

GABRIEL AUGUSTO NOVAES

**UTILIZAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA  
ANTIMICROBIANA NO SÊMEN DE GALOS DOMÉSTICOS:  
ANÁLISE DE DIFERENTES TEMPOS DE PRÉ-IRRADIAÇÃO,  
IRRADIÂNCIA E EXPOSIÇÃO RADIANTE DA LUZ**

São Paulo

2021

GABRIEL AUGUSTO NOVAES

**UTILIZAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA  
ANTIMICROBIANA NO SÊMEN DE GALOS DOMÉSTICOS:  
ANÁLISE DE DIFERENTES TEMPOS DE PRÉ-IRRADIAÇÃO,  
IRRADIÂNCIA E EXPOSIÇÃO RADIANTE DA LUZ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Departamento:**

Reprodução Animal

**Área de concentração:**

Reprodução Animal

**Orientador:**

Prof. Dr. Ricardo José Garcia Pereira

São Paulo

2021

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4076 FMVZ	<p>Novaes, Gabriel Augusto Utilização da terapia fotodinâmica antimicrobiana no sêmen de galos domésticos: análise de diferentes tempos de pré-irradiação, irradiância e exposição radiante da luz / Gabriel Augusto Novaes. – 2021. 102 f. : il.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2021.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal. Área de concentração: Reprodução Animal. Orientador: Prof. Dr. Ricardo José Garcia Pereira.</p> <p>1. Aves. 2. Inseminação artificial. 3. aPDT. 4. Resistência bacteriana. 5. Azul de metileno. I. Título.</p>
-----------------	---

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Laet, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.



# Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Universidade de São Paulo

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "UTILIZAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA NO TRATAMENTO ANTIMICROBIANO DO SÊMEN DE GALOS DOMÉSTICOS: ANÁLISE DE DIFERENTES TEMPOS DE PRÉ-IRRADIAÇÃO, IRRADIÂNCIA E EXPOSIÇÃO RADIANTE DA LUZ", protocolada sob o CEUA nº 3579040418 (ID 005509), sob a responsabilidade de **Ricardo José Garcia Pereira e equipe; Gabriel Augusto Novaes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 19/09/2018.

We certify that the proposal "PHOTODYNAMIC THERAPY AS AN ANTIMICROBIAL TREATMENT OF DOMESTIC ROOSTER'S SEMEN: ANALYSIS OF DIFFERENT PRE-IRRADIATION TIME, LIGHT IRRADIANCE AND LIGHT RADIANT EXPOSURE", utilizing 80 Birds (40 males and 40 females), protocol number CEUA 3579040418 (ID 005509), under the responsibility of **Ricardo José Garcia Pereira and team; Gabriel Augusto Novaes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 09/19/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [05/2018](#) a [05/2020](#)

Área: [Reprodução de Aves](#)

Origem: [Não aplicável biotério](#)

Espécie: [Aves](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [16 a 18 semanas](#)

N: [40](#)

Linhagem: [Hisex White](#)

Peso: [2 a 3 kg](#)

Origem: [Não aplicável biotério](#)

Espécie: [Aves](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [15 a 18 semanas](#)

N: [40](#)

Linhagem: [Hisex White](#)

Peso: [1 a 2 kg](#)

Local do experimento: Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

São Paulo, 26 de maio de 2021

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

Camilla Mota Mendes  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

# FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: NOVAES, Gabriel Augusto

Título: Utilização da terapia fotodinâmica antimicrobiana no sêmen de galos domésticos: análise de diferentes tempos de pré-irradiação, irradiância e exposição radiante da luz.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## Banca Examinadora

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

*A Deus, que sempre colocou as pessoas certas em meu caminho e me proporcionou excelentes oportunidades.*

*Aos meus pais e meus avós, os quais me concederam suporte moral e financeiro para a realização deste sonho, bem como são os principais exemplos para o meu desenvolvimento como ser humano.*

*Aos meus demais familiares, pois todos contribuíram de alguma forma para a construção de meu caráter.*

*À minha namorada Denise e sua família, por todo apoio, paciência e incentivo para continuar mesmo quando as coisas pareciam inalcançáveis.*

*A todos os meus amigos (Derek, Raphaella, Jamile, Thais, Bittar...), pelo companheirismo e pela convivência que me tornaram um ser social. Com toda a certeza vocês me fazem ir muito mais longe.*

*A todos os meus Mestres, desde o ensino básico até a pós-graduação, pois vocês foram responsáveis pela construção da minha moral e de meu senso crítico, o que me permitiu enfrentar e ultrapassar os diferentes desafios da vida. Vocês sempre serão meus exemplos em todas as etapas de minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

À FAPESP: processo n° 2018/02849-7, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro para aquisição dos insumos fundamentais para o andamento desta pesquisa.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP e ao Departamento de Reprodução Animal pela disponibilização da infraestrutura e de equipamentos essenciais para as análises realizadas neste estudo.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Ricardo José Garcia Pereira**, por todo incentivo e apoio psicológico e científico para o desenvolvimento dos experimentos. Saiba que sem o senhor nada disso seria possível. O senhor tornou-se mais do que um orientador, tornou-se um amigo que levarei para a vida inteira.

À **Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro** e ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, por disponibilizar o LedBox para a irradiação das amostras e pelo auxílio no delineamento experimental e na interpretação dos resultados relacionados à PDT.

Ao **Prof. Dr. Marcílio Nichi**, pela ajuda no delineamento experimental das etapas do projeto, por me auxiliar nas análises estatísticas dos resultados e pela amizade formada nestes anos de estágio e Mestrado no VRA.

À **Profa. Dra. Terezinha Knobl** por disponibilizar sua infraestrutura laboratorial para a realização das análises microbiológicas, e à sua orientada **Fernanda** por todo o auxílio para a confecção e avaliação das placas.

A todos os professores, técnicos, secretários, tratadores e técnicos de limpeza do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP, que direta ou indiretamente foram essenciais para a realização de minhas pesquisas.

Aos meus colegas do Grupo de Estudos para Multiplicação de Aves (GEMA), **Brunão, Marcel, Bianca** (que inclusive veio do Pará para me ajudar nos experimentos rsrs), por todo apoio, amizade e auxílio técnico nos experimentos.

Aos meus colegas do Laboratório de Andrologia (LA), **Diego, Roberta (Bobbie), Giulia, Ken e Henrique**, pela amizade e por sempre me auxiliarem com as técnicas relacionadas às avaliações seminais das amostras.

