



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS (UFG)
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA (EVZ)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

GABRIEL HENRIQUE SANTOS

**Avaliação do potencial do peptídeo indolicidina na
descontaminação de sêmen bovino**

GOIÂNIA,
2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES
E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Gabriel Henrique Santos

3. Título do trabalho

Avaliação do potencial do peptídeo indolicidina na descontaminação de sêmen bovino

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
 - b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
- O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Rocha Lino De Souza, Professor do Magistério Superior**, em 21/04/2024, às 16:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gabriel Henrique Santos, Usuário Externo**, em 26/04/2024, às 13:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4522136** e o código CRC **E01E272F**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Gabriel Henrique Santos

3. Título do trabalho

Avaliação do potencial do peptídeo indolicidina na descontaminação de sêmen bovino

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Rocha Lino De Souza, Professor do Magistério Superior**, em 31/10/2024, às 19:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gabriel Henrique Santos, Usuário Externo**, em 04/11/2024, às 12:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4920223** e o código CRC **67D93B9A**.

GABRIEL HENRIQUE SANTOS

**Avaliação do potencial do peptídeo indolicidina na
descontaminação de sêmen bovino**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG), como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Saúde Animal, Tecnologia e Segurança de alimentos

Linha de pesquisa: Tecnologias aplicadas a ciência animal e aos alimentos

Orientador: Professor Doutor Guilherme Rocha Lino de Souza - ICB/UFG

Coorientador: Professor Doutor Esteban Nicolás Lorenzón - UFJ

Professora Doutora Paula Maria Pires do Nascimento Penido - EVZ/UFG

GOIÂNIA,
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Santos, Gabriel Henrique

Avaliação do potencial do peptídeo indolicidina na descontaminação de sêmen bovino [manuscrito] / Gabriel Henrique Santos. - 2021. xv, 45 f.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza; co orientador Dr. Esteban Nicolás Lorenzón; co-orientador Dr. Paula Maria Pires do Nascimento Penido .

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2021.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. BoHV-1. 2. Leptospira. 3. peptídeos bioativos. 4. inativação viral. I. Souza, Guilherme Rocha Lino de, orient. II. Título.

CDU 639.09



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº **572** da sessão de Defesa de Dissertação de **Gabriel Henrique Santos**, que confere o título de Mestre em **Ciência Animal**, na área de concentração em **Saúde Animal, Tecnologia e Segurança de Alimentos**.

Aos **quatro dias do mês de março de dois mil e vinte e um** a partir das **14h00min**, por meio de videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada **“Avaliação do potencial do peptídeo indolicidina na descontaminação de sêmen bovino”**. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, **Prof. Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza (ICB/UFG)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Prof.ª Dr.ª Maria Lúcia Gambarini (EVZ/UFG)**, membro titular externo ao programa; **Prof. Dr. Álvaro Ferreira Júnior (EVZ/UFG)**, membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca **não** sugeriu de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo **Prof. Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos **quatro dias do mês de março de dois mil e vinte e um**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Rocha Lino De Souza, Professor do Magistério Superior**, em 04/03/2021, às 16:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Lucia Gambarini, Professor do Magistério Superior**, em 04/03/2021, às 17:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Álvaro Ferreira Júnior, Professor do Magistério Superior**, em 04/03/2021, às 19:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1908862** e o código CRC **8B4326AC**.

Referência: Processo nº 23070.003402/2021-71

SEI nº 1908862

Projeto de pesquisa intitulado: Avaliação da atividade antiviral do peptídeo de indolicidina e seu potencial na desinfecção de sêmen bovino

RESUMO

O interesse crescente pela inseminação artificial em bovinos tem levado os pesquisadores a estudarem técnicas que viabilizem a conservação de sêmen sem comprometer a sua capacidade de fertilização. Esse projeto avaliou a atividade antiviral e antibacteriana do peptídeo indolicidina e seu potencial uso como agente antiviral de um produto de alto valor comercial, que é o sêmen de bovinos selecionados. Primeiramente foi avaliada a atividade antibacteriana do peptídeo de indolicidina frente a bactéria *E. coli* nas concentrações descritas na literatura. Baseando-se na *Escherichia coli*, foi avaliada a atividade antibacteriana do peptídeo nas concentrações 10 μM , 20 μM , 30 μM frente a *Leptospira interrogans*. Posteriormente, foi testado o peptídeo nas concentrações 10 μM , 20 μM , 30 μM sob as células em cultura (MDBK), no qual, não foi constatado nenhuma alteração da morfologia e viabilidade celular. Logo, foi analisada a atividade antiviral do peptídeo em células MDBK infectadas artificialmente com o alfa herpesvírus bovino do tipo-1 (BoHV-1), no qual, o peptídeo foi incubado nas concentrações 4 μM , 6 μM , 8 μM , 10 μM , 20 μM e 30 μM , paralelamente, foi avaliada a inocuidade do peptídeo frente ao sêmen bovino segundo parâmetros de qualidade. O peptídeo de indolicidina apresentou inocuidade frente ao sêmen e as células em cultura. Nas bactérias a melhor concentração identificada foi 30 μM , enquanto no BoHV-1 a melhor concentração foi 8 μM . Até o presente momento nenhuma metodologia foi descrita para uma inativação eficiente do BoHV-1, nem mesmo para a minimização da concentração viral em sêmen bovino, o que torna este projeto interessante para a comercialização de sêmen no mercado nacional e internacional.

Palavras-chave: BoHV-1, *Leptospira*, peptídeos bioativos, inativação viral.

ABSTRACT

The growing interest in artificial insemination in cattle has led researchers to study techniques that make it possible to preserve semen without compromising its ability to fertilize. This project evaluated the antiviral and antibacterial activity of the peptide indolicidin and its potential use as an antiviral agent for a product of high commercial value, which is the semen of selected cattle. Firstly, the antibacterial activity of the indolicidin peptide was evaluated against the bacterium *E. coli* at the concentrations described in the literature. Based on *Escherichia coli*, the antibacterial activity of the peptide was evaluated at concentrations of 10 μM , 20 μM and 30 μM against *Leptospira interrogans*. Subsequently, the peptide was tested at concentrations of 10 μM , 20 μM and 30 μM on cultured cells (MDBK), in which no changes in cell morphology or viability were observed. The antiviral activity of the peptide was then analyzed in MDBK cells artificially infected with bovine alphaherpesvirus type-1 (BoHV-1), in which the peptide was incubated at concentrations of 4 μM , 6 μM , 8 μM , 10 μM , 20 μM and 30 μM , and the safety of the peptide against bovine semen was evaluated according to quality parameters. The indolicidin peptide was safe against semen and cultured cells. In bacteria, the best concentration identified was 30 μM , while in BoHV-1 the best concentration was 8 μM . To date, no methodology has been described for the efficient inactivation of BoHV-1, nor even for minimizing the viral concentration in bovine semen, which makes this project interesting for the commercialization of semen on the national and international markets.

Keywords: BoHV-1, *Leptospira*, bioactive peptides, viral inactivation

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha sincera gratidão a todas as pessoas que tornaram possível a conclusão desta dissertação.

Em primeiro lugar, desejo expressar minha sincera admiração e gratidão ao Prof. Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza. Sua orientação perspicaz, compromisso e encorajamento constante foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Suas contribuições não apenas enriqueceram este meu trabalho, mas também moldaram minha trajetória acadêmica de maneira significativa.

À minha amiga e colega de bancada, Dr^a Taise Maria dos Anjos Oliveira, gostaria de expressar minha profunda gratidão. Seu apoio, compreensão e conselhos ao longo deste percurso foram verdadeiramente inestimáveis.

Não posso deixar de mencionar à Universidade Federal de Goiás, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), cujo generoso financiamento tornou possível minha dedicação integral a esta pesquisa.

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer a minha família e amigos pelo amor incondicional, apoio inabalável e compreensão durante os momentos desafiadores. Seu encorajamento constante foi a força motriz por trás desta jornada acadêmica.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Arquitetura do vírion do BoHV-1 em uma microscopia eletrônica de transmissão e um modelo esquemático. 5
- Figura 2 - Ciclo de replicação lítica do HSV como modelo esquemático para replicação do BoHV-1 devido as características inerentes da família *Herpesviridae*. 6
- Figura 3 - Modelo esquemático da maturação e saída do BoHV-1 das células hospedeiras. 7
- Figura 4 - Trafego neural do BoHV-1 durante a entrada e saída no sistema nervoso periférico. 8
- Figura 5 - Microscopia eletrônica da *Leptospira sp.* Fonte da imagem: Drug Target Review 10
- Figura 6 - Modelos de ruptura da membrana bacteriana por AMPs. (A) Ruptura da membrana pelo modelo de poros tireoidais. (B) Ruptura da membrana pelo modelo de barrel-stave. (C) Ruptura da membrana pelo mecanismo do tapete. 13
- Figura 7 - Mecanismo de Inibição da replicação viral por meio da ligação peptídica na subunidade PB2 da RNA polimerase viral. 15
- Figura 8 - Estrutura primária da Indolicidina 15
- Figura 9 - Perfil cromatográfico do peptídeo após a purificação. 24
- Figura 10 - Espectro de massas do peptídeo puro. Os picos de 954,00, 636,33 e 477,50 correspondem à relação carga/massa (m/z) do peptídeo com 2, 3 e 4 cargas positivas, respectivamente. 25
- Figura 11 - Viabilidade de E.coli em meio de cultura LB após cultivo overnight. C – controle positivo (amostra não tratada); Inicial – OD inicial (meio de cultura + bactéria). * significativo (p<0,05). ns - não significativo. 26
- Figura 12 - Viabilidade da *Leptospira* em meio de cultura utilizando dois parâmetros de avaliação. A - OD a 600nm ao final de sete dias de cultivo em meio de cultura nas 3 concentrações (10, 20 e 30 μ M). B – avaliação por score da viabilidade (motilidade e morte de *Leptospiras*) em microscopia de campo escuro ao final de sete dias de cultivo nas 3 concentrações (10, 20 e 30 μ M). * significativo (p<0,05). ns - não significativo. 27
- Figura 13 - Microscopia de campo escuro do efeito da indolicidina sob *Leptospira interrogans*: Painel A – Cultura de *Leptospira* sem tratamento (controle); Painel B – Cultura de *Leptospira* tratada com 10 μ M do peptídeo; Painel C – Cultura de *Leptospira* tratada com 20 μ M do peptídeo; Painel D – Cultura de *Leptospira* tratada com 30 μ M do peptídeo. 28
- Figura 14 - Efeito de diferentes concentrações do peptídeo Indolicidina na viabilidade do vírus BoHV-1 em cultura de célula MDBK (gráfico). Painel A – microscopia do CPE característico

da infecção de células MDBK pelo vírus (vírus vivo) observado na amostra controle (C). – Painel B – microscopia das células MDBK sem CPE – característico da ausência de infecção viral (vírus inativado com peptídeo na concentração de 10 μ M). Painel C – microscopia das células MDBK tratadas com o peptídeo sem qualquer alteração morfológica detectável. * significativo ($p < 0,05$). ns - não significativo. 29

Figura 15 - Efeito da Indolicidina nas concentrações de 4, 6, 8 e 10 μ M sobre a viabilidade do vírus BoHV-1 em cultura de célula MDBK. 30

Figura 16 - Microscopia (20X) do efeito da Indolicidina na viabilidade do BoHV-1 em cultura de MDBK: Painel A – Controle negativo (cultura pura - sem CPE); Painel B – CPE característico da infecção de células MDBK pelo vírus (vírus vivo) observado na amostra controle C (sem tratamento com peptídeo); Painel C – células MDBK tratadas com 6 μ M de peptídeo, exibindo menor CPE; Painel D – células MDBK tratadas com 8 μ M de peptídeo indicando menor CPE. 30

Figura 17 - Teste de inocuidade do peptídeo (30 μ M) em sêmen. A – Motilidade total do espermatozoide expressos em porcentagem. B – Vigor de sêmen expressos em score. C1, C2 e C3 – amostras controle (não tratado com peptídeo) de sêmen fresco de três touros de raças diferentes. S1, S2 e S3 – amostras de sêmen dos mesmos touros tratadas com o peptídeo. ns - não significativo ($p < 0,05$). 32

Figura 18 - Efeito da Indolicidina nas concentrações de 10 e 30 μ M em sêmen artificialmente infectado pelo BoHV-1, observando a viabilidade do vírus em cultura de célula MDBK. C – controle não tratado com o peptídeo. 10 e 30 μ M – concentrações da indolicidina. * significativo ($p < 0,05$). 33

Figura 19 - Microscopia do efeito da Indolicidina na viabilidade do sêmen artificialmente infectado pelo BoHV-1 em cultura de MDBK: Painel A – Controle negativo da cultura sem CPE; Painel B – CPE característico da infecção de células MDBK pelo vírus (sem tratamento com peptídeo); Painel C – células MDBK tratadas com 10 μ M de peptídeo, exibindo CPE na titulação $10^{-2,5}$ TCID₅₀/mL; Painel D – células MDBK tratadas com 30 μ M de peptídeo não indicando CPE no centro do micropoço. 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teste da inocuidade do peptídeo no sêmen avaliados pelo CASA, no qual, é dado um score em porcentagem para motilidade dos espermatozoides, avaliando assim, o efeito espermicida do peptídeo. Controle – sêmen fresco (não tratado pelo peptídeo) de três touros de raças diferentes. 30 e 100 μM – sêmen incubado com o peptídeo por 30 minutos. 32

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

μ M - Micro Molar
AMG531 - Agonista do Receptor de Trombopeietina Romiplostim
AMPs - Peptídeos Antimicrobianos
BoHV-1 - Alfaherpesvírus bovino-1
BoHV-5 - Alfaherpesvírus bovino-5
BP - Pares de base
CASA - Análise computadorizada de espermatozoides
CPE - Efeito citopático
DCM - Diclorometano
DIC - N,N'-diisopropilcarbodiimida
DMF - Dimetilformamida
EM - Espectrometria de massa
EMJH - Meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
GP - Glicoproteínas
GT - Gânglios trigêmeos
HIV - Vírus da imunodeficiência humana
HOBt - Hidroxibenzotriazol
HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HSV-1 - Alfaherpesvírus simples humano tipo 1
HSV-2 - Alfaherpesvírus simples humano tipo 2
HSV-3 - Alfaherpesvírus simples humano tipo 3
IA - Inseminação artificial
IBR - Rinotraqueite infecciosa bovina
IFN - Interferon
IPB - Balanopostite postular infecciosa
IPV - Vulvovaginite postular infecciosa
MDBK - Células Madin-Darby Bovine Kidney
OIE - Organização Mundial de Saúde Animal
PCR - Reação em cadeia da DNA polimerase
SFS - Síntese em Fase de Solução (SFS) "
SPFS - Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS)"
TFA - Ácido trifluoroacético
TNF - Fator de necrose tumoral
UE - União europeia
UFC - Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1.	xvi	
2.	3	
2.1.	3	
	2.1.1.	4
	2.1.2.	5
	2.1.3.	8
	2.1.4.	9
2.2.	9	
	2.2.1.	10
2.3.	11	
	2.3.1.	11
	2.3.2.	12
2.4.	15	
3.	17	
3.1.	17	
3.2.	17	
4.	18	
5.	19	
5.1.	19	
5.2.	20	
5.3.	20	
5.4.	20	
5.5.	21	
5.6.	21	
5.7.	21	

5.8. 22

5.9. 22

5.10. 23

5.11. 23

6. 24

6.1. 24

6.2. 25

6.3. 28

6.4. 31

6.5. 33

7. 35

REFERÊNCIAS

36

ANEXO 1 - Parecer da Comissão de Ética no uso de Animais

44

1. INTRODUÇÃO

A eficiência reprodutiva é um dos principais fatores envolvidos na viabilidade econômica do setor de criação de animais. Estima-se que as perdas econômicas ocasionadas pelas infecções reprodutivas somam mais de dez bilhões de dólares por ano em todo o mundo¹.

A aplicação de técnicas apropriadas para conservação de sêmen bovino é de grande importância para reprodução animal e novos estudos vêm ganhando espaço. A minimização da propagação de patógenos possibilita o aproveitamento de animais que dispõem de alto mérito genético para comercialização em mercados nacionais e internacionais, assegurando a biossegurança e qualidade do produto².

Segundo a Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA), a comercialização de sêmen de gado de corte e leite no Brasil cresceu 18% em 2019. Juntos, os dois segmentos venderam 16.436.741 doses de sêmen. A importação de sêmen também cresceu e chegou a 8.813.852 de doses. Já as exportações cresceram em relação aos demais anos, chegando a 485.340 doses exportadas e a produção nacional de sêmen foi de 10.940.746 doses³⁻⁵.

Assim, é possível observar que a pecuária vem investindo fortemente nas técnicas de inseminação artificial (IA), a produção *in vitro* de embriões (PIVE) e a transferência de embriões têm impulsionado o melhoramento genético e a eficiência reprodutiva em todo o mundo, inclusive no Brasil. Porém, os investimentos em tecnologias de nada adiantam se os animais ou rebanhos possuem problemas sanitários, como, por exemplo, enfermidades que podem ser transmitidas por sêmen ou embriões, e que provocam, entre outros males, abortamentos, repetição de cio, infertilidade e esterilidade. Se considerarmos um preço médio de US\$15/dose, estamos diante de um mercado potencial de 840 milhões de dólares

Buscando garantir a qualidade sanitária do sêmen industrializado, as centrais de inseminação artificial realizam tratamentos celulares utilizando apenas antibióticos (normalmente nos diluentes comerciais) antes dos procedimentos de inseminação artificial e transferência de embriões. Além disso, alguns procedimentos como, isolamento de microrganismos em meios de cultura, inoculação em animais susceptíveis ou diagnósticos através de técnicas sorológicas, são realizadas para garantir o controle sanitário. Estas técnicas, entretanto, apresentam limitações principalmente de ordem prática, resultantes da sua complexidade, da infraestrutura necessária à sua realização, ou do tempo necessário para a detecção e caracterização dos agentes patogênicos nos procedimentos laboratoriais.

