

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ FACULDADE DE VETERINÁRIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS MESTRADO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

THALES MÁRCIO CABRAL DOS SANTOS

USO DO PEPTÍDEO Ctn[1-9], DERIVADO DA CROTALICIDINA, NA ATIVAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS

FORTALEZA – CEARÁ 2020

THALES MÁRCIO CABRAL DOS SANTOS

USO DO PEPTÍDEO Ctn[1-9], DERIVADO DA CROTALICIDINA, NA ATIVAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias. Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas

Coorientador: Prof. Dr. Gandhi Rádis-Baptista

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação Universidade Estadual do Ceará Sistema de Bibliotecas

Santos, Thales Marcio Cabral Dos. USO DO PEPTÍDEO Ctn[1-9], DERIVADO DA CROTALICIDINA, NA ATIVAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS [recurso eletrônico] / Thales Marcio Cabral Dos Santos. - 2020. 75 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Mestrado acadêmico) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinaria, Curso de Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias - Mestrado Acadêmico, Fortaleza, 2020.

Orientação: Prof. Dr. Vicente Jose de Figueiredo Freitas.

1. Embrião. 2. Partenogênese. 3. Peptídeo antimicrobiano. 4. Vipericidina. I. Título.

THALES MÁRCIO CABRAL DOS SANTOS

USO DO PEPTÍDEO Ctn[1-9], DERIVADO DA CROTALICIDINA, NA ATIVAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias. Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Aprovada em: 06 de julho de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas (Orientador) Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Gandhi Rádis-Baptista (Coorientador/Examinador) Universidade Federal do Ceará (UFC)

lice norria Casta

Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins (Examinadora) Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Luciana Magalhães Melo (Suplente) UNIFAMETRO

Aos meus pais Teles e Tiêne e meus irmãos Teles Jr e Neto.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Ceará, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) da Faculdade de Veterinária (FAVET).

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo apoio financeiro através do projeto PRONEX (PR2-0101-00059.01.00/15) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos, essenciais para a realização deste trabalho.

À minha família, minha mãe Tiene, meu pai Teles, meus irmãos Teles Júnior e Antônio Neto (Netinho), minha avó Romilda, minhas tias Telma, Tânia, Taíze e Tédia, meu tio Erny, meus primos Josiberto e Danielma, por todos os momentos difíceis e momentos felizes me ajudaram e sempre me motivaram a continuar, que sem eles nada disso seria possível.

À minha namorada, Norma, por todo este caminho percorrido esteve comigo em todos os momentos, me motivando e acima de tudo sendo uma companheira e minha melhor amiga para qualquer eventualidade. Obrigado por tudo, te amo.

Aos funcionários do Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCR): Bodó, Selmar e César, por terem participado diretamente e indiretamente da minha vivência laboratorial.

Ao pessoal dos abatedouros "Garrote" e "Paraibano": Mário, Dr. Rogério, Cláudio e Bonifácio, pela cooperação e cessão dos ovários bovinos.

À equipe de LFCR que me ajudou durante essa jornada: Thaís, Mirelly, João Victor, Sâmara, Gabriel, Izabella, Lorena e Irana. Todos foram essenciais para que este mestrado tenha sido realizado e principalmente pela parceria e momentos de descontração que todos proporcionaram.

À professora Luciana Melo, por ter participado do meu crescimento e ajudado de forma essencial meus trabalhos.

Ao professor Gandhi, por ter colaborado, não só com os peptídeos, mas com sua calma e mente bastante aberta.

Ao meu orientador, o professor Vicente, por ter me dado essa oportunidade única de fazer parte de um laboratório ótimo e de participar do meu crescimento pessoal e acadêmico.

RESUMO

Em mamíferos, o influxo do cálcio é fator primordial para a ativação oocitária após ovulação de um oócito maturado e com competência ao desenvolvimento. Biotecnologias da reprodução, como a injeção intracitoplasmática de espermatozoide e tranferência nuclear de células somáticas necessitam da ativação oocitária artificial para dar continuidade ao desenvolvimento embrionário. Os estudos com as catelicidinas, presentes no veneno de cascavéis, mostraram propriedades antimicrobianas, antitumorais e antifúngicas. Além disso, o peptídeo sintético de crotalicidina (Ctn[1-9]), uma vipericidina relacionado à família das catelicidinas, possui capacidade de promover influxo de cálcio em células cancerígenas. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do (Ctn[1-9]), ligado covalentemente com a Rodamina B (RhoB-Ctn[1-9]), na ativação oocitária e no posterior desenvolvimento de embriões bovinos produzidos por partenogênese. Ovários bovinos foram colhidos em abatedouro local e foram puncionados os folículos medindo entre 2-8 mm. Os complexos cumulus-oócito obtidos (n = 1599) foram submetidos à maturação *in vitro* por 26 h e então divididos (n= 1178) nos diferentes grupos experimentais: Ctn[1-9] (0, 1, 10 e 40 µM) e grupo controle (ionomicina 5 µM), com tempo de exposição de 4 min em todos os grupos. Posteriormente, os oócitos foram incubados por 4 h com 6-DMAP em meio SOF, seguido de cultivo in vitro em meio SOF por sete dias. A análise estatística foi realizada utilizando o software Minitab. Os dados são apresentados como porcentagem e comparados através do teste exato de Fisher. Os resultados foram considerados significativos quando P < 0.05. No dia dois de cultivo, em relação à taxa de clivagem, não houve diferença estatística (P > 0,05) entre as concentrações 1 μ M (19,6%), 10 μ M (22,4%) e 40 μ M (14,7%), entretanto o grupo 1 μ M e 10 μ M foram significativamente maiores (P < 0,05) do que o grupo 0 µM (8,4%). Para a taxa de formação de blastocisto, grupos 0 µM (0,6%), 10 µM (1,8%) e 40 μ M (2,2%) não demonstraram diferença significativa (P > 0,05) entre eles, porém o grupo 40 μ M foi significativamente maior (P < 0.05) do que o grupo 1 μ M (0%). Em conclusão, o RhoB-Ctn[1-9] demonstrou ser capaz de induzir a clivagem em oócitos bovinos. Além disso, a ativação e o desenvolvimento até o estádio de blastocisto mostram pouca ou nenhuma toxicidade deste peptídeo como agente ativador de oócitos bovinos.

Palavras-chave: Embrião. Partenogênese. Peptídeo antimicrobiano. Vipericidina.

ABSTRACT

In mammals, calcium influx is critical to oocyte activation post-ovulation of a matured oocyte with competence to development. Reproductive biotechnologies such as cell intracytoplasmic sperm injection and somatic nuclear transfer necessarily use artificial oocyte activation to continue embryo development. The studies on cathelicidins, present in pit rattlesnake venom, showed antimicrobial, antitumor and antifungal properties. In addition, the synthetic peptide from crotalicidin (Ctn[1-9]), a vipericidin related to the cathelicidin family, has the capacity to promote calcium influx in cancer cells. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of Ctn[1-9], covalently conjugated with Rhodamine B (RhoB-Ctn[1-9]), on oocyte activation and development of bovine embryos produced by parthenogenesis. Bovine ovaries were collected in local abattoir and follicles measuring 2-8 mm were punctured. Cumulusoocyte complexes (n = 1599) were subjected to *in vitro* maturation for 26 h and then divided (n= 1178) to different experimental groups: Ctn[1-9] (0; 1; 10 and 40 µM) and control group (ionomycin 5 μ M), with 4 min exposure time for all groups. Then, oocytes were incubated for 4 h in 6-DMAP in SOF medium and followed for in vitro culture in SOF medium for seven days. Statistical analysis were performed using Minitab software. Data are shown as percentage and compared by Fisher's exact test. Results were significant when P < 0.05. In day two of culture, concerning cleavage rate, there was no statistical difference (P > 0.05) between concentration 1 μ M (19.6%), 10 μ M (22.4%) and 40 μ M (14.7%), however group 1 μ M and 10 μ M were significantly higher (P < 0.05) than group $0 \mu M$ (8.4%). For the blastocyst formation rate, groups with $0 \mu M$ (0.6%), 10 μ M (1.8%) and 40 μ M (2.2%) showed no significant difference (P > 0.05) among them, yet group 40 μ M was significantly higher (P < 0.05) than group 1 μ M (0%). In conclusion, RhoB-Ctn[1-9] showed to be able to induced cleavage in bovine oocytes. In addition, the activation and development to the blastocyst stage show little or no toxicity of this peptide as an activating agent for bovine oocytes.

Keywords: Embryo. Parthenogenesis. Antimicrobial Peptide. Vipericidin.

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1 Sequência de análise de PAMRCs (Peptídeo Antimicrobiano Relacionado de Catelicidina) de veneno de serpentes demonstrado através de região hipervariável seguido do Cterminal como uma característica fundamental de peptídeos reptilianos, comparado com outros peptídeos de vertebrados do mesmo clado.
- Figura 2 Diagrama esquemático de modelo proposto para ativação oocitária induzida por espermatozoide na fecundação em mamíferos.
- Figura 3 Esquema simplificado demonstrando a técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI).
- Figura 4 Esquema demonstrando a técnica de transferência nuclear de células somáticas (TNCS) utilizada para obtenção da ovelha "Dolly".

22

24

26

CAPÍTULO 1

Figure 1 – Structural formula of RhoB-Ctn[1-9]. The Rhodamine B-Lys-Arg-Phe-Lys-Lys-Phe-Phe-Lys-Lys-NH2 (RhoB-KRFKKFFKK-NH₂), RhoB-Ctn[1-9] structural formula was draw with the ACD/ChemSketch - A Free Comprehensive Chemical Drawing Package

(https://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/). The alternance of positively charged dipeptides (LysArg, KR and LysLys, KK) and the hydrophobic phenylalanine (Phe, F) residues is observable. The N-terminal covalently linked rhodamine B and the C-terminal amidation are represented. Experimental MW = 1681.13 g mol-1. Molecular formula $C_{91}H_{131}N_{20}O_{11}$.

56

Figure 2 – Representative bovine embryos produced after oocyte activation with RhoB-Ctn[1-9] at 0, 10 and 40 μM and ionomycin (5 μM, control) for 2 and 7 days of treatment. Line 1 shows the embryos cleaved on day 2 (black arrows), while line 2 shows the blastocysts obtained on day 7 (white arrows) of culture.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1 –	Structures and properties of crotalicidin, crotalicidin-derived	
	peptides and in tandem encrypted crotalicidin peptides.	52
Table 2 –	Antimicrobial and hemolytic activity of Ctn[1-9] peptide	
	analogues.	53
Table 3 –	Effect of different concentrations of RhoB-Ctn[1-9] in the	
	activation of bovine oocytes.	54
Table 4 –	Summary of the biological activities observed for the encrypted	
	vipericidin peptide, RhoB-Ctn[1-9].	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-DMAP	6-dimethylaminopurine (6-dimetilaminopurina)	
AI	Anáfase I	
AOA	Ativação Oocitária Artificial	
BSA	Bovine serum albumin (Albumina sérica bovina)	
CEUA	Comitê de Ética para o Uso de Animais	
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico	
COCs	Cumulus-oocyte complexes (Complexos cumulus-oócito)	
CG	Cortical granulus (grânulos corticais)	
Ctn	Crotalicidin (Crotalicidina)	
DAG	Diacilglicerol	
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)	
EGF	Epidermal growth factor (Fator de crescimento epidermal)	
EVP	Encrypted Vipericidin Peptide (Peptídeo Encriptado de Vipericidina)	
FAVET	Faculdade de Veterinária	
FBS	Fetal Bovine Serum (Soro Fetal Bovino – SFB)	
FPM	Fator Promotor da Maturação	
FSH	Follicle Stimulating Hormone (Hormônio Folículo Estimulante)	
FUNCAP	Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico	
GVBD	Germinal vesicle breakdown (Quebra da vesícula germinativa)	
ICMART	International Committee Monitoring Assisted Reproductive Technologies	
	(Comitê Internacional de Monitoramento de Tecnologias Reprodutivas	
	Assistidas)	
ICSI	Intracytoplasmatic Sperm Injection (Injeção Intracitoplasmática de	
	Espermatozoide)	
IL-6	Interleucina-6	
IL-10	Interleucina-10	
InsP ₃	Inositol 1,4,5-trisfosfato	
InsP ₃ R	Receptor do inositol 1,4,5-trisfosfato	
IVC	<i>In vitro culture</i> (Cultivo in vitro – CIV)	
IVF	In vitro fertilization (Fecundação in vitro – FIV)	

IVM	In vitro maturation (Maturação in vitro – MIV)
LFCR	Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução
LH	Luteinizing hormone (Hormônio luteinizante)
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
PAMs	Peptídeos antimicrobianos
PIP2	fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato
ΡLCζ	Fosfolipase C Zeta
PM	Plasm membrane (membrana plasmática)
PN	Pronúcleo
PPC	Peptídeos de Penetração Celular
PV	Espaço perivitelino
RE	Retículo endoplasmático
RhoB	<i>Rhodamine B</i> (Rodamina B)
SOF	Synthetic oviductal fluid (Fluido sintético do oviduto - SOF)
TI	Telófase I
TCM	Tissue culture medium (Meio de cultivo de tecido)
TNCS	Transferência Nuclear de Células Somáticas
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor</i> α (Fator de Necrose Tumoral α)
ZP	Zona pelúcida

LISTA DE SÍMBOLOS

Ca ²⁺	Íons cálcio
$[Ca^{2+}]_i$	Concentração de cálcio intracelular
CO ₂	Dióxido de carbono
g	Aceleração devido à gravidade
°C	Grau Celsius
h	Horas
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μΜ	Micromolar
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
min	Minuto
nm	Nanômetro
N_2	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de sódio
O ₂	Oxigênio
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16	
2	REVISÃO DE LITERATURA	18	
2.1	Peptídeos antimicrobianos	18	
2.1.1	Catelicidinas	18	
2.1.1.1	Vipericidinas	20	
2.2	Ativação oocitária em mamíferos	21	
2.2.1	Papel do cálcio na ativação	21	
2.3	Uso da ativação oocitária em biotécnicas da reprodução	22	
2.3.1	Partenogênese	23	
2.3.2	Injeção intracitoplasmática de espermatozoides	24	
2.3.3	Transferência nuclear de células somáticas	25	
3	JUSTIFICATIVA	27	
4	HIPÓTESE CIENTÍFICA	28	
5	OBJETIVOS	28	
5.1	Geral	28	
5.2	Específicos	28	
6	THE RHODAMINE B-ENCRYPTED VIPERICIDIN PEPTIDE, RHOB-		
	CTN[1-9], DISPLAY DIFFERENTIAL BIOLOGICAL		
	ACTIVITIES	29	
7	CONCLUSÃO	58	
8	PERSPECTIVAS	59	
	REFERÊNCIAS	60	
	APÊNDICES	72	
	APÊNDICE A - RESUMO NOS ANAIS DA XXXIV REUNIÃO ANUAL DA	73	
	SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2020		

1 INTRODUÇÃO

A reprodução é o elemento chave do conceito de aptidão biológica e por isso é o principal condutor da história da vida de todos os organismos. Devido à seleção natural, genes ligados à reprodução são repassados com sucesso para as próximas gerações. Entretanto, a fecundação interna observada nos mamíferos, não é de longe o único modo de reprodução (AANEN; BEEKMAN; KOKKO, 2016).