Aos estagiários e alunos de Iniciação Científica, **Lourenço, Victor, Brian, André, Vitor, Henrique, Paula, Evelyn e Bárbara**, pela ajuda com a manutenção dos galos, pela amizade, e pelo auxílio com a leitura das centenas de lâminas relacionadas às análises seminais.

À **Raphaela Gabrielle Brito Sousa** por me aturar nos 5 anos de faculdade e mais 2 anos de Mestrado, não apenas no VRA mas também na República. Tenha certeza que sua amizade me fez chegar muito mais longe. Ah, e obrigado por me ensinar a cozinhar, rsrs. Agradeço por tudo minha irmã que a vida concedeu.

À **Mônica Cavallin** por todos os conselhos, puxões de orelha e reuniões. Como eu sempre digo, mais do que uma amiga, você tornou-se minha mãezinha científica.

À **Tania M. Yoshimura** pelas dezenas de vezes que trouxe o equipamento do IPEN até o VRA e pelo auxílio com as avaliações microbiológicas e com os resultados.

Ao **Caetano Padial Sabino** por todo auxílio técnico com o equipamento utilizado para a irradiação das amostras.

## RESUMO

NOVAES, G. A. **Utilização da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana no sêmen de galos domésticos: análise de diferentes tempos de pré-irradiação, irradiância e exposição radiante da luz.** [Photodynamic Therapy as an antimicrobial alternative for semen of domestic rooster: analysis of different pre-irradiation time, light irradiance and light radiant exposure]. 2021. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A avicultura se destaca entre os setores do agronegócio brasileiro, uma vez que o Brasil se apresenta como o terceiro maior produtor e o maior exportador mundial de carne de frango. Portanto, o emprego de biotecnologias que otimizem este tipo de criação é extremamente relevante, destacando-se a inseminação artificial. Todavia, em virtude da cloaca ser uma via comum ao ejaculado e às excretas, altos graus de contaminação são frequentemente observados no sêmen de aves. Para contornar esta situação muitos diluidores de sêmen possuem antibióticos em sua composição, uma prática que intensifica a problemática da resistência bacteriana. Deste modo, com o objetivo de gerar alternativas à antibioticoterapia, nosso laboratório deu início aos estudos buscando adaptar a Terapia Fotodinâmica (PDT) para o tratamento do sêmen de galos domésticos. Para isso, estamos somando esforços para entender como alterações na concentração de fotosensibilizador (azul de metileno – AM) e no tempo de pré-irradiação com essa substância, na exposição radiante ( $J/cm^2$ ) e irradiância ( $mW/cm^2$ ) da luz influenciam a viabilidade espermática e as bactérias presentes no sêmen. Os resultados demonstraram que a incubação com AM em concentrações inferiores a 25  $\mu M$  não comprometem as motilidades total e progressiva dos espermatozoides, independentemente do tempo avaliado (1 ou 5 min), por outro lado concentrações superiores mostram-se altamente tóxicas à progressividade. Visto isso, decidiu-se dar início às irradiações utilizando uma concentração intermediária de AM (10  $\mu M$ ) e o tempo de incubação mais curto (1 min), na tentativa de evitar ao máximo a absorção do AM pelos espermatozoides. As irradiações das amostras seminais foram realizadas através do equipamento Led Box 660 nm por 30, 60, 120 e 180s nas irradiâncias de 44.3, 28.98 e 17.35  $mW/cm^2$ . A partir dos resultados, observou-se que o AM e a luz isoladamente não causam nenhum efeito sobre os parâmetros dos espermatozoides. Todavia quando os mesmos são associados na PDT, de forma geral, ao passo que se elevaram os tempos de exposição à luz os efeitos sobre os parâmetros

espermáticos também aumentaram progressivamente, independente da irradiância utilizada. Portanto, na segunda etapa, decidiu-se fixar os menores tempos de exposição à luz (30 e 60 seg.), nas três irradiâncias, e avaliar a eficácia antimicrobiana da PDT frente aos coliformes presentes no sêmen dos galos. Diferente do esperado, a PDT nestas condições menos deletérias aos espermatozoides, não foi capaz de reduzir significativamente as colônias presentes no plasma seminal dos reprodutores. Os achados das três etapas desse estudo sugerem fortemente uma falha na seletividade do AM, o qual muito provavelmente está sendo demasiadamente absorvido pelos espermatozoides, o que explicaria os impactos sobre a cinética espermática e a ineficácia na redução dos coliformes após irradiação. Visto isso, acreditamos que estudos mais aprofundados com o intuito de melhor compreender a origem dos danos acarretados à cinética dos espermatozoides são extremamente relevantes, assim como pesquisas que busquem aumentar a seletividade da PDT frente aos coliformes presentes no plasma seminal, por exemplo investigando novas classes de fotossensibilizadores ou associando moléculas que tornem o AM mais seletivo, por exemplo os peptídeos antimicrobianos ou as nanopartículas.

Palavras-chave: Aves. Inseminação artificial. aPDT. Resistência bacteriana. Azul de metileno.

## ABSTRACT

NOVAES, G. A. **Photodynamic Therapy as an antimicrobial alternative for semen of domestic rooster: analysis of different pre-irradiation time, light irradiance and light radiant exposure.** [Utilização da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana no sêmen de galos domésticos: análise de diferentes tempos de pré-irradiação, irradiância e exposição radiante da luz]. 2021. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