O uso dos antibióticos de amplo espectro tem se mostrado muitas vezes ineficaz no controle da proliferação microbiana, devido ao aumento da resistência dos microrganismos a esses compostos. Ainda assim, sua utilização vem crescendo a cada década, com a finalidade de combater as numerosas doenças existentes nos animais. Além disso, a indicação do uso de antibióticos se limita somente as bactérias, não sendo eficazes em diversos outros microrganismos de interesse reprodutivo presentes no sêmen, como os vírus, protozoários ou fungos oportunistas em meio de cultura^{6,7}. Técnicas atualmente descritas para a lavagem do sêmen, como o gradiente descontínuo de Percoll[®] e o *swim-up* são utilizadas na separação de espermatozoides de alta mobilidade para uso em técnicas reprodutivas e reduzir contaminantes microbianos associados ao sêmen. Contudo, esses procedimentos de lavagem podem reduzir a viabilidade espermática⁸.

Entre os principais agentes virais isolados no sêmen bovino está o alfa herpesvírus bovino-1 (BoHV-1). O BoHV-1 é um vírus da família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*⁹. O vírus é constituído por uma cadeia dupla de DNA fechado em um nucleocapsídeo icosaédrico e rodeado por uma membrana lipídica derivada do hospedeiro com glicoproteínas virais incorporadas¹⁰.

Neste contexto, os peptídeos bioativos com ação antimicrobiana e antiviral são uma alternativa interessante para a desinfecção de materiais biológicos ou subprodutos de origem animal. Seu modo de ação faz parte da tática defensiva do hospedeiro frente à um determinado agente infeccioso e foram identificados em diversos seres vivos, tais como, mamíferos, aracnídeos, anfíbios, plantas, fungos e até organismos unicelulares. Os peptídeos geralmente são moléculas curtas, contendo de 8 a 50 aminoácidos, com baixo peso molecular, em sua maioria catiônicos, anfipáticos, podendo agir em um amplo espectro de microrganismos tais como, os vírus, fungos, protozoários, bactérias Gram-negativa e Gram-positivas¹¹.

Entre os inúmeros peptídeos bioativos descritos na literatura, o peptídeo de indolicidina chama a atenção pela sua capacidade de inibir tanto bactérias quanto alguns vírus. A indolicidina é um peptídeo natural, pertencente à família das catelicidinas e é isolado em neutrófilos bovinos. É constituído por 13 resíduos de aminoácidos, sendo 5 triptofanos. O espectro de atuação desta molécula é abrangente, incluindo bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, além da capacidade antiviral¹². Logo, como objetivo deste trabalho, a avaliação da viabilidade deste peptídeo para a desinfecção de sêmen mostra-se importante como alternativa aos antibióticos tradicionalmente empregados pois, além de possibilitar a inativação de diferentes classes de patógenos em uma única dose, dificulta a seleção e/ou manutenção de cepas resistentes.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Alfaherpesvírus bovino-1

O alfaherpesvírus bovino-1 (BoHV-1) é um vírus de fita dupla de DNA que infecta os tratos respiratório e genital de bovinos e búfalos, causando os sintomas clínicos que incluem rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), vulvovaginite postular infecciosa em vacas e novilhas (IPV), balanopostite postular infecciosa em touros (IPB), conjuntivite, enterite, redução da produção de leite e diminuição da eficiência alimentar, levando à uma importante diminuição no ganho de peso¹³. Além disso, o BoHV-1 está relacionado problemas reprodutivos em vacas, como aumento do número de natimortos e aborto¹⁴. Mesmo com baixa taxa de mortalidade, os animais acometidos pela infecção podem ser alvos de doenças secundárias e oportunistas¹⁵.

Devido a sua capacidade de entrar em latência, touros infectados pelo BoHV-1 tornam-se portadores do vírus ao longo da vida e transmitem o vírus intermitentemente ao sêmen^{16,17}. Logo, o vírus tem uma alta prevalência na população bovina e estima-se que cerca de 50 a 90% dos rebanhos brasileiros sejam infectados pelo BoHV-1^{14,18,19}. Para detecção do vírus no sêmen bovino algumas técnicas podem ser empregadas. O isolamento do vírus em cultura celular é considerado o padrão-ouro para detecção do BoHV-1 no sêmen, porém essa técnica possui baixa sensibilidade, é cara e laboriosa²⁰. Atualmente, o diagnóstico molecular vem sendo amplamente e utilizado por meio da técnica de reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) em suas várias formas para a detecção do BoHV-1 em sêmen bovino, porém essas técnicas necessitam de equipamentos e reagentes caros e um laboratório para realização²¹.

O principal método de erradicação e tratamento do BoHV-1 consiste na vacinação dos rebanhos em locais com altas taxas de prevalência^{13,22}, porém, até o momento, não existe um protocolo para a descontaminação de vírus em sêmen bovino.

Mesmo com baixa mortalidade, o BoHV-1 é listado na Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) como agente causador de doença notificável, demonstrando sua importância global com consequências para o comércio e/ou trânsito de animais e subprodutos de origem animal, sendo considerada uma importante doença na União Europeia (UE)^{15,23,24}.

Recentemente, diversos países da UE implementaram programas de erradicação do BoHV-1, facilitando a comercialização de gado, sêmen e embriões entre os países membros. Logo, os países livres do vírus proibem a entrada de animais e insumos contaminados^{15,23}. Como os rebanhos brasileiros apresentam altas taxas de prevalência do BoHV-1 mesmo com a vacina¹⁸, já que a vacinação não é compulsória, pode-se inferir que o sêmen brasileiro é um

possível vetor do vírus, prejudicando sua comercialização com os países do bloco europeu. Assim, métodos para rápida triagem e descontaminação viral do sêmen merecem atenção por parte dos pesquisadores brasileiros, com o objetivo de minimizar as sanções impostas às exportações, aumentando a possibilidade de negócios com diversos outros países.

2.1.1. Classificação do BoHV-1

O BoHV-1 pertence ao Gênero *Varicellovirus* na subfamília *Alphaherpesvirinae* da Família *Herpesviridae* da Ordem *Herpesvirales*²⁵. Baseando-se em análises genéticas e antigênicas encontram-se três subtipos bem definidos de BoHV-1: BoHV-1.1, BoHV-1.2a e BoHV-1.2b^{26,27}. Existia também os subtipos BoHV-1.3a e BoHV-1.3b, contudo, esses subtipos atualmente compõem uma espécie separada denominada *alfaherpesvírus bovino-5* (BoHV-5)^{27,28}.

Os isolados do subtipo BoHV-1.1 são preponderantes na Europa, América do Norte ou América do Sul, sendo esse subtipo regularmente detectado no trato respiratório de fetos abortados e em bovinos acometidos por IBR. As cepas isoladas do subtipo BoHV-1.2a são predominantes no Brasil e são relacionadas as infecções respiratórias e no trato genital, abrangendo IBR, IPV, IPB e abortos²⁹. Os isolados do subtipo BoHV-1.2b são constantemente isolados dos bovinos na Austrália ou na Europa, sendo correlacionado com doenças respiratórias, IPV e IPB³⁰.

Como parte da família *Herpesviridae*, o vírion do BoHV-1 tem aproximadamente 200 a 300 nm e segue a mesma arquitetura que os demais membros da família (Figura 1): um núcleo acomodando um DNA genômico linear de fita dupla, capsídeo icosaédrico com 162 capsômeros, um envelope viral formado por bicamada lipídica oriunda do próprio hospedeiro com glicoproteínas virais incorporadas e proteínas de tegumento preenchendo o espaço entre envelope e capsídeo^{28,29,31}. Como parte da família *Herpesviridae*, algumas funções ocorrem de modo semelhante, como a transcrição do genoma e montagem do capsídeo no núcleo da célula hospedeira, produção da progênie infecciosa que leva a apoptose da célula hospedeira, capacidade de permanecer latente, enzimas para síntese de DNA e proteínas conservadas em toda família²⁸.

Assim como os outros membros da subfamília *Alphaherpesvirinae*, o BoHV-1 é denotado com uma faixa variável de hospedeiros (diferentes espécies), ciclo reprodutivo curto, infecção lítica nas células do hospedeiro e tendência a estabelecer latência nos gânglios

sensoriais periféricos³². Como integrante do gênero *Varicellovirus*, o BoHV-1 apresenta amplo tropismo aos tecidos²⁸.

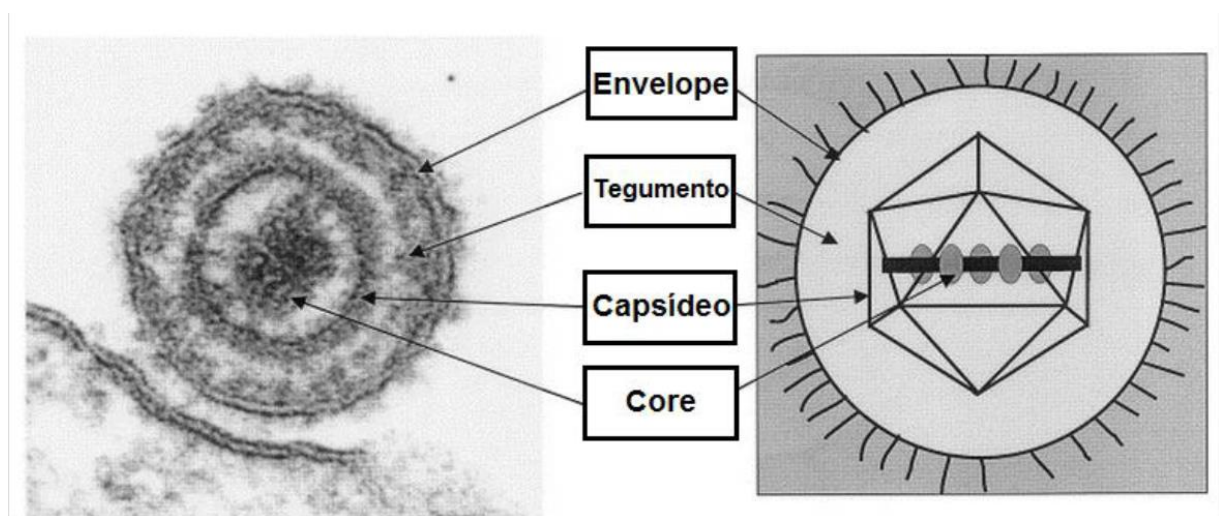


Figura 1 - Arquitetura do vírion do BoHV-1 em uma microscopia eletrônica de transmissão e um modelo esquemático.

Adaptado: Mettenleiter³³.

2.1.2. Ciclo de replicação do BoHV-1 na célula hospedeira

O BoHV-1 é disseminado pelo contato direto entre animais ou aerossóis em distancias curtas, nas mucosas do trato respiratório superior, trato genital ou da conjuntiva. Além disso, o acasalamento pode transmitir o patógeno por meio do sêmen infectado, assim como pela inseminação artificial¹⁰. Geralmente, as primeiras células infectadas são as células epiteliais ou os linfócitos T, no qual ocorre a ligação da proteína gC, presente no envelope viral, com os glicosaminoglicanos da membrana da célula hospedeira. Seguido da ligação da proteína gD a receptores celulares específicos (Figura 2). No caso do BoHV-1, essa ligação ocorre apenas com a nectina-1 (uma proteína membro da superfamília das imunoglobulinas) e após a interação de alta afinidade da gD com os receptores celulares, a partícula viral se funde com a membrana plasmática da célula. Este processo de fusão conta com o auxílio de mais quatro GPs: gD, gB, gH e gL³⁴.

Após entrar no citosol, as partículas virais são transportadas para o núcleo da célula hospedeira por meio de um complexo motor associado aos microtúbulos, adentrando o núcleo através dos poros presentes e liberando o DNA viral para a replicação. Assim que a partícula viral adentra a célula, proteínas tegumentares virais são liberadas no citosol, interagindo com o ambiente e minimizando a resposta da célula frente ao vírus (Figura 3). No núcleo a DNA

polimerase viral é sintetizada e começa a replicação do DNA viral, assim como a produção de mRNA viral que dará origem aos diversos componentes que formam a partícula viral³⁴.

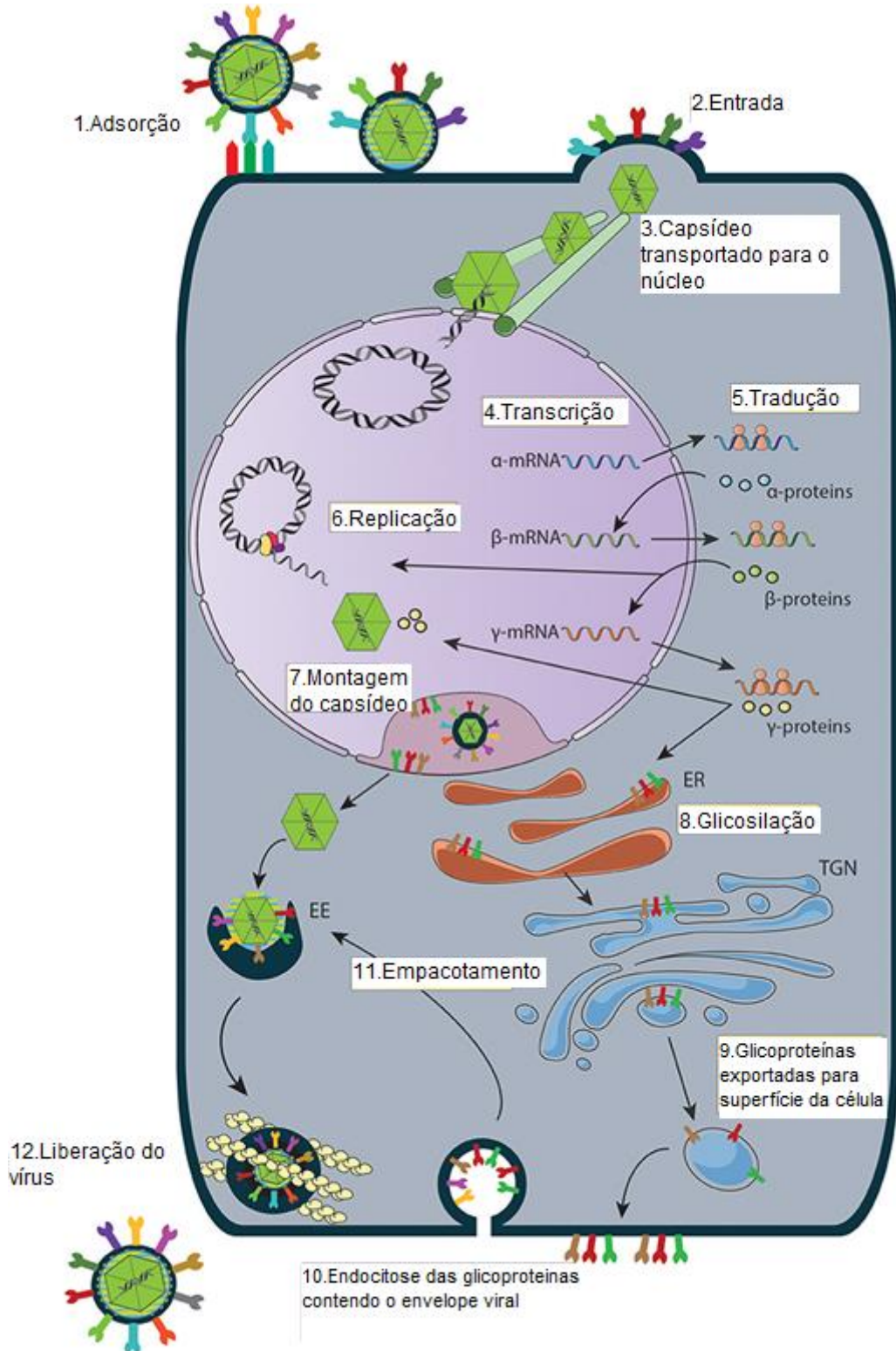


Figura 2 - Ciclo de replicação lítica do HSV como modelo esquemático para replicação do BoHV-1 devido às características inerentes da família *Herpesviridae*. Adaptado: Ibáñez et al.³⁵

A montagem do vírion ocorre com as subunidades do capsídeo agrupando-se em um molde dentro do núcleo da célula hospedeira para formar uma partícula intermediária do capsídeo. Durante o empacotamento do DNA viral dentro do capsídeo ocorre a maturação da partícula viral, assim que o BoHV-1 amadurece, os capsídeos deixam o núcleo para receber o envelope primário. No momento em que o capsídeo funde-se com a membrana externa do núcleo, ele perde o envelope primário, liberando somente o capsídeo no citosol. Já no citosol, os capsídeos recebem as proteínas do tegumento e o envelope secundário, provavelmente derivadas do complexo de Golgi repleto de proteínas virais e proteínas do tegumento externo, gerando o vírion maduro (Figura 3)³⁶. Por fim, a partícula viral funde-se a membrana plasmática da célula hospedeira, levando a morte celular, em partes devido a apoptose, que é induzida por membros da família Bcl-2 nos estágios finais da infecção ativando a via das caspases³⁷.

