3. Essas amostras então foram avaliadas individualmente seis horas após o descongelamento (Tabelas 4 e 5). Esse tempo foi definido de acordo com os resultados extraídos das etapas anteriores (Figuras 11 e 12), onde esses apresentaram uma maior taxa de sobrevivência quando comparado para duas e quatro horas.

Tabela 4. Taxa de sobrevivência das amostras do grupo 8 (larvas desembainhadas + congelamento lento) pós-descongelamento

18/12 - 6 horas descongelamento											
Grupo 8 (40ul)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Média
Número de Larvas	109,0	117,0	95,0	120,0	105,0	87,0	128,0	84,0	120,0	94,0	105,9
Presença de Motilidade (n^o)	43,0	46,0	15,0	66,0	26,0	54,0	10,0	6,0	10,0	17,0	29,3
Presença de Motilidade (%)	39,4	39,3	15,8	55,0	24,8	62,1	7,8	7,1	8,3	18,1	27,7

Tabela 5. Taxa de sobrevivência das amostras do grupo 7 (larvas desembainhadas + crioprotetor + congelamento lento) pós-descongelamento

18/12 - 6 horas descongelamento											
Grupo 7 (40ul)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Média
Número de Larvas	123,0	102,0	100,0	97,0	99,0	111,0	113,0	97,0	103,0	115,0	106,0
Presença de Motilidade (n^o)	43,0	53,0	65,0	61,0	74,0	67,0	75,0	73,0	46,0	63,0	62,0
Presença de Motilidade (%)	35,0	52,0	65,0	62,9	74,7	60,4	66,4	75,3	44,7	54,8	58,5

Partindo dessa análise, ficou então definido o montante de larvas viáveis para cada um dos grupos, e o número de larvas inoculadas por animal para cada grupo (Tabela 6).

Tabela 6. Média de larvas viáveis utilizadas no teste in vivo

	Total de larvas viáveis	Larvas por animal
Grupo 8	13888	2778
Grupo7	24549	4092

Após a inoculação dos animais, formaram-se três grupos, H+ (larvas desembainhadas + congelamento lento), H+/C+ (larvas desembainhadas + crioprotetor + congelamento lento) e controle. Sendo esses provenientes de larvas do grupo 8, 7 e de larvas frescas, respectivamente. A partir do sétimo dia pós-infecção, amostras de fezes de cada animal foram avaliadas em dias alternados até a data da necropsia, para assim determinar o início do período patente e a evolução da infecção (Figura 15).