The poultry industry stands out among different sectors of the Brazilian agribusiness, since Brazil is the third largest producer and the world largest exporter of chicken meat. Therefore, the use of biotechnologies that optimize its productivity is extremely relevant, especially artificial insemination. However, because cloaca is a common route for ejaculate and excreta, high degrees of contamination are often observed in poultry semen. To overcome this situation, many semen extenders include antibiotics in their composition, a practice that intensifies the problem of bacterial resistance. Thus, aiming at generating alternatives for the use of antibiotics, our laboratory started exploring Photodynamic therapy (PDT) for its use in poultry semen. To that end, first we tried to understand how changes in concentration photosensitizer (Methylene Blue – MB) and pre-irradiation time with this substance, in the radiant exposure ( $J / cm^2$ ) and irradiance ( $mW / cm^2$ ) of light influence sperm viability and bacteria present in semen. Our results showed that incubation with MB at concentrations below  $25 \mu M$  does not significantly alter sperm total and progressive motilities, regardless of time (1 or 5 min), but higher concentrations are extremely harmful. Consequently, we decided to start irradiations using an intermediate concentration of MB ( $10 \mu M$ ) with the shortest incubation time (1 min), in an attempt to avoid as much as possible. the absorption of MB by sperm cells Irradiations of the seminal samples were carried out using the Led Box equipment 660 nm for 30, 60, 120 and 180s at the irradiance of 44.3, 28.98 and 17.35  $mW / cm^2$ . Data revealed that MB and light by themselves did not influence sperm parameters. However, when they are associated in PDT, whenever times of exposure to light increased, effects on sperm parameters also increased progressively, regardless of the irradiance used. Hence, it was decided in the second phase to fix the shortest exposure times to light (30 and 60 sec.) using three different irradiances, in order to evaluate the antimicrobial efficacy of PDT against the total coliforms and gram-negative bacteria present in the semen of the roosters. Unexpectedly, under these less harmful conditions to sperm, PDT

was not able to significantly reduce colonies in the seminal plasma. These findings strongly suggest a failure in the selectivity of MB, which very likely was also being absorbed by sperm cells, which may explain the impact on sperm kinetics and the ineffectiveness in reducing coliforms after irradiation. In view of this, we believe that more in-depth studies in order to better understand the source of the damage caused to sperm kinetics are extremely relevant, as well as research that seeks to increase the selectivity of PDT in relation to coliforms present in seminal plasma, for example investigating new classes of photosensitizers or associating molecules that make MB more selective, for example antimicrobial peptides or nanoparticles.

Keywords: Birds. Artificial insemination. aPDT. Bacterial resistance. Methylene blue.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Matrizes de frangos de corte alojadas no Brasil nos últimos 10 anos.....	17
Figura 2 -	Mercado mundial de carne de frango.....	18
Figura 3 -	Exportações de carne de frango no Brasil nos últimos 10 anos.....	18
Figura 4 -	Custos da produção de carne de frango no primeiro semestre de 2019 e 2020.....	19
Figura 5 -	Anatomia do sistema reprodutor feminino das aves.....	22
Figura 6 -	Procedimento para Inseminação Artificial em aves domésticas.....	23
Figura 7 -	Procedimento para colheita de sêmen em galos ( <i>Gallus gallus domesticus</i> ).....	24
Figura 8 -	Colheita de sêmen em codorna japonesa ( <i>Coturnix japonica</i> ).....	25
Figura 9 -	Higienização das penas ao redor da cloaca dos machos antes da colheita seminal....	26
Figura 10 -	Anatomia do sistema reprodutor masculino de aves domésticas.....	27
Figura 11 -	Mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica (diagrama de Jablonski modificado)..	37
Figura 12 -	Danos intracelulares ocasionados pela Terapia Fotodinâmica.....	37
Figura 13 -	Delineamento experimental do estudo, evidenciando os experimentos realizados em cada etapa.....	55
Figura 14 -	Sistema das irradiações com o Led Box 660 nm, evidenciando o compartimento das placas de ensaio de 96 poços e a forma em que eram montadas e a tela de configuração do equipamento.....	59
Figura 15 -	Sistema de cultivo das amostras em formato de estria, seguindo a metodologia de JETT <i>et al.</i> (1997).....	62
Figura 16 -	Resultados dos cultivos microbiológicos das amostras seminais submetidas à PDT por 30 segundos.....	82
Figura 17 -	Resultados dos cultivos microbiológicos das amostras seminais submetidas à PDT por 60 segundos.....	83
Gráfico 1 -	Regressão linear da irradiância em mW/cm <sup>2</sup> medida pelo Power Meter versus as porcentagens programadas no equipamento Led Box 660 nm.....	58
Gráfico 2 -	Motilidades total e progressiva dos espermatozoides de aves após incubação por 5 minutos com diferentes concentrações do fotossensibilizador Azul de Metileno.....	64
Gráfico 3 -	Efeito da incubação com diferentes concentrações de AM (0, 5, 10, 15 e 20 µM) na motilidade e na progressividade de espermatozoides de galos.....	66
Gráfico 4 -	Resultados das irradiações das amostras seminais de galos com Led Box 660 nm na irradiância de 44.3 mW/cm <sup>2</sup> .....	70
Gráfico 5 -	Resultados das irradiações das amostras seminais de galos com Led Box 660 nm na irradiância de 28.98 mW/cm <sup>2</sup> .....	72
Gráfico 6 -	Resultados das irradiações das amostras seminais de galos com Led Box 660 nm na irradiância de 17.35 mW/cm <sup>2</sup> .....	74

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Comparação entre os sinais clínicos em aves e humanos associados às principais bactérias relatadas em sêmen de aves domésticas e de relevância na avicultura industrial.....	31
Tabela 2 -	Irradiâncias (mW/cm <sup>2</sup> ) do Led Box 660 nm relativos às diferentes porcentagens programadas no equipamento.....	58
Tabela 3 -	Resultados das análises repetidas no tempo referentes ao segundo experimento da etapa de pré-irradiação.....	65
Tabela 4 -	Resultados da etapa 2 referentes ao tratamento das amostras seminais com a maior irradiância (44.3 mW/cm <sup>2</sup> ).....	69
Tabela 5 -	Resultados da etapa 2 referentes ao tratamento das amostras seminais com a irradiância de 28.98 mW/cm <sup>2</sup> .....	71
Tabela 6 -	Resultados da etapa 2 referentes ao tratamento das amostras seminais com a menor irradiância (17.35 mW/cm <sup>2</sup> ).....	73
Tabela 7 -	Resultados do segundo experimento da etapa 2, referentes às análises computadorizadas do movimento espermático 0, 30 e 60 minutos após submissão das amostras seminais à 17.35 mW/cm <sup>2</sup> de PDT .....	77
Tabela 8 -	Resultados do segundo experimento da etapa 2, referentes às análises computadorizadas do movimento espermático 0, 30 e 60 minutos após submissão das amostras seminais à 28.98 mW/cm <sup>2</sup> de PDT .....	78
Tabela 9 -	Resultados das análises repetidas no tempo das variáveis de cinética espermática analisadas através do CASA, referente ao segundo experimento da etapa 2, na irradiância de 17.35 mW/cm <sup>2</sup> .....	79
Tabela 10 -	Resultados das análises repetidas no tempo das variáveis de cinética espermática analisadas através do CASA, referente ao segundo experimento da etapa 2, na irradiância de 28.98 mW/cm <sup>2</sup> .....	79
Tabela 11 -	Resultados da etapa 3, referentes às Análises computadorizadas do movimento espermático (CASA) e dos cultivos microbiológicos do sêmen de galos domésticos antes e após tratamento fotodinâmico.....	81

## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	15
2.	<b>CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
2.1.	AVICULTURA INDUSTRIAL NO BRASIL .....	17
2.2	INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM AVES DE PRODUÇÃO .....	20
2.2.1	<b>Técnica para Inseminação Artificial em aves domésticas</b> .....	21
2.2.2	<b>Técnicas para colheita seminal de aves domésticas</b> .....	23
2.2.3	<b>Inseminação Artificial em aves x Saúde pública</b> .....	27
2.3	TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA .....	34
2.3.1	<b>Mecanismo de ação da aPDT</b> .....	35
2.4.1	<b>Terapia Fotodinâmica com Fenotiazinas</b> .....	38
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	40
3.	<b>CAPÍTULO 2: EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM FENOTIAZINA SOBRE OS ESPERMATOZOIDES E AS BACTÉRIAS PRESENTES NO PLASMA SEMINAL DE GALOS-DOMÉSTICOS</b> .....	51
3.1	INTRODUÇÃO.....	51
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	53
3.2.1	<b>Delineamento Experimental</b> .....	53
3.2.2	<b>Animais</b> .....	56
3.2.3	<b>Coleta e Processamento do Sêmen</b> .....	56
3.2.4	<b>Irradiação das amostras seminais</b> .....	57
3.2.5	<b>Análises seminais</b> .....	58
❖	<i>Avaliação Computadorizada do Movimento Espermático (CASA)</i> .....	60
❖	<i>Integridade de membrana plasmática e integridade acrossomal</i> .....	60
❖	<i>Atividade mitocondrial</i> .....	61
3.2.7	<b>Análise estatística</b> .....	62
3.3	RESULTADOS .....	64

3.4	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....	84
3.5	CONCLUSÃO.....	91
3.6	AGRADECIMENTOS .....	91
3.7	REFERÊNCIAS .....	92
<b>4.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>100</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>100</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O agronegócio desempenha um papel fundamental na economia brasileira gerando empregos, renda e garantindo a distribuição de alimentos para toda a população. Neste contexto, a avicultura industrial se destaca uma vez que o Brasil é considerado o terceiro maior produtor e o maior exportador mundial de carne de frango a nível global. Somente em 2019, o país exportou 4,2 milhões de toneladas de carne de frango e 7,7 mil toneladas de ovos, o que garantiu uma receita superior a 7 bilhões de dólares (ABPA, 2020). De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), o ovo e a carne de frango estão entre as proteínas de origem animal mais consumidas a nível global, por consumidores das mais diferentes culturas, religiões e tradições e, dentro do setor pecuário, a avicultura surge como o subsector mais eficiente no uso de recursos naturais e no fornecimento de proteína para suprir uma demanda global crescente (MOTTET; TEMPIO, 2017). Assim, o desenvolvimento de biotecnologias que otimizem este tipo de criação mostra-se extremamente relevante pois podem diminuir custos e agregar valor ao produto final.

A inseminação artificial (IA) é um método com grande potencial no setor avícola tendo em vista seus benefícios econômicos, genéticos e sanitários (DHAMA *et al.*, 2014; MOHAN *et al.*, 2018). A indústria de perus é um exemplo clássico dos benefícios proporcionados pela IA, uma vez que a incompatibilidade de peso entre machos e fêmeas matrizes (ocasionado pela intensa seleção genética para ganho de musculatura peitoral) tornou inviável a reprodução através de cópula natural (KHARAYAT *et al.*, 2016). Todavia, não é raro que amostras seminais de aves domésticas tenham altos graus de contaminação bacteriana em virtude da cloaca ser uma via comum ao ejaculado e às excretas (WILCOX; SHORB, 1958; GALE; BROWN, 1961; HAINES *et al.*, 2013; DHAMA *et al.*, 2014). Para contornar esta situação muitos diluidores de sêmen para aves possuem antibióticos em sua composição (ALTHOUSE, 2008; SCHULZE *et al.*, 2020), uma prática que tem sido debatida pela comunidade científica dadas as suas implicações no que tange a resistência bacteriana (MATHEW; CISSELL; LIAMTHONG, 2007; MARINHO, 2013). Estima-se que, caso nenhuma atitude seja tomada para controlar a propagação de bactérias multirresistentes, estas podem ser responsáveis por 10 milhões de mortes ao ano até 2050 (O'NEILL, 2016). Desta forma, estudos que visem proporcionar técnicas alternativas à antibioticoterapia tornam-se extremamente relevantes.

Uma técnica que, apesar de sua descoberta há mais de 100 anos, vem despertando recentemente o interesse de diversos pesquisadores é a Terapia Fotodinâmica (PDT), a qual a eficácia já foi comprovada contra uma gama de agentes infecciosos, dentre eles bactérias gram-negativas e gram-positivas, fungos, vírus e protozoários (PODBIELSKA *et al.*, 2006; PILEGGI *et al.*, 2013; AURELIANO *et al.*, 2014; NASCIMENTO *et al.*, 2015; SELLERA *et al.*, 2016; SABINO *et al.*, 2020). Suas principais vantagens em relação aos antibióticos abrangem a pouca seletividade quando comparada aos antimicrobianos, uma vez que os fotossensibilizadores podem atuar em diversas classes de microrganismos; possui eficácia na inativação de bactérias multirresistentes; os microrganismos não apresentam resistência à técnica mesmo após inúmeras repetições da terapia; e os efeitos adversos e danos ao tecido do hospedeiro são observados com menor frequência e intensidade (MAISCH, 2015; HAMBLIN, 2016; GHORBANI *et al.*, 2018; SABINO *et al.*, 2020). No entanto, apesar destas vantagens em relação aos antibióticos e da eficácia da PDT frente aos principais patógenos de relevância na criação animal (p.e. *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*...) já ter sido comprovada em diversos estudos, apenas um trabalho na literatura investigou a utilização da PDT no tratamento de amostras seminais (EAGLESOME *et al.*, 1994). Estes autores avaliaram a eficiência da PDT para a descontaminação de determinados patógenos presentes no sêmen de touros, entretanto, nas condições experimentais utilizadas, não obtiveram os resultados esperados, todavia ressaltaram a relevância do aperfeiçoamento da técnica e da elaboração de novos protocolos.