Dentre várias formas de produção de descendentes, uma que tem mostrado importância na área da pesquisa, é a reprodução assexuada, em particular, a partenogênese. Isto deve-se ao fato de que algumas das técnicas utilizadas na reprodução assistida necessitam da ativação oocitária artificial em uma das etapas de seu processo. Os principais exemplos são: a Transferência Nuclear de Células Somáticas (TNCS) e a Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide (ICSI), como descrito por Kharche e Birade (2013) e Rubino et al. (2016), respectivamente.

Em mamíferos, oócitos parados em metáfase II (MII) da meiose, retomam o ciclo e iniciam o desenvolvimento embrionário após ativação oocitária, a qual ocorre no momento da fecundação como um resultado de uma série de oscilações da concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) no citoplasma oocitário. Estas oscilações de Ca²⁺ são promovidas naturalmente por uma proteína presente no espermatozoide, a fosfolipase C zeta (PLCζ) (SAUNDERS et al., 2002).

No aspecto clínico, quando ocorre falha na ativação dos oócitos após ICSI, estes podem ser ativados artificialmente por procedimentos que promovem a entrada do Ca^{2+} . A ativação artificial de oócitos maturos pode ser realizada por estímulos químicos ou físicos, dependendo de cada protocolo e espécie utilizada. (DUCIBELLA et al., 2002; DUA et al., 2019).

O influxo de cálcio é muito importante para a aquisição da capacidade fecundante do oócito (YANAGIMACHI, 2005). Dessa forma, alguns estudos auxiliam a propor novos agentes promotores da mobilização de [Ca²⁺]_i, como, por exemplo, as catelicidinas, que são peptídeos pleiotrópicos de defesa, também chamados de peptídeos antimicrobianos (PAMs). Os PAMs são expressos em numerosas formas de vida na imunidade inata que apresentam potencial antimicrobiano de amplo espectro (gramnegativos e positivos), além de atuar contra vírus e fungos (GIULIANI; RINALDI, 2011). A distribuição de peptídeos relacionados às catelicidinas entre espécies de vertebrados é significantemente vasto, incluindo formas bastante primitivas como *Myxina* e *Bungarus caeruleus*.

Falcão et al. (2014) investigaram o veneno de quatro crotalíneos e identificaram seis tipos de peptídeos precursores das catelicidinas, os quais foram denominados vipericidinas, as quais mostraram atividade antimicrobiana contra bactérias gramnegativas e que possuem baixa citotoxicidade. Além disso, estes peptídeos apresentaram também a capacidade de abrir canais na bicamada lipídica de células do câncer de mama, promovendo a entrada do Ca²⁺ extracelular para o meio intracelular (WANG et al., 2015). Dessa forma, seria interessante a realização de estudos que verifiquem um possível efeito deste peptídeo na ativação de oócitos, representando uma alternativa aos atuais agentes químicos disponíveis e que estão sendo utilizados em diferentes espécies (LI et al., 1999).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Peptídeos antimicrobianos (PAMs)

Para que haja sucesso na sobrevivência dos seres vivos em um ambiente que não está livre de patógenos é necessário que exista uma resposta rápida às agressões ambientais. Para isto acontecer os organismos desenvolveram mecanismos de defesa a partir da produção de PAMs, os quais impedem o crescimento e invasão dos patógenos em suas superfícies internas e externas. Além disso, outra característica dos PAMs é a habilidade de reconhecer a membrana biológica de microorganismos, os quais possuem componentes de reconhecimento e adesão (BALS; WILSON, 2003; BROGDEN, 2005). Por esta habilidade, alguns PAMs possuem propriedades de penetração celular, as quais consistem em interagir e ligar membranas celulares e de translocação de substâncias para o interior do citosol sem afetar a viabilidade celular. Quando utilizados baixos níveis, evitando uma possível toxicidade à célula, estes peptídeos de penetração célular (PPC) atuam diretamente na translocação e endocitose. Assim, os PPCs podem ser conjugados a diferentes cargas, seja por eletrostática ou interações covalentes, sendo possível transportar o complexo formado para a região intracelular, sendo utilizado como ferramenta de pesquisa com ácidos nucleicos, proteínas, drogas e carreadores de drogas in vitro e in vivo (RÁDIS-BAPTISTA et al., 2017; GOMES et al., 2018; FALCÃO; RÁDIS-BAPTISTA, 2020).

Evolutivamente têm-se pensado nos peptídeos como um antigo sistema de proteção ligado à imunidade inata que possuem capacidade de evitar infecções oportunistas. Esses peptídeos formam uma barreira no epitélio contra agentes nocivos, uma vez que a imunidade inata tem como objetivo detectar moléculas exclusivas de organismos infecciosos, chamado também de primeira linha de defesa nos mamíferos (FEARON; LOCKSLEY, 1996; GALLO; HUTTNER, 1998). Estes peptídeos, de acordo com a estrutura, são classificados em duas famílias: defensinas e catelecidinas. As defensinas são catiônicas, ricas em arginina, cisteínas e ainda possuem várias pontes de dissulfeto. Também participam da imunidade adaptativa do hospedeiro, sobrepondo suas funções com quimiocinas e, assim, exibindo microbicidas sinérgicos e efeitos de imunocontrole (GANZ et al., 1985; WANG et al., 2008).

2.1.1 Catelicidinas

As catelicidinas são um grupo de PAMs que possui propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, imunoestimulatórias e imunomoduladoras. A família das catelicidinas é caracterizada por um domínio catelin N-terminal altamente conservado e um domínio antimicrobial C-terminal hipervariável (Figura 1) que pode ser extraído pela ação de proteinases (GOPALAKRISHNAKONE et al., 2017). Estes peptídeos possuem a capacidade de estimular células do sistema imunológico (macrófagos e neutrófilos) a secretarem citocinas quimiotáticas para atrair outras células do sistema imune ao local da infecção. Ao mesmo tempo as catelicidinas podem se ligar às endotoxinas e prevenir a liberação de citocinas tóxicas, como o fator de necrose tumoral alfa (FABISIAK; MURAWSKA; FICHNA, 2016). PAMs naturais derivados das catelicidinas foram identificados primeiramente em neutrófilos bovinos (ZANETTI et al., 1990) e posteriormente em outros mamíferos, inclusive o homem (DÜRR; SUDHEENDRA; RAMAMOORTHY, 2006). O primeiro relato deste peptídeo em répteis foi feito por Wang et al. (2008) que isolaram e identificaram a catelicidina-BF a partir do veneno da serpente Bungarus fasciatus. As espécies bovina, equina, ovina e caprina possuem mais de uma catelicidina (BALS; WILSON, 2003), já em humanos foi encontrada apenas um tipo (DÜRR; SUDHEENDRA; RAMAMOORTHY, 2006), assim como em macaco Rhesus (BALS et al., 2001) e cobaias (NAGAOKA et al., 1997).

Figura 1 – Sequência de análise de PAMRCs (Peptídeos Antimicrobianos Relacionados à Catelicidina) de veneno de serpentes demonstrado através de região hipervariável seguido do C-terminal como uma característica fundamental de peptídeos reptilianos, comparado com outros peptídeos de vertebrados do mesmo clado.



Fonte: Adaptado de Falcão e colaboradores (2014).

2.1.1.1 Vipericidinas

As vipericidinas consistem em precursores relacionados das catelicidinas da glândula de veneno de *Bothrops atrox* (batroxicidina), *Bothrops lutzi* (lutzicidina), *Crotalus durissus terrificus* (crotalicidina) e *Lachesis muta rhombeata* (laschesicidina). As vipericidinas são sequências extremamente conservadas, nas quais em seus hospedeiros naturais (elapídeos e jararacas), possuem potente atividade antimicrobiana contra bactérias gram-negativas, com baixa citotoxicidade. Portanto, sendo uma boa candidata a ser utilizada como agente antimicrobiano. Podem também atuar contra alvos intracelulares após o rompimento das membranas, provocando a inativação do DNA e das proteínas em conjunto com ativação de enzimas autolíticas, resultando na destruição de células tumorais e dos microrganismos (FRIEDRICH et al., 2000; FALCÃO et al., 2014; WANG et al., 2015). De acordo com Falcão e colaboradores (2015), a crotalicidina e batroxicidina, estes foram sintetizados, cada um com uma região C-terminal no grupo amida, e testados em propriedades biológicas, os quais demonstraram maior atividade antimicrobiana do que o grupo gentamicina.

Posteriormente, estas atividades antimicrobianas foram confirmadas por Oliveira-Júnior e colaboradores (2018), os quais analisaram os efeitos imunomodulatórios das vipericidinas em macrófagos. Estes peptídeos demonstraram propriedades antiinflamatórias, similares a LL-37 (XHINDOLI et al., 2016), pois promoveram uma infrarregulação de citocinas pro-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), e uma suprarregulação de citocinas antiinflamatórias como a interleucina-10 (IL-10) na presença de estímulos inflamatórios (OLIVEIRA-JÚNIOR et al., 2018).

Recentemente foi observado que a agregação de peptídeos dentro da bicamada lipídica pode formar poros transitórios semelhantes a canais e torná-la menos espessa, contribuindo à disfunção da membrana e atividade microbicida dos PAMs (BAHAR; REN, 2013). Neste grupo de catelicidinas, as características estruturais gerais, típicas em todos os precursores de catelicidinas em vertebrados, são mantidas, incluindo proteínas precursoras com um peptídeo sinalizador (~20 resíduos de aminoácidos), seguido de uma sequência conservada e um terminal carboxila hipervariável no qual as sequências catiônicas de PAMs são contidos e proteoliticamente liberados (ZHAO et al., 2008).

Uma característica estrutural interessante é a repetição em conjunto de nove resíduos de aminoácidos, dos quais uma sequência de consenso pode ser extraída. O primeiro nonapeptídeo (resíduos 1 a 9), inicialmente denominado EVP (Peptídeo Encriptado de Vipericidina) e aqui denominado Ctn [1-9], possui os determinantes estruturais para exibir uma sequência potencial com interatividade da membrana celular (SCHMIDT et al., 2010). As atividades biológicas do Ctn [1-9] marcado com Rodamina B (RhoB) foram inicialmente investigadas *in vitro*, em células de câncer de mama humano MDA-MB-231 e MCF-7 (WANG et al., 2015). O RhoB-Ctn [1-9] exibiu uma parada na propagação de células MCF-7. Além disso, a citotoxicidade causada pelo peptídeo na célula de câncer de mama foi relacionada à interferência no fluxo de cálcio intracelular (WANG et al., 2015).

2.2 Ativação oocitária em mamíferos

Os oócitos bovinos são ovulados no estádio de MII. Neste momento, eles são incapazes de iniciar o desenvolvimento se não forem fecundados por um espermatozoide. Assim, a fecundação restaura a capacidade do oócito para progredir através do ciclo celular (retomada da meiose) induzindo uma série de mudanças morfológicas e fisiológicas, genericamente referidas como ativação (TALMOR-COHEN; ELIYAHU; SHALGI, 2002).

2.1.1 Papel do cálcio na ativação

Nos mamíferos estudados até a presente data, um dos eventos celulares mais observados e estudados após a interação espermatozoide-oócito é o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ (RAZ; SHALGI, 1998). Esta elevação na concentração de $[Ca^{2+}]_i$ ocorre após o espermatozoide atravessar a zona pelúcida e ligar-se à membrana perivitelínica de um oócito parado em MII (Figura 2), fazendo-o retomar a meiose pela segunda vez (SHEN et al., 2008). Os sinais de $[Ca^{2+}]_i$ após a fecundação consiste em repetitivos aumentos, comumente conhecidos como oscilações de Ca^{2+} . Um fator derivado do espermatozoide, a PLC ζ , é o componente espermático mais provável de ser responsável por essas oscilações (SAUNDERS et al., 2002). As PLCs são conhecidas por hidrolisarem fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (PIP2) em diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5trisfosfato (InsP₃), ambas moléculas de sinalização eficazes, entretanto a InsP₃ é a molécula mais provável de auxiliar na liberação de Ca^{2+} durante a fecundação (BERRIDGE, 2002; HOJNIK; KOVAČIČ, 2019). Em algumas espécies, a produção de InsP₃ leva a um único e progressivo aumento de Ca²⁺, como observado na ativação artificial (WHITAKER, 2008). Esse aumento é responsável pela exocitose de grânulos corticais, promovendo o enrijecimento da zona pelúcida e consequentemente bloqueando a poliespermia, retomada da meiose e síntese de proteínas, além da extrusão do segundo corpúsculo polar e formação dos pronúcleos. Esses eventos celulares são denominados como ativação oocitária (ITO; PARRINGTON; FISSORE, 2011; HAVERFIELD et al., 2016).

Figura 2 - Diagrama esquemático de modelo proposto da ativação oocitária induzida por espermatozoide na fecundação em mamíferos.



Fonte: Adaptado de Hojnik e Kovačič (2019).

2.3 Uso da ativação oocitária em biotécnicas da reprodução

A habilidade de retomar a meiose e dar continuidade à maturação após o estádio de diploteno é obtida gradualmente durante os períodos subsequentes do crescimento oocitário. Em oócitos totalmente crescidos, a meiose continua após a quebra da vesícula germinativa (GVBD) através do estádio de metáfase I (MI), anáfase I (AI) e telófase I (TI) até o estádio de metáfase II (MII), quando a meiose é novamente parada. Uma vez que um oócito tem a capacidade de passar por todas essas fases, este é denominado um oócito com competência ao desenvolvimento embrionário (SAGATA, 1996).