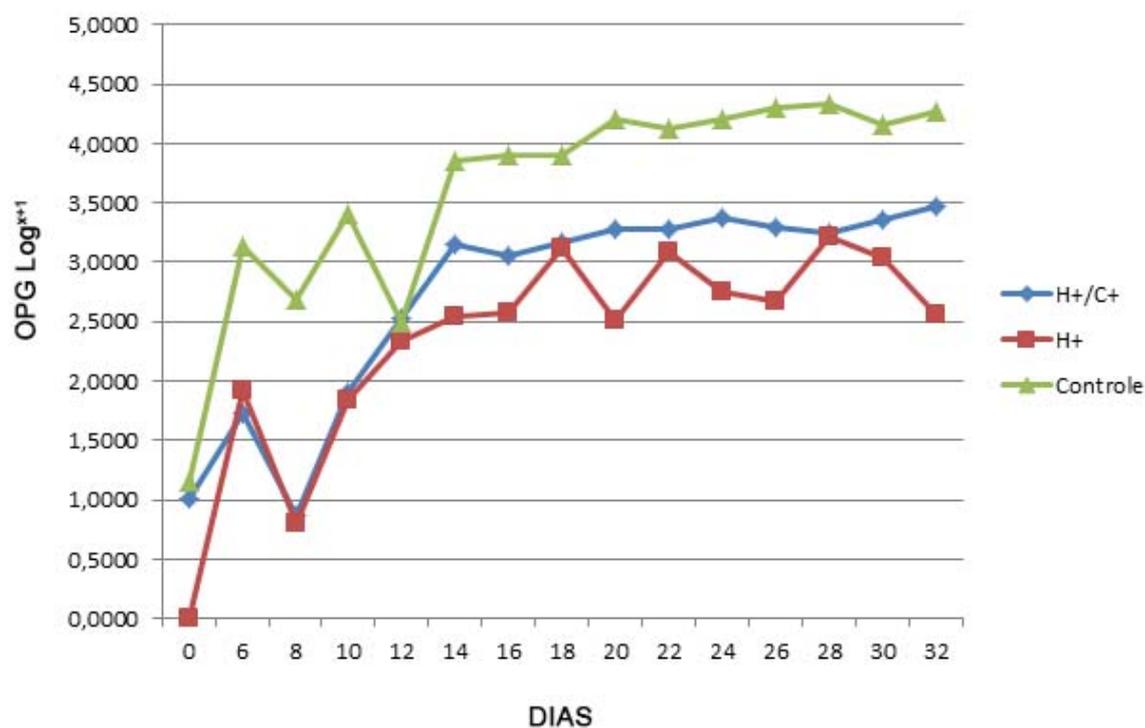


Figura 15. Média dos valores de OPG, a partir do sétimo dia pós-infecção, para cada um dos grupos (H+, H+/C+ e controle) durante o período de infecção experimental.

Após a necropsia dos animais e posterior recuperação dos vermes adultos, esses foram computados. Contabilizou-se então o número de machos, fêmeas e o total de parasitas encontrado em cada animal infectado experimentalmente, para os diferentes grupos, H+/C+ (larvas desembainhadas + crioprotetor + congelamento lento), H+ (larvas desembainhadas + congelamento lento) e Controle (larvas frescas), respectivamente (Figuras 16,17 e 18).

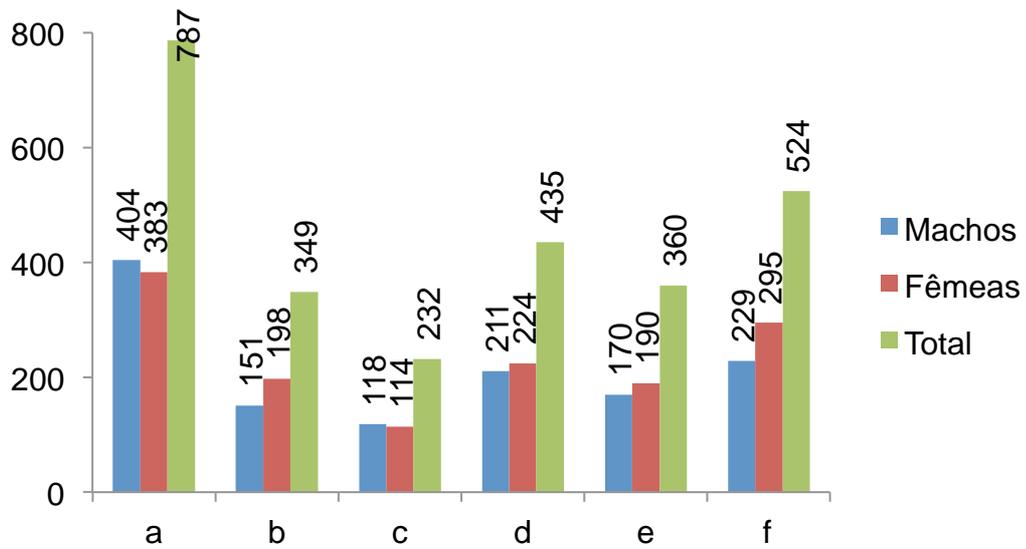


Figura 16. Contagem absoluta de helmintos adultos obtidos dos animais do grupo H+/C+ (larvas desembainhadas + crioprotetor + congelamento lento), pós-necropsia.