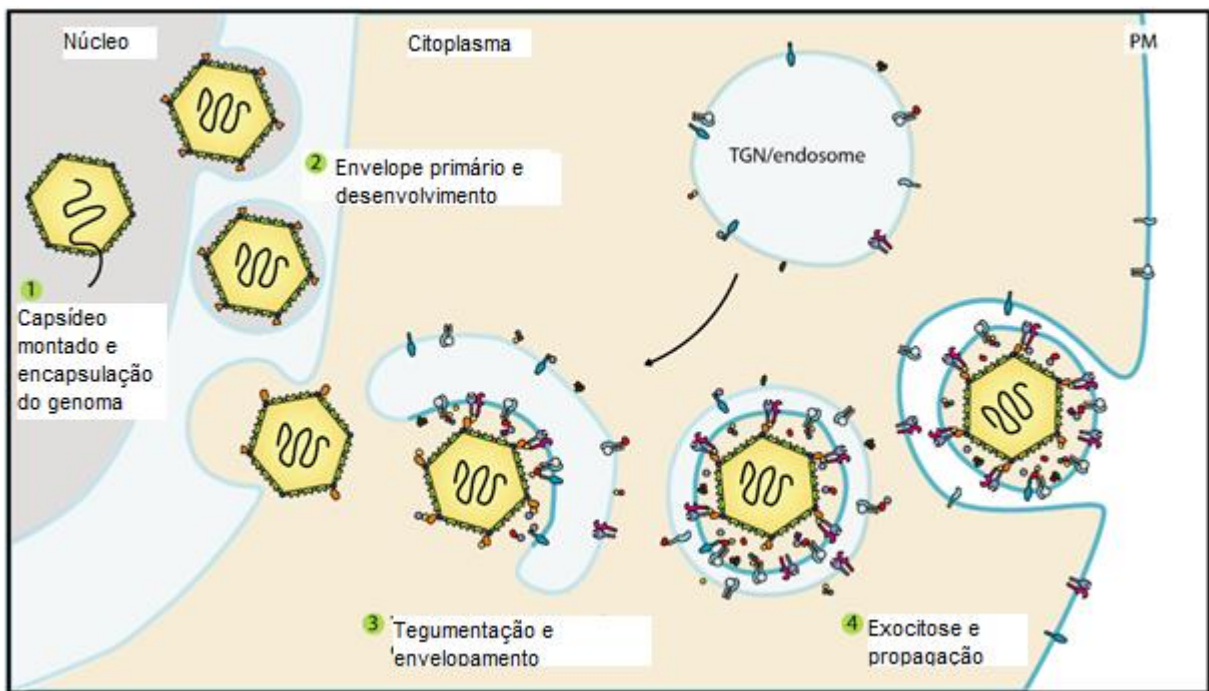


Figura 3 - Modelo esquemático da maturação e saída do BoHV-1 das células hospedeiras.
Adaptado: Owen, Crump e Graham³⁶

Após a destruição da célula hospedeira, as partículas virais são liberadas para infectar novas células e novos hospedeiros, principalmente por meio da dispersão de suas partículas na mucosa nasal e no sêmen.

2.1.3. Latência

Estabelecer latência e se reativar são capacidades cruciais para transmissão do BoHV-1. Após a infecção aguda nas mucosas da cavidade oral, nasal ou ocular, o BoHV-1 adentra o sistema nervoso periférico por meio do contato de célula-célula, sendo o local primário da latência os neurônios sensoriais nos gânglios trigêmeos (GT). O material genético do vírus é identificado de 2 a 6 dias após a infecção no GT. E a sua atividade lítica é encerrada e os neurônios infectados abrigam o genoma viral, estabelecendo assim a latência (Figura 4)³⁸.

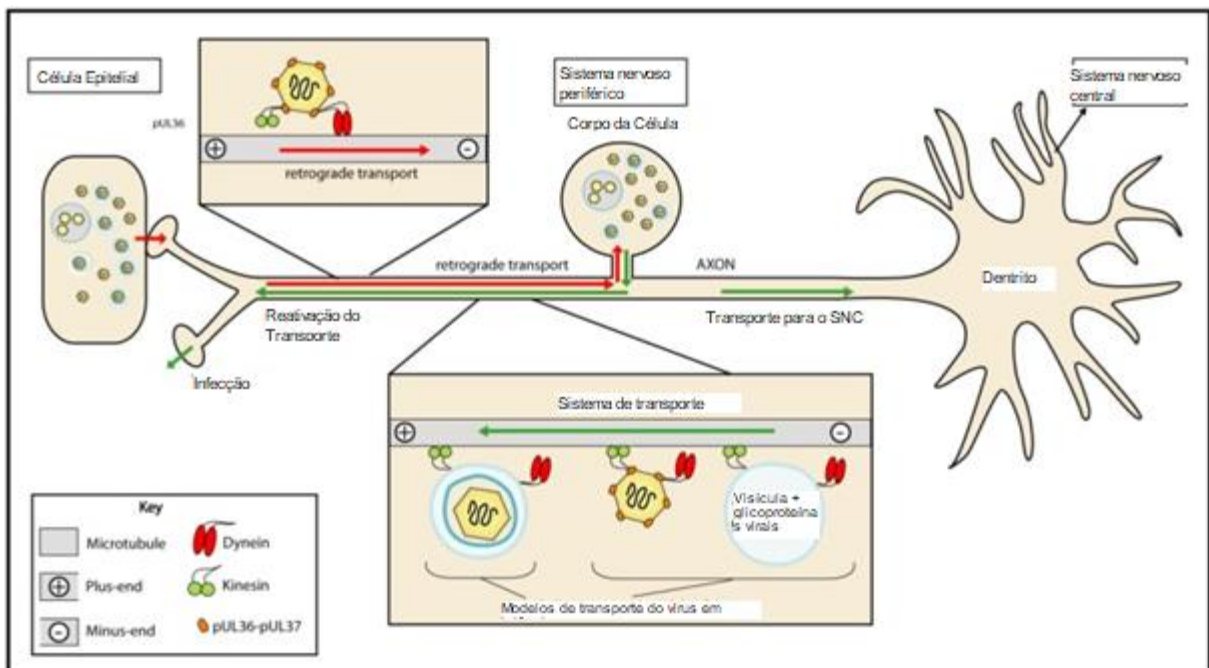


Figura 4 - Tráfego neural do BoHV-1 durante a entrada e saída no sistema nervoso periférico.

Fonte: Owen, Crump e Graham.³⁶

Depois do hospedeiro se estressar ou ser suprimido imunologicamente, dexametasona mimetiza o estresse *in vitro*, o BoHV-1 é reativado e as partículas virais infecciosas são conduzidas intra-axonalmente aos tecidos periféricos novamente, podendo promover a apoptose de células do GT em bezerros infectados³⁹⁻⁴¹. Uma característica específica do BoHV-1, é que o vírus não migra ao sistema nervoso central após a latência, diferente do BoHV-5 que é conhecido pelos danos neurológicos ao sistema nervoso central³⁴.

2.1.4. Transmissão do BoHV-1 através do sêmen bovino

No sêmen bovino o patógeno viral majoritariamente encontrado é o BoHV-1, podendo ser transmitido pela monta natural ou pela inseminação artificial. Os touros com infecção genital do BoHV-1, tem a partícula viral se replicando no prepúcio, pênis e provavelmente na porção distante da uretra, no qual, possivelmente o sêmen é contaminado pelo contato com a mucosa infectada com partículas virais^{21,42}. Logo, o sêmen é um excelente vetor para o BoHV-1, podendo ser transmitido mesmo após o congelamento e descongelamento do sêmen, sendo um importante vetor da doença por meio da inseminação artificial⁴³⁻⁴⁵.

2.2. *Leptospira interrogans*

Entre os patógenos bacterianos de interesse reprodutivo, a *Leptospira spp.* é digna de atenção. A leptospirose é uma infecção provocada por uma espiroqueta do gênero *Leptospira*, da Família *Leptospiraceae* e da Ordem *Spirochaetales*^{46,47}. Além do seu impacto na saúde animal, a *Leptospira* é um caso de saúde pública principalmente nos países tropicais, devido a negligência de doenças emergentes, logo essa zoonose é uma infecção emergente⁴⁷.

Essa antropozoonose bacteriana, de elevada prevalência, cosmopolita e diagnosticada em países tropicais, principalmente em períodos de elevados índices pluviométricos, infectando humanos, animais silvestres e animais domésticos é tradicionalmente subdivida em dois gêneros, as patogênicas como a *Leptospira interrogans* e a não patogênica saprófita como a *Leptospira biflexa*. Além disso, as *Lepstoria spp.* pode ser classificada em mais de 20 espécies como as *L. interrogans*, *L. biflexa*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. wolbachii*, *L. meyeri*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilii*, *L. kirschneri*, *L. fainei*, *L. alexanderi*, *L. broomii*, *L. wolffii*, *L. kmetyi*, *L. licerasiae*, *L. alstonii*, *L. terpstrae*, *L. yanagawae*, *L. idonii* e *L. vanthielii* e em mais de 250 sorovares dependendo dos marcadores antigênicos encontrados^{47,48}.

As bactérias do gênero *Leptospira* são bactérias flageladas intituladas espiroquetas, apresentam formato helicoidal, alongado e fino exibindo espiras curtas e regulares no lado direito, seu tamanho aproximado é de 6,0 a 12 µm de comprimento 0,1 a 0,15 µm de espessura (Figura 5). São bactérias aeróbicas obrigatórias, não são visíveis em microscópios óticos convencionais (somente microscópios de campo escuro ou contraste de fase), sua temperatura ideal é entre 28°C a 30°C, com pH entre 7,2 a 7,6 e seu crescimento é lento (cerca de 20 horas) quando comparada com outras bactérias como a *E. coli*^{49,50}.

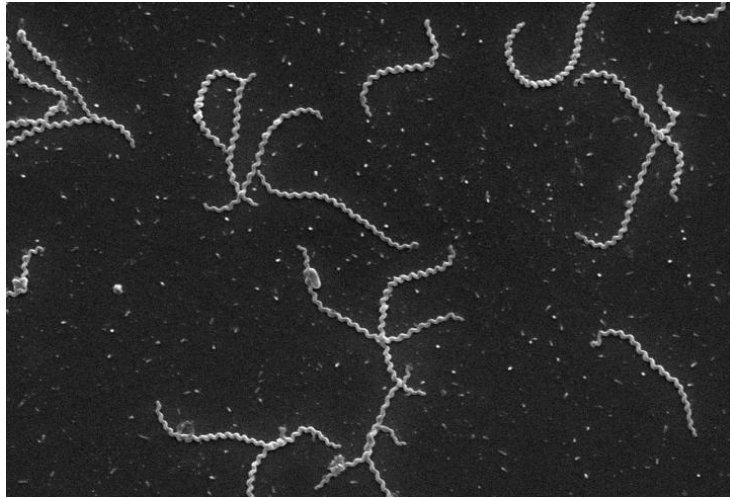


Figura 5 - Microscopia eletrônica da *Leptospira sp.*
Fonte da imagem: Drug Target Review

2.2.1. Detecção da *Leptospira* em sêmen

Diversos estudos avaliaram a possibilidade de se encontrar a *Leptospira* em sêmen de diversos animais⁵¹⁻⁵³. No estudo realizado por Kim et al. foi identificado através da técnica de PCR a *L. interrogans* em sêmen e sêmen criopreservado⁵². Em camelos também foi identificado a *Leptospira spp.* através da técnica de PCR realizada por Al-Busadah, El-Bahr e Khalafalla em um estudo⁵³. Em bovinos, essa história não é diferente, alguns estudos identificaram a *Leptospira spp* por meio da técnica de PCR em sêmen e em embriões⁵⁴⁻⁵⁶.

Outro estudo, avaliou a presença da *Leptospira spp.* em sêmen e fluido vaginal em caprinos⁵⁷. Nesse estudo eles identificam a *Leptospira* em fluido vaginal e em sêmen por meio do microscópio de campo escuro, porém as culturas bacteriológicas dos fluidos apresentaram resultados negativos. Essas amostras também foram submetidas a PCR, apresentando um resultado positivo. Logo, imagina-se que o sêmen e o fluido vaginal possam ter dificultado a cultura bacteriológica do *Leptospira*.

Em diversos estudos identificou-se a *Leptospira* em sêmen, porém o sêmen disponibilizado comercialmente é suplementado com antibióticos (penicilina, estreptomicina, gentamicina), todavia, o efeito do antibiótico é minimizado pela criopreservação tornando assim, a *Leptospira* uma patologia possivelmente transmitida também pela manipulação do sêmen congelado, necessitando de novos métodos de eliminação de patógenos presentes no sêmen.

2.3. Peptídeos bioativos

Os peptídeos são polímeros curtos constituídos de aminoácidos unidos por ligações peptídicas⁵⁸. Assim, os peptídeos representam uma classe de moléculas que se localizam entre pequenas moléculas, tais como fármacos e macrocomponentes, como as proteínas em tecidos biológicos, embora diferem-se dos dois terapeuticamente e bioquimicamente^{58,59}.

Os peptídeos bioativos são moléculas compostas por aminoácidos ligados covalentemente entre si, que podem ter um amplo espectro de ação, incluindo atividade antibacteriana e antiviral⁶⁰. A definição dos peptídeos bioativos baseada em suas funções é complexa, uma vez que, um mesmo peptídeo pode apresentar várias funções.⁶¹ Contudo, um exemplo de definição dos peptídeos bioativos é sua determinação como componente derivado de alimentos, que além de exercer valor nutricional, exercem efeitos fisiológicos no organismo⁶². Logo, não existe uma diretriz que consiga abranger todos os peptídeos bioativos, mas, flexionando um pouco a definição anterior de alimentos, podem-se tratar os peptídeos bioativos como moléculas biologicamente ativas que exercem efeitos fisiológicos no organismo.

Os fármacos em geral, foram mais utilizados que os peptídeos devido ao seu tempo de meia-vida maior e sua biodisponibilidade oral, contudo, com o recente desenvolvimento de patógenos multirresistentes aos fármacos, os peptídeos estão ganhando cada vez mais espaço. Com os peptídeos análogos, novos métodos permitiram a modulação das propriedades farmacocinéticas e da especificidade do alvo por meio de modificações na sequência peptídica, incorporando novos aminoácidos na cadeia prolongando a meia-vida e/ou melhorando a solubilidade⁶³. Dessa forma, os peptídeos proporcionam uma abordagem terapêutica mais eficiente que os fármacos, pois, a probabilidade de desenvolver resistência é menor, já que as atividades biológicas ocorrem em pouquíssimo tempo⁶⁴.

2.3.1. Base química dos peptídeos

Os peptídeos comerciais podem ser classificados em nativos, análogos e heterólogos. Os peptídeos nativos apresentam a mesma sequência que os peptídeos encontrados nos organismos vivos. Atualmente, grande parte dos peptídeos nativos do mercado são produzidos sinteticamente ou por expressão recombinante, diferente dos primeiros peptídeos adquiridos através do isolamento e purificação dos tecidos vivos de mamíferos. Contudo, apresentam como adversidade tempo de meia-vida plasmática curta e biodisponibilidade oral

negligenciável. O curto tempo de meia-vida dos peptídeos terapêuticos é elucidado pela presença de numerosas peptidases e mecanismos de inativação, limitando seu uso. Outro empecilho é a biodisponibilidade oral, pois as enzimas digestivas responsáveis pela quebra das ligações peptídicas das proteínas da dieta são hábeis em clivar as ligações dos peptídeos terapêuticos, além disso, a alta polaridade e o peso molecular dos peptídeos limitam demasiadamente a absorção intestinal⁵⁹.

Já os peptídeos análogos são caracterizados como versões modificadas dos peptídeos naturais, no qual, se altera um ou mais aminoácidos da cadeia peptídica com o intuito de melhorar seu desempenho⁶⁵.

Os peptídeos heterólogos são sintetizados a partir de bibliotecas sintéticas, não sendo embasada em peptídeos naturais, logo sua descoberta baseia-se inteiramente por métodos computacionais⁶⁶.

Grande parte dos peptídeos terapêuticos disponíveis no mercado e em desenvolvimento são análogos, que embasam sua atividade intrínseca em hormônios nativos, porém com características farmacêuticas melhoradas⁵⁹.

2.3.2. Peptídeos Antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são moléculas essenciais conservadas e evolutivas do sistema imune inato e adquirido, encontrado em todos os organismos vivos, incluindo bactérias, fungos e vírus. Os AMPs exercem uma função importante na proteção do hospedeiro e nos organismos multicelulares complexos durante o processo evolutivo^{67,68}. Em animais, os AMPs constituem a primeira linha de defesa, sendo associados a macrófagos, neutrófilos e linfócitos, revestindo as células epiteliais de tecidos e órgãos expostos ao ambiente externo, atuando na linha de frente da defesa imunológica^{68,69}. Graças a sua ação de amplo espectro frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, protozoários, parasitas, células cancerígenas e diferentes tipos de vírus envelopados, os AMPs são uma excelente alternativa, visto que seus efeitos vão além da atividade antimicrobiana, desempenhando papéis nas respostas inflamatórias, angiogênese, sinalização celular e cicatrização^{67,69}.

O método de ação dos AMPs em bactérias pode ser classificado em dois tipos: lise da membrana celular e lise celular não membranosa (alvos intracelulares)⁶⁹. Geralmente, as propriedades que levam a lise da membrana celular estão associadas às particularidades inter-relacionadas dos peptídeos, pois grande parte dos AMPs têm sua carga líquida positiva e propensão a ser anfipático, denotando que eles podem se contorcer em estruturas hidrofóbicas

e com superfície hidrofílica. A união destas propriedades facilita a interação com estruturas carregadas negativamente das bactérias. Logo, acredita-se que após a interação inicial dos AMPs com a membrana das bactérias, poros são formados perturbando o controle sobre o fluxo iônico da célula, conduzindo à lise osmótica e morte celular⁷⁰.