Em mamíferos, a fecundação é definida como um processo no qual um espermatozoide capacitado se ligará à zona pelúcida, fundindo-se à membrana oocitária e ativando o oócito. Este fato promove uma série de eventos que subsequentemente resultará no início da embriogênese (BONET et al., 2013). Esses espermatozoides capacitados, após penetração, irão desencadear influxo de Ca²⁺, assim como oscilação na concentração intracitoplasmática do mesmo, promovendo a segunda retomada meiótica, extrusão do segundo corpúsculo polar (AJDUK; YAMAUCHI; WARD, 2006), exocitose de grânulos corticais (SWANN; LAI, 2016) e formação dos pronúcleos (SWANN; LARMAN; LAI, 2004).

A ativação partenogenética é uma ferramenta válida para avaliar a maturação e qualidade citoplasmática. Além disso, a identificação de um procolo otimizado para ativação oocitária é necessário para a produção de embriões viáveis (KARCHE e BIRADE, 2013). Dessa forma, há a necessidade de uma boa qualidade oocitária e de estímulos para ativação para que haja sucesso em algumas biotécnicas da reprodução, tais como a partenogênese, ICSI e TNCS.

2.2.1 Partenogênese

Conhecido como "nascimento virgem", a partenogênese é o desenvolvimento embrionário sem a necessidade de contribuição genética paterna e sem redução meiótica de cromossomos (KAUFMAN; HUBERMAN; SACHS, 1975). O processo é uma estratégia reprodutiva comum entre insetos como pulgões, moscas, formigas e abelhas, mas também acontece em alguns vertebrados como lagartos, serpentes, peixes, pássaros e anfíbios (HIPP; ATALA, 2004). Em mamíferos, esse processo não acontece naturalmente, mesmo possuindo oócitos com capacidade de clivar independente da ocorrência de fecundação (WARE et al., 1989). Todavia, com uso de substâncias químicas e alteração de temperatura é possível ativar os oócitos de forma artificial, como no descrito por Pincus (1939). Este autor, trabalhando com roedores, observou que foi capaz de obter 12 oócitos partenogenicamente ativados e quatro embriões de duas células. Desde então, vários mamíferos já foram utilizados como modelos experimentais para trabalhos com partenogênese, como humanos (WINSTON et al., 1991), camundongos (KONO et al., 2004), bubalinos (MAHMOUD; PUGLISI; SCHOLKAMY, 2007), caprinos (SOUZA-FABJAN et al., 2016) e bovinos (QUE et al., 2019).

Para promover a ativação oocitária artificial, quando necessário simular essa ação do espermatozoide para produzir embriões *in vitro*, utiliza-se, após a maturação, estímulos químicos ou físicos (TACHIBANA et al., 2009). A partenogênese em oócitos bovinos pode ser induzida através de estrôncio (MÉO; LEAL; GARCIA, 2004), ionomicina (LOI et al., 1998), cálcio ionóforo (KUMAR et al., 2014), etanol (PATHAK; KHARCHE; GOEL, 2017), pulsos elétricos (VITULLO; OZIL, 1992) e ondas de ultrassom (SATO; YOSHIDA; MIYOSHI, 2005).

2.2.2. Injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)

A ICSI é um procedimento que se faz necessário o uso de um microscópio invertido e vários dispositivos de micromanipulação (micromanipulador, microinjetores e micropipetas), no qual um único espermatozoide será microinjetado, através de uma pipeta microinjetora, atravessando a zona pelúcida, na região do oolema (Figura 3). Nascimentos de uma variedade de espécies foram obtidas através deste método, incluindo animais de estimação, de produção e humanos. Em humanos, esta técnica é normalmente utilizada em homens que são inférteis (YANAGIMACHI, 2005). Já em bovinos, a vantagem da ICSI é de utilizar de forma efetiva o espermatozoide para o melhoramento genético do rebanho, através do uso do sêmen de animais com alta qualidade genética, assim como para estudar a interação entre oócito e espermatozoides durante a fecundação (OIKAWA et al., 2005; ARIAS et al., 2014).





Fonte: Adaptado de https://juhifertility.com/best-icsi-treatment-in-hyderabad

O método foi originalmente introduzido em 1992 como uma forma modificada da fecundação *in vitro* convencional por Palermo e colaboradores (1992). O desenvolvimento da ICSI é um dos avanços marcantes na tecnologia reprodutiva assistida, sendo possível utilizar sêmen com baixa quantidade e qualidade espermática. Atualmente, esta técnica já está bem estabelecida nas clínicas e laboratórios de reprodução (PALERMO; NERI; ROSENWAKS, 2015). Devido à sua utilidade e confiabilidade, a ICSI tem sido extensamente adotada como método de inseminação artificial em várias circunstâncias. De acordo o *International Committee Monitoring Assisted Reproductive Technologies* (ICMART) em 2005, o uso do procedimento de ICSI em humanos, em relação à outras biotécnicas reprodutivas, pode variar de acordo com a região, como por exemplo, no oriente médio compreende 96% do total, 81% na América Latina, 70% na América do Norte, 76% na Europa e 56% na Australia e Nova Zelândia (ISHIHARA et al., 2015).

Há mais de duas décadas, a ICSI vem sendo uma forma de lidar com a infertilidade masculina, entretanto, os oócitos ainda não conseguem ser fecundados apenas pelo uso da técnica. Por ser uma técnica na qual o espermatozoide não entra em contato com a zona pelúcida (ZP), há a possibilidade de não promover estas oscilações. Assim como na FIV, após esta manipulação, o oócito será submetido à oscilações de Ca²⁺ (DUCIBELLA et al., 2002), portanto, o uso da ativação oocitária artificial (AOA) promoveu que falhas fossem superadas, aumentando as taxas da ativação e consequentemente da chance de nascimentos (NOROZI-HAFSHEJANI et al., 2018), assim como uma nova esperança para casais com problemas de fertilidade que são submetidos à ICSI (CRAWFORD; LEDGER, 2019).

2.2.3. Transferência nuclear de células somáticas (TNCS)

A clonagem ou transferência nuclear utilizando células somáticas adultas para produzir embriões clones é uma biotécnica promissora com potenciais aplicações na reprodução animal e medicina regenerativa. A TNCS foi a técnica utilizada para o nascimento da ovelha "Dolly" (Figura 4) e tem sido ultimamente utilizada em diferentes espécies, através da introdução de células somáticas doadoras dentro do citoplasma de um oócito enucleado, objetivando a formação de um embrião que carregue o genoma do animal doador (WILMUT et al., 1997).

As células doadoras devem estar sincronizadas nas fases G0, G1 e M para serem transferidas a um oócito enucleado em MII, de modo que evite possíveis danos ao DNA

e uma replicação desordenada do DNA do genoma da célula doadora. Além disso, estas células precisam estar compatíveis com a atividade do FPM nestes oócitos (CAMPBELL et al., 1996).

Existem vários métodos de enucleação, dentre eles, o mais comum envolve um método especializado de sistema de micromanipulação, o qual utiliza uma micropipeta para segurar levemente o oócito enquanto outra micropipeta é utilizada para aspirar o núcleo (NIEMANN; LUCAS-HAHN, 2012). A localização do DNA oocitário é normalmente identificado através do corpúsculo polar em oócitos maturos parados em MII. O oócito maturo enucleado será então fusionado com a célula doadora através de um pulso elétrico e, em seguida, o oócito será ativado artificialmente, (CAMPBELL et al., 2007; CIBELLI et al., 2013).

Figura 4 – Esquema demonstrando a técnica de transferência nuclear de células somáticas (TNCS) utilizada para obtenção da ovelha "Dolly".



Fonte: Adaptado de https://shsbiotech2014.wixsite.com/animal-cloning-/charters

3 JUSTIFICATIVA

A ativação oocitária é uma etapa essencial na realização de procedimentos como a ICSI e a TNCS, as quais demandam uma maior taxa de eficiência da etapa de ativação. Além disso, a ativação de oócitos é etapa integrante de pesquisas com o uso da partenogênese, a qual apresenta-se como excelente ferramenta de pesquisa. A ativação partenogenética permite a expressão do potencial de desenvolvimento dos oócitos, se tornando uma boa alternativa para a avaliação dos procedimentos da produção *in vitro* de embriões (BONI; CUOMO; TOSTI, 2002).

As modernas biotécnicas da reprodução, tais como a TNCS, vêm criando possibilidades nunca antes imaginadas, além de trazer avanços nas atividades ligadas à produção animal. No entanto, devido aos baixos resultados ainda obtidos em algumas dessas biotécnicas, o estudo de protocolos alternativos é importante para o incremento desses resultados.

No que se refere à espécie bovina, o Brasil é líder mundial na produção in vitro de embriões, pois em 2013 cerca de 70% dos embriões produzidos no mundo foram obtidos no Brasil (IETS, 2015). Apesar do aumento na demanda e na acessibilidade da técnica, as baixas taxas de desenvolvimento embrionário prejudicam a eficiência deste procedimento e quaisquer vantagens econômicas associadas.

O mecanismo de ação dos peptídeos derivados do veneno de algumas serpentes, mais especificamente os derivados de vipericidinas, agem aumentando o influxo extracelular e liberando intracelularmente Ca²⁺ em células do câncer de mama (WANG et al., 2015). Com esta abordagem, experimentos utilizando peptídeos derivados de vipericidinas podem contribuir para a minimização dos problemas relacionados às taxas de embriões produzidos *in vitro* em diferentes biotécnicas reprodutivas, como no caso da partenogênese, ICSI e TNCS.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

O uso do peptídeo RhoB-Ctn[1-9], derivado da crotalicidina, promove a ativação de oócitos bovinos.

5 OBJETIVOS

5.1 GERAL

Avaliar o efeito do peptídeo sintético RhoB-Ctn[1-9] em oócitos e embriões bovinos.

5.2 ESPECÍFICOS

Com o uso do RhoB-Ctn[1-9]:

- a. Verificar a taxa de clivagem resultante da ativação de oócitos bovinos.
- Determinar a taxa de produção de blastocistos bovinos após ativação oocitária.

6 CAPÍTULO 1

The Rhodamine B-encrypted vipericidin peptide, RhoB-Ctn[1-9], display differential biological activities

Artigo submetido ao periódico: Peptides Fator de impacto: 2,659 Qualis: A3

The Rhodamine B-encrypted vipericidin peptide, RhoB-Ctn[1-9], display differential biological activities

Thales Márcio Cabral dos Santos^a, Hilania Valeria Doudou Lima^b, Luciana Magalhães Melo^{a,c}, Vicente José de Figueirêdo Freitas^{a,*}, Gandhi Rádis-Baptista^{b,d*}

^a Laboratory of Physiology and Control of Reproduction, Faculty of Veterinary, State University of Ceará (UECE), Fortaleza-CE, Brazil

^b Post-graduate Program in Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará (UFC), Fortaleza-CE, Brazil

^c Molecular Genetics Research Unit, University Center Fametro (UNIFAMETRO),

Fortaleza-CE, Brazil

^d Laboratory of Biochemistry and Biotechnology, Institute of Marine Science, Federal University of Ceará (UFC), Fortaleza-CE, Brazil

* Authors for correspondence:

Gandhi Rádis-Baptista

Laboratory of Biochemistry and Biotechnology. Institute for Marine Sciences, Federal University of Ceará, Av. da Abolição, 3207, Meireles, Fortaleza-CE, Brazil. 60165081. Phone: +55 85 3085 7007. E-mail: gandhi.radis@ufc.br

Vicente José de Figueirêdo Freitas

Laboratory of Physiology and Control of Reproduction, Faculty of Veterinary, State

University of Ceará, Av. Dr. Silas Munguba, 1700, Fortaleza-CE, Brazil. 60714-903.

Phone: +55 85 3101 9861. E-mail: vicente.freitas@uece.br

Abstract

Crotalicidin (Ctn), a snake cathelidicin-related antimicrobial peptide, is a 34-residue amino acid long, linear, lysine-rich vipericidin from the venom gland of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. Ctn, as well as other vipericidin members has, as integral part of its structure, in tandem repeats of nine amino acid residues (1KRFKKFFKK9 and 16KRLKKIFKK24), of which a consensus sequence is evidenced, 1KRhKKhFKK9 (where, h is a hydrophobic amino acid residue). These repeats are encrypted in the two designed N- and C-terminal fragments of Ctn, that possess distinct and variable anti-infective and anti-proliferative activities toward bacteria, fungi and tumor cells. In the present study, it was demonstrated that the first repeat, named Ctn[1-9], covalently conjugated with Rhodamine B at its N-terminal (denoted RhoB-Ctn[1-9]) displays a selective antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*, while the naïve, unlabeled nonapeptide (Ctn[1-9]) is inactive. Importantly, RhoB-Ctn[1-9] was able to activate bovine oocyte embryo and not interfere with blastocyst formation and progression. These findings set the stage to investigate the in tandem repeat core motifs that are encrypted in the crotalicidin peptides and derivatives.

Keywords: crotalicidin; crotalidicin-derived peptide; rhodamine B-conjugated peptide; anti-infective peptide; oocyte activation

1. Introduction

The vipericidins comprise a group of related peptides expressed in the venom glands of the South American pit vipers that belong to the cathelicidin family of antimicrobial peptides from the innate immune system of vertebrates [1]. Within the group of vipericidins, crotalicidin (Ctn) from rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* venom gland, and short-derived peptides have been studied for their anti-infective properties, such as antimicrobial, anti-parasite and antitumoral activities, as reviewed elsewhere [2,3]. Mature crotalicidin (H2N-RFKKFFKKVKKSVKKRLKKIFKKPMVIGVTIPFCOOH) is a 34-residue amino acid long, linear, lysine-rich peptide with an amphipathic alphahelical topology, which is the product of post-translation modification of a longer preproprecursor that contains the conserved cathelin domain [1, 4].