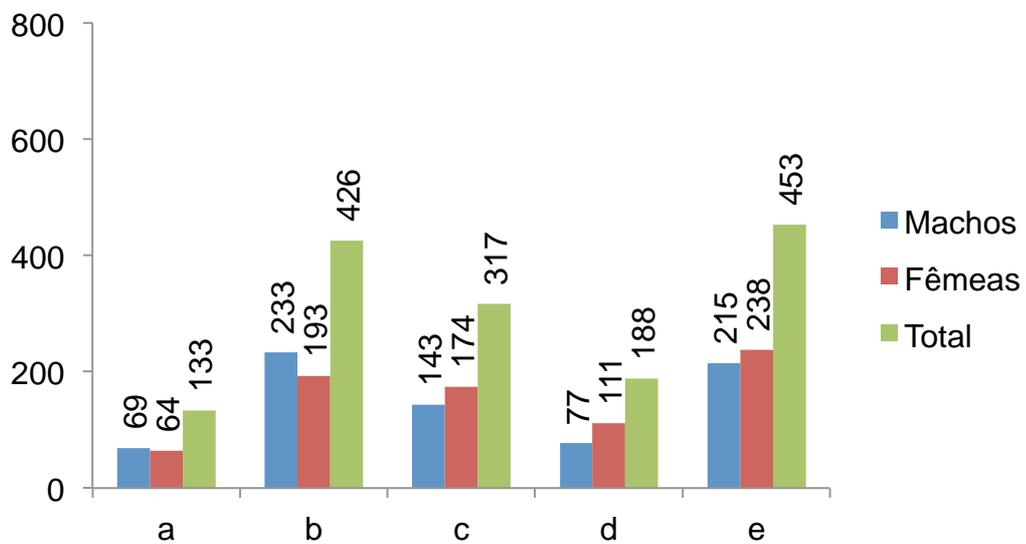


Figura 17. Contagem absoluta de helmintos adultos obtidos dos animais do grupo H+ (larvas desembainhadas + congelamento lento), pós-necropsia.

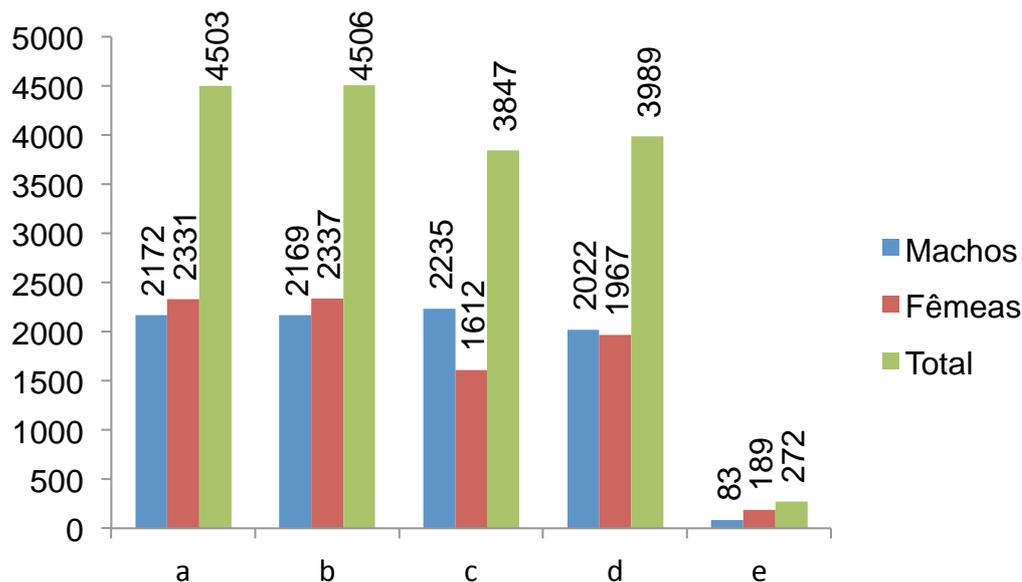


Figura 18. Contagem absoluta de helmintos adultos obtidos dos animais do grupo Controle (larvas frescas), pós-necropsia.