Atualmente, existem três modelos para ruptura da membrana por AMPs (Figura 6). O modelo barrel-stave propõe que os peptídeos se integram verticalmente na bicamada, no qual, monômeros peptídicos se inserem na membrana dispostos paralelamente e a porção hidrofílica está cobrindo o lúmen do canal, enquanto a porção hidrofóbica está voltada para fora. O modelo de poros toroidais indica que os peptídeos se inserem verticalmente na bicamada e induzem uma curvatura da membrana, ocasionando na dobra da membrana externa e interna para dentro. E o mecanismo do carpete, que sugere que os peptídeos absorvem paralelamente à membrana e logo que atinge uma densidade de revestimento eles desintegram a estrutura da membrana, causando a aparência de carpete^{11,70}.

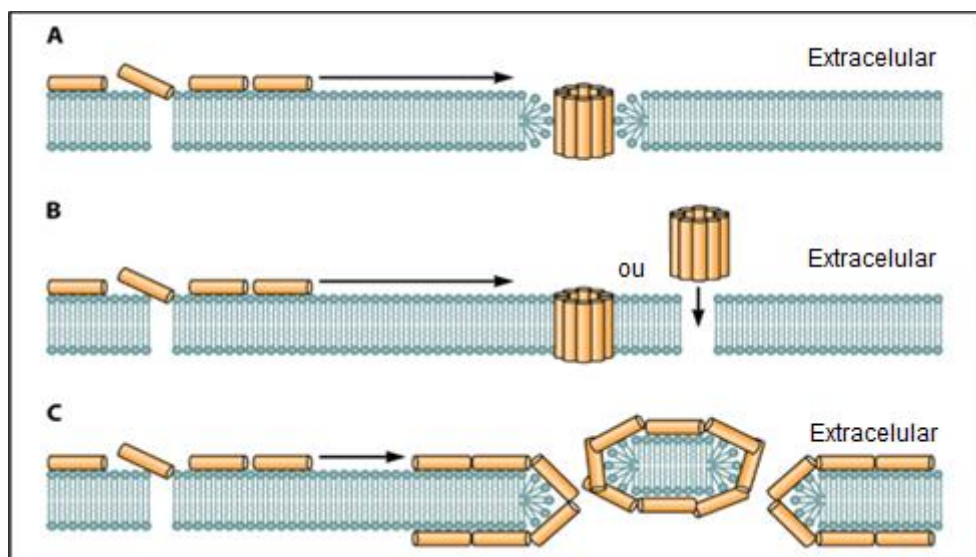


Figura 6 - Modelos de ruptura da membrana bacteriana por AMPs. (A) Ruptura da membrana pelo modelo de poros toroidais. (B) Ruptura da membrana pelo modelo de barrel-stave. (C) Ruptura da membrana pelo mecanismo do carpete.

Fonte: Le, Fang e Sekaran.¹¹

Os AMPs podem atravessar a membrana celular e bloquear processos fisiológicos essenciais nas bactérias sem causar danos extensivos à membrana. Os principais alvos intracelulares são macromoléculas, como DNA, RNA, lipídeos II ou proteínas citoplasmáticas, inibindo assim os processos metabólicos, levando a morte celular⁷¹. O processo de entrada dos AMPs geralmente ocorre por penetração direta ou endocitose, sendo que a endocitose ocorre tanto pelo processo de micropinocitose ou por meio de vias medidas por receptor. Na

micropinocitose, a dinâmica é facilitada pela formação do macropinosoma carreador de AMPs através da membrana plasmática. Nas vias mediadas por receptores, a formação de vesículas no citoplasma é anteposto pela formação de cavidades mediada por proteínas de membrana¹¹. Geralmente, os peptídeos antimicrobianos exercem ambas as funções no combate as bactérias e vírus, podendo exercer o efeito de ruptura da membrana celular em um microrganismo e a em outro ação não-membrano-lítica, e vice-versa⁶⁹.

Os peptídeos bioativos antivirais apresentam três principais mecanismos de ação. Os peptídeos que inibem a ligação do vírus com a membrana das células, impedindo a fusão viral. Existem duas propostas para o mecanismo de inibição da entrada do vírus pelos peptídeos. Na primeira proposta, a entrada do vírus pode ser bloqueada pela interação do peptídeo com uma proteína de membrana, na qual o agente vírus se liga para entrar na célula, alterando assim sua função, impedindo a ligação do vírus. Na segunda proposta, envolve a alteração da conformação de uma proteína de membrana da célula essencial para o vírus, impedindo a formação do endossoma e liberação do material genético viral na célula hospedeira⁷². Logo, os peptídeos que impedem a entrada do vírus na célula hospedeira são candidatos promissores para terapia viral.

Outro mecanismo de ação dos peptídeos bioativos antivirais é através da destruição do envelope viral. O envelope viral é derivado da membrana das células do hospedeiro conjugadas com lipídios e rico em esfingolipídios e colesterol, atribuindo carga negativa e caráter anfipático ao envelope. Habitualmente, as interações peptídeo-membrana são mediadas por interações eletrostáticas e as rupturas na membrana ocorrem por diferentes meios. Graças a interação eletrostática, os peptídeos com cargas positivas são atraídos pela bicamada lipídica com carga negativa, inserindo-se na camada constantemente e quando atingem uma concentração crítica de peptídeos desencadeiam a ruptura da membrana. Esse episódio colabora para formação de poros no envelope, possibilitando que moléculas com baixo peso molecular penetrem no capsídeo, contribuindo com a destruição da bicamada lipídica e extravasamento dos componentes virais⁷².

O terceiro mecanismo dos peptídeos antivirais inibem a replicação viral, no qual, um de seus principais alvos são as subunidades da RNA polimerase viral (Figura 7). Os peptídeos se ligam a uma subunidade e assim impedem a formação do complexo da polimerase, por meio do bloqueio do sítio de ligação, impedindo assim a replicação da material genético do vírus⁷².

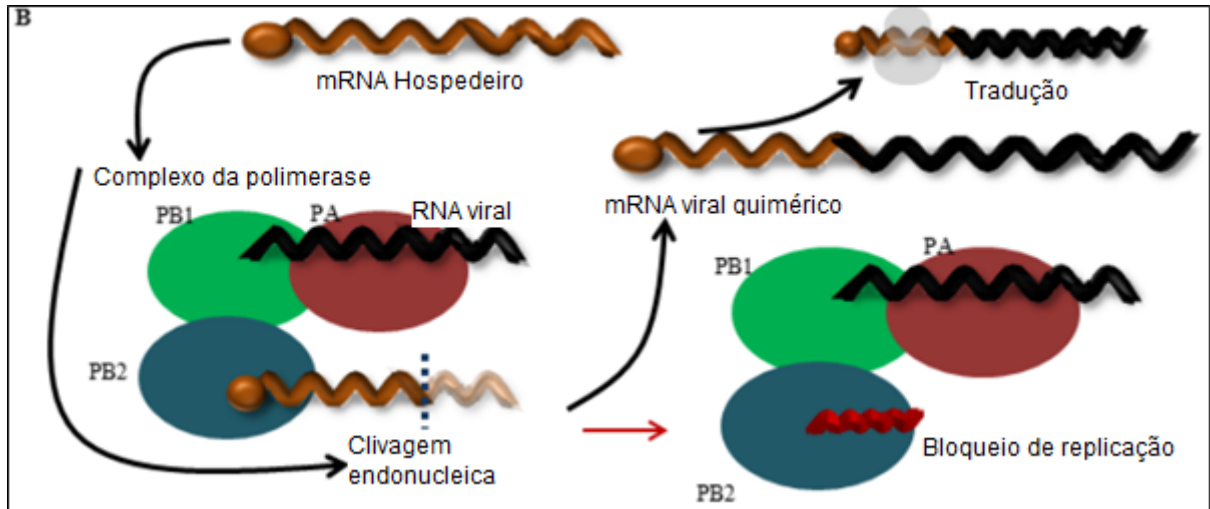


Figura 7 - Mecanismo de Inibição da replicação viral por meio da ligação peptídica na subunidade PB2 da RNA polimerase viral.
Adaptado: Skalickova et al.⁷²

Independentemente da ação dos peptídeos bioativos, sendo antibacterianos ou antivirais, eles são alternativas a serem estudadas, para melhorar a qualidade de vida seja em animais, plantas ou em humanos.

2.4. Peptídeo de Indolicidina

Entre os inúmeros peptídeos bioativos descritos na literatura, o peptídeo de indolicidina chama a atenção pela sua capacidade de inibir tanto bactérias e alguns vírus. A indolicidina é um peptídeo natural, pertencente à família das catelicidinas e é isolado em neutrófilos bovinos. É constituído por 13 resíduos de aminoácidos, dos quais cinco são triptofanos. O espectro de atuação desta molécula é abrangente, incluindo bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, além da capacidade antiviral⁷³.

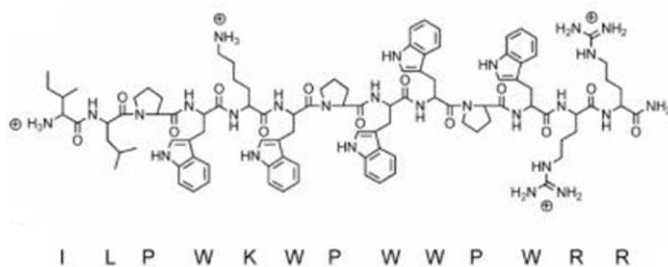


Figura 8 - Estrutura primária da Indolicidina

A alta concentração de indolicidina induz permeabilidade da membrana sem que ocorra a lise celular. Logo, o aumento da permeabilidade facilita a entrada contínua do peptídeo de citosol para inibir exclusivamente a biossíntese de DNA⁷⁴⁻⁷⁶. Além de ligar-se diretamente com o DNA, o peptídeo de indolicidina impede o afrouxamento do DNA pela inativação de DNA topoisomerase I. Surpreendentemente, este estágio ocorre sem o desenrolar da dupla hélice do DNA, sugerindo múltiplos papéis inibitórios da indolicidina contra várias enzimas associadas ao DNA bacteriano e viral⁷⁷. Além disso, o peptídeo de indolicidina apresentou atividade inibitória contra o HSV-1 e HSV-2⁷⁸. Outro fato surpreendente sobre a indolicidina, é que um de seus análogos apresentou atividade membrana lítica, além da inibição intracelular do DNA, RNA e proteínas⁷⁹.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o uso do peptídeo indolicidina na descontaminação de sêmen bovino.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a inocuidade do peptídeo frente ao cultivo de células MDBK;
- Avaliar a atividade antiviral do peptídeo utilizando como modelo o BoHV-1 em células MDBK artificialmente infectadas;
- Avaliar a atividade antibacteriana do peptídeo utilizando como modelos as bactérias *Escherichia coli* e *Leptospira interrogans*;
- Determinar a inocuidade dos peptídeos sobre o sêmen bovino;
- Avaliar a ação do peptídeo na desinfecção do sêmen bovino artificialmente infectado pelo BoHV-1 em células MDBK.

4. HIPÓTESES

O peptídeo de indolicidina tem capacidade de eliminar patógenos de interesse reprodutivo no sêmen bovino fresco e congelado, sem causar danos ao espermatozoide.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Síntese do peptídeo

O peptídeo de indolicidina foi cedido pelo Professor Dr. Esteban Nicolás Lorenzón da Unidade Acadêmica Especial de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Jataí. A metodologia utilizada foi à SPFS proposta por Merrifield⁸⁰. A mesma é baseada no crescimento da cadeia peptídica, aminoácido por aminoácido, a partir de sua região C-terminal que se encontra ligada covalentemente ao suporte polimérico (resina). Assim, o crescimento da cadeia peptídica é no sentido do aminoácido C-terminal para o N-terminal. A remoção de subprodutos de reação e reagentes em excesso em cada etapa é realizada por filtração e lavagem.

Baseando-se no protocolo padrão, os acoplamentos foram realizados mediante a ativação do grupo carboxila do Fmoc-aminoácido com N,N'-diisopropilcarbodiimida/N-hidroxibenzotriazol (DIC/HOBt) durante duas horas com agitação, utilizando como solvente 50% de dimetilformamida (DMF) em diclorometano (DCM). Na reação foi utilizado excesso de Fmoc-aminoácidos e agentes acoplantes, na proporção de 2 vezes em relação ao número teórico de sítios reativos existentes na resina. A desproteção do grupo amino após acoplamento foi realizada em meio básico com uma solução 20% 4-metilpiperidina em DMF durante 20 minutos. Entre os passos experimentais, foram efetuadas lavagens com DMF e DCM. O sucesso de cada etapa de acoplamento/desproteção foi monitorado mediante o teste da ninidrina⁸¹, sendo que no caso de resultado positivo (cor azul), a reação de acoplamento foi repetida. No caso de resultado negativo (cor amarela) a Fmoc-peptidil-resina foi desprotegida e o Fmoc-aminoácido seguinte foi acoplado.

Para separar os peptídeos das resinas ao final das sínteses, foram realizadas reações de clivagem utilizando uma solução composta de supressores de reações colaterais (scavengers) em ácido trifluoroacético (TFA). As reações foram conduzidas sob agitação moderada durante 2h à temperatura ambiente. Ao término, os peptídeos foram precipitados com éter etílico gelado e lavados 3 vezes com esse solvente para eliminação dos reagentes presentes na solução de clivagem. O precipitado obtido foi ressuscitado com uma solução aquosa contendo 0,045% de TFA. O sobrenadante contendo o peptídeo foi liofilizado e identificado como peptídeo bruto.

5.2. Purificação do peptídeo

A purificação do produto da síntese foi realizada por HPLC^{82,83} em fase reversa no modo semipreparativo, utilizando uma coluna do tipo C₁₈ e uma fase móvel constituída por água TFA 0,045% (solvente A) e acetonitrila TFA 0,035% (solvente B). Durante a purificação foram recolhidas diferentes frações, e a pureza dessas foi determinada por HPLC analítica, também em coluna C₁₈ e mesma fase móvel. Os tubos contendo os peptídeos purificados foram reunidos e liofilizados.

O peso molecular do produto da síntese foi determinado por EM^{84,85}. A síntese, purificação e caracterização citadas foram desenvolvidas em colaboração com pesquisadores do Instituto de Química da UNESP, Araraquara.

5.3. Ressuspensão do peptídeo indolicidina

Foi ressuspensionado 0,01 g do peptídeo indolicidina liofilizado em 500 µL de água Mili-Q autoclavada. Após a ressuspensão, foi determinada a real concentração do peptídeo observando sua absorbância por meio da espectrofotometria. Foi adicionado 1 µL da solução com o peptídeo no NanoView (*Biosciences*[®], *Brighton, EUA*) a OD₂₈₀ e utilizado água Mili-Q autoclavada como branco. Para definir a concentração do peptídeo, a equação de Lambert-Beer foi utilizada:

$$A = C \cdot L \cdot \epsilon$$

Logo, **A** é dada como a absorbância OD₂₈₀ identificada no NanoView, **C** é concentração do peptídeo, **L** é o caminho óptico percorrido pela luz e **ε** é a absorvidade molar, no qual foi utilizada a absorvidade do triptofano, pois o peptídeo é rico em triptofano.

5.4. Atividade antibacteriana *in vitro* do peptídeo frente a *E. coli*

Uma suspensão de *E. coli* (cepa DH5α) com OD₆₀₀ inicial de 0,006 (1,0 x 10⁸ UFC/mL) em meio LB composto por 1% de tritona, 2% de NaCl e 0,5% de extrato de levedura foi incubado com peptídeos nas concentrações de (1 µM, 16 µM e 32 µM) e mantidas sob agitação de 250 rpm a 37°C durante toda a noite. Ao final do período de incubação, a OD₆₀₀ final foi avaliada em espectrofotômetro e comparadas à OD₆₀₀ do grupo controle (sem peptídeo), sendo também determinada a concentração em UFC/mL.

5.5. Atividade antibacteriana *in vitro* do peptídeo frente a *Leptospira interrogans*

O processo de proliferação e manutenção da cultura da *Leptospira interrogans* do sorovar Hardjo foi realizado no Laboratório de Diagnóstico de Leptospirose (LDL) da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ/UFG), no qual, uma suspensão bacteriana com OD₆₀₀ inicial de 0,001 em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), foi incubada com o peptídeo (nas concentrações de 10, 20 e 30 µM), por 1 hora em estufa com temperatura controlada a 29,3°C. Após a incubação, 100 µl de cada amostra foram adicionadas separadamente a 12 tubos de ensaio de vidro contendo 900 µl de meio EMJH para avaliar o crescimento da cultura em estufa com temperatura controlada à 29,3° C, após sete dias. Para avaliar a eficiência do tratamento, 30 µl das amostras foram submetidas à microscopia de campo escuro; e 900 µl de cada amostra foi avaliada novamente em espectrofotômetro, comparando o valor das OD₆₀₀ finais com àquelas estabelecida no início do experimento e com o grupo controle (sem peptídeo).

5.6. Fonte Viral

O BoHV-1 da cepa de Los Angeles (LA) foi cultivado em células *Madin-Darby Bovine Kidney* (MDBK), cultivadas em meio essencial mínimo (*MEM - GIBCO®*, *Grand Island, EUA*), suplementado com soro fetal bovino 10% (*SFB - GIBCO®*, *Grand Island, EUA*), antibiótico e antifúngico habituais a 10 mg/ml (penicilina e estreptomicina). Para obtenção da titulação inicial do vírus foi adotado o protocolo proposto por Trimmed Spearman-Kärber⁸⁶.