An interesting structural feature observed in crotalicidin and in other vipericidin members is the *in tandem* repeats of nine amino acid residues (1KRFKKFFKK9 and 16KRLKKIFKK24), of which a consensus sequence may be extracted, 1KRhKKhFKK9, in which *h* is a hydrophobic amino acid residue. The first nonapeptide (residues 1 to 9), previously named encrypted vipericidin peptide, EVP50, hereafter named Ctn[1-9], has the structural determinants to display a potential cell-membrane interactivity (e.g., interaction and insertion into the lipid membrane of eukaryotic and prokaryotic cells), seen that it is essentially cationic, Lys-rich peptide, with alternate hydrophobic residues that form an amphiphilic α -helix [5, 6]. However, the short size of Ctn[1-9] might be a critical factor for a given biological or cellular function, as seen for oligoarginine peptides of different sizes [7, 8]. Worth of mention, such an *in tandem* repeat and consensus sequence of the prototype Ctn[1-9] is an integral part of the two designed crotalicidin peptide fragments, the Ctn[1-14] (1KRFKKFFKKVKKSV14) and Ctn[15-34]

(15KKRLKKIFKKPMVIGVTIPF34), which are the structural products of dissection and minimization of crotalicidin [4]. Interestingly, the N-terminal crotalicidin fragment, Ctn[1-14] was shown to preserve the helicity but lost the antimicrobial and antitumoral efficacy that, otherwise, are seen in the full, mature Ctn, which is anti-infective and antiproliferative, but slightly cytotoxic. In contrast, the more active multi-functional, antiinfective Ctn derivate peptide, the C-terminal crotalicidin fragment, Ctn[15-34], adopts a random coil structure in solution, and is as active as the parental full-length peptide Ctn against bacteria, fungi and cancer cell in culture, and less cytotoxic to healthy cells [2-4]. In Table 1, the primary structures and physicochemical characteristics of these peptides are presented for clarity. The biological activities of naïve and rhodamine B (RhoB)-conjugated Ctn[1-9] was initially investigated in vitro, in human breast cancer MDA-MB-231 and MCF-7 cells, and in vivo in zebrafish model [9]. It was verified that naïve, unlabeled Ctn[1-9] was ineffective to control tumor cell proliferation and was harmless to zebrafish larvae. In contrast, the rhodamine B-labeled nonapeptide, RhoB-Ctn[1-9] (RhoB-EVP50), in which this fluorophore was covalently linked to the peptide N-terminal, exhibited a concentration-dependent arrest effect of human breast cancer MDA-MB-231 and MCF-7 cells propagation and accumulated massively in the blood vessels of zebrafish larvae, causing acute toxicity. Moreover, the cytotoxicity caused by RhoB-EVP50 to MCF-7 breast cancer cell was related with the interference in the flux of intracellular calcium [9].

Obviously, seen that (*i*) peptide structural modification and target-selectivity are variables necessary to match for the disclosure of useful biological or pharmacological activity, i.e., its structural-activity relationships; (*ii*) peptide from venom might have interesting therapeutic ratio, i.e. the drug safety profile, as observed, for example, for the antimicrobial peptides [10], ancrod - a thrombin like enzyme from the Malayan pit viper

venom [11], chlorotoxin – a scorpion venom neurotoxin [12], and crotamine – a cellpenetrating, antitumoral peptide from the South American rattlesnake venom [13]; (*iii*) intracellular calcium regulates multiple cytoplasmic events, including oocyte activation I embryo development [14-16], these fact prompted us to study some potential and selected biological activities of the RhoB-Ctn[1-9]. To this aim, in addition to test the activity of RhoB-Ctn[1-9] as an antimicrobial peptide, the activation of bovine oocyte and toxicity to bovine embryo were assessed. It is now reported that naïve, unlabeled Ctn[1-9] lacks any antimicrobial effect, while RhoB-Ctn[1-9] was active against *Pseudomonas aeruginosa*, a Gram-positive bacteria, and yeasts, including the potentially pathogenic *Candida albicans*. Furthermore, it was observed that RhoB-Ctn[1-9] can activate bovine oocyte and was harmless to bovine embryo, at low concentration, and did not interfere with embryo development.

2. Material and methods.

2.1. Bioethics and chemicals

All protocols used in the study were approved by the Committee of Animal Ethics of the State University of Ceará (CEUA/UECE). All chemicals used in this study were from Sigma-Aldrich Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA) unless otherwise indicated.

2.2. Peptides

The peptides were commercially prepared by solid phase peptide synthesis (China Peptides Company, Ltd., Shanghai, China), with over 95% of purity as proofed by LC/ESI-mass spectrometry analysis. Peptides were solubilized in sterile deionized water or buffered phosphate-saline (PBS) to make a 1 mM stock solution and stored in aliquots $at - 20^{\circ}$ C, until required. Melittin was from SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg,

Germany). In Figure 1, the structural formula of RhoB-Ctn[1-9] is presented, in which the positively charged dipeptides -Lys-Arg- and -Lys-Lys-, intervened by hydrophobic Phe residues, are clearly observable.

2.3. Antimicrobial tests (antibacterial and antifungal activities)

The strains of bacteria and yeasts, including pathogenic microbes, were obtained from The National Institute for Health Quality Control - INCQS, the Oswaldo Cruz Foundation - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. The determination of the minimum inhibitory concentration (MIC), with these strains of bacteria and yeasts was performed according to the methodology recommended by the Clinical and Laboratory Standard Institute [17, 18]. In sterile microtubes, 100 µL of microbial suspension in culture medium (0.5 McFarland Standard, about 108 colony forming units per milliliter, CFU/mL, for bacteria and 106 CFU/mL, for yeasts). These suspensions were then diluted to obtain 106 CFU/mL for bacteria or 104 CFU/mL for yeasts and used in all the microbiological assays. In a 96well, sterile microplates, peptide, in serial concentrations ranging from 20 μ M to 9 nM, and 100 µL of the microbial suspensions were transferred and gently homogenized. Controls of medium sterility and microbial growth were included. The microplates were incubated for at 37°C (for bacteria) or at 35°C (for yeasts), from 24 h. Thereafter, the microbial growth was evaluated by eyes. The MICs were determined as the lowest concentration of peptide able to inhibit the microbial growth, as evidenced by the absence of turbidity. To determine the minimum lethal concentration (MLC), 5 µL aliquots of microbial suspension treated with peptides as for the determination of their MICs, which did not show microbial growth, were transferred onto agar plates and incubated at 37°C, for 24 h. After this period, colonies were enumerated. MLC was defined as the lowest concentration able to inhibit the microbial growth by at least 99.9% in relation to the inoculum [19, 20]. Tests were in triplicate.

2.4 Recovery and in vitro maturation of oocyte

Bovine ovaries (n = 290) were obtained in local abattoirs and immediately transported to the laboratory in sterile NaCl solution (9 g/L), supplemented with antibiotics (Pentabiótico Veterinário, Fort Dodge, Campinas, Brazil). A total of 1599 *cumulus*oocyte complexes (COCs) were aspirated from follicles (2-8 mm), with an 18-gauge needle connected to a 10 mL disposable sterile syringe. COCs were inspected with a stereomicroscope (SMZ800, Nikon Co., Tokyo, Japan) and only COCs enclosed in three compact layers of *cumulus* cells and homogeneous cytoplasm were selected for testing [21]. For *in vitro* maturation, COCs were washed in TCM-199 medium with 10% (v/v) fetal bovine serum (Gibco, Grand Island, NY, USA), 20 µg/mL follicle stimulating hormone and luteinizing hormone (Pluset; Hertape-Calier, Spain), 0.2 mM sodium pyruvate, 0.1 mM cysteamine, 1×antibiotic-antimycotic, 10 ng/mL epidermal growth factor, 1 µg/mL estradiol and 1 mM l-glutamine. COCs were incubated at 38.5°C for 26 h in an atmosphere of 5% CO2.

2.5. Oocyte activation and embryo culture

The *in vitro* matured COCs were denuded using a vortex for 2 min and, thereafter, only the matured oocytes were used for activation. Then, 1172 oocytes were distributed in five groups comprised by the ionomycin (at 5 μ M, control group) and the RhoB-Ctn[1-9] at four different concentrations (0, 1, 10 and 40 μ M). In all groups, the oocyte exposure was for a short 4 min, followed by a 4 h-period of incubation in the presence of 6-DMAP (2 μ M) in synthetic oviductal fluid (SOF) medium, containing 0.1 M NaCl, 6 mM KCl, 2 mM CaCl₂.2H₂O, 1 mM KH₂PO₄, 1,5 mM MgSO₄.7H₂O, 20 mM NaHCO₃, 0.2 mM sodium pyruvate, 0.1% non-essential amino acid solution (MEM), 0.2% Basal Medium Eagle (BME), 1× antibiotic-antimycotic, 0.8% BSA and 2.5% fetal bovine serum (Gibco,
Grand Island, NY, USA). After that, oocytes were washed three times in SOF medium and cultured for seven days in SOF medium at 38.5°C, in a humid atmosphere of 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂, under mineral oil. The rates of oocyte cleavage and blastocyst formation were determined at the second and seventh day of incubation, respectively.

2.6. Hemolytic assay

The percentage of eventual hemolysis caused by peptides was evaluated as previously described [1]. Briefly, human blood samples from voluntary healthy donors were collected in Vacutainer tubes (Becton Dickinson, BD, São Paulo, Brazil) and centrifuged $(1,000 \times g, at 4 \circ C, for 10 min)$. The plasma was removed and the pellet containing the red blood cells was washed three times with PBS. The pellet was resuspended in PBS to make an 8% (v/v) red blood cell suspension. One volume of peptide solution in PBS (100 \Box l, from 0.3125 to 40 µM) were gently mixed with one volume of red blood suspension, in individual wells of a 96-well clear flat bottom plate, making a final concentration of 4% (v/v) of red blood cells and 0.1562 to 20 µM of peptides. The mixture was incubated at 37 °C for 60 min, under gentle agitation, centrifuged (1,000 \times g, RT, for 2 min). The amount of released hemoglobin from lysed erythrocytes was quantified at 540 nm, in a multiple detection microplate reader (Synergy HT, The BioTek Co., Winoski, VT, USA). Untreated red blood cell suspensions and treated with 1% Triton X-100 and melittin (12.5 and 50 M) were used as negative and positive controls, respectively. The percentage of hemolysis was determined as follow: [DO^{540nm} (treated) - DO^{540nm} (untreated)] / [DO^{540nm} (Triton X-100) - DO^{540nm} (untreated)] x 100. Tests were in triplicate.

2.7. Statistical analysis

Concerning the data of oocyte activation and embryo culture, analyzes were performed using Minitab Statistical Software v.16. Data are presented as percentage and compared by Fischer's exact test. A significance level of $\alpha = 0.05$ was used.

3. Results

3.1 Antimicrobial

The first core nonapeptide repeat of crotalicidin, the Ctn[1-9], in its naïve form, acetylated at the N-terminal and amidated at the C-terminal lacked observable antimicrobial activity against representative strains of bacteria and yeasts tested (Table 2). The rhodamine B-conjugated Ctn[1-9] displayed significant antimicrobial activity against a Gram-positive bacteria (*P. aeruginosa*) and a pathogenic yeast (*C. albicans*). Since the cationic dye rhodamine B could influence the microbicide activity of RhoB-Ctn[1-9], when conjugate to Ctn[1-9], the second repeat of crotalicidin – a decapeptide the Ctn[15-24] (Table 1), with an extra Lys at the N-terminal an therefore with an extra +1 charge was tested and again did not show any detectable antimicrobial activity with the tested strains. Therefore, the only crotalicidin nonapeptide analogue that demonstrated antimicrobial activity is the RhoB-Ctn[1-9].

3.2. Hemolytic activity

Since rhodamine B may confer some level of cytotoxicity to peptides that are conjugated with this fluorophore, the level of hemolysis of human erythrocytes were assessed for all Ctn[1-9] peptide analogues and compared with melittin – a cytolytic bee toxin. RhoB-Ctn[1-9], naïve Ctn[1-9] and the chemical modified N- and C-terminal peptides were very low hemolytic, while melittin caused 100% of hemolysis at 12.5 μ M. The most active peptide version, RhoB-Ctn[1-9], at the concentrations of 12.5 μ M and 25 μ M, was only

0.6 and 1.6% hemolytic (Table 2). The other peptides caused less than 1% of hemolysis when the concentrations were lower than 50 μ M.

3.3. Effect on oocyte activation and bovine embryo development

Since RhoB-Ctn[1-9] was the peptide analogue that shown activity on bacteria and yeast cells, and a discrete hemolytic effect with concentration up to 50 μ M, the experiments with bovine oocytes were designed only with such a peptide version. When bovine oocytes were treated with the RhoB-Ctn[1-9], it was observed that at the concentrations of 1, 10 and 40 μ M, the percentage of oocyte cleavage was 19.6 %, 22.4 % and 14.7 %, respectively and the blastocysts formation occurred at 10 μ M and 40 μ M for (1.8 % and 2.2 %, respectively) (Table 3). As expected, the control group, ionomycin, at 5 μ M, showed the expected results of oocyte activation, with 80.0 % of oocyte cleavage and further progress of embryo development, demonstrated by 35.6 % of blastocyst formation (Table 3). It is important to note that the negative control, untreated oocytes, produced a single blastocyst, but with altered morphology (Fig. 2). Comparatively and quantitatively, the ionomycin-treated bovine oocytes showed to be the gold standard of oocyte cleavage and blastocyst formation, although the RhoB-Ctn[1-9] showed for the first time the property to induce such biological activities and processes, without toxicity to the bovine embryo development.

4. Discussion

The crotalicidin belongs to the vipericidin family of the cathelicidin-related antimicrobial peptides and is expressed in the venom gland of the South American rattlesnake, *Crotalus durissu terrificus*. Similar crotalicidin peptide sequences, such are batroxicidin, lachesicidin and lutzicidin are also found in other pit viper species and in species of Asian

elapid snakes, like BF-CRAMP, NA-CRAMP and OH-CRAMP [22, 23]. Short N- and C-terminal fragments of crotalicidin, namely Ctn[1-4] and Ctn[15-34], were designed and their biological functions characterized and reported, as recently reviewed [2, 3]. The size reduction of bioactive peptides has some advantages for biomedical application, such as cost-effective production and use and reduction of potential toxicity by dissecting the biologically active peptide moiety [24, 25]. The short N-terminal crotalicidin peptide, 20-mer, is the most active and less cytotoxic designed fragment, displaying similar biological activities of the full-Ctn parental sequence, as aforementioned. Surprisingly, crotalicidin and the other viperids members all have two *in tandem* repeats of nine amino acid residues that are integral part of and are encrypted in vipericidin sequences [1, 9]. Both Ctn[1-14] and Ctn[15-34] preserve each one copy of this nonapeptide repeat (Table 1).

The prepropercursor of crotalicidin is known to be pos-translationally processed by elastases and eventually other tissue proteases, releasing the mature cathelicidin-related peptides [26]. Despite the presence of elastase cleavage sites (-Val-Lys-, -VK-) in crotalicidin sequence, processed short fragments such as the synthetic Ctn[15-34] were not found in the venom proteome of rattlesnakes up to date, except the full, mature 34-residue peptide [27]. Moreover, the Ctn[15-34] shows a considerable structural stability in the serum and biological fluid [4, 28] with proline residues usually involved in the stability of cathelicidin-related antimicrobial peptides [26], what might explain the absence of further native proteolytic peptide fragments. However, the additional Ctn proteolytic processing in the venom gland could not be discard, seen that posttranslational modifications of venom peptide preproprecursors are a recurrent theme that results in the diversity of molecules and biological activity seen in animal venoms [29]. Thus the dissection of the nonapeptide repeats of crotalicidin, exemplified by Ctn[1-9], deserved further investigation to disclose unpredictable bioactivity of cryptic peptide sequences.