Os grupos responderam positivamente ao desafio in vivo conforme demonstrado acima. As duas técnicas desafiadas mantiveram de alguma forma a capacidade infectiva das larvas L3, após um período de oito meses de congelamento.

Para o grupo H+/C+, o qual foi infectado experimentalmente com larvas do grupo 7, foi recuperado uma média de 448 vermes por animal, enquanto que para o grupo H+, infectado com larvas do grupo 8, foram recuperados 303. Para estes dois grupos, sem diferenças estatisticamente significativas (H+/C+, $447,83 \pm 192,38$; H+, $303,4 \pm 141,3764$), a taxa de recuperação de vermes adultos foi próxima de 11%, índice bem menor de infectividade quando comparado com os 68,5% de vermes adultos recuperados para cultura fresca de larvas (Figura 19).

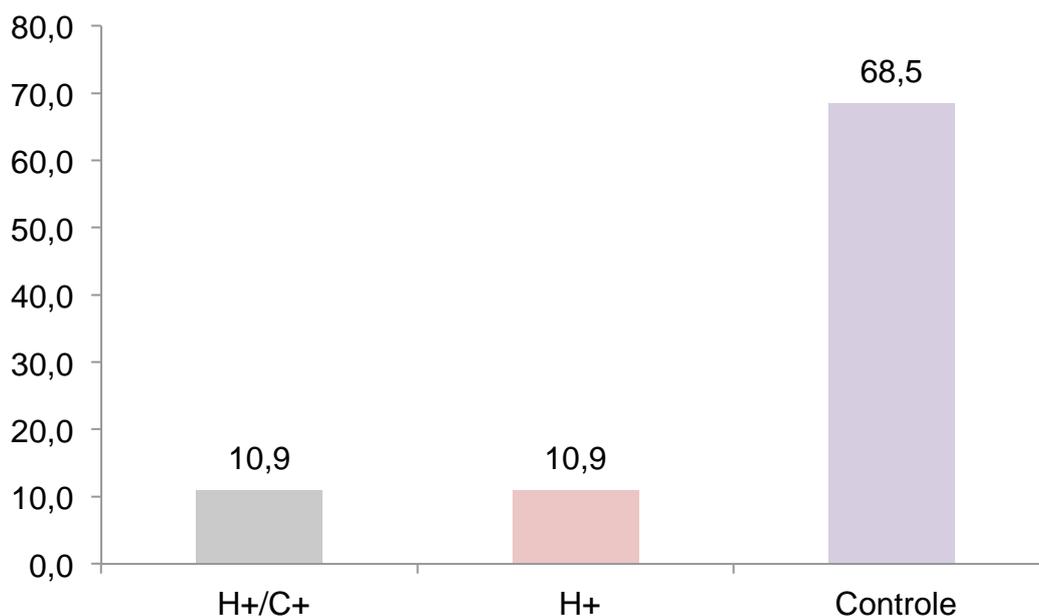


Figura 19. Porcentagem de vermes adultos recuperados para cada grupo experimentalmente infectado.

Esses dados mostram que a manutenção da infectividade não variou para as diferentes taxas de motilidade encontradas para as técnicas após o descongelamento. Lembrando, que o grupo banhado em Etileno Glicol apresentou uma maior quantidade de larvas classificadas com motilidade alta, chegando a atingir um índice médio de 40% após quatro meses de congelamento. Diferentemente do que se foi verificado para as larvas que não foram banhadas com o crioprotetor, das quais apenas 22% apresentaram motilidade classificada como alta, aos quatro meses de congelamento.