5.7. Avaliação da toxicidade do peptídeo frente as células de cultura

A toxicidade sobre as células MDBK em cultura foi realizada quadruplicatas para avaliar a inocuidade do peptídeo. Logo, as células foram cultivadas em MEM, suplementadas com SBA 10%, antibiótico e antifúngico a 10 mg/ml. Posteriormente, foram incubadas em uma placa de microtitulação (*Maxisorp - Nunc - Sigma-Aldrich®*) com o peptídeo nas concentrações de 10 µM, 20 µM, 30 µM e foram utilizadas amostras não tratadas com o peptídeo como controle negativo (somente células e meio) em estufa de CO₂ a 37°C durante 72 horas. Decorrido às 72 horas, foi avaliada a morfologia e viabilidade celular em microscópio invertido.

5.8. Atividade antiviral *in vitro* do peptídeo frente ao BoHV-1

Inicialmente o peptídeo de indolicidina nas concentrações de 10 μM , 20 μM e 30 μM foi incubado com uma alíquota da suspensão viral contendo $10^{5,75}$ TCID₅₀/mL de BoHV-1 durante 1 hora a temperatura ambiente. Após o período de incubação, foram realizadas diluições seriadas (até 10^{-6}) das amostras, em seguida, adicionadas a quatro poços de uma placa de microtitulação de 96 poços que continham uma suspensão de células MDBK. As monocamadas são suplementadas com 100 μL de MEM, 5% de SFB e incubadas (72h a 37°C) em uma atmosfera com 5% de CO₂.

Posteriormente e diante dos resultados obtidos com as concentrações peptídicas iniciais, um novo ensaio seguindo os parâmetros anteriores foi realizado com o peptídeo nas concentrações de 4 μM , 6 μM , 8 μM e 10 μM sendo incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a diluição seriada, as monocamadas foram incubadas por 72 horas a 37°C.

Decorrido as 72 horas foi avaliado o efeito citopático (CPE) característico da infecção pelo BoHV-1, por meio de microscópio invertido e uma nova titulação foi realizada para determinação da presença ou ausência de partículas virais infecciosas.

5.9. Avaliação da toxicidade do peptídeo no sêmen

A avaliação do sêmen foi realizada em parceria com o Setor de Reprodução Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ/UFG). Foi utilizado sêmen congelado de três touros das raças Angus, Gir e Nelore. Para avaliar a toxicidade do peptídeo no sêmen, 30 μM do peptídeo foi incubado com 50 μL de sêmen por 15 minutos. Após esse período, os parâmetros de qualidade e viabilidade espermática foram avaliados conforme recomendado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). Para isso, uma alíquota com 50 μL do sêmen puro (controle negativo) e outra alíquota tratada com o peptídeo foi depositada em uma lâmina de vidro para microscopia após a incubação, pré-aquecida a 37°C em mesa aquecedora, coberta com uma lamínula também aquecida a 37°C e levada ao microscópio óptico binocular (aumento de 20X e 40X). Os valores de motilidade foram expressos em porcentagem que variaram de 0 a 100%, sendo 0% para espermatozoides imóveis e 100% para desempenho máximo. O tipo de movimento espermático foi avaliado pelo vigor em uma escala de 0 a 5 (0 - sem motilidade, 1 - movimento lateral fraco com alguma progressão, 2 - movimento lateral moderado com progressão ocasional, 3 - progressão lenta, 4 - progressão regular e 5 - progressão rápida)⁸⁷.

Afim de confirmar a inocuidade do peptídeo frente ao sêmen, a análise computadorizada de espermatozoides (CASA) foi realizada em parceria com o Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal, na Universidade Estadual de Goiás no campus de São Luís de Montes Belos. A análise consiste em adicionar 10 µL de sêmen fresco em uma lamínula específica do equipamento, as amostras foram avaliadas e lhe são dadas um score em porcentagem baseadas na motilidade. Assim, foram utilizados três touros das raças Nelore, Angus e Wagyu, incubados com o peptídeo indolicidina nas concentrações de 30 e 100 µM por 30 minutos, decorrido o tempo as amostras foram analisadas pelo CASA e comparadas com os seus respectivos controles.

5.10. Titulação viral no sêmen

O peptídeo indolicidina nas concentrações de 10 µM e 30 µM foi incubado com o sêmen infectado artificialmente com $10^{5,75}$ TCID₅₀/mL de uma suspensão de BoHV-1, durante 1 hora a temperatura ambiente. Após o período de incubação, foram realizadas diluições seriadas (até 10^{-6}) das amostras, em seguida, adicionadas a quatro poços de uma placa de microtitulação de 96 poços que continham uma suspensão de células MDBK. As monocamadas foram suplementadas com 100 µL de MEM, 5% de SFB e incubadas (72h a 37°C) em uma atmosfera com 5% de CO₂. Após 72 horas as monocamadas foram examinadas e comparadas com o grupo controle negativo quanto à presença do CPE. Constatando a ausência do CPE, as placas foram submetidas a congelamento e descongelamento e reinoculadas em uma nova placa de microtitulação. Após três passagens cegas sem EC, as amostras foram avaliadas quanto a presença ou ausência do CPE, podendo ser classificadas como positivas ou negativas respectivamente.

5.11. Análise estatística

Os ensaios realizados com as bactérias e com o sêmen foram executados em triplicatas e os ensaios realizados com vírus e a cultura de células foram executados em quadruplicatas. Todos os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (SD) para cada ensaio. Para analisar a diferença entre os tratamentos, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Tukey, utilizando-se do software GraphPad Prism 8.2.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, Estados Unidos). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Síntese, purificação e caracterização do peptídeo

Pelo perfil cromatográfico do peptídeo indolicidina na HPLC (Figura 9), fica evidenciado, que a síntese e purificação do peptídeo se deu de maneira satisfatória. O peptídeo absorve fortemente a luz ultravioleta e, pela diferença entre a luz incidida e a absorvida podemos observar um único pico em 220nm característico da pureza do material.

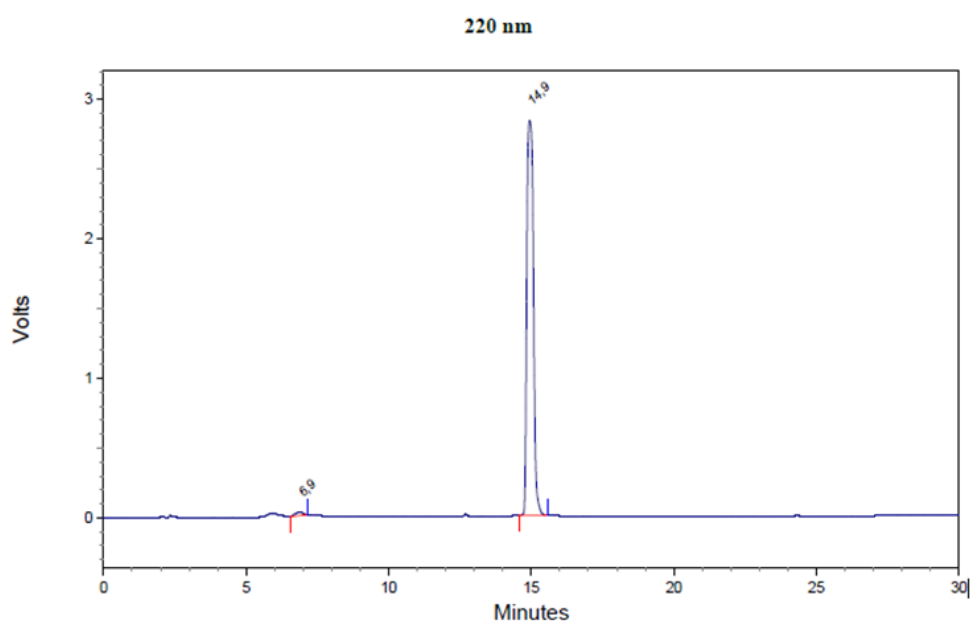


Figura 9 - Perfil cromatográfico do peptídeo após a purificação.

A Figura 10 corresponde ao espectro de massas do peptídeo após a purificação. É possível evidenciar 3 picos principais, 954,00, 636,33 e 477,50, correspondentes ao peptídeo carregado com 2, 3 e 4 cargas positivas, respectivamente.

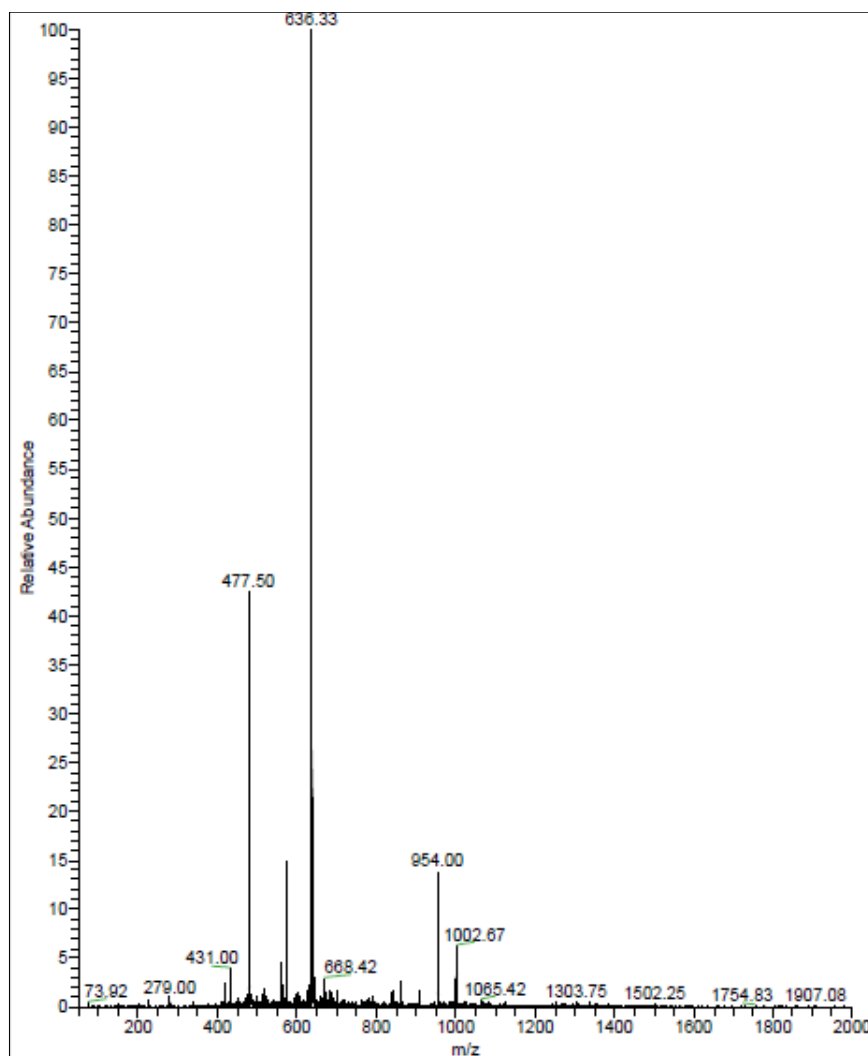


Figura 10 - Espectro de massas do peptídeo puro. Os picos de 954,00, 636,33 e 477,50 correspondem à relação carga/massa (m/z) do peptídeo com 2, 3 e 4 cargas positivas, respectivamente.

Juntas, a Figura 9 e a Figura 10 mostram que o peptídeo utilizado nos experimentos desenvolvidos neste trabalho corresponde à indolicidina com uma porcentagem de pureza acima de 99%.

Após a ressuspensão do peptídeo a sua concentração foi determinada pela fórmula de Lambert-Beer e sua concentração determinada foi de 216 μM .

6.2. Atividade antibacteriana do peptídeo

O patógeno bacteriano que foi escolhido no estudo foi a *Leptospira interrogans*, devido a seu interesse reprodutivo, e a *E. coli* foi escolhida como controle da eficácia do peptídeo. Baseando-se na literatura, algumas concentrações foram escolhidas para o ensaio com

a *E. coli*, considerada neste trabalho como controle da atividade bactericida do peptídeo de indolicidina^{76,88}. Por esse motivo as concentrações foram diferentes daquelas utilizadas no modelo *Leptospira*.

É possível encontrar na literatura estudos demonstrando que 16 μM é a concentração mínima necessária para inibir completamente a proliferação da *E. coli*^{64,71,89}, porém nesse estudo não foi alcançado essa concentração. Nossos resultados corroboram com estudo realizado por Vergis et al. onde, utilizando a indolicidina em cepas de *E. coli*. Multirresistentes verificou que a concentração inibitória mínima foi de 32 μM ⁹⁰.

Mesmo que a $\text{OD}_{600\text{nm}}$ apresentada pela concentração de 16 μM demonstre uma pequena queda em relação ao grupo controle e a concentração de 1 μM (Figura 11), os resultados não foram estatisticamente significativos, confirmada pela concentração semelhante entre os dois tratamentos (1 μM e 16 μM) comparados ao grupo controle ($3,1 \times 10^7$ UFC/ml). A completa inativação bacteriana foi alcançada no tratamento utilizando 32 μM de peptídeo (Figura 11).

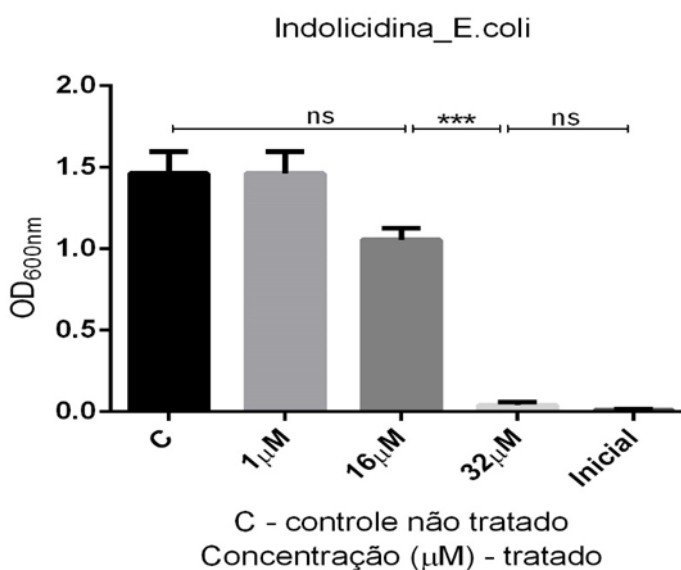


Figura 11 - Viabilidade de *E. coli* em meio de cultura LB após cultivo overnight. C – controle positivo (amostra não tratada); Inicial – OD inicial (meio de cultura + bactéria). * significativo ($p < 0,05$). ns - não significativo.

Apesar do ligeiro aumento (não significativo) da $\text{OD}_{600\text{nm}}$ do grupo tratado (32 μM) comparado à $\text{OD}_{600\text{nm}}$ inicial (meio de cultura + bactéria), nenhuma unidade formadora de colônia (UFC/ml) foi observada no cultivo em LB ágar. Independentemente da ineficácia do

peptídeo na concentração de 16 μM , o principal objetivo foi alcançado, ou seja, a validação da capacidade bactericida do peptídeo observada em outros estudos ^{71,76,89-92}.

Confirmada a eficácia do peptídeo em *E. coli*, iniciou-se o experimento com *Leptospira*. Os resultados estão ilustrados nas Figura 12 e Figura 13. A viabilidade das *Leptospiras* em cultura é exibida na Figura 12 (OD_{600nm} ao final de sete dias de cultivo nas 3 concentrações descritas). Os resultados mostram que o peptídeo na concentração de 30 μM foi mais eficiente na redução da viabilidade da bactéria comparado com o respectivo controle C3 (Figura 12A).

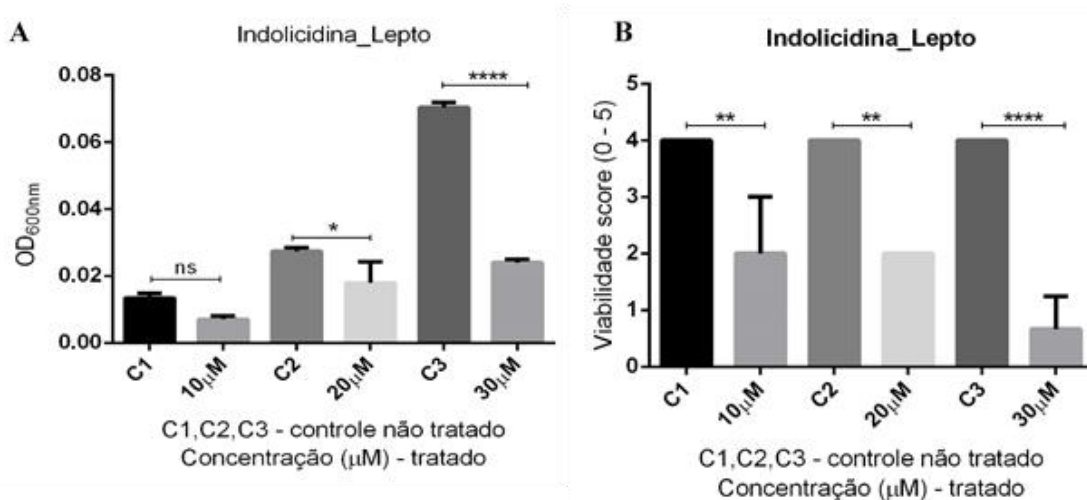


Figura 12 - Viabilidade da *Leptospira* em meio de cultura utilizando dois parâmetros de avaliação. A - OD a 600nm ao final de sete dias de cultivo em meio de cultura nas 3 concentrações (10, 20 e 30 μM). B - avaliação por score da viabilidade (motilidade e morte de *Leptospiras*) em microscopia de campo escuro ao final de sete dias de cultivo nas 3 concentrações (10, 20 e 30 μM). * significativo ($p < 0,05$). ns - não significativo.