The N-terminal unlabeled Ctn[1-9], as shown here, lacked any antimicrobial activity with the selected strains, while the RhoB-Ctn[1-9], the fluorescent analogue, displayed a microbicide effect against a Gram-positive bacteria and yeasts, including pathogenic species (Table 2). Although the absence of biological microbicide activity of the unlabeled peptides was initially unexpected, in contrast to the covalently conjugated rhodamine B-analogue, this kind of effect was observed previously by some of us with other biological models, like *in vivo* model with zebrafish larvae and *in vitro* model with malignant breast cancer cells [9]; naïve Ctn was inactive and harmless, whereas RhoB-Ctn[1-9] was cytotoxic to tumor cell and caused acute toxicity to zebrafish larvae. Thus, distinct models of study expand our repertoire of activities and biological targets.

Rhodamine B is cationic dye in which the net charge is normally dependent of the pH milieu; at physiological pH rhodamine B molecule is neutral and at pH below 6 it is positively charged [30], although the extinction coefficient of rhodamine B in conjugates are quite stable and increases slightly at low pH values [31]. So, it was hypothesized that even small charge variation at the N-terminal of the Ctn[1-9] peptide analogue, impaired by rhodamine B conjugation, could be responsible for the difference between the antimicrobial-active and inactive peptide forms. In fact, positive charge chain extension of peptide N- or C-terminal was shown to increase the antimicrobial activity of magainin [32]. However, the decapeptide Ctn[15-24] (15KKRLKKIFKK24, net positive charge = +8), corresponding to the second in tandem repeat of crotalicidin, which is identical to Ctn[1-9] except for an extra Lys residue at the N-terminal and a Ile replacing the Phe in the position 7 of the nonapeptide, is also deprived of antimicrobial activity and causes a similar low level of hemolysis. Likewise, the acetyl-Ctn[1-9] (CH₃CO-KRLKKIFKK, net charge = +5, not shown) was also inactive as an antimicrobial, so the charge contribution at the position -1 of the nonapeptide seems not to be determinant for the activity of the

short crotalicidin repeat, Ctn[1-9], but the activity is restricted to the rhodamine Bconjugate analogue.

Indeed, covalent conjugation of rhodamine B to designed peptides, such as the PI(4,5)P2binding site of geosolin, has improved the biological activities compared to the parental unlabeled peptides, with profile similar or superior to known antimicrobial peptides [33]. Moreover, fluorophore conjugation of cell-penetrating peptides was demonstrated to influence the mode of interaction with biological membrane, the intracellular localization, the cytotoxicity and the ultimate biological function [34, 35]; in the way that neutral or negatively charged fluorophores conferring lesser dramatic influence than positively charged and hydrophobic fluorophores [34].

An important biological effect observed for the RhoB-Ctn[1-9] is the interference with the flux of intracellular calcium, as seen in human breast cancer cells [9]. Intracellular calcium fluctuation and calcium signaling have important roles in cell fates and cell biology, ranging from differentiation to cell death [14, 36]. Therefore, it was interesting to investigate biological process in which calcium-mediated events is involved and, therefore, to count on *in vivo* models to study the differential function of peptides. For instance, the oocyte activation depends exclusively on calcium influx to trigger a stimulus to make the ooplasm of the oocyte, promote the cortical granule exocytosis, block the polyspermy, promote meiosis resumption, the synthesis of proteins, extrusion of the second polar body and the formation of pronuclei, thus play an essential role in the development of a oocyte to embryo stage [37, 38]. Artificial activation by chemical and/or physical stimuli may lead to the initiation of fertilization processes, but in most cases does not give rise to viable offspring [37, 38]. However, these observations allow to indicate that the egg is endowed with the machinery to initiate embryo development processes. In this study, when matured oocytes were treated with RhoB-Ctn[1-9] as a stimulus factor

of activation, oocyte cleavage occurred at all three tested concentrations (1, 10 and 40 μ M). Moreover, toxicity was not observed as oocyte development progressed to form blastocysts, with a comparative similar fashion as ionomycin – a gold standard chemical for this purpose.

Regarding to oocytes that were not exposed to RhoB-Ctn[1-9], but treated only with 6-DMAP and cultured in SOF medium for seven days, although a low percentage of cleaved oocytes were found, the percentage of cleavage was very low, i.e., 8.4% and 0.6% of blastocyst formation (Table 3). It is known that 6-DMAP has the potential to accelerate the pronuclei formation, so the oocyte can continue developing from metaphase II through embryo, however, this very low cleavage rate obtained with only 6-DMAP usually occur in mouse [39] and hamster oocytes [40]. Thus, RhoB-Ctn[1-9] was able to induce oocyte cleavage and did not compromised the embryo development, since blastocyst formation progressed normally. The definitive mechanism of oocyte activation by RhoB-Ctn[1-9] needs a deep investigation, but these findings set the stage for addressing the molecular events that are responsible for triggering the activation of bovine oocyte. Nevertheless, the fact of RhoB-Ctn[1-9] possess a selective antimicrobial activity in detriment to the unconjugated peptide version and the property of activation of bovine oocyte at early stages without interference with embryo development is an important finding. Examples of multi-effector antimicrobial peptides with intrinsic multiple functionalities have been documented [41-44]. For instance, the human cationic antimicrobial peptide hCAP18 (LL-37), a cathelicidin, connects the innate and adaptive immune responses, by modulating numerous processes in which cellular and cytokine-mediated responses are involved, such as chemoattraction of leukocytes and lymphocytes, activation and induced-differentiation of dendritic cells [43, 45]. Another kind of cationic antimicrobial peptides, the β -defensions, was shown to induce the activation and proliferation of skin

keratinocytes, promoting and accelerating skin healing [42, 46]. So, the roles of antimicrobial peptides are not restricted uniquely to antibiosis, having meaningful hidden biological and pharmacological functions [46].

Thus, the N-terminal covalent modification of Ctn[1-9], the core repetitive motif of crotalicidin and from other vipericidins and snake venom cathelicidins, with the organic cationic rhodamine B increases the repertoire of biological functionalities and application. Last but not least, whether peptides with sequences similar to this designed synthetic nonapeptide, Ctn[1-9], or other encrypted, longer vipericidin-derived peptides with multi-functionalities are naturally generated by post-translational proteolytic-processing and modification in the snake venom gland and secreted into the venom remains an open question that needs to be further addressed.

5. Conclusion

The biologically active RhoB-Ctn[1-9] analogue showed a selective antimicrobial activity and the ability to induce cleavage in bovine oocytes. Furthermore, activation and development to the blastocyst stage, shows little or no toxicity of the activating agent on bovine oocytes.

Credit author statement

Thales M. C. Santos (writing, methodology, investigation), Hilania V. D. Lima (methodology, investigation), Luciana M. Melo (writing, review, conceptualization), Vicente J. F. Freitas (writing, review, project administration, funding acquisition), Gandhi Rádis-Baptista (writing, review, conceptualization, supervision, resources).

Declaration of Disclosure

None of the authors declare any conflict of interest.

Acknowledgments

The authors are thankful to the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Toxinology Program), the Ministry of Education and Culture and the National Council of Research and Development, (CNPq), the Ministry of Science, Technology, Innovation and Communication (MCTI-C), Federal Government of Brazil, for the financial support and project endorsement.

Funding

Funding: This work was supported by the State of Ceará Foundation for Scientific and Technological Development Support (FUNCAP, Pronex programme, grant # PR2-0101-00059.01.00/15) and The National Council of Research and Development, the Ministry of Science, Technology and Innovation, grant numbers # 307733/2016-5 and # 431077/2016-9 (to G.R.-B.). G.R-B. and V.J.F.F are senior researchers from CNPq/MCTI.

References

[1] C.B. Falcao, B.G. de La Torre, C. Pérez-Peinado, A.E. Barron, D. Andreu, G. Rádis-Baptista, Vipericidins: a novel family of cathelicidin-related peptides from the venom gland of South American pit vipers, Amino acids 46(11) (2014) 2561-71.

[2] C.B. Falcao, G. Radis-Baptista, Crotamine and crotalicidin, membrane active peptides from Crotalus durissus terrificus rattlesnake venom, and their structurally-minimized fragments for applications in medicine and biotechnology, Peptides 126 (2020) 170234. [3] C. Pérez-Peinado, S. Defaus, D. Andreu, Hitchhiking with Nature: Snake Venom Peptides to Fight Cancer and Superbugs, Toxins 12(4) (2020).

[4] C.B. Falcao, C. Pérez-Peinado, B.G. de la Torre, X. Mayol, H. Zamora-Carreras, M. Jiménez, G. Rádis-Baptista, D. Andreu, Structural Dissection of Crotalicidin, a Rattlesnake Venom Cathelicidin, Retrieves a Fragment with Antimicrobial and Antitumor Activity, Journal of medicinal chemistry 58(21) (2015) 8553-63.

[5] Y. Huang, J. Huang, Y. Chen, Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function, Protein & Cell 1(2) (2010) 143-152.

[6] N. Schmidt, A. Mishra, G.H. Lai, G.C.L. Wong, Arginine-rich cell-penetrating peptides, FEBS Letters 584(9) (2010) 1806-1813.

[7] S. Futaki, T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda, Y. Sugiura, Arginine-rich Peptides: an abundant source of memebrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery, Journal of Biological Chemistry 276(8) (2001) 5836-5840.

[8] C.N. Cultrara, S. Shah, G. Antuono, C.J. Heller, J.A. Ramos, U. Samuni, J. Zilberberg,
D. Sabatino, Size Matters: Arginine-Derived Peptides Targeting the PSMA Receptor Can
Efficiently Complex but Not Transfect siRNA, Molecular Therapy - Nucleic Acids 18
(2019) 863-870.

[9] L. Wang, J.Y. Chan, J.V. Rêgo, C.M. Chong, N. Ai, C.B. Falcão, G. Rádis-Baptista, S.M. Lee, Rhodamine B-conjugated encrypted vipericidin nonapeptide is a potent toxin to zebrafish and associated with in vitro cytotoxicity, Biochimica et biophysica acta 1850(6) (2015) 1253-60.

[10] Y.P. Di, Q. Lin, C. Chen, R.C. Montelaro, Y. Doi, B. Deslouches, Enhanced therapeutic index of an antimicrobial peptide in mice by increasing safety and activity against multidrug-resistant bacteria, Science Advances 6(18) (2020) eaay6817.

[11] D.E. Levy, J. Trammel, W.W. Wasiewski, Ancrod for acute ischemic stroke: a new dosing regimen derived from analysis of prior ancrod stroke studies, Journal of stroke and cerebrovascular diseases: the official journal of National Stroke Association 18(1) (2009) 23-7.

[12] P.G. Ojeda, C.K. Wang, D.J. Craik, Chlorotoxin: Structure, activity, and potential uses in cancer therapy, Biopolymers 106(1) (2016) 25-36.

[13] I. Kerkis, M.A. Hayashi, A.R. Prieto da Silva, A. Pereira, P.L. De Sá Júnior, A.J. Zaharenko, G. Rádis-Baptista, A. Kerkis, T. Yamane, State of the art in the studies on crotamine, a cell penetrating peptide from South American rattlesnake, BioMed research international 2014 (2014) 675985.

[14] G.E. Kass, S. Orrenius, Calcium signaling and cytotoxicity, Environ Health Perspect107 Suppl 1(Suppl 1) (1999) 25-35.

[15] Y.-L. Miao, C.J. Williams, Calcium signaling in mammalian egg activation and embryo development: the influence of subcellular localization, Mol Reprod Dev 79(11) (2012) 742-756.

[16] F.D. Nascimento, L. Sancey, A. Pereira, C. Rome, V. Oliveira, E.B. Oliveira, H.B. Nader, T. Yamane, I. Kerkis, I.L. Tersariol, J.L. Coll, M.A. Hayashi, The natural cell penetrating peptide crotamine targets tumor tissue in vivo and triggers a lethal calcium-dependent pathway in cultured cells, Molecular pharmaceutics 9(2) (2012) 211-21.

[17] CLSI, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. 11th ed. CLSI standard M07, Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA, USA (2018).

[18] CLSI, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third edition. CLSI document M27-A3, Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA, USA (2008). [19] P.C. Taylor, F.D. Schoenknecht, J.C. Sherris, E.C. Linner, Determination of minimum bactericidal concentrations of oxacillin for Staphylococcus aureus: influence and significance of technical factors, Antimicrob Agents Chemother 23(1) (1983) 142-50.

[20] C.J. Shanholtzer, L.R. Peterson, M.L. Mohn, J.A. Moody, D.N. Gerding, MBCs for Staphylococcus aureus as determined by macrodilution and microdilution techniques, Antimicrob Agents Chemother 26(2) (1984) 214-9.

[21] L. Leibfried, N.L. First, Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro, Journal of animal science 48(1) (1979) 76-86.

[22] M.L. van Hoek, Antimicrobial peptides in reptiles, Pharmaceuticals (Basel) 7(6)(2014) 723-753.

[23] G. Radis-Baptista, Vipericidins, Snake Venom Cathelicidin-Related Peptides, in the Milieu of Reptilian Antimicrobial Polypeptides, 2015, pp. 1-25.

[24] M. Vila-Perelló, A. Sánchez-Vallet, F. García-Olmedo, A. Molina, D. Andreu, Structural Dissection of a Highly Knotted Peptide Reveals Minimal Motif with Antimicrobial Activity, Journal of Biological Chemistry 280(2) (2005) 1661-1668.

[25] W. Lee, D.G. Lee, Fungicidal mechanisms of the antimicrobial peptide Bac8c,Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1848(2) (2015) 673-679.

[26] A.E. Shinnar, K.L. Butler, H.J. Park, Cathelicidin family of antimicrobial peptides:
proteolytic processing and protease resistance, Bioorganic chemistry 31(6) (2003) 425-36.

[27] G.A. Wiezel, P.Y.T. Shibao, C.T. Cologna, R. Morandi Filho, C. Ueira-Vieira, E. De Pauw, L. Quinton, E.C. Arantes, In-Depth Venome of the Brazilian Rattlesnake Crotalus durissus terrificus: An Integrative Approach Combining Its Venom Gland

Transcriptome and Venom Proteome, Journal of proteome research 17(11) (2018) 3941-3958.