Isso mostra que as larvas criopreservadas ainda sofrem com os efeitos do processo de criogenia, uma vez que o grupo controle foi estatisticamente superior aos demais ($3423,4 \pm 1786,632$; $P=0,0003$; $F=15,93$). O que no entanto não impede que essas sejam preservadas em nitrogênio líquido, uma vez que apresentaram elevados índices de sobrevivência após o descongelamento, e a sua replicação é algo prático, rotineiro e de baixo custo. Quando comparados com a manutenção desses parasitas em animais.

6. CONCLUSÃO

O atual trabalho mostrou que para o desembainhamento das larvas infectivas de *Haemonchus contortus*, a concentração de 200ppm de hipoclorito se mostrou mais desejável, quando consideramos o tempo necessário para conclusão do desembainhamento de pelo menos 90% das larvas, em conjunto com a inexistência de efeitos lesivos prejudiciais a sobrevida.

Entre as técnicas de criopreservação ficou exemplificado que a ausência da etapa de remoção da bainha e a velocidade de congelamento ultrarrápido (vitrificação) são extremamente lesivas para larvas infectivas (L3) de *Haemonchus contortus*. Resultando, nesse experimento, em mortalidade de 100%.

O Etileno Glicol, crioprotetor intracelular, potencializa os índices de sobrevida e motilidade para longos períodos de arrefecimento, e deu indícios de ser capaz de preservar esses índices pós-descongelamento por longos períodos. Diferentemente do que foi visto na ausência desse, onde com o passar do tempo, ocorreu um decaimento nos índices das amostras criopreservadas.

Após as diferentes fases de avaliação, a técnica de congelamento com as seguintes etapas: remoção da bainha com Hipoclorito de Sódio a uma concentração de 200ppm, uso de Etileno Glicol e o congelamento lento, mostrou ser a técnica mais benéfica e viável dentre as oito diferentes técnicas testadas ao longo do processo experimental. Sendo essa capaz de reativar com elevadas taxas de sobrevida e motilidade as amostras congeladas, mantendo assim sua capacidade infectiva.

7. REFERÊNCIAS

AMARANTE, A.F.T. Sustainable worm control practices in South America. **Small Ruminant Research**, Arkansas. v. 118, p. 56 – 62, 2014.

ANDERSON, F. L.; LEVINE, N. D.; BOATMAN, D. A. Survival of third-stage *Trichostrongylus colubriformis* larvae on pasture. **Journal of Parasitology**, Lawrence. v. 56, p. 209-232, 1970.

AVMA. American Veterinary Medical Association. **AVMA Guidelines on Euthanasia (Formerly Report of the AVMA Panel on Euthanasia) 2007**. Disponível em: <<http://www.avma.org/resources/euthanasia.pdf>>. Acesso em: 26 de setembro de 2012.

BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectant on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, Philadelphia. v. 22, p. 1061-1069, 2001.

BLACKHALL W. J.; POULIOT, J. F.; PRICHARD, R. K., et al. *Haemonchus contortus*: selection at a glutamate-gated chloride channel gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains. **Experimental Parasitology**, New York. v.190, 42-48, 1998.

CAMPBELL W. C.; BLAIR; LYNDIA S.; EGERTON, J. R. Unimpaired infectivity of the nematode *Haemonchus contortus* after freezing for 44 weeks in the presence of liquid nitrogen. **Journal of Parasitology**, Lawrence. v. 59, p. 425-427, 1973.

CAMPBELL, W. C.; THOMSON, B. M. Survival of nematode larvae after freezing over liquid nitrogen. **Australian Veterinary Journal**, Victoria. v.49, p.110-111, 1973.

CHAGAS, A. C. S.; KATIKI, L. M.; SILVA, I. C.; GIGLIOTI, R.; ESTEVES, S. N.; OLIVEIRA, M. C. S.; BARIONI Jr, W. *Haemonchus contortus*: A multiple-resistant Brazilian isolate and the costs for its characterization and maintenance for research use. **Parasitology international**, Amsterdam. v. 62, n.1, p. 1 – 6, 2013.