Apesar de observado um aumento da OD final em todos os tratamentos comparados ao controle não tratado, nas amostras utilizando 30 μM , depois de 7 dias de cultivo, praticamente todas as bactérias tiveram seu principal parâmetro de viabilidade (motilidade) alterado, logo foram consideradas neste estudo como inviáveis (baixo score) quando avaliadas por microscopia de campo escuro, apesar de não ter sido realizado novo cultivo confirmatório (Figura 12B e Figura 13).

Embora o melhor resultado exposto refere-se à concentração de 30 μM , a concentração de 20 μM exibiu um resultado significativo (Figura 12 e Figura 13). Esse resultado é evidenciado na microscopia, quando compara-se o painel A (controle) com o painel C da Figura 13, no qual, são observados vários grumos (aglomerado de bactérias provavelmente

mortas) e pouca motilidade das células remanescentes. O painel B (10 μM) apresentou poucos grumos, compatíveis com os resultados de score apresentados na Figura 13.

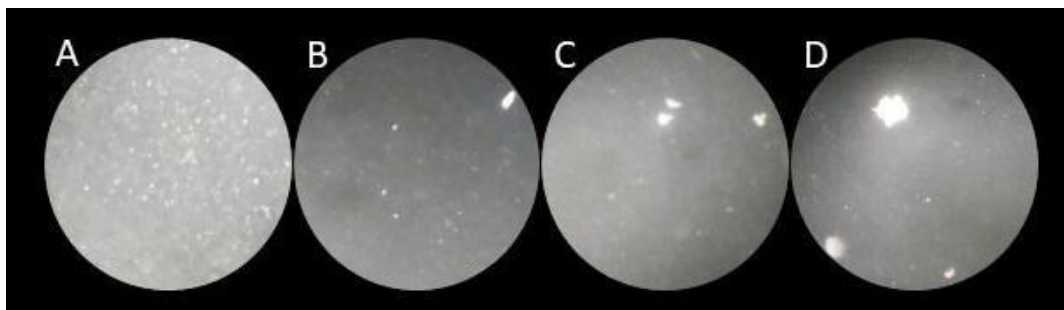


Figura 13 - Microscopia de campo escuro do efeito da indolicidina sob *Leptospira interrogans*: Painel A – Cultura de *Leptospira* sem tratamento (controle); Painel B – Cultura de *Leptospira* tratada com 10 μM do peptídeo; Painel C – Cultura de *Leptospira* tratada com 20 μM do peptídeo; Painel D – Cultura de *Leptospira* tratada com 30 μM do peptídeo.

O resultado encontrado foi satisfatório e condizente com o esperado, pois o peptídeo de indolicidina apresenta um amplo espectro de atuação frente a microrganismos. Além da ação contra *Leptospira* apresentada nesse trabalho, existem diversos estudos demonstrando a capacidade bactericida da indolicidina frente à várias outras bactérias gram-negativas⁹³⁻⁹⁵. Em tais estudos, a sinergia entre o peptídeo e alguns antibióticos foi avaliada, porém o peptídeo de indolicidina por si só já foi capaz de inibir rapidamente a proliferação bacteriana. Acredita-se que essa capacidade bactericida do peptídeo decorra da sua carga (catiônica), favorecendo sua interação com a parede celular ou membrana plasmática presentes tanto em bactérias gram-negativas quanto gram-positivas^{77,79,96}.

6.3. Atividade antiviral do peptídeo

Considerando o primeiro ensaio antiviral realizado, em todas as concentrações de peptídeos avaliadas, podemos verificar a inativação completa do BoHV-1, com a redução do título viral a zero, comparado ao título da amostra controle C ($10^{5,75}$ TCID₅₀/mL) em células MDBK artificialmente infectadas (Figura 14). Os resultados podem ser confirmados pelos painéis A, B (Figura 14), representando respectivamente o CPE característico da infecção pelo vírus na amostra controle (C) e a inativação viral caracterizada pela ausência do CPE na menor concentração de peptídeo utilizada.

Pode-se concluir também que o tratamento com o peptídeo na concentração de 30 μM foi inócua as células MDBK em cultura, salientado pela ausência de qualquer alteração

morfológica detectável quando comparado ao controle utilizando células pura em cultura. (Figura 14 painel C).

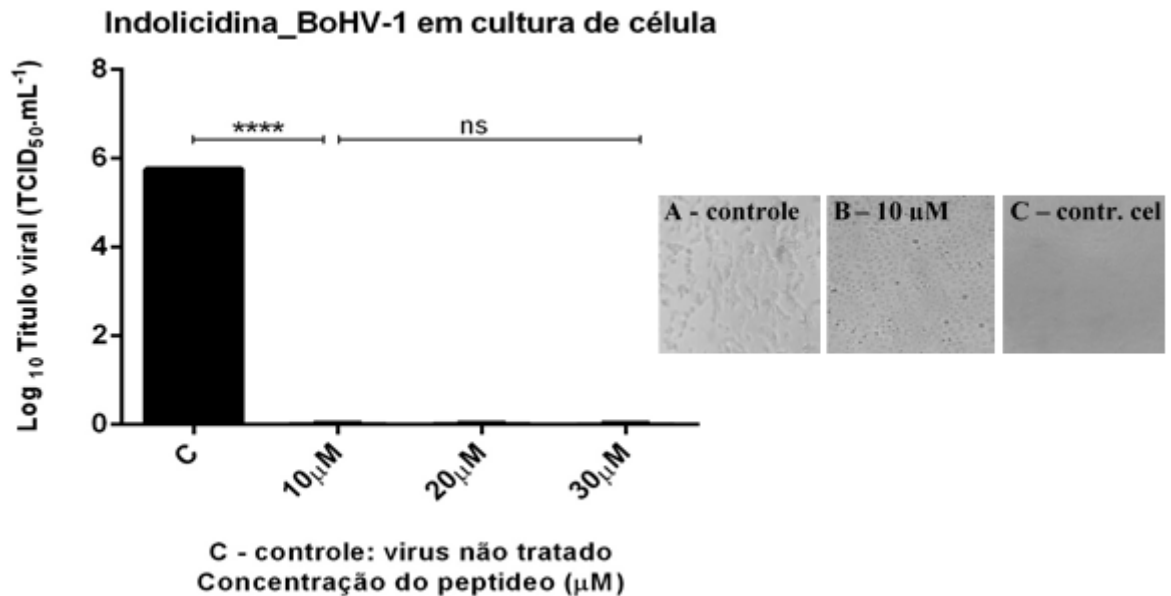


Figura 14 - Efeito de diferentes concentrações do peptídeo Indolicidina na viabilidade do vírus BoHV-1 em cultura de célula MDBK (gráfico). Painel A – microscopia do CPE característico da infecção de células MDBK pelo vírus (vírus vivo) observado na amostra controle (C). – Painel B – microscopia das células MDBK sem CPE – característico da ausência de infecção viral (vírus inativado com peptídeo na concentração de 10µM). Painel C – microscopia das células MDBK tratadas com o peptídeo sem qualquer alteração morfológica detectável. * significativo ($p < 0,05$). ns - não significativo.

Buscando atingir a menor concentração com atividade antiviral do peptídeo, um novo ensaio foi realizado, no qual, é possível observar que a concentração de 4 µM não apresentou diferença significativa quando comparado ao controle não tratado, 6 µM foi capaz de diminuir significativamente o título viral e as concentrações de 8 µM e 10 µM foram capazes de inativar completamente o vírus (Figura 15).

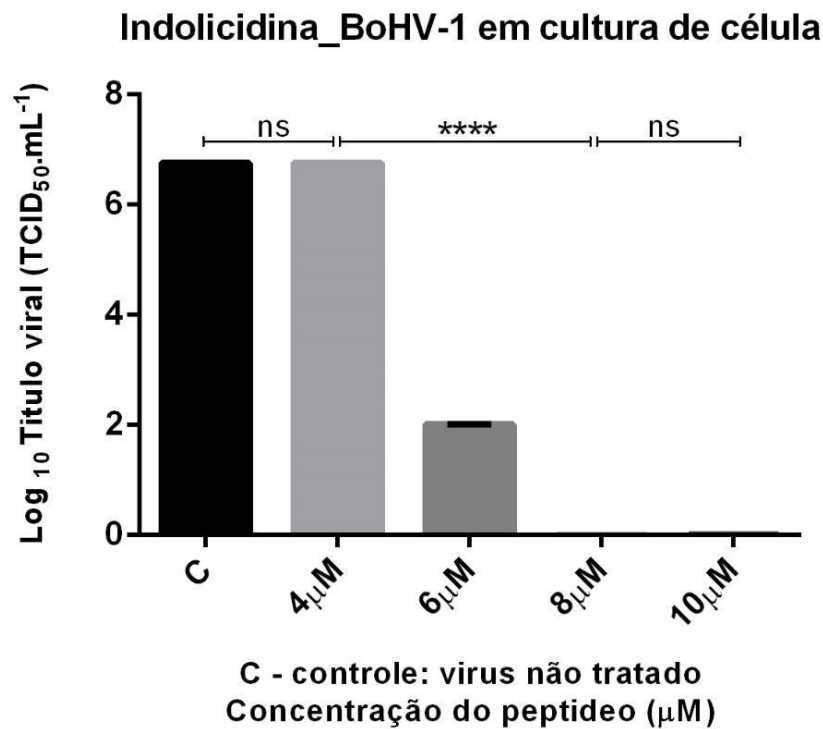


Figura 15 - Efeito da Indolicidina nas concentrações de 4, 6, 8 e 10 µM sobre a viabilidade do vírus BoHV-1 em cultura de célula MDBK.

É interessante notar nesse novo ensaio é que, na concentração de 6 µM, foi observado um menor CPE em toda extensão do poço na placa de microtitulação (Figura 16 painel C), em comparação com o poço do grupo controle do vírus, sem tratamento (Figura 16 painel B).

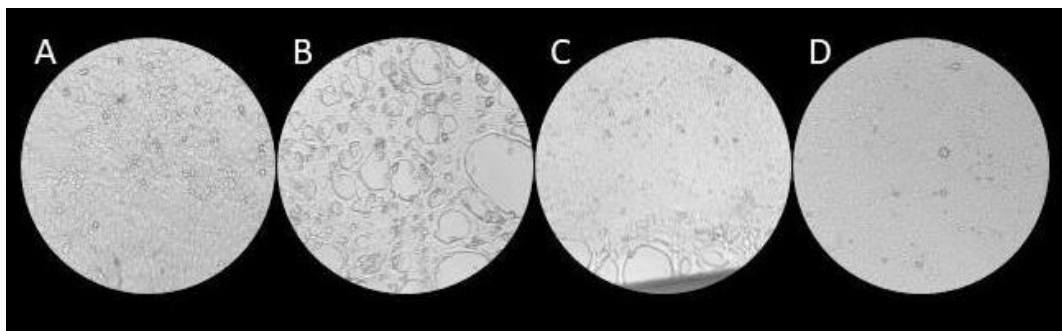


Figura 16 - Microscopia (20X) do efeito da Indolicidina na viabilidade do BoHV-1 em cultura de MDBK: Painel A – Controle negativo (cultura pura - sem CPE); Painel B – CPE característico da infecção de células MDBK pelo vírus (vírus vivo) observado na amostra controle C (sem tratamento com peptídeo); Painel C – células MDBK tratadas com 6 µM de peptídeo, exibindo menor CPE; Painel D – células MDBK tratadas com 8 µM de peptídeo indicando menor CPE.

Além da possibilidade mais provável da ação peptídica sobre o envelope lipoproteico presente no BoHV-1, outra vantagem da indolicidina e seus análogos é sua conhecida interação com o DNA¹¹. Obviamente ainda sem comprovação, neste sentido, a inativação viral se daria em diferentes vias, maximizando sua ação, podendo influenciar negativamente a reativação do material genético ainda presente em partículas virais não infecciosas, resultado da inativação pela indolicidina e, conseqüente produção de proteínas virais.

Resultados semelhantes ao nosso foram encontrados em diferentes estudos conduzidos utilizando os vírus humanos HSV-1 e HSV-2 como alvo do peptídeo indolicidina⁹⁷. No entanto, em nosso trabalho para a inativação completa do BoHV-1, a concentração inibitória mínima do peptídeo foi 13 vezes menor, impactando satisfatoriamente a produção desse insumo para uso na desinfecção de BoHV-1 em matérias biológicas.

Talvez, outro fator que tenha corroborado com este fato, é que a indolicidina é um peptídeo naturalmente encontrado em neutrófilos bovinos, com tal característica o BoHV-1 poderia apresentar maior suscetibilidade a indolicidina.

A indolicidina também foi testada frente a outro vírus *in vitro*, o vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus de RNA^{71,98,99}. Porém, a concentração utilizada para inibir o HIV foi demasiadamente alta (acima de 100 μ M), dificultando o seu uso terapêutico, pois acima de 100 μ M o peptídeo apresenta efeito hemolítico nas células em cultura⁸⁹. Logo, a versatilidade desse peptídeo observada em diferentes tipos virais e cepas bacterianas credencia esta molécula à novos estudos com objetivo de ampliar sua ação aos demais microrganismos de interesse reprodutivo, ampliando a possibilidade de eliminação de patógenos não apenas em sêmen, mas em todos os materiais biológicos objetos das técnicas reprodutivas como oócitos e embriões, além dos insumos como meios de cultura e reagentes.

6.4. Inocuidade do peptídeo frente ao sêmen bovino

Os testes de inocuidade em sêmen foram feitos levando em consideração os parâmetros de qualidade de sêmen (motilidade e vigor) descritos pelo CBRA. Observando os dados iniciais obtidos na EVZ/UFG não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros de qualidade de sêmen após o tratamento com os peptídeos quando comparados as amostras controle sem tratamento (Figura 17). Em adição, nenhuma alteração estrutural nos espermatozoides foi observada.

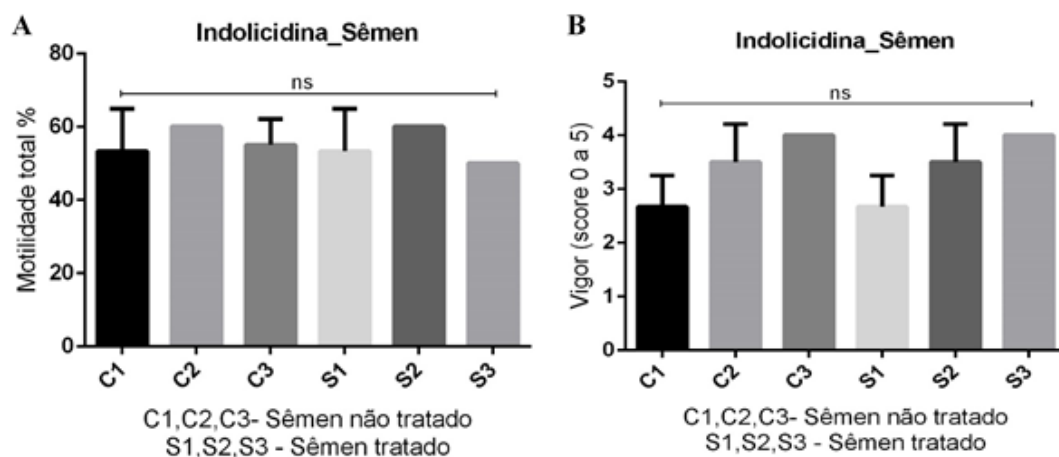


Figura 17 - Teste de inocuidade do peptídeo (30 µM) em sêmen. A – Motilidade total do espermatozoide expressos em porcentagem. B – Vigor de sêmen expressos em score. C1, C2 e C3 – amostras controle (não tratado com peptídeo) de sêmen fresco de três touros de raças diferentes. S1, S2 e S3 – amostras de sêmen dos mesmos touros tratadas com o peptídeo. ns - não significativo ($p < 0,05$).

Acredita-se que a concentração de 30 µM não apresentou efeito espermicida devida a baixa concentração utilizada no experimento. O efeito citotóxico do peptídeo de indolicidina e alguns análogos foi muito bem detalhado pelo estudo feito por Jindal et al. em 2015, no qual, o efeito citotóxico começa a ser evidente a partir da concentração de 62,5 µg/ml sem agravamento pelo tempo de exposição⁸⁹.

Confirmando os resultados observados, o teste no CASA foi realizado com duas concentrações, 30 e 100 µM. Essas concentrações foram escolhidas levando em conta a atividade antiviral do peptídeo e sua atividade bactericida. Além disso, o estudo feito por Jindal et al., demonstrou que o peptídeo indolicidina tem efeito citotóxico nas células em elevadas concentrações, logo, este ensaio buscou avaliar este efeito em células espermáticas conforme a

Tabela 1 avaliando o score de motilidade do CASA.

Tabela 1 - Teste da inocuidade do peptídeo no sêmen avaliados pelo CASA, no qual, é dado um score em porcentagem para motilidade dos espermatozoides, avaliando assim, o efeito espermicida do peptídeo. Controle – sêmen fresco (não tratado pelo peptídeo) de três touros de raças diferentes. 30 e 100 µM – sêmen incubado com o peptídeo por 30 minutos.

Os resultados obtidos no CASA, demonstram que não houve diferença significativa entre	Motilidade em porcentagem (N ^a de células avaliadas)			
	Controle	30 µM	100 µM	
as amostras de sêmen tratadas com o peptídeo de indolicidina em uma concentração de 30 µM	Touro 1	81(4692)	77(3806)	25(2501)
e as amostras controle, confirmando sua inocuidade frente a concentração considerada de amplo	Touro 2	76(2580)	74(5614)	38(1200)
	Touro 3	81(4293)	78(4745)	17(1990)

espectro deste trabalho (bactericida e viricida). Surpreendentemente, apesar da redução significativa da porcentagem de motilidade quando os espermatozoides foram submetidos ao tratamento com 100 μM , esta concentração não foi capaz de eliminar completamente a atividade espermática como esperado.