[28] C. Pérez-Peinado, S.A. Dias, D.A. Mendonça, M. Castanho, A.S. Veiga, D. Andreu, Structural determinants conferring unusual long life in human serum to rattlesnakederived antimicrobial peptide Ctn[15-34], Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society 25(8) (2019) e3195.

[29] C.M. Modahl, R.K. Brahma, C.Y. Koh, N. Shioi, R.M. Kini, Omics Technologies for Profiling Toxin Diversity and Evolution in Snake Venom: Impacts on the Discovery of Therapeutic and Diagnostic Agents, Annual Review of Animal Biosciences 8(1) (2020) 91-116.

[30] Y.J. Oh, T.C. Gamble, D. Leonhardt, C.H. Chung, S.R. Brueck, C.F. Ivory, G.P. Lopez, D.N. Petsev, S.M. Han, Monitoring FET flow control and wall adsorption of charged fluorescent dye molecules in nanochannels integrated into a multiple internal reflection infrared waveguide, Lab on a chip 8(2) (2008) 251-8.

[31] E. Birtalan, B. Rudat, D.K. Kölmel, D. Fritz, S.B.L. Vollrath, U. Schepers, S. Bräse, Investigating rhodamine B-labeled peptoids: Scopes and limitations of its applications, Peptide Science 96(5) (2011) 694-701.

[32] R. Bessalle, H. Haas, A. Goria, I. Shalit, M. Fridkin, Augmentation of the antibacterial activity of magainin by positive-charge chain extension, Antimicrob Agents Chemother 36(2) (1992) 313-7.

[33] R. Bucki, J.J. Pastore, P. Randhawa, R. Vegners, D.J. Weiner, P.A. Janmey, Antibacterial activities of rhodamine B-conjugated gelsolin-derived peptides compared to those of the antimicrobial peptides cathelicidin LL37, magainin II, and melittin, Antimicrob Agents Chemother 48(5) (2004) 1526-1533. [34] D. Birch, M.V. Christensen, D. Staerk, H. Franzyk, H.M. Nielsen, Fluorophore labeling of a cell-penetrating peptide induces differential effects on its cellular distribution and affects cell viability, Biochimica et biophysica acta. Biomembranes 1859(12) (2017) 2483-2494.

[35] S.F. Hedegaard, M.S. Derbas, T.K. Lind, M.R. Kasimova, M.V. Christensen, M.H. Michaelsen, R.A. Campbell, L. Jorgensen, H. Franzyk, M. Cárdenas, H.M. Nielsen, Fluorophore labeling of a cell-penetrating peptide significantly alters the mode and degree of biomembrane interaction, Scientific Reports 8(1) (2018) 6327.

[36] M.C.X. Pinto, F.M.P. Tonelli, A.L.G. Vieira, A.H. Kihara, H. Ulrich, R.R. Resende, Studying complex system: calcium oscillations as attractor of cell differentiation, Integrative Biology 8(2) (2016) 130-148.

[37] J. Ito, J. Parrington, R.A. Fissore, PLCζ and its role as a trigger of development in vertebrates, Mol Reprod Dev 78(10-11) (2011) 846-853.

[38] J. Haverfield, S. Nakagawa, D. Love, E. Tsichlaki, M. Nomikos, F.A. Lai, K. Swann,G. FitzHarris, Ca2+ dynamics in oocytes from naturally-aged mice, Scientific Reports 6(1) (2016) 19357.

[39] G.C. Lan, S.F. Ma, Z.Y. Wang, M.J. Luo, Z.L. Chang, J.H. Tan, Effects of posttreatment with 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) on ethanol activation of mouse oocytes at different ages, Journal of experimental zoology. Part A, Comparative experimental biology 301(10) (2004) 837-43.

[40] L. Wang, H. Jiang, Z. Li, Effects of Electrical Pulse and 6-DMAP on Cleavage of Golden Hamster Oocytes—Morphological and Physiological Observations, Journal of Functional Morphology and Kinesiology 1(2) (2016) 240-248.

[41] K. Splith, I. Neundorf, Antimicrobial peptides with cell-penetrating peptide properties and vice versa, European Biophysics Journal 40(4) (2011) 387-397.

[42] B. Mi, J. Liu, Y. Liu, L. Hu, Y. Liu, A.C. Panayi, W. Zhou, G. Liu, The Designer Antimicrobial Peptide A-hBD-2 Facilitates Skin Wound Healing by Stimulating Keratinocyte Migration and Proliferation, Cellular Physiology and Biochemistry 51(2) (2018) 647-663.

[43] D.J. Davidson, A.J. Currie, G.S.D. Reid, D.M.E. Bowdish, K.L. MacDonald, R.C. Ma, R.E.W. Hancock, D.P. Speert, The Cationic Antimicrobial Peptide LL-37 Modulates Dendritic Cell Differentiation and Dendritic Cell-Induced T Cell Polarization, The Journal of Immunology 172(2) (2004) 1146.

[44] N. Mookherjee, M.A. Anderson, H.P. Haagsman, D.J. Davidson, Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential, Nature Reviews Drug Discovery 19(5) (2020) 311-332.

[45] J.M. Kahlenberg, M.J. Kaplan, Little Peptide, Big Effects: The Role of LL-37 in Inflammation and Autoimmune Disease, The Journal of Immunology 191(10) (2013) 4895.

[46] J. Schauber, R.L. Gallo, Expanding the roles of antimicrobial peptides in skin: alarming and arming keratinocytes, The Journal of investigative dermatology 127(3) (2007) 510-2.

TABLES

Table 1

Structures and properties of crotalicidin, crotalicidin-derived peptides and in tandem encrypted crotalicidin peptides.

Peptide	Sequence ^a	Nr	Net charge	$\mathbf{H}^{(c)}$	μH ^(c)
		residues	b		
Crotalicidin ₁₋₃₄	1 <u>KRFKKFFKK</u> VKKSVK <u>KRLKKIFKK</u> PMVIGVTIPF ₃₄	34	+16	0.263	0.440
Ctn[1-14]	1 KRFKKFFKK VKKSV14	14	+9	-0.012	0.763
Ctn[1-9]	1 KRFKKFFKK 9	9	+7	-0.066	0.835
Ctn[15-34]	15KKRLKKIFKKPMVIGVTIPF34	10	+8	-0.166	0.701
Ctn[15-34]	15KKRLKKIFKKPMVIGVTIPF34	20	+8	0.455	0.311
Segment 16-24	$_{16}$ KRLKKIFKK $_{24}$	9	+7	-0.074	0.826
Consensus	1 KRhKKhFKK 9	9	-	-	-

H, hydrophobic amino acid residues at positions 3 and 7; aC-terminal amidated peptides; bcalculated from the C-terminal amidated peptides with the 'Peptide property calculator' software (http://pepcalc.com); cestimated hydrophobicity (H) and Hydrophobic moment (μ H) as calculated with the 'Heliquest' software (http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/).

Table 2

Antimicrobial and hemolytic activity of Ctn[1-9] peptide analogues.

	S. aureus	ATCC	P. aer	uginosa	C. all	bicans	Saccha	romyces	Hemoly	ysis (%)
	653	38P	ATCO	C 27853	ATCO	C 90029	cere	visiae		
Peptide Name	MIC	MLC	MIC	MLC	MIC	MLC	MIC	MLC	12.5 µM	50 µM
Ctn[1-9]-NH ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	0.8	1.0
Ctn[1-9]	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4	0.4
Acetyl-Ctn[1-9]	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4	0.6
RhoB-Ctn[1-9]	-	-	10	20	20	20	20	20	0.6	1.6
Melittin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	100	100

MIC and MLC are in micromolar (μM); hyphen ("-") denotes that MIC and MLC was not observed up to 20 μM; "nd", not determined; Antimicrobial activity for *C. albicans* was determined in Sabouraud and YPD, while for *S. cerevisiae* only in YPD; - NH2, C-terminal amidated peptide; acetyl-., acetylated N-terminal peptide; RhoB, rhodamine B, N-terminal labeled peptide.

Table 3

Effect of different concentrations of RhoB-Ctn[1-9] in the activation of bovine oocytes.

Groups	Concentration	Nr exposed	Nr cleaved	Nr blastocysts	
	(µM)	oocytes	(%)	(%)	
Ionomycin	5	250	200 (80.0) ^a	89 (35.6) ^a	
	0	155	13 (8.4) ^c	$1 (0.6)^{b,c}$	
RhoB-Ctn[1-9]	1	214	42 (19.6) ^b	0 (0.0) ^c	
Kilob-Ctil[1-7]	10	286	64 (22.4) ^b	$5(1.8)^{b,c}$	
	40	273	40 (14.7) ^{b,c}	6 (2.2) ^b	

Different superscript letter in the same column denote significant difference (P < 0.05).

Table 4

Summary of the biological activities observed for the encrypted vipericidin peptide, RhoB-Ctn[1-9].

	eptide effect		
Cells and in vivo models	Ctn[1-9]	RhoB-Ctn[1-9]	Reference
Microorganisms			
P. aeruginosa (Gram+ bacteria)	Inactive	Antibacterial	This work
C. albicans (pathogenic yeast)	Inactive	Antifungal	This work
S. cerevisiae (baker yeast)	Inactive	Antifungal	This work
Mammalian cells			
Erythrocytes (human)	Inactive	Low hemolytic	This work
MDA-MB-231 (breast cancer cell)	Inactive	Cytotoxic	[9]
MCF-7 (breast cancer cell)	Inactive	Cytotoxic	[9]
Organisms			
Zebrafish larvae	Inactive	Acute toxicity	[9]
Bovine embryo	nd	Oocyte activation	This work

"nd", not determined.

FIGURES

Fig. 1. Structural formula of RhoB-Ctn[1-9]. The Rhodamine B-Lys-Arg-Phe-Lys-Lys-Phe-Phe-Lys-Lys-NH2 (RhoB-KRFKKFFKK-NH₂), RhoB-Ctn[1-9] structural formula was draw with the ACD/ChemSketch - A Free Comprehensive Chemical Drawing Package (https://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/). The alternance of positively charged dipeptides (LysArg, KR and LysLys, KK) and the hydrophobic phenylalanine (Phe, F) residues is observable. The N-terminal covalently linked rhodamine B and the C-terminal amidation are represented. Experimental MW = 1681.13 g mol-1. Molecular formula $C_{91}H_{131}N_{20}O_{11}$.



Fig. 2. Representative bovine embryos produced after oocyte activation with RhoB-Ctn[1-9] at 0, 10 and 40 μ M and ionomycin (5 μ M, control) for 2 and 7 days of treatment. Line 1 shows the embryos cleaved on day 2 (black arrows), while line 2 shows the blastocysts obtained on day 7 (white arrows) of culture.

	la constante de		RhoB-Ctn[1-9]		
Day	ιοποτηγείη 5 μΜ	0 μ Μ	10 μ Μ	40 μ Μ	
2					
7				<u>100 µт</u> ,	

7 CONCLUSÃO

O RhoB-Ctn[1-9] biologicamente ativo demonstrou a capacidade de induzir a clivagem em oócitos bovinos. Além disso, a ativação e o desenvolvimento até o estádio de blastocisto mostram pouca ou nenhuma toxicidade deste peptídeo como agente ativador de oócitos bovinos.

8 PERSPECTIVAS

Este trabalho realizou estudos preliminares sobre o uso do peptídeo sintético Ctn[1-9], em diferentes concentrações, na ativação de oócitos bovinos maturados. Os resultados demonstram uma atividade interessante.

No entanto, necessário se faz estudos posteriores, com diferentes concentrações do peptídeo e sobretudo com a verificação do influxo de Ca²⁺ durante o momento de ativação oocitária.

REFERÊNCIAS

AANEN, D.; BEEKMAN, M.; KOKKO, H. Weird sex: the underappreciated diversity of sexual reproduction. **Philosophical Transactions of The Royal Society B**, v. 371, p. 1-4, 2016.

AJDUK, A.; YAMAUCHI, Y.; WARD, M. A. Sperm chromatin remodeling after intracytoplasmic sperm injection differs from that of *in vitro* fertilization. **Biology of Reproduction**, v. 75, p. 442-451, 2006.

ARIAS, M. E.; RISOPATRÓN, J.; SÁNCHEZ, R.; FELMER, R. Intracytoplasmic sperm injection affects embryo developmental potential and gene expression in cattle. **Reproductive Biology**, v. 15, p. 34-41, 2014.

BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial peptides. Pharmaceuticals, v. 6, p. 1543-1575, 2013.

BALS, R.; LANG, C.; WEINER, D. J.; VOGELMEIER, C.; WELSCH, U.; WILSON, J. M. Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) mucosal antimicrobial peptides are close homologues of human molecules. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, p. 370-375, 2001.

BALS, R.; WILSON, J. M. Cathelicidins - a family of multifunctional antimicrobial peptides. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, p. 711-720, 2003.

BERRIDGE, M. J. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. **Cell Calcium**, v. 32, p. 235-249, 2002.

BESSALLE, R.; HAAS, H.; GORIA, A.; SHALIT, I.; FRIDKIN, M. Augmentation of the antibacterial activity of magainin by positive-charge chain extension. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 36, p. 313-317, 1992.

BIRCH, D.; CHRISTENSEN, M. V.; STAERK, D.; FRANZYK, H.; NIELSEN, H. M. Fluorophore labeling of a cell-penetrating peptide induces differential effects on its cellular distribution and affects cell viability. **Biochimica et biophysica acta. Biomembranes**, v. 1859, p. 2483-2494, 2017.

BIRTALAN, E.; RUDAT, B.; KÖLMEL, D. K.; FRITZ, D.; VOLLRATH, S. B. L.; SCHEPERS, U.; BRÄSE, S. Investigating rhodamine B-labeled peptoids: Scopes and limitations of its applications. **Peptide Science**, v. 96, p. 694-701, 2011.

BONET, S.; CASAS, I.; HOLT, W. H.; YESTE, M. Boar spermatozoa within the oviductal environment (II): sperm capacitation. In: YESTE, M. Ed. **Boar Reproduction. Fundamentals and New Biotechnological Trends**, Heidelberg: Springer, p. 347-405, 2013.

BONI, R., CUOMO, A., TOSTI, E. Development potential in bovine oocytes is related to cumulus-oocyte complex grade, calcium current activity, and calcium stores. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 836-842, 2002.