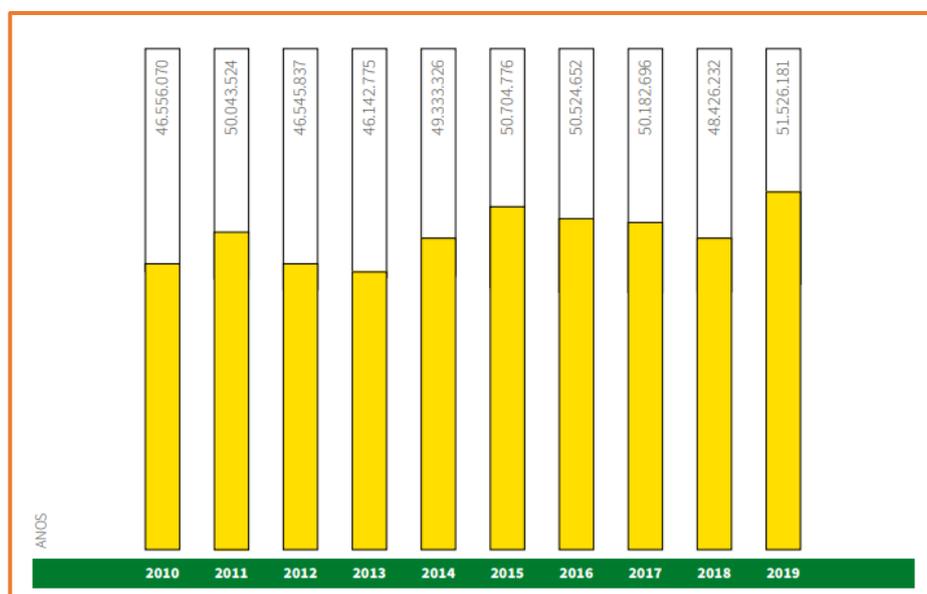
Deste modo, com o objetivo de gerar alternativas ao uso de antibióticos nos diluidores para sêmen, investigamos neste projeto de Mestrado os efeitos da PDT com azul de metileno (AM) sobre os espermatozoides e os coliformes fecais presentes no plasma seminal de galos domésticos, utilizando diferentes parâmetros de pré-irradiação (concentração do AM e tempo de incubação) e variados parâmetros físicos da fonte de luz (irradiância, tempo de exposição e dose). A presente dissertação será apresentada em dois capítulos. O primeiro capítulo consiste na revisão de literatura, onde serão abordadas informações importantes para compreender a relevância do presente estudo, bem como entender os mecanismos relacionados à técnica da PDT. O capítulo 2, por sua vez, consiste no artigo que será submetido para revistas científicas indexadas, abrangendo a metodologia detalhada, os resultados obtidos e a discussão destes resultados.

## 2. CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. AVICULTURA INDUSTRIAL NO BRASIL

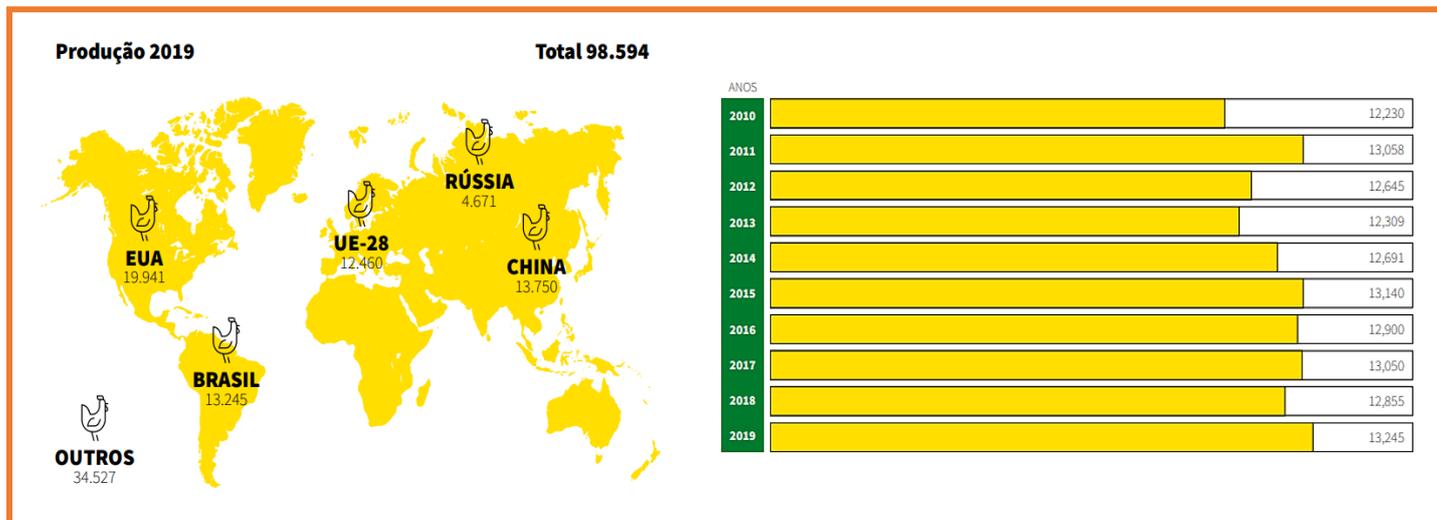
A avicultura brasileira se destaca no mercado internacional, em especial no segmento de carne de frangos, onde ocupa o terceiro lugar em produção e lidera o ranking de exportações, à frente de grandes potências como Estados Unidos, China e União Europeia. Apesar da recorrente crise econômica que assombra o país, de acordo com o último relatório anual da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), em 2019 o Brasil bateu o recorde de alojamento de matrizes de corte e produção de carne de frango (Figuras 1 e 2) dos últimos 10 anos, alcançando as impressionantes marcas de mais de 51 milhões de matrizes de corte alojadas e mais de 13.2 milhões de toneladas de carne produzidas. Aproximadamente 32% da produção brasileira de carne de frango teve como destino final a exportação em 2019 (Figura 3), o que gerou uma receita de quase 7 bilhões de dólares e manteve o país no posto de maior exportador mundial deste segmento (ABPA, 2020). Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), dados preliminares de abate do primeiro semestre de 2020 indicam que, apesar dos impactos provenientes da pandemia da Covid-19, em especial sobre os custos dos insumos (Figura 4), a produção de frango brasileira foi equivalente à de 2019 no mesmo período.