CHESSA, B.; PEREIRA, F.; ARNAUD, F.; AMORIM, A.; GOYACHE, F.; MAINLAND, I.; KAO, R. R.; PEMBERTON, J. M.; BERARDI, D.; STEAR, M. J.; ALBERTI, A.; PITTAU, M.; IANUZZI, L.; BANABAZI, M. H.; KAZWALA, R. R.; ZHANG, Y.; ARRANZ, J. J.; ALI, B. A.; WANG, Z.; UZUN, M.; DIONE, M. M.; OLSAKER, I.; LARS-ERIK, H.; SAARMA, U.; AHMAD, S.; MARZANOV, N.; EYTHORSDDOTTIR, E.; HOLLAND, M. J.; AJMONE-MARSAN, P.; BRUFORD, M. W.; KNATANEN, J.; SPENCER, T. E.; PALMARINI, M. Revealing the History of Sheep e Domestication using retrovirus integrations. **Science**, Washington. v. 324, n. 5926, p. 532-536, 2009.

COLES, G.C.; JACKSON, F.; POMROY, W.E.; PRICHARD, R.K.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SILVESTRE, A.; TAYLOR, M.A; VERCRUYSSSE, J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam. v. 136, p.167–185, 2006.

COLES, G, C.; SIMPKIN, K. G.; AND BRISCOE, M. G.; Routine cryopreservation of ruminant nematode larvae. **Research veterinary Science**, London. v.28, p. 391-392, 1980.

CONDER, G. A.; JOHNSON, S. S. Viability of Infective Larvae of *Haemonchus contortus*, *Ostertagia ostertagi* and *Trichostrongylus colubriformis* following exsheathment by various techniques. **Journal of Parasitology**, Lawrence. v. 82, p. 100-102, 1996.

CROWE, J. H. Anhydrobiosis: An unsolved problem. **American Naturalist**, Chicago. v. 105, n. 946, p. 563-573, 1971.

DENVIREDDY, R. V.; SWALUND, D. J.; OLIN, T.; VINCENT, W.; TROEDSON, M. H. T.; BISCHOF, J. C.; ROBERTS, K. P. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry. **Biology of Reproduction**, New York. v. 66, p. 222-231, 2002.

ECHEVARRIA, F. A. M.; TRINDADE, G. N. P. Anthelmintic resistance by *Haemonchus contortus* to ivermectin in Brazil. **Veterinary Record**, London. v.124, p. 147-148, 1989.

ECKERT, J. Alternativen zu Tierversuchen in der Parasitologie. **Alternativen zu Tierexperimenten**, Heidelberg. p. 53- 62, 1987 b.

ECKERT, J. Cryopreservation of Parasites. **Experientia**, Basel. v. 44, p.873-877, 1988.

ECKERT, J. Cryopreservation of parasites. **Zentralblatt für bakteriologie mikrobiologie und hygiene**, Stuttgart. v. 267, p.298-299, 1987a.

FERNANDES A. C.; HEROLD B.; MAIA H.; RAUTER A. M.; RODRIGUES J. A. R. **Guia IUPAC para a nomenclatura de compostos orgânicos**. Lisboa: Lidel, p. 220, 2002.

Getachew, T.; Dorchies, P.; Jacquet P. Trends and challenges in the effective and sustainable control of *Haemonchus contortus* infection in sheep. Review. **Parasite**, Paris. v. 14, n.1, p. 3 – 14, 2007.

GILL, J. H.; REDWIN, J. M. Cryopreservation of the first-stage larvae of trichostrongylid nematode parasites. **International Journal for Parasitology**, Oxford. v.25, p.1421-1426, 1995.

HAM, P. J.; TOWNSON, S.; JAMES, E. R.; BIANCO, A. E. An improved technique for the cryopreservation of *Onchocerca microfilariae*. **Parasitology**, Cambridge. v.83, p.139-146, 1981.