BUCKI, R.; PASTORE, J. J.; RANDHAWA, P.; VEGNERS, R.; WEINER, D. J.; JANMEY, P. A. Antibacterial activities of rhodamine B-conjugated gelsolin-derived peptides compared to those of the antimicrobial peptides cathelicidin LL37, magainin II, and melittin. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, p. 1526-1533, 2004.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature**, v. 3, p. 238-250, 2005.

CAMPBELL, K. H. S.; LOI, P.; OTAEGUI, P. J.; WILMUT, I. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. **Reproduction**, v. 1, p. 40-46, 1996.

CAMPBELL, K. H. S.; FISHER, P.; CHEN, W. C.; CHOI, I.; KELLY, R. D. W.; LEE. J-H.; XHU, J. Somatic cell nuclear transfer: Past, present and future perspectives. **Theriogenology**, v. 68, p. s214-s231, 2007.

CIBELLI, J.; WILMUT, I. S.; JAENISCH, R.; GURDON, J.; LANZA, R.; WEST, M.; CAMPBELL, K. H. S. Artificial activation of mammalian oocytes for cloning: present status and future perspectives. In: WAKAL, T.; ITO, J.; FISSORE, A. Ed. **Principles of Cloning**, London: Academic Press, p. 3-10, 2013.

CRAWFORD, G. E.; LEDGER, W. L. *In vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection beyond 2020. **BJOG**, v. 126, p. 237-243, 2019.

CULTRARA, C. N.; SHAH, S.; ANTUONO, G.; HELLER, C. J.; RAMOS, J. A.; SAMUNI, U. ZILBERBERG, J.; SABATINO, D. Size Matters: Arginine-Derived Peptides Targeting the PSMA Receptor Can Efficiently Complex but Not Transfect siRNA. **Molecular Therapy – Nucleic Acids**, v. 18, p. 863-870, 2019.

CLSI, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Ed. **Third edition CLSI document M27-A3**, Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

CLSI, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Ed. **11th standard M07**, Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

DAVIDSON, D. J.; CURRIE, A. J.; REID, G. S. D.; BOWDISH, D. M. E; MACDONALD, K. L.; MA, R. C.; HANCOCK, R. E. W.; SPEERT, D. P. The Cationic Antimicrobial Peptide LL-37 Modulates Dendritic Cell Differentiation and Dendritic Cell-Induced T Cell Polarization. **The Journal of Immunology**, v. 172, p. 1146, 2004.

DI, Y. P.; LIN, Q.; CHEN, C. MONTELARO, R. C.; DOI, Y.; DESLOUCHES, B. Enhanced therapeutic index of an antimicrobial peptide in mice by increasing safety and activity against multidrug-resistant bacteria. **Science Advances**, v. 6, p. eaay6817, 2020.

DUA, Q.; NAGOORVALI, D.; CHAUHAN, M. S.; PALTA, P.; MATHUR, P.; SINGH, M. K. Calcium ionophore enhanced developmental competence and apoptotic dynamics of goat parthenogenetic embryos produced *in vitro*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 55, p. 159-168, 2019.

DUCIBELLA, T.; HUNEAU, D.; ANGELICHIO, E.; XU, Z.; SCHULTZ, R. M.; KOPF, G. S.; FISSORE, R.; MADOUX, S.; OZIL, J. P. Egg-to-embryo transition is driven by differential responses to Ca²⁺ oscillation number. **Developmental Biology**, v. 250, p. 280-291, 2002.

DÜRR, U. H. N.; SUDHEENDRA, U. S.; RAMAMOORTHY, A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1758, p. 1408-1425, 2006.

FABISIAK, A.; MURAWSKA, N.; FICHNA, J. LL-37: Cathelicidin-related antimicrobial peptide with pleiotropic activity. **Pharmacological Reports**, v. 473, p. 1-7, 2016.

FALCÃO, C. B.; LA TORRE, B. G.; PÉREZ-PEINADO, C.; BARRON, A. E.; ANDREU, D.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Vipericidins: a novel family of cathelicidin-related peptides from the venom gland of South American pit vipers. **Amino Acids**, v. 46, p. 2561-2571, 2014.

FALCÃO, C. B.; PÉREZ-PEINADO, C.; LA TORRE, B. G.; MAYOL, X.; ZAMORA-CARRERAS, H.; JIMÉNEZ, M.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; ANDREU, D. Structural dissection of crotalicidin, a rattlesnake venom cathelicidin, retrieves a fragment with

antimicrobial and antitumor activity. **Journal of Medicina Chemistry**, v. 58, p. 8553-8563, 2015.

FALCÃO, C. B.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Crotamine and crotalicidin, membrane active peptides from *Crotalus durissus terrificus* rattlesnake venom, and their structurallyminimized fragments for applications in medicine and biotechnology. **Peptides**, v. 126, p. 1-9, 2020.

FEARON, D. T.; LOCKSLEY, R. M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. **Elements of Immunity**, v. 272, p. 50-54, 1996.

FUTAKI, S.; SUZIKI, T.; OHASHI, W.; YAGAMI, T.; TANAKA, S.; UEDA, K.; SUGIURA, Y. Arginine-rich Peptides: an abundant source of memebrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery, v. 276, p. 5836-5840, 2001.

FRIEDRICH, C. L.; MOYLES, D.; BEVERIDGE, T. J.; HANCOCK, R. E. W. Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on gram-positive bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 2086-2092, 2000.

GALLO, R. L.; HUTTNER, K.M. Antimicrobial peptides: an emerging concept in cutaneous biology. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 111, p. 739-743, 1998.

GANZ, T.; SELSTED, M. E.; SZKLARED, D.; HARWIG, S. S. L.; DAHER, K.; BAINTONO, D. F.; LEHRER, R. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 76, p. 1427-1435, 1985.

GIULIANI, A.; RINALDI, A. C. Beyond natural antimicrobial peptides: multimeric peptides and other peptidomimetic approaches. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, p. 2255-2266, 2011.

GOMES, B.; AUGUSTO, M. T.; FELÍCIO, M. R.; HOLLMANN, A.; FRANCO, O. L.; GONÇALVES, S.; SANTOS, N. C. Designing improved active peptides for therapeutic approaches against infectious diseases. **Biotechnology Advances**, v. 36, p. 415-429, 2018.

GOPALAKRISHNAKONE, P.; INAGAKI, H.; VOGEL, C-W.; MUKHERJEE, A. K.; RAHMY, T. R. Vipericidins, Snake Venom Cathelicidin-Related Peptides, in the Milieu of Reptilian Antimicrobial Polypeptides. In: RÁDIS-BAPTISTA, G. **Snake Venoms**, Dordrecht: Springer Science + Business Media, p. 297-326, 2017. HAVERFIELD, J.; NAKAGAWA, S.; LOVE, D.; TSICHLAKI, E.; NOMIKOS, M.; LAI, F. A.; SWANN, K.; FITZHARRIS, G. Ca²⁺ dynamics in oocytes from naturally-aged mice. **Scientific Reports**, v. 6, p. 19357, 2016.

HIPP, J.; ATALA, A. Tissue engineering, stem cells, cloning, and parthenogenesis: new paradigms for therapy. **Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction**, v. 1, p. 3-12, 2004.

HEDEGAARD, S. F.; DERBAS, M. S.; LIND, T. K.; KASIMOVA, M. R.; CHRISTENSEN, M. V.; MICHAELSEN, M. H.; CAMPBELL, R. A.; JORGENSEN, L.; FRANZYK, H.; CÁRDENAS, M.; NIELSEN, H. M. Fluorophore labeling of a cellpenetrating peptide significantly alters the mode and degree of biomembrane interaction. **Scientific Reports**, v. 8, p. 6327, 2018.

HOJNIK, N.; KOVAČIČ, B. Oocyte Activation Failure: Physiological and Clinical Aspects. In: WU, B.; FENG, H. L. Ed. **Embryology - Theory and Practice**, London: IntechOpen, p. 1-25, 2019.

HUANG, Y.; HUANG, J.; CHEN, Y. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. **Protein Cell**, v. 1, p. 143-152, 2010.

IETS, The International Embryo Transfer Society. 2015 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. Disponível em: http://www.iets.org/pdf/comm_data/December2015.pdf>. Acesso em: 10 de junho de 2020.

ISHIHARA, O.; ADAMSON, G. D.; DYER, S.; MOUZON, J.; NYGREN, K. G.; SULLIVAN, E. A.; ZEGERS-HOCHSCHILD, F.; MANSOUR, R. International committee for monitoring assisted reproductive technologies: world report on assisted reproductive technologies, 2007. Fertility and Sterility, v. 103, p. 402-413, 2015.

ITO, J.; PARRINGTON, J.; FISSORE, R. A. PLCζ and its role as a trigger of development in vertebrates. **Molecular Reproduction & Development**, v. 78, p. 846-853, 2011.

KAHLENBERG, J. M.; KAPLAN, M. J. Little Peptide, Big Effects: The Role of LL-37 in Inflammation and Autoimmune Disease. **The Journal of Immunology**, v. 191, p. 4895, 2013.

KAUFMAN, M. H.; HUBERMAN, E.; SACHS, L. Genetic control of haploid parthenogenetic development in mammalian embryos. **Nature**, v. 254, p. 694-695, 1975.

KASS, G. E.; ORRENIUS, S. Calcium signaling and cytotoxicity. **Environ Health Perspect**, v. 107, p. 25-35, 1999.

KERKIS, I.; HAYASHI, M. A.; PRIETO DA SILVA, A. R.; PEREIRA, A.; DE SÁ JÚNIOR, P. L.; ZAHARENKO, A. J.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; KERKIS, A.; YAMANE, T. State of the art in the studies on crotamine, a cell penetrating peptide from South American rattlesnake. **BioMed research international**, v. 2014, p. 1-9, 2014.

KONO, T.; OBATA, Y.; WU, Q.; NIWA, K.; ONO, Y.; YAMAMOTO, Y.; PARK, E. S.; SEO, J.; OGAWA, H. Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. **Nature**, v. 428, p. 860-864, 2004.

KUMAR, D.; GOPALAKRISHNA, R.; SINGH, A. P.; RANJAN, R.; PANDEY, S. K.; SARKHEL, B. C. Developmental potency of pre-implant parthenogenetic goat embryos: effect of activation protocols and culture media. **In vitro cellular & developmental biology**, v. 50, p. 1-6, 2014.

KHARCHE, S. D.; BIRADE, H. S. Parthenogenesis and activation of mammalian oocytes for *in vitro* embryo production: a review. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 4, p. 170–182, 2013.

LAN, G. C.; MA, S. F.; WANG, Z. Y.; LUO, M. J. CHANG, Z. L.; TAN, J. H. Effects of posttreatment with 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) on ethanol activation of mouse oocytes at different ages. Journal of experimental zoology. Part A, Comparative experimental biology, v. 301, p. 837-843, 2004.

LEE, W.; LEE, D. G. Fungicidal mechanisms of the antimicrobial peptide Bac8c. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**, v. 1848, p. 673-679, 2015.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. Journal of Animal Science, v. 48, p. 76-86, 1979.

LEVY, D. E.; TRAMMEL, J.; WASIEWSKI, W. W. Ancrod for acute ischemic stroke: a new dosing regimen derived from analysis of prior ancrod stroke studies. **Journal of Stroke** & Cerebrovascular Diseases, v. 18, p. 23-27, 2009.

LI, X.; HAMANO, K.; QIAN, X. Q.; FUNAUCHI, K.; FURUDATE, M.; MINATO, Y. Oocyte activation and parthenogenetic development of bovine oocytes following Intracytoplasmic Sperm Injection. **Zygote**, v. 7, p. 233-237, 1999.

LOI, P.; LEDDA, S.; FULKA, J.; CAPPAI, P.; MOOR, R. M. Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols. **Biology of reproduction**, v. 58, p. 1177-1187, 1998.

MAHMOUD, K. G. M.; PUGLISI, R.; SCHOLKAMY, T. H. Artificial meiotic arrest and parthenogenetic activation of buffalo oocytes using cycloheximide. **Cytologia**, v. 2, p. 173-180, 2007.

MÉO, S. C.; LEAL, C. L. V.; GARCIA, J. M. Activation and early parthenogenesis of bovine oocytes treated with ethanol and strontium. **Animal Reproduction Science**, v. 81, p. 35-46, 2004.

MI, B.; LIU, J. LIU, Y.; HU, L.; LIU, Y. PANAYI, A. C.; ZHOU, W.; LIU, G. The Designer Antimicrobial Peptide A-hBD-2 Facilitates Skin Wound Healing by Stimulating Keratinocyte Migration and Proliferation. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 51, p. 647-663, 2018.

MIAO, Y. L.; WILLIAMS, C. J. Calcium signaling in mammalian egg activation and embryo development: the influence of subcellular localization. **Mol Reprod Dev**, v. 79, p. 742-756, 2012.

MOOKHERJEE, N.; ANDERSON, M. A.; HAAGSMAN, H. P.; DAVID, D. J. Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 19, p. 311-332, 2020.

MODAHL, C. M.; BRAHMA, R. K.; KOH, C. Y.; SHIOI, N.; KINI, R. M. Omics Technologies for Profiling Toxin Diversity and Evolution in Snake Venom: Impacts on the Discovery of Therapeutic and Diagnostic Agents. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 8, p. 91-116, 2020.

NAGAOKA, I.; TSUTSUMI-ISHII, Y.; YOMOGIDA, S.; YAMASHITA, T. Isolation of cDNA encoding guinea pig neutrophil cationic antibacterial polypeptide of 11 kDa (CAP11) and evaluation of CAP11 mRNA expression during neutrophil maturation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 22742-22750, 1997.

NASCIMENTO, F. D.; SANCEY, L.; PEREIRA, A.; ROME, C.; OLIVEIRA, V.; OLIVEIRA, E. B.; NADER, H. B.; YAMANE, T.; KERKIS, I.; TERSARIOL, I. L.; COLL, J. L.; HAYASHI, M. A. The natural cell penetrating peptide crotamine targets tumor tissue

in vivo and triggers a lethal calcium-dependent pathway in cultured cells. **Molecular pharmaceutics**, v. 9, p. 211-212, 2012.

OH, Y. J.; GAMBLE, T. C.; LEONHARDT, D.; CHUNG, C. H.; BRUECK, S. R.; IVORY, C. F.; LOPEZ, G. P.; PETSEV, D. N.; HAN, S. M. Monitoring FET flow control and wall adsorption of charged fluorescent dye molecules in nanochannels integrated into a multiple internal reflection infrared waveguide. **Lab on a chip**, v. 8, p. 251-258, 2008.