Figura 1 - Número de matrizes de frangos de corte alojadas no Brasil nos últimos 10 anos



Fonte: (ABPA, 2020)

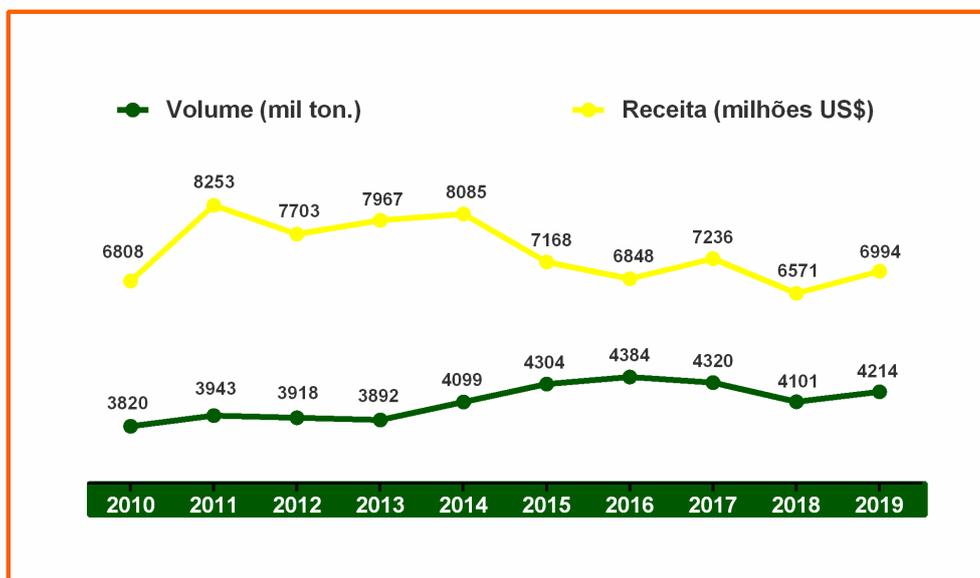
Figura 2 - Mercado mundial de carne de frango



Fonte: (ABPA, 2020)

Legenda: (A) Produção global de carne de frango no ano de 2019; (B) Produção brasileira de carne de frango na década de 2010-2019.

Figura 3 – Exportações de carne de frango no Brasil nos últimos 10 anos



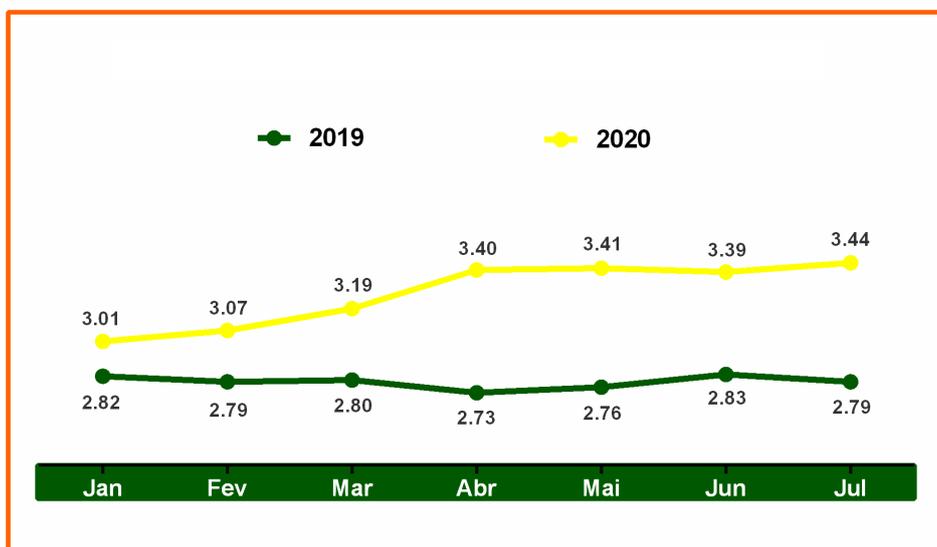
Fonte: (ABPA, 2020)

A demanda por produtos de origem animal vem aumentando nas últimas décadas em decorrência do crescimento exponencial da população mundial, a qual estima-se alcançar 9.7 bilhões de habitantes em 2050 (UN, 2019). Nesse contexto, a produção de frangos de

corde mostra-se fundamental, visto que apresenta rápido crescimento, demanda menor área e energia para produzir do que a carne bovina e um preço final mais acessível para os estratos econômicos mais baixos (MOTTET; TEMPIO, 2017). De acordo com Alexandratos e Bruinsma (2012), nos últimos 50 anos, a produção global de carne de frango apresentou uma taxa de crescimento anual superior aos demais produtos de origem animal (5% para carne de frango, 1.5% para carne bovina, 3.1% para carne suína e 1.7% para pequenos ruminantes) e o consumo per capita global aumentou de 2.88 kg em 1961 para 14.99 kg em 2013 (FAOSTAT, 2021).

O consumo de frango no Brasil supera o de outras carnes e responde por cerca de 45% do consumo total de proteína animal no país (USDA, 2020). Segundo estimativa da USDA, o consumo doméstico de frango pelos brasileiros deve crescer ainda mais em 2021 e chegar a um recorde de quase 10.5 milhões, um aumento de 4.5% em relação ao ano anterior. Projeções de Alexandratos e Bruinsma (2012) indicam que, enquanto a demanda global pela carne bovina e suína pode aumentar em 66% e 43%, respectivamente, entre os anos de 2005 e 2050, a procura pela carne de frango deve apresentar um notável crescimento de 121%, e a demanda por ovos adicionais 65%. Estes dados estatísticos demonstram a importância global da avicultura industrial, mas também evidenciam a necessidade pela busca constante de otimização no segmento, sempre buscando uma produção mais eficiente e sustentável. As biotécnicas reprodutivas aparecem neste cenário como uma importante ferramenta, visto que aceleram o melhoramento genético dos indivíduos e aumentam a eficiência reprodutiva dos rebanhos, permitindo assim uma maior produtividade por área utilizada (SINGH *et al.*, 2019). Dentre elas pode-se destacar a inseminação artificial (IA), a qual sua utilização em aves será melhor discutida a seguir.