HUBÁLEK z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, New York. v. 46, p. 205-229, 2003.

HUBERT, J.; KERBOUEF, D. A High Efficiency Technique for the Long-Term reservation of Infective Nematode Larvae, **Canadian Journal Veterinary Research**, Ottawa. v. 61, p. 77-79, 1997.

IBGE, 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/tabelas_pdf/tab17.pdf>. Acesso em: 26/11/2012

JAMES, E. R. Cryopreservation of helminths. **Parasitology Today**, Cambridge. v. 1, n. 5, p. 134-139, 1985.

JAMES E. R.; GREEN, D. R. Manipulation of apoptosis in the host-parasite interaction, **Trends in parasitology**, Oxford. v. 20, n. 6, p. 280-287, 2004.

JAMES, E. R. Parasite cryopreservation by vitrification. **Cryobiology**, New York. v. 49, p. 201–210, 2004.

JAMES E. R.; PEACOCK R. Studies on the cryopreservation of *Dictyocaulus viviparus* (Nematoda) third-stage larvae. **Journal Helminthology**, Londres. v. 60, p. 65-73, 1986.

JAMES, E. R. **Protozoa and helminth parasites of man and animals.** In: Ashwood-Smith, M. J. & Farran t. J. (ed.), *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology.* Pitman Press, Bath, Avon, England. p. 155-185, 1980.

JAMES, E. R. *Schistosoma mansoni*: Cryopreservation of schistosomula by two-step addition of ethanedioi and rapid cooling. **Experimental Parasitology**, New York. v. 52, p. 105-116, 1981.

KASAI, M. Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: Development of ultrarapid vitrification. **Reproductive Medicine and Biology**, Tókió. v. 1, p. 1-9, 2002.

KATES, K. C. Survival on pasture of free-living stages of some common gastrointestinal nematodes of sheep. **Proceeding Of The Helminthological Society Of Washington**, Lawrence. v.17, p.39-58, 1950.

KEILIN, D. The Problem of Anabiosis or Latent Life: History and Current Concept. . **Proceeding Of The Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, London. v. 150, n.939, p. 149-191, 1959.

KELLY, J . D.; CAMPBELL, W. C.; WHITLOCK. H. V. Infectivity of *Ancylostoma caninum* larvae after freezing over liquid nitrogen. **Australian Veterinary Journal**, Victoria. v. 52, p. 141-143, 1976.

KENNETH B.; JANET M. Biochemical adaption for freezing tolerance in the wood frog, *Rana sylvatica*. **Journal Comparative Physiology**, Berlim. v. 155, p. 29-36, 1984.

KUMSA B.; ABEBE G. Multiple anthelmintic resistance on a goat farm in Hawassa (southern Ethiopia). **Tropical Animal Health and Production**, Edimburgo, v. 41, p. 62-65, 2009.

LUX HOPPE, E. G.; TESTI, A. Aspectos sanitários fundamentais à ovinocultura comercial. **Casa da Agricultura**, Campinas. ano 15, n. 3, p. 29 – 31, 2012.

MAZUR, P. Basic concepts in freezing cell. In: **Deep freezing of boar semen**. Proceedings. Uppsala, p.199-222, 1985.

MULLER R.; JAMES E.; ECKERT J.; POPIEL I.; ROSSI P. Cryopreservation of parasites. **Annales De Parasitologie Humaine Et Comparée**, Paris v. 66, p, 5-9, 1991.

Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. Estatísticas FAO, 2007. Disponível em: www.fao.org

PRICHARD, R. Anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam. v. 54, p. 259-268, 1994.

PURDY P. H.; A review on goat sperm cryopreservation. **Small Rumin Res**, Arkansas. v.63, p.215-225, 2006.