6.5. Viabilidade do vírus em sêmen tratado com o peptídeo.

O peptídeo de indolicidina foi capaz de diminuir a carga viral do BoHV-1 na concentração de 10 μM quando incubado com o sêmen, porém ele não foi capaz de eliminar completamente a infecção após as três passagens cegas. Conforme a Figura 18 e Figura 19, o peptídeo foi capaz de inibir o vírus até a concentração de $10^{2.5}$ TCID₅₀/mL. Essa diferença entre a eficiência do peptídeo sobre o vírus em meio de cultura e o vírus em sêmen, possivelmente deve-se aos constituintes do sêmen, que podem ter influência sobre a efetividade do peptídeo.

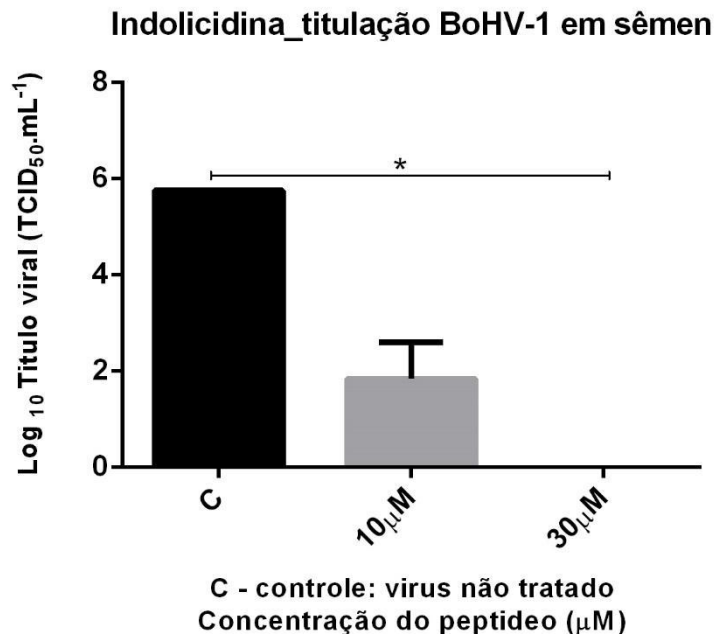


Figura 18 - Efeito da Indolicidina nas concentrações de 10 e 30 μM em sêmen artificialmente infectado pelo BoHV-1, observando a viabilidade do vírus em cultura de célula MDBK. C – controle não tratado com o peptídeo. 10 e 30 μM – concentrações da indolicidina. * significativo ($p < 0,05$).

No entanto, a concentração inicial em todos os ensaios de inativação viral foi superestimada. No tratamento utilizando 10 μM , podemos observar uma redução superior a 4 Log aproximadamente, comparado ao título controle ($10^{5.75}$ TCID₅₀/mL) (Figura 18). Títulos menores aos utilizados neste trabalho são atribuídos às infecções naturais¹⁰⁰, o que torna

improvável esta concentração no sêmen. Neste sentido, podemos considerar a concentração de 10 μM também eficiente para a eliminação do vírus e desinfecção do sêmen.

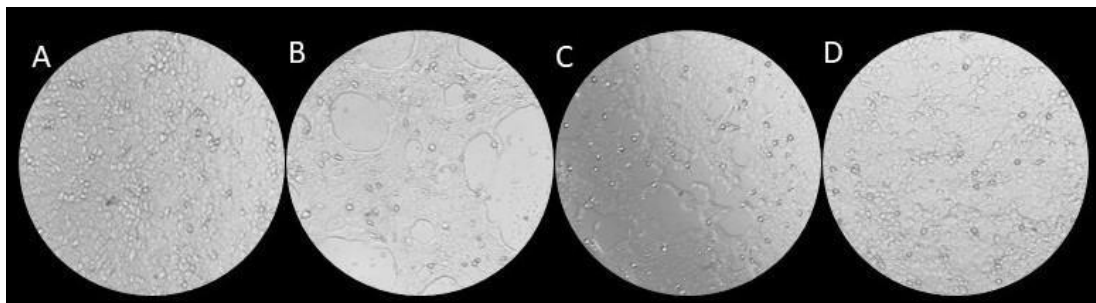


Figura 19 - Microscopia do efeito da Indolicidina na viabilidade do sêmen artificialmente infectado pelo BoHV-1 em cultura de MDBK: Painei A – Controle negativo da cultura sem CPE; Painei B – CPE característico da infecção de células MDBK pelo vírus (sem tratamento com peptídeo); Painei C – células MDBK tratadas com 10 μM de peptídeo, exibindo CPE na titulação $10^{-2.5}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$; Painei D – células MDBK tratadas com 30 μM de peptídeo não indicando CPE no centro do micropoço.

Mesmo que a concentração de 10 μM seja incapaz de eliminar completamente o vírus do sêmen, a concentração de 30 μM foi capaz de eliminá-lo completamente após o congelamento e descongelamento, além de que, essa concentração não apresentou efeito espermicida, mostrando-se como a melhor concentração para eliminar patógenos de origem viral e bacteriana.

Recentemente nosso grupo tem demonstrado nova metodologia, baseada no uso de imunoconjugados para a inativação fotodinâmica do BoHV-1 em sêmen¹⁰¹. No entanto, este trabalho, pela primeira vez, demonstra a viabilidade do uso do peptídeo indolicidina para a desinfecção de sêmen. Nossos resultados de 30 μM garante a sanidade e a qualidade dos subprodutos de origem animal, importante para o rompimento das barreiras sanitárias impostas ao Brasil devido ao BoHV-1 na exportação de sêmen.

7. CONCLUSÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de carne bovina, assim como é reconhecido internacionalmente como um dos principais produtores de embriões *in vitro*. Entretanto, devido à presença de algumas doenças infecto contagiosas, as barreiras sanitárias nacionais e internacionais podem dificultar o comércio interno ou proibir a exportação destes produtos (sêmen e embriões). Desta forma, nossos resultados colaboram para a minimização desses problemas fornecendo uma alternativa para a eliminação de patógenos (vírus e bactérias) presentes em subprodutos de origem animal.

De acordo com os resultados apresentados, foi possível constatar que o peptídeo de indolicidina é capaz de inibir a proliferação da *Leptospira interrogans* e do *alfaherpesvírus bovino-1*. Também foi constatada a inocuidade do peptídeo frente ao sêmen bovino segundo os parâmetros de qualidade de sêmen descritos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Além disso, foi confirmada a capacidade de eliminação do BoHV-1 em cultura de célula e a desinfecção do vírus pelo peptídeo em sêmen artificialmente infectado.

Assim, os resultados comprovam a eficácia do peptídeo indolicidina frente aos patógenos de interesse reprodutivo, surgindo como uma nova alternativa para desinfecção do sêmen.

Oferecendo uma alternativa aos antibióticos, a metodologia descrita nesse trabalho poderia ser incorporada aos protocolos sanitários atualmente utilizados para a eliminação de patógeno pois, além de ser inócuo ao espermatozoide e ao meio ambiente, possui atividade biológica rápida e de amplo espectro.

1. REFERÊNCIAS

1. Feuz DM, Umberger WJ. Beef cow-calf production. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract.* 2003;19(2):339–63.
2. Sellera FP, Nascimento CL, Ribeiro MS. Photodynamic Therapy in Veterinary Medicine: From Basics to Clinical Practice [Internet]. Sellera FP, Nascimento CL, Ribeiro MS, editors. Cham: Springer International Publishing; 2016. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-45007-0>
3. ASBIA. Relatório estatístico de produção, importação e comercialização de sêmen - 2019 [Internet]. 2019. Available from: <http://www.asbia.org.br>
4. ASBIA. Relatório estatístico de produção, importação e comercialização de sêmen - 2018 [Internet]. 2018. Available from: <http://www.asbia.org.br>.
5. ASBIA. Relatório estatístico de produção, importação e comercialização de sêmen - 2017 [Internet]. 2017. Available from: <http://www.asbia.org.br>.
6. Morrell J, Wallgren M, Morrell JM, Wallgren M. Alternatives to Antibiotics in Semen Extenders: A Review. *Pathogens* [Internet]. 2014 Dec 15 [cited 2019 Jan 6];3(4):934–46. Available from: <http://www.mdpi.com/2076-0817/3/4/934>
7. Eaglesome MD, Garcia MM. Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen [Internet]. Vol. 16, Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 1997 [cited 2019 Jan 6]. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/092a/79773511955ae8f6a42fdf7a0bea0d8ed147.pdf>
8. DROBNIS EZ, ZHONG CQ, OVERSTREET JW. Separation of Cryopreserved Human Semen Using Sephadex Columns, Washing, or Percoll Gradients. *J Androl* [Internet]. 1991 May 6 [cited 2020 Nov 8];12(3):201–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/j.1939-4640.1991.tb00250.x>
9. Segura-Correa J, Zapata-Campos C, Jasso-Obregón J, Martínez-Burnes J, López-Zavala R. Seroprevalence and risk factors associated with bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus in North-Eastern Mexico. 2016;6(263):143–9.
10. Barber KA, Daugherty HC, Ander SE, Jefferson VA, Shack LA, Pechan T, et al. Protein composition of the Bovine herpesvirus 1.1 Virion. *Vet Sci.* 2017 Mar 1;4(1).
11. Le C-F, Fang C-M, Sekaran SD. Intracellular Targeting Mechanisms by Antimicrobial Peptides. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2017 Apr;61(4):1–16. Available from: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.02340-16>
12. Selsted ME, Novotny MJ, Morris WL, Tang YQ, Smith W, Cullor JS. Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *J Biol Chem.* 1992;267(7):4292–5.
13. Xu J, Li X, Jiang B, Feng X, Wu J, Cai Y, et al. Antiviral Immunotoxin Against Bovine herpesvirus-1: Targeted Inhibition of Viral Replication and Apoptosis of Infected Cell. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 Apr 4 [cited 2019 Sep 30];9(APR). Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.00653/full>
14. Oliveira MT, Campos FS, Dias MM, Velho FA, Freneau GE, Brito WMED, et al. Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls. *Theriogenology* [Internet]. 2011 Apr 1 [cited 2019 Sep 28];75(6):1139–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21247624>

15. Ring SC, Graham DA, Sayers RG, Byrne N, Kelleher MM, Doherty ML, et al. Genetic variability in the humoral immune response to bovine herpesvirus-1 infection in dairy cattle and genetic correlations with performance traits. *J Dairy Sci.* 2018 Jul 1;101(7):6190–204.
16. Rana SK, Kota SNLS, Samayam PNR, Rajan S, Srinivasan VA. Use of real-time polymerase chain reaction to detect bovine herpesvirus 1 in frozen cattle and buffalo semen in India. *Vet Ital* [Internet]. 2011;47(3):313–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21947969>
17. Yang Z, Xu G, Reboud J, Ali SA, Kaur G, McGiven J, et al. Rapid Veterinary Diagnosis of Bovine Reproductive Infectious Diseases from Semen Using Paper-Origami DNA Microfluidics. *ACS Sensors.* 2018;3(2):403–9.
18. Arruda EF, Silva TIB, Aragão BB, Castro RS, Gomes YA. Soroprevalence of bovine alphaherpesvirus type 1 (BoHV-1) and risk factors associated with dairy properties of the municipality of Senador Guimard, Acre, Brazil. *Arq Inst Biol (Sao Paulo)* [Internet]. 2019 [cited 2019 Oct 1];86:1–6. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-16572019000100215&tlng=en
19. Mendes VRA, Costa EP, Queiroz VLD, Silva Júnior A, Alves SVP, Guimarães JD, et al. Impairment on nuclear maturation rate in oocytes from cows naturally infected by bovine herpesvirus 1 (BoHV-1). *Pesqui Veterinária Bras* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2019 Oct 1];38(12):2207–12. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2018001202207&tlng=en
20. Weiblen R, Kreutz LC, Canabarro TF, Schuch LF, Rebelatto MC. Isolation of Bovine Herpesvirus 1 from Preputial Swabs and Semen of Bulls with Balanoposthitis. *J Vet Diagnostic Investig* [Internet]. 1992 Jul 25 [cited 2019 Oct 3];4(3):341–3. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/104063879200400321>
21. Pawar SS, Meshram CD, Singh NK, Sonwane AA, Saini M, Rautmare SS, et al. Rapid detection of bovine herpesvirus 1 in bovine semen by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Arch Virol.* 2014;159(4):641–8.
22. Sayers RG, Byrne N, O'Doherty E, Arkins S. Prevalence of exposure to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and bovine herpesvirus-1 (BoHV-1) in Irish dairy herds. *Res Vet Sci.* 2015 Jun 1;100:21–30.
23. Martinez-Ibeas AM, Power C, McClure J, Sayers RG. Prevalence of BoHV-1 seropositive and BVD virus positive bulls on Irish dairy farms and associations between bull purchase and herd status. *Ir Vet J* [Internet]. 2015 [cited 2019 Sep 28];68:28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26664696>
24. Sayers RG. Associations between exposure to bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) and milk production, reproductive performance, and mortality in Irish dairy herds. *J Dairy Sci.* 2017 Feb 1;100(2):1340–52.
25. ICTV IC on T of V. ICTV Taxonomy history: Bovine alphaherpesvirus 1. 2015.
26. Metzler AE, Matile H, Gassmann U, Engels M, Wyler R. European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. *Arch Virol* [Internet]. 1985 [cited 2019 Oct 4];85(1–2):57–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2990389>

27. Petrini S, Iscaro C, Righi C. Antibody Responses to Bovine Alphaherpesvirus 1 (BoHV-1) in Passively Immunized Calves. *Viruses* [Internet]. 2019 [cited 2019 Sep 28];11(1). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30609738>
28. Levings RL, Roth JA. Immunity to Bovine Herpesvirus 1: I. Viral lifecycle and innate immunity. *Anim Heal Res Rev* [Internet]. 2013 Jun 26;14(1):88–102. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1466252313000042/type/journal_article
29. Chothe SK, Sebastian A, Thomas A, Nissly RH, Wolfgang D, Byukusenge M, et al. Whole-genome sequence analysis reveals unique SNP profiles to distinguish vaccine and wild-type strains of bovine herpesvirus-1 (BoHV-1). *Virology* [Internet]. 2018 Sep;522(June):27–36. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.06.015>
30. van Oirschot JT. Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. *Vet. Q.* 17, 29–33. doi:10.1080/01652176.1995.9694526. *Vet Q* [Internet]. 1995 [cited 2019 Oct 4];17(1):29–33. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01652176.1995.9694526>
31. Wild P, Engels M, Senn C, Tobler K, Ziegler U, Schraner EM, et al. Impairment of Nuclear Pores in Bovine Herpesvirus 1-Infected MDBK Cells. *J Virol.* 2005 Jan 15;79(2):1071–83.
32. Pellett PE, Roizman B. The family Herpesviridae: a brief introduction. In: Philadelphia: Wolters Kluwer Health, editor. *Fields Virology*. 5th ed. 2007. p. 2479–2499.
33. Mettenleiter TC. Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: Role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. *Virus Res.* 2003;92(2):197–206.
34. Muylkens B, Thiry J, Kirten P, Schynts F, Thiry E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. Vol. 38, *Veterinary Research*. 2007. p. 181–209.
35. Ibáñez FJ, Farías MA, Gonzalez-Troncoso MP, Corrales N, Duarte LF, Retamal-Díaz A, et al. Experimental dissection of the lytic replication cycles of herpes simplex viruses in vitro. Vol. 9, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2018.
36. Owen D, Crump C, Graham S. Tegument Assembly and Secondary Envelopment of Alphaherpesviruses. *Viruses* [Internet]. 2015 Sep 18 [cited 2019 Oct 2];7(9):5084–114. Available from: <http://www.mdpi.com/1999-4915/7/9/2861>
37. Frizzo da Silva L, Kook I, Doster A, Jones C. Bovine Herpesvirus 1 Regulatory Proteins bICP0 and VP16 Are Readily Detected in Trigeminal Ganglionic Neurons Expressing the Glucocorticoid Receptor during the Early Stages of Reactivation from Latency. *J Virol* [Internet]. 2013 Oct 15 [cited 2019 Oct 2];87(20):11214–22. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.01737-13>
38. Zhu L, Workman A, Jones C. Potential Role for a β -Catenin Coactivator (High-Mobility Group AT–Hook 1 Protein) during the Latency-Reactivation Cycle of Bovine Herpesvirus 1. *J Virol.* 2017 Mar 1;91(5).
39. Silvestro C, Bratanich A. The latency related gene of bovine herpesvirus types 1 and 5 and its modulation of cellular processes. *Arch Virol.* 2016;161(12):3299–308.
40. Pawar SS, Meshram CD, Singh NK, Saini M, Mishra BP, Gupta PK. Loop-Mediated Isothermal Amplification for Rapid Detection and Differentiation of Wild-Type Bovine Herpesvirus-1 and Glycoprotein E-Deleted Marker Vaccine Strain. *Anim Biotechnol.*