Figura 4 – Comparação dos custos da produção de carne de frango no primeiro semestre de 2019 e 2020



Fonte: (USDA, 2020)

## 2.2 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM AVES DE PRODUÇÃO

A IA foi a primeira biotecnologia reprodutiva aplicada à reprodução de aves domésticas, e até os dias atuais é considerada uma ferramenta valiosa na avicultura industrial, visto que permite o aproveitamento mais eficiente das amostras seminais e contorna diversos problemas reprodutivos intrínsecos às aves, entre eles a incompatibilidade entre casais, deficiências físicas que impossibilitam a cópula natural, problemas comportamentais, baixa qualidade seminal e assincronia reprodutiva entre machos e fêmeas (BENOFF *et al.*, 1981, DHAMA *et al.*, 2014, PEREIRA, 2014). Além disso, os resultados de fertilidade e eclodibilidade alcançados com a técnica de IA são, em sua grande maioria, superiores aos obtidos com cópula natural (SAEKI; NAGOMI, 1964; BRILLARD, 2003; HABIBULLAH *et al.*, 2015; MOHAN *et al.*, 2016). Nas granjas de perus modernos, as fêmeas reprodutoras são, em sua totalidade, inseminadas artificialmente pois a seleção genética contínua para obter animais com peitos robustos e musculosos resultou em várias linhagens pesadas, que possuem grande dificuldade para se reproduzir em razão do peso e tamanho excessivo, podendo causar injúrias graves às matrizes durante a cópula natural (DHAMA *et al.*, 2014; TRIPLETT *et al.*, 2016). A IA nesta espécie vem proporcionando bons resultados, visto que, apenas no Brasil, foram produzidas 172 mil toneladas de carne de peru no ano de 2019, e destas foram exportadas 37 mil toneladas, gerando uma receita de 82 milhões de dólares (ABPA, 2020).

Nas demais espécies de aves domésticas, alguns fatores anátomo-fisiológicos contribuem para o uso limitado da IA na rotina das granjas. Por exemplo, em decorrência da presença de espuma da glândula cloacal e baixo volume de sêmen em codornas (MOHAN *et al.*, 2002; SHIT *et al.*, 2010) e galinhas-d'angola (MOHAN *et al.*, 2013). Similarmente, a IA não é uma técnica simples em patos e gansos, porque, ao contrário de galinhas e peruas, o orifício do oviduto não pode ser evertido (COOPER, 1977) e, as técnicas disponíveis para a colheita seminal em aves, ainda permanecem bastante ineficiente nestas espécies (ŁUKASZEWICZ, 2010). Outra característica intrínseca das aves que compromete a utilização da técnica de IA reside no fato da cloaca representar um local comum a passagem do sêmen e das excretas (uratos e fezes), contribuindo para o alto risco de contaminação das amostras seminais durante a colheita e a transmissão de patógenos intestinais para as fêmeas durante as inseminações (DHAMA *et al.*, 2014). As alternativas que podem ser empregadas para contornar ou atenuar a contaminação das

amostras e as técnicas de colheita de sêmen e inseminação artificial disponíveis até o momento para sua utilização em aves serão abordadas a seguir.

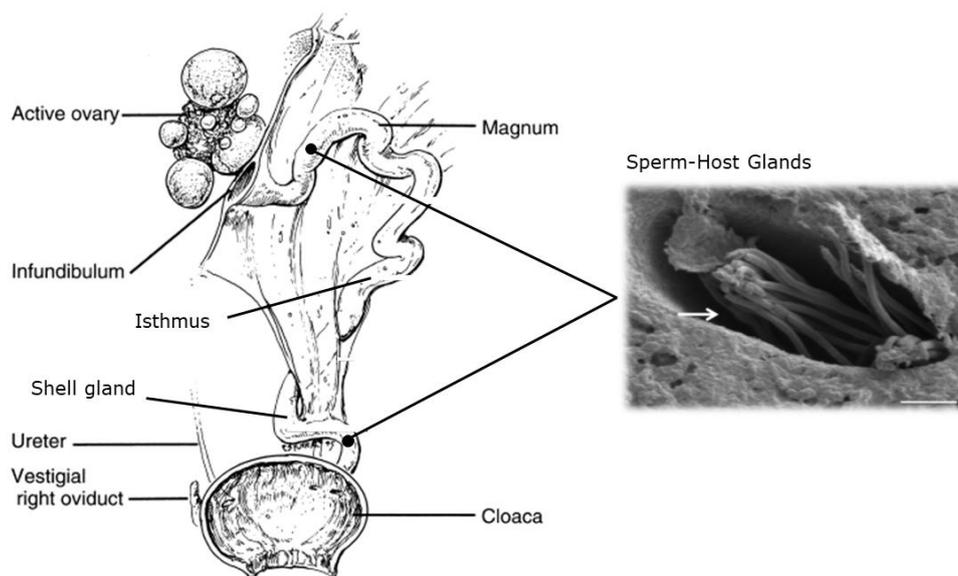
### 2.2.1 Técnica para Inseminação Artificial em aves domésticas

Como mencionado anteriormente, uma das principais vantagens da IA consiste no melhor aproveitamento do sêmen dos machos, uma vez que ao utilizar diluidores específicos (soluções que mimetizam as condições ideais para a sobrevivência dos espermatozoides), um único ejaculado pode ser utilizado para inseminar um grande número de fêmeas, o que não seria possível através da cópula natural (MIAN *et al.*, 1990; LAKE, 1995; MOHAN *et al.*, 2018). Em aves essa vantagem torna-se ainda mais marcante devido à alta concentração das amostras seminais das espécies domésticas em geral. A concentração seminal em galos varia entre 3 a 7 bilhões de espermatozoides por mililitro (GETACHEW, 2016), e em perus pode chegar de 8 a 12 bilhões por mililitro (DOUARD *et al.*, 2005; IAFFALDANO *et al.*, 2009). Portanto, estima-se que, ao diluir o sêmen e distribuir em doses inseminantes que normalmente variam entre 80 a 100 milhões de espermatozoides (MOHAN *et al.*, 2018), o número de fêmeas fertilizadas por um único macho seja 4 vezes maior do que a cópula natural em galos, e 10 vezes superior à cópula natural em perus. Mohan e Sharma (2017) demonstraram em seu estudo que é possível inseminar 70 galinhas por dia com o ejaculado de um único macho diluído na proporção de 1:6 (38 milhões de espermatozoides por dose), alcançando fertilidades iguais ou superiores a 90%. Esta característica do sêmen das aves reduz os custos com alimentação e mão de obra atrelados à manutenção de um grande número de machos no plantel e aumenta a viabilidade da IA na rotina das granjas.