RENATA, C. V. T.; PRATES, M.; MARTINS, I.; NEIVA L. F. Criopreservação de Nematóides exóticos, **XXXVII Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, Bento Gonçalves, 2004.

REW, R. S.; CAMPBELL, W. C. Infectivity of *Haemonchus contortus* in sheep after freezing for ten years overliquid nitrogen. **Journal Parasitology**, Lawrence. v. 69, p. 251–252, 1983

SANGSTER, N. C. Managing parasiticide resistance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam. v. 98, 89-109, 2001.

SMITH, et al. Cryopreservation of the entomogenous nematode parasite *Steinernema feltiae* (= *Neoaplectana carpocapsae*). **Cryobiology**, New York. v. 27, p. 319-327, 1990.

SMITH, B. S.; HODGSON, A.; POPIEL, I.; MINTER, D. M.; JAMES, E. R. Cryopreservation of the entomogenous nematode parasite *Steinernema feltiae*. **Cryobiology**, New York. v. 27, p. 319-327, 1990.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. K.; MCCUE, P. M.; BRUEMMER, J. Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: Colorado State University. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**, Bulletin, n. 9, p. 80, 1999.

SOMMERVILLE, R. I. The exsheathing mechanism of nematode infective larvae. **Experimental Parasitology**, New York, v. 6, p. 18-30, 1957.

TAYLOR, M. A.; HUNT, K.R.; GOODYEAR, K.L. Anthelmintic resistance detection methods. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam. v. 103, p. 183-194, 2002.

VAN WYK, J.A.; GERBER, H.M.; AIVES, R.M.H. Cryopreservation of some common nematodes of ruminants for up to 11.3 years. **Onderstepoort Journal Veterinary Research**, Durbanville. v. 57, p. 1-6, 1990.

VAN WYK J.A.; GERBER H.M.; VAN ARDT W.P. Cryopreservation of the infective larvae of the common nematodes of ruminants. **Onderstepoort Journal Veterinary Research**, Durbanville. v. 44, p.173-194, 1977.

VAN WYK, J. A. Viability of nematode larvae after exsheathment with Sodium Hypochlorite. **Parasitology Today**, Cambridge. v. 14, n. 12, 1998.

VAN WYK, J. A.; GERBERB, H. M.; VILLIERS, F. J. Parenterally administered gastrointestinal nematode infective larvae viable after more than 15 years in liquid nitrogen. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 88, p. 239–247, 2000.

VIANA, J. G. A. Panorama Geral da Ovinocultura no Mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, Porto Alegre. n. 12, v. 4, 2008.

VILMAR, G.; RENATA, C. V. T.; MARLI, P.; IRENE, M. Aplicação da técnica de criopreservação para espécies de *Pratylenchus*. **XXVII Congresso Brasileiro de Nematologia**, Goiânia, 2007.

WEINSTEIN P. P.; JONES M. F. The in vitro cultivation of *Nippostrongylus muris* to the adult stage. **Journal Parasitology**, Lawrence. v. 42, p. 215-236, 1956.

WERTEJUK, M. Influence of environmental conditions on the invasive larvae of gastrointestinal nematodes of sheep. **Acta parasitologica**, Warszawa. n. 7, p. 315-342, 1959.

WHARTON, D. A. **A Functional Biology of Nematodes**. Croom Helm, London and Sydney, p. 192, 1986.

WHARTON, D. A.; ALLAN, G. S. Cold tolerance mechanisms of the free-living stages of *trichostrongylus colubriformis*. **Journal experimental Biology**, London. v. 145, p. 353-369, 1989.

WOOD, I.B.; AMARAL, N. K.; BAIRDEN, K.; DUNCAN, J. L.; KASSAI, T.; MALONE, J. B. JR.; PANKAVIC, J. A.; REINECKE, R. K.; SLOCOMBE, O.; TAYLOR, S. M.; VERCRUYSSSE, J. World association for the advancement of veterinary parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam. v. 58, p. 181-213, 1995.