NIEMANN, H.; LUCAS-HAHN, A. Somatic cell nuclear transfer cloning: practical applications and current legislation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 2-10, 2012.

NOROZI-HAFSHEJANI, M.; TAVALAEE, M.; AZADI, L.; BAHADORANI, M.; NASR-ESFAHANI, M. H. Effects of assisted oocyte activation with calcium-ionophore and strontium chloride on *in vitro* ICSI outcomes. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 21, p. 1109-1117, 2018.

OIKAWA, T.; TAKADA, N.; KIKUCHI, T.; NUMABE, T.; TANENAKA, M.; HORIUCHI, T. Evaluation of activation treatments for blastocyst production and birth of viable calves following bovine intracytoplasmic sperm injection. **Animal Reproduction Science**, v. 86, p. 187-194, 2005.

OJEDA, P. G.; WANG, C. K.; CRAIK, D. J. Chlorotoxin: Structure, activity, and potential uses in cancer therapy. **Biopolymers**, v. 106, p. 25-36, 2016.

OLIVEIRA-JÚNIOR, N. G.; FREIRE, M. S.; ALMEIDA, J. A.; REZENDE, T. M. B.; FRANCO, O. L. **Cytokine**, v. 111, p. 309-316, 2018.

PALERMO, G. D.; JORIS, H.; DEVROEY, P.; STEIRTEGHEM, A. C. V. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. **The Lancet**, v. 340, p. 17-18, 1992.

PALERMO, G. D.; NERI, Q. N.; ROSENWAKS, Z. To ICSI or not to ICSI. Seminars in Reproductive Medicine, v. 33, p. 92-102, 2015.

PATHAK, J.; KHARCHE, S. D.; GOEL, A. Effects of different activation protocols on cleavage rate and blastocyst production of caprine oocytes. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 18, p. 243-248, 2017.

PÉREZ-PEINADO, C.; DIAS, S. A.; MENDONÇA, D. A.; CASTANHO, M.; VEIGA, A. S.; ANDREU, D. Structural determinants conferring unusual long life in human serum to

rattlesnake-derived antimicrobial peptide Ctn[15-34], Journal of peptide science: an official publication of the European Peptide Society, v. 25, p. e3195, 2019.

PÉREZ-PEINADO, C.; DEFAUS, S.; ANDREU, D. Hitchhiking with nature: snake venom peptides to fight cancer and superbugs. **Toxins**, v. 12, p. 1-23, 2020.

PINCUS, G. The breeding of some rabbits produced by recipients of artificially activated ova. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 25, p. 557-558, 1939.

PINTO, M. C. X.; TONELLI, F. M. P.; VIEIRA, A. L. G.; KIHARA, A. H.; ULRICH, H.; RESENDE, R. R. Studying complex system: calcium oscillations as attractor of cell differentiation. **Integrative Biology**, v. 8, p. 130-148, 2016.

QUE, E. L.; DUNCAN, F. E.; LEE, H. C.; HORNICK, J. E.; VOGT, S.; FISSORE, R. A.; O'HALLORAN.; WOODRUFF, T. K. Bovine eggs release zinc in response to parthenogenetic and sperm induced egg activation. **Theriogenology**, v. 127, p. 41-48, 2019.

RÁDIS-BAPTISTA, G.; CAMPELO, I. S.; MORLIGHEM, J. R. L.; MELO, L. M.; FREITAS, V. J. F. Cell-penetrating peptides (CPPs): From delivery of nucleic acids and antigens to transduction of engineered nucleases for application in transgenesis. **Journal of Biotechnology**, v. 252, p. 15-26, 2017.

RAZ, T.; SHALGI, R. Early events in mammalian egg activation. **Human Reproduction**, v. 13, p. 133-145, 1998.

RUBINO, P.; VIGANÒ, P.; LUDDI, A.; PIOMBONI, P. The ICSI procedure from past to future: a systematic review of the more controversial aspects. **Human Reproduction Update**, v. 22, p. 194-227, 2016.

SAUNDERS, C. M.; LARMAN, M. G.; PARRINGTON, J.; COX, L. J.; ROYSE, J.; BLAYNEY, L. M.; SWANN, K.; LAI, F. A. PLCζ: a sperm-specific trigger of Ca2+ oscillations in eggs and embryo development. **Development**, v. 129, p. 3533-3544, 2002.

SAGATA, N. Meiotic metaphase arrest in animal oocytes: its mechanisms and biological significance. **Trends in Cell Biology**, v. 6, p. 22-28, 1996.

SATO, K.; YOSHIDA, M.; MIYOSHI, K. Utility of ultrasound stimulation for activation of pig oocytes matured in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 72, p. 396-403, 2005.

SCHAUBER, J.; GALLO, R. L. Expanding the roles of antimicrobial peptides in skin: alarming and arming keratinocytes. **The Journal of investigative dermatology**, v. 127, p. 510-2, 2007.

SCHMIDT, N.; MISHRA, A.; LAI, G. H.; WONG, G. C. L. Arginine-rich cell-penetrating peptides, **FEBS Letters**, v. 584, p. 1806-1813, 2010.

SHEN P.C.; LEE S.N.; LIU B.T.; CHU F.H.; WANG C.H.; WU J.S.; LIN H.H.; CHENG W.T.K. The effect of activation treatments on the development of reconstructed bovine oocytes, **Animal Reproduction Science**, v. 106, p. 1-12, 2008.

SOUZA-FABJAN, J. M. G.; LOCATELLI, Y.; DUFFARD, N.; CORBIN, E.; BATISTA, R. I. T. P.; FREITAS, V. J. F.; BECKERS, J.; MERMILLOD, P. Intrinsic quality of goat oocytes already found denuded at collection for *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, v. 86, p. 1989-1998, 2016.

SHANHOLTZER, C. J.; PETERSON, L. R.; MOHN, M. L.; MOODY, J. A.; GERDING,

D. N. MBCs for Staphylococcus aureus as determined by macrodilution and microdilution techniques. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 26, p. 214-219, 1984.

SHINNAR, A. E.; BUTLER, K. L.; PARK, H. J. Cathelicidin family of antimicrobial peptides: proteolytic processing and protease resistance. **Bioorganic chemistry**, v. 31, p. 425-436, 2003.

SPLITH, K.; NEUNDORF, I. Antimicrobial peptides with cell-penetrating peptide properties and vice versa. **European Biophysics Journal**, v. 40, p. 387-397, 2011.

SWANN, K.; LARMAN, M. G.; LAI, F. A. The cytosolic sperm factor that triggers Ca²⁺ oscillations and egg activation in mammals is a novel phospholipase C: PLCζ. **Reproduction Review**, v. 127, p. 431-439, 2004.

SWANN, K.; LAI, F. A. Egg activation at fertilization by a soluble sperm protein. **Physiological Reviews**, v. 96, p. 127-149, 2016.

TACHIBANA, M.; SPARMAN, M.; SRITANAUDOMCHAI, H.; MA, H.; CLEPPER, L.; WOODWARD, J.; LI, Y.; RAMSEY, C.; KOLOTUSHKINA, O.; MITALIPOV, S. Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. **Nature**, v. 461, p. 367-372, 2009.

TALMOR-COHEN, A.; ELIYAHU, E.; SHALGI, R. Signaling in mammalian egg activation: role of protein kinases. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 187, p. 145-149, 2002.

TAYLOR, P. C.; SCHOENKNECHT, F. D.; SHERRIS, J. C.; LINNER, E. C. Determination of minimum bactericidal concentrations of oxacillin for Staphylococcus aureus: influence and significance of technical factors. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 23, p. 142-150, 1983.

VAN HOEK, M. L. Antimicrobial peptides in reptiles. **Pharmaceuticals**, v. 7, p. 723-753, 2014.

VILA-PERELLÓ, M.; SÁNCHEZ-VALLET, A.; GARCÍA-OLMEDO, F.; MOLINA, A.; ANDREU, D. Structural Dissection of a Highly Knotted Peptide Reveals Minimal Motif with Antimicrobial Activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 1661-1668, 2005.

VITULLO, A. D.; OZIL, J. Repetitive calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear development during mouse oocyte activation. **Developmental Biology**, v. 151, p. 128-136, 1992.

WANG, Y.; HONG, J.; LIU, X.; YANG, H.; LIU, R.; WU, J.; WANG, A.; LIN, D.; LAI, R. Snake cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a potent peptide antibiotics. **PlosOne**, v. 3, p. 1-9, 2008.

WANG, L.; CHAN, J. Y. W.; RÊGO, J. V.; CHONG, C-M.; AI, N.; FALCÃO, C. B.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; LEE, S. M. Y. Rhodamine B-conjugated encrypted vipericidin nonapeptide is a potent toxin to zebrafish and associated with *in vitro* cytotoxicity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1850, p. 1253-1260, 2015.

WANG, L.; JIANG, H.; LI, Z. Li, Effects of Electrical Pulse and 6-DMAP on Cleavage of Golden Hamster Oocytes—Morphological and Physiological Observations. Journal of Functional Morphology and Kinesiology, v. 1, p. 240-248, 2016.

WARE, C. B.; BARNES, F. L.; MAIKI-LAURILA, M.; FIRST, N. L. Age dependence of bovine oocyte activation. **Gamete Research**, v. 22, p. 265-275, 1989.

WIEZEL, G. A.; SHIBAO, P. Y. T.; COLOGNA, C. T.; MORANDI FILHO, R.; UEIRA-VEIRA, C.; DE PAUW, E.; QUINTON, L.; ARANTES, E. C. In-Depth Venome of the Brazilian Rattlesnake Crotalus durissus terrificus: An Integrative Approach Combining Its Venom Gland Transcriptome and Venom Proteome. **Journal of proteome research**, v. 17, p. 3941-3958, 2018.

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; MCWHIR, J.; KIND, A. J.; CAMPBELL, K. H. S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v. 385, p. 810-813, 1997.

WINSTON, N.; JOHNSON, M.; PICKERING, S.; BRAUDE, P. Parthenogenetic activation and development of fresh and aged human oocytes. **Fertility and Sterility**, v. 56, p. 904-912, 1991.

WHITAKER, M. Calcium signaling in early embryos. **Philosophical Transactions of The Royal Society B**, v. 363, p. 1401-1418, 2008.

XHINDOLI, D.; PACOR, S.; BENINCASA, M.; SCOCCHI, M.; GENNARO, R.; TOSSI, A. The human cathelicidin LL-37 — A pore-forming antibacterial peptide and host-cell modulator. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1858, p. 546-566, 2016.

YANAGIMACHI, R. Intracytoplasmic injection of spermatozoa and spermatogenic cells: its biology and applications in humans and animals. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 10, p. 247-288, 2005.

ZANETTI, M.; LITTERI, L.; GENNARO, R.; HORSTMANN, H.; ROMEO, D. Bactenecins, defense polypeptides of bovine neutrophils, are generated from precursor molecules stored in the large granules. **The Journal of Cell Biology**, v. 111, p. 1363-1371, 1990.

ZHAO, H.; GAN, T. X.; LIU, X. D.; JIN, Y.; LEE, W. H.; SHEN, J. H.; ZHANG, Y. Identification and characterization of novel reptile cathelicidins from elapid snakes. **Peptides**, v. 29, p. 1685-1691, 2008.

APÊNDICE
APÊNDICE A – RESUMO NOS ANAIS DA XXXIV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2020

Use of the synthetic peptide EVP50 for activation of bovine oocytes

<u>Thales Márcio Cabral dos Santos</u>¹, Sâmara Bryda da Silva¹, Gabriel Acácio de Moura¹, Satish Kumar¹, Mirelly Mirna Alves de Sousa Silva¹, João Victor da Silva Albuquerque¹, Izabella Costa Malagutti¹, Luciana Magalhães Melo², Gandhi Rádis-Baptista³, Vicente José de Figueiredo Freitas¹

¹ Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE, ² Unidade de Genética Molecular da UNIFAMETRO, Fortaleza-CE, ³ Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE

Fertilization in mammals is characterized by oscillations in intracellular calcium concentration that are responsible for oocyte activation. The interest in oocyte activation mechanisms has increased due to embryo biotechnologies, such as cloning by nuclear transfer and intracytoplasmic sperm injection. Vipericidins comprise the cathelicidin-related antimicrobial peptides from the venom gland of the pit vipers and previous studies shown that EVP50, a vipericidin encrypted nonapeptide, induced extracellular calcium influx and intracellular calcium release. Therefore, it has been hypothesized that EVP50 may cause oscillations in intracellular calcium concentration in oocytes. Thus, the aim of this study was to evaluate EVP50 for activation of bovine oocytes. EVP50 was obtained through solid phase synthesis and with a purity higher than 95% that was confirmed by high performance liquid chromatography and mass spectrometry. Ovaries were collected in a local abattoir and follicles (2-8 mm) were punctured. The COCs recovered were subjected to IVM for 26 h. Mature oocytes were allocated in five experimental groups: control (ionomycin 5 μ M) and EVP50 (0, 1, 10 and 40 µM) incubated for 4 min. After, oocytes were incubated with 6-DMAP (2 µM) during 4 h in SOF medium and then submitted to IVC in SOF medium for seven days. The rates of cleavage and blastocyst production were evaluated on the second and seventh day of culture, respectively. Analysis was performed using Minitab software. Data are presented as percentage (\pm SD) and compared by Fischer's exact test. Differences were considered significant at the 5% level of significance. In total, 1172 oocytes were obtained from 11 replicates. Oocytes were distributed as follow: ionomycin (250) and EVP50 0 μ M (155), 1 μ M (214), 10 μ M (286) and 40 μ M (273). The control group (ionomycin) was always significantly superior (P<0.05) to the other groups, both in the rate of cleavage (80.0 ± 15.3%) and blastocyst production (35.6 ± 10.8%). Comparing cleavage rates among EVP50 groups, we observe that 1 (19.6 ± 10.4%) and 10 μ M (22.4 ± 12.4%) were higher (P<0.05) than 0 μ M (8.4 ± 6.3%) and similar (P>0.05) to 40 μ M (14.7 ± 12.9%). As for the production of blastocysts, the best (P<0.05) results were obtained using 40 μ M (2.2 ± 3.7%), when compared to 0 (0.6 ± 0.5%), 1 (0.0%) and 10 μ M (1.8 ± 3.7%). In conclusion, EVP50 has the potential to activate bovine oocytes, especially in higher concentrations. However, further studies in relation to incubation time and testing of other concentrations are necessary.

This study was financed by PRONEX/FUNCAP (grant PR2-0101-00059.01.00-15)

Keywords: Embryo, Parthenogenesis, Peptide, Vipericidins.