- 2015;26(4):268–72.
41. Chowdhury SI, Wei H, Weiss M, Pannhorst K, Paulsen DB. A triple gene mutant of BoHV-1 administered intranasally is significantly more efficacious than a BoHV-1 glycoprotein E-deleted virus against a virulent BoHV-1 challenge. *Vaccine* [Internet]. 2014;32(39):4909–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.07.004>
 42. Chandranaik BM, Rathnamma D, Patil SS, Kovi RC, Dhawan J, Ranganatha S, et al. Development of a Probe Based Real Time PCR Assay for Detection of Bovine Herpes Virus-1 in Semen and Other Clinical Samples. *Indian J Virol* [Internet]. 2013 Jun 16 [cited 2019 Sep 28];24(1):16–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24426253>
 43. Diallo IS, Corney BG, Rodwell BJ. Detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 using a multiplex real-time polymerase chain reaction. *J Virol Methods* [Internet]. 2011;175(1):46–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.04.013>
 44. Sarangi LN, Naveena T, Rana SK, Surendra KSNL, Reddy RVC, Bajibabu P, et al. Evaluation of a specialized filter-paper matrix for transportation of extended bovine semen to screen for bovine herpesvirus-1 by real-time PCR. *J Virol Methods* [Internet]. 2018;257:1–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.03.009>
 45. Morán PE, Favier PA, Lomónaco M, Catena MC, Chiapparrone ML, Odeón AC, et al. Search for the genome of bovine herpesvirus types 1 , 4 and 5 in bovine semen. 2013;3:126–30.
 46. Leite AI, Coelho WAC, Brito RLL, Silva GCP, Santos RF, Mathias LA, et al. Caracterização epidemiológica da leptospirose suína em criações não tecnificadas do semiárido brasileiro. *Pesqui Veterinária Bras* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2020 Nov 8];38(4):613–9. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2018000400613&lng=en&nrm=iso&tlng=pt
 47. Mehrotra P, Ramakrishnan G, Dhandapani G, Srinivasan N, Madanan MG. Comparison of *Leptospira interrogans* and *Leptospira biflexa* genomes: Analysis of potential leptospiral-host interactions. *Mol Biosyst*. 2017;13(5):883–91.
 48. Paixão AP, Santos HP, Alves LMC, Pereira H de M, Carvalho RFB de, Costa Filho VM, et al. *Leptospira* spp. em bovinos leiteiros do estado do Maranhão, Brasil: frequência, fatores de risco e mapeamento de rebanhos reagentes. *Arq Inst Biol (Sao Paulo)* [Internet]. 2016 [cited 2020 Nov 8];83(0). Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-16572016000100238&lng=en&nrm=iso&tlng=pt
 49. Haake DA. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology* [Internet]. 2000 Jul 1 [cited 2020 Nov 8];146(7):1491–504. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2664406/>
 50. Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol* [Internet]. 2010 Jan;140(3–4):287–96. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113509001163>
 51. Givens MD. Review: Risks of disease transmission through semen in cattle. *Animal*. 2018;12(s1):s165–71.
 52. Kim S, Lee DS, Suzuki H, Watarai M. Detection of *Brucella canis* and *Leptospira*

- interrogans in canine semen by multiplex nested PCR. *J Vet Med Sci.* 2006;68(6):615–8.
53. Al-Busadah KA, El-Bahr SM, Khalafalla AI. Serum biochemical profile and molecular detection of pathogens in semen of infertile male dromedary camels (*Camelus dromedarius*). *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2017;180:58–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.03.003>
 54. Masri SA, Nguyen PT, Gale SP, Howard CJ, Jung SC. A Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of *Leptospira* spp. in Bovine Semen. *Can J Vet Res* [Internet]. 1997 [cited 2020 Nov 8];61(1):15–20. Available from: </pmc/articles/PMC1189363/?report=abstract>
 55. Vinodh R, Raj GD, Govindarajan R, Thiagarajan V. Detection of *Leptospira* and *Brucella* genomes in bovine semen using polymerase chain reaction. *Trop Anim Health Prod* [Internet]. 2008 Jun [cited 2020 Nov 8];40(5):323–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18509939/>
 56. Heinemann MB, Garcia JF, Nunes CM, Gregori F, Higa ZMM, Vasconcellos SA, et al. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Vet Microbiol.* 2000;73(4):261–7.
 57. Lilenbaum W, Vargas R, Brandão FZ, Cortez A, de Souza SO, Brandão PE, et al. Detection of *Leptospira* spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. *Theriogenology* [Internet]. 2008 Apr 15 [cited 2020 Nov 8];69(7):837–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18291518/>
 58. Shahidi F, Zhong Y. Bioactive Peptides. *J AOAC Int.* 2008;91(4):914–931.
 59. Lau JL, Dunn MK. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorganic Med Chem* [Internet]. 2018;26(10):2700–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.052>
 60. Craik DJ, Fairlie DP, Liras S, Price D. The Future of Peptide-based Drugs. *Chem Biol Drug Des* [Internet]. 2013 Jan 1 [cited 2019 Jan 6];81(1):136–47. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/cbdd.12055>
 61. Boonen K, Creemers JW, Schoofs L. Bioactive peptides, networks and systems biology. *BioEssays.* 2009;31(3):300–14.
 62. Ryan JT, Ross RP, Bolton D, Fitzgerald GF, Stanton C. Bioactive peptides from muscle sources: Meat and fish. *Nutrients.* 2011;3(9):765–91.
 63. Agyei D, Danquah MK. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2011 May;29(3):272–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.001>
 64. Jindal HM, Zandi K, Ong KC, Velayuthan RD, Rasid SM, Samudi Raju C, et al. Mechanisms of action and in vivo antibacterial efficacy assessment of five novel hybrid peptides derived from Indolicidin and Ranalexin against *Streptococcus pneumoniae*. *PeerJ* [Internet]. 2017 Oct 5;5:e3887. Available from: <https://peerj.com/articles/3887>
 65. Hannon JP, Nunn C, Stolz B, Bruns C, Weckbecker G, Lewis I, et al. Drug Design at Peptide Receptors. *J Mol Neurosci* [Internet]. 2002 [cited 2019 Aug 15];18(1–2):15–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11931345>
 66. Peng S-B, Zhang X, Paul D, Kays LM, Gough W, Stewart J, et al. Identification of

- LY2510924, a novel cyclic peptide CXCR4 antagonist that exhibits antitumor activities in solid tumor and breast cancer metastatic models. *Mol Cancer Ther* [Internet]. 2015 Feb [cited 2019 Aug 15];14(2):480–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25504752>
67. Kang H-K, Kim C, Seo CH, Park Y. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. *J Microbiol* [Internet]. 2017 Jan 30;55(1):1–12. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12275-017-6452-1>
 68. Chanu KV, Thakuria D, Kumar S. Antimicrobial peptides of buffalo and their role in host defenses. *Vet World* [Internet]. 2018 Feb;11(2):192–200. Available from: <http://www.veterinaryworld.org/Vol.11/February-2018/17.html>
 69. Shah P, Hsiao FSH, Ho YH, Chen CS. The proteome targets of intracellular targeting antimicrobial peptides. *Proteomics*. 2016;16(8):1225–37.
 70. Andersson DI, Hughes D, Kubicek-Sutherland JZ. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resist Updat* [Internet]. 2016 May [cited 2019 Aug 14];26:43–57. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1368764616300024?via%3Dihub>
 71. Mishra A, Choi J, Moon E, Baek K-H. Tryptophan-Rich and Proline-Rich Antimicrobial Peptides. *Molecules* [Internet]. 2018 Apr 2;23(4):815. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/23/4/815>
 72. Skalickova S, Heger Z, Krejcova L, Pekarik V, Bastl K, Janda J, et al. Perspective of Use of Antiviral Peptides against Influenza Virus. *Viruses* [Internet]. 2015 Oct 20 [cited 2019 Aug 14];7(10):5428–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26492266>
 73. Selsted ME, Novotny MJ, Morris WL, Tang YQ, Smith W, Cullor JS. Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *J Biol Chem*. 1992;267(7):4292–5.
 74. Schibli DJ, Epand RF, Vogel HJ, Epand RM. Tryptophan-rich antimicrobial peptides: Comparative properties and membrane interactions. *Biochem Cell Biol*. 2002;80(5):667–77.
 75. Subbalakshmi C, Krishnakumari V, Nagaraj R, Sitaram N. Requirements for antibacterial and hemolytic activities in the bovine neutrophil derived 13-residue peptide indolicidin. *FEBS Lett*. 1996 Oct 14;395(1):48–52.
 76. Subbalakshmi C, Sitaram N. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 1998 Mar [cited 2019 Aug 15];160(1):91–6. Available from: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12896.x>
 77. Marchand C, Krajewski K, Lee HF, Antony S, Johnson AA, Amin R, et al. Covalent binding of the natural antimicrobial peptide indolicidin to DNA abasic sites. *Nucleic Acids Res*. 2006 Oct 15;34(18):5157–65.
 78. Matanic VCA, Castilla V. Antiviral activity of antimicrobial cationic peptides against Junin virus and herpes simplex virus. 2004;23:382–9.
 79. Friedrich CL, Rozek A, Patrzykat A, Hancock REW. Structure and Mechanism of Action of an Indolicidin Peptide Derivative with Improved Activity against Gram-positive Bacteria. *J Biol Chem*. 2001 Jun 29;276(26):24015–22.

80. Merrifield RB. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J Am Chem Soc* [Internet]. 1963 Jul 1 [cited 2020 Nov 2];85(14):2149–54. Available from: <https://www.scienceopen.com/document?vid=e6d73512-4877-46db-a0c4-17a8fe2d5bf7>
81. Kaiser E, Colescott RL, Bossinger CD, Cook PI. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal Biochem*. 1970 Apr 1;34(2):595–8.
82. Montone CM, Capriotti AL, Cavaliere C, La Barbera G, Piovesana S, Zenezini Chiozzi R, et al. Peptidomic strategy for purification and identification of potential ACE-inhibitory and antioxidant peptides in *Tetrademus obliquus* microalgae. *Anal Bioanal Chem*. 2018;410(15):3573–86.
83. Liu P, Lan X, Yaseen M, Wu S, Feng X, Zhou L, et al. Purification, Characterization and Evaluation of Inhibitory Mechanism of ACE Inhibitory Peptides from Pearl Oyster (*Pinctada fucata martensii*) Meat Protein Hydrolysate. *Mar Drugs* [Internet]. 2019 Aug 8;17(8):463. Available from: <https://www.mdpi.com/1660-3397/17/8/463>
84. Stawikowski M, Fields GB. Introduction to peptide synthesis [Internet]. Vol. 69, *Current protocols in protein science*. NIH Public Access; 2013 [cited 2019 Aug 12]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18429226>
85. Zecchi R, Franceschi P, Tigli L, Ricci F, Boscaro F, Pioselli B, et al. Mass spectrometry imaging as a tool for evaluating the pulmonary distribution of exogenous surfactant in premature lambs. *Respir Res*. 2019;20.
86. Hamilton MA, Russo RC, Thurston R V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ Sci Technol* [Internet]. 1977 Jul 1 [cited 2020 Nov 2];11(7):714–9. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es60130a004>
87. Souza WJ, Nascente EP, Santos FC, Malaquias J V, Sereno JRB, Viana EF, et al. Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1): método de diagnóstico e sua influência na qualidade espermática em touros infectados experimentalmente [Bovine Herpes virus type 1 (BoHV-1): Diagnosis method and its influence on spermatid quality in experimentally infected bulls]. *Arq Bras Med Vet Zootec* [Internet]. 2018;1163–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-10229>
88. Falla TJ, Nedra Karunaratne D, Hancock REW. Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. *J Biol Chem*. 1996;271(32):19298–303.
89. Jindal HM, Le CF, Mohd Yusof MY, Velayuthan RD, Lee VS, Zain SM, et al. Antimicrobial Activity of Novel Synthetic Peptides Derived from Indolicidin and Ranalexin against *Streptococcus pneumoniae*. Bhattacharjya S, editor. *PLoS One* [Internet]. 2015 Jun 5 [cited 2020 Nov 6];10(6):e0128532. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0128532>
90. Vergis J, Malik SS, Pathak R, Kumar M, Ramanjaneya S, Kurkure NV, et al. Antimicrobial Efficacy of Indolicidin Against Multi-Drug Resistant Enterococcal *Escherichia coli* in a *Galleria mellonella* Model. *Front Microbiol* [Internet]. 2019 Nov 29 [cited 2020 Nov 7];10. Available from: [/pmc/articles/PMC6895141/?report=abstract](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6895141/?report=abstract)
91. Falla TJ, Nedra Karunaratne D, Hancock REW. Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. *J Biol Chem* [Internet]. 1996 Aug 9 [cited 2020 Nov 6];271(32):19298–303. Available from: <http://www.jbc.org/>

92. Albiol Matanic VC, Castilla V. Antiviral activity of antimicrobial cationic peptides against Junin virus and herpes simplex virus. *Int J Antimicrob Agents*. 2004;23(4):382–9.
93. Zhou Y, Peng Y. Synergistic effect of clinically used antibiotics and peptide antibiotics against gram-positive and gram-negative bacteria. *Exp Ther Med [Internet]*. 2013 [cited 2020 Nov 7];6(4):1000–4. Available from: /pmc/articles/PMC3797290/?report=abstract
94. Ghaffar K, Hussein W, Khalil Z, Capon R, Skwarczynski M, Toth I. Levofloxacin and Indolicidin for Combination Antimicrobial Therapy. *Curr Drug Deliv*. 2015;12(1):108–14.
95. Galdiero E, Siciliano A, Maselli V, Gesuele R, Guida M, Fulgione D, et al. An integrated study on antimicrobial activity and ecotoxicity of quantum dots and quantum dots coated with the antimicrobial peptide indolicidin. *Int J Nanomedicine [Internet]*. 2016 Aug 26 [cited 2020 Nov 7];11:4199–211. Available from: /pmc/articles/PMC5008656/?report=abstract
96. Ladokhin AS, Selsted ME, White SH. Bilayer Interactions of Indolicidin, a Small Antimicrobial Peptide Rich in Tryptophan, Proline, and Basic Amino Acids. Vol. 72, *Biophysical Journal*. 1997.
97. Yasin B, Pang M, Turner JS, Cho Y, Dinh NN, Waring AJ, et al. Evaluation of the inactivation of infectious herpes simplex virus by host-defense peptides. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000;19(3):187–94.
98. Robinson WE, McDougall B, Tran D, Selsted ME. Anti-HIV-1 activity of indolicidin, an antimicrobial peptide from neutrophils. *J Leukoc Biol [Internet]*. 1998 Jan;63(1):94–100. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jlb.63.1.94>
99. Zuend CF, Nomellini JF, Smit J, Horwitz MS. Generation of a Dual-Target , Safe , Inexpensive Microbicide that Protects Against HIV-1 and HSV-2 Disease. *Sci Rep [Internet]*. 2018;(October 2017):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-21134-1>
100. Rocha MA, Barbosa EF, Guimarães SEF, Dias Neto E, Gouveia AMG. A high sensitivity-nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. *Vet Microbiol*. 1998 Aug 28;63(1):1–11.
101. Oliveira TM dos A, Bezerra FC, Gambarini ML, Teles AV, Cunha PHJ da, Brazil DS, et al. Immunoconjugates to increase photoinactivation of bovine alphaherpesvirus 1 in semen. *Vet Microbiol*. 2020 Aug 1;247:108780.

2. ANEXO 1 - Parecer da Comissão de Ética no uso de Animais



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 20 de maio de 2019.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO ATENDIMENTO DE PENDÊNCIA DO PROTOCOLO N°. 023/19

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Doutorado

II - Identificação:

- Data de apresentação a CEUA: 29/03/2019
- Data do atendimento da pendência: 08/05/2019
- Título do projeto: Imunoinativação fotodinâmica do Herpesvírus bovino tipo 1 em sêmen
- Pesquisador Responsável/ Unidade: Taise Maria dos Anjos Oliveira - EVZ
- Pesquisadores Participantes: Pablo José Gonçalves/UFV, Amanda Vargas Teles/UFV, Fábio de Castro Bezerra/UFV.
- Médico Veterinário/CRMV: Taise Maria dos Anjos Oliveira - CRMV/GO 06251.
- Unidade onde será realizado: EVZ/UFV

III – Respostas as pendências:

Solicitação da CEUA:

- 1- Apresentar teste estatístico para a determinação do número amostral ou pelo menos 1 referência (completa) da área em que utilizam número de animais semelhantes.
- 2- Deixar Claro se o material é aproveitado de out.ro protocolo já aprovado no CEUA-UFV.

Resposta do Pesquisador Responsável:

- 1- O pesquisador mostrou uma série de trabalhos, com referências completas que justificam o número de animais.
- 2- O pesquisador responsável afirma que não serão utilizados materiais de outros projetos

VI - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, o projeto foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA da Universidade Federal de Goiás.

Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(s) pesquisador(es) responsável(is) deverá(ão) encaminhar à CEUA-PRPI-UFV o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, a qual está prevista para finalizar suas ações até **31/03/2021**.

VII - Data da reunião: 20/05/2019.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFV, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufv@gmail.com



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Imunoinativação fotodinâmica do Herpesvírus bovino tipo 1 em sêmen**”, registrada com o protocolo nº **023/19**, sob a responsabilidade de **Guilherme Rocha Lino de Souza** e **Taise Maria dos Anjos Oliveira** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - 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 aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG), em reunião de **20/05/2019**.

- Finalidade: () Ensino (X) Pesquisa Científica
- Vigência da autorização (início e fim): 20/05/2019 a 31/03/2021
- Espécie/linhagem/raça: *Gallus gallus domesticus*, White Leghorn, e Bovinos (*Bos taurus*), Cruzados (Nelore/Gir).
- Nº de animais autorizados: 4 galinhas e 4 touros
- Peso/Idade *Gallus gallus domesticus* 20 meses (1,5 Kg) e *Bos taurus* de 4 anos (900 Kg)
- Sexo: *Gallus gallus domesticus* (Fêmeas); *Bos taurus* (Machos)
- Origem (fornecedor): Aviário da Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG e Setor de Reprodução Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG.

Dra. Marina Pacheco Miguel
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com