Outro fator que beneficia o uso da IA em aves é a presença das glândulas hospedeiras de espermatozoides no oviduto das fêmeas. Conforme representado na figura 5, estas estruturas localizam-se na lâmina própria das mucosas útero-vaginal e infundibular (BURKE; OGASAWARA, 1969; BRILLARD, 1993; SASANAMI *et al.*, 2013), e possuem a importante função de selecionar e armazenar os espermatozoides provenientes da cópula ou IA e liberá-los gradativamente durante sucessivas ovulações. De acordo com Bakst *et al.* (2010), é possível encontrar espermatozoides residentes nas glândulas após 2 a 3 semanas da IA em galinhas e 10 a 15 semanas em peruas, no entanto a partir de 7 dias a capacidade fertilizante dos espermatozoides armazenados começa a decair significativamente, como pode-se observar no estudo de Sexton (1977). Isto significa

dizer que, em aves, um intervalo semanal entre as inseminações é o suficiente para manter uma alta fertilidade do lote, o que reduz bruscamente os custos com a técnica.

Figura 5 - Anatomia do sistema reprodutor feminino das aves



Fonte: Modificado de POLLOCK; OROSZ, 2012 e SASANAMI *et al.*, 2013

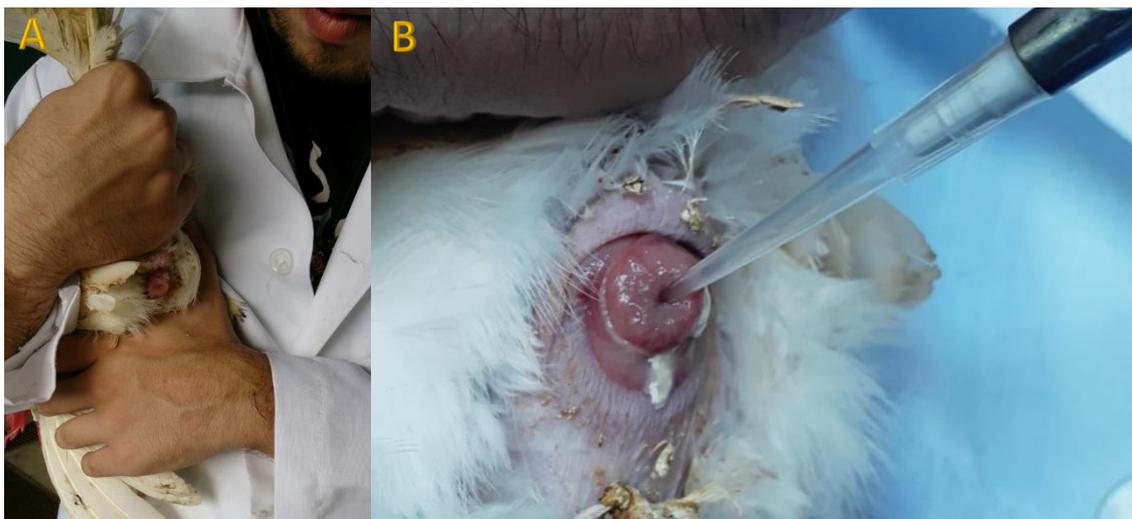
Legenda: As retas indicam os locais onde encontram-se as glândulas hospedeiras ("Sperm-Host Glands"), e a figura à direita consiste em uma microscopia eletrônica da região útero-vaginal do oviduto de uma codorna japonesa, evidenciando uma glândula repleta de espermatozoides (seta). Barra= 2.5µm.

A técnica utilizada para IA em aves domésticas foi descrita por Burrows e Quinn (1937a), e o principal objetivo é a deposição do sêmen na região da vagina, o mais próximo possível das glândulas hospedeiras de espermatozoides. Este procedimento pode ser executado por duas pessoas. Enquanto o auxiliar aplica uma adequada pressão no abdômen da galinha para que ocorra a eversão do orifício vaginal através da cloaca, conforme demonstrado na figura 6, o aplicador deposita o sêmen a uma profundidade de 2 a 4 cm no orifício vaginal, concomitantemente com a retirada da pressão sobre o abdômen da fêmea para atenuar a perda de sêmen por movimento retrógrado. A inseminação pode ser realizada através de palhetas estéreis, tubos plásticos, seringas ou pipetas. Em escala industrial, distribuidores automatizados de sêmen com palhetas individuais carregadas com a dose inseminante são comumente utilizados (MOHAN *et al.*, 2018).

A hora do dia em que a IA é realizada desempenha um papel significativo na fertilidade dos ovos. De forma geral, as inseminações realizadas nos períodos vespertinos

ou noturnos tendem a apresentar maiores fertilidades do que aquelas realizadas pela manhã (CHRISTENSEN; JOHNSTON, 1977). Isso ocorre porque as fêmeas concentram as oviposições no período da manhã e, grande parte dos espermatozoides inseminados em galinhas e peruas dentro de 1 a 3 horas antes ou logo após a oviposição são eliminados pela contração da vagina envolvida neste processo (BRILLARD; BAKST, 1990). Outro fator primordial para o sucesso do procedimento de IA é a obtenção de uma amostra seminal de boa qualidade, ou seja, livre de contaminação com urato, fezes ou sangue, e com volume e concentração dentro do esperado para a espécie (DHAMA *et al.*, 2014; MOHAN *et al.*, 2018). Para isto, é imprescindível o conhecimento das técnicas disponíveis para a colheita seminal em aves, bem como os principais cuidados que devem ser tomados antes da colheita para evitar a contaminação das amostras, temas que serão discutidos no tópico a seguir.

Figura 6 - Procedimento para Inseminação Artificial em aves domésticas



Fonte: Acervo pessoal (2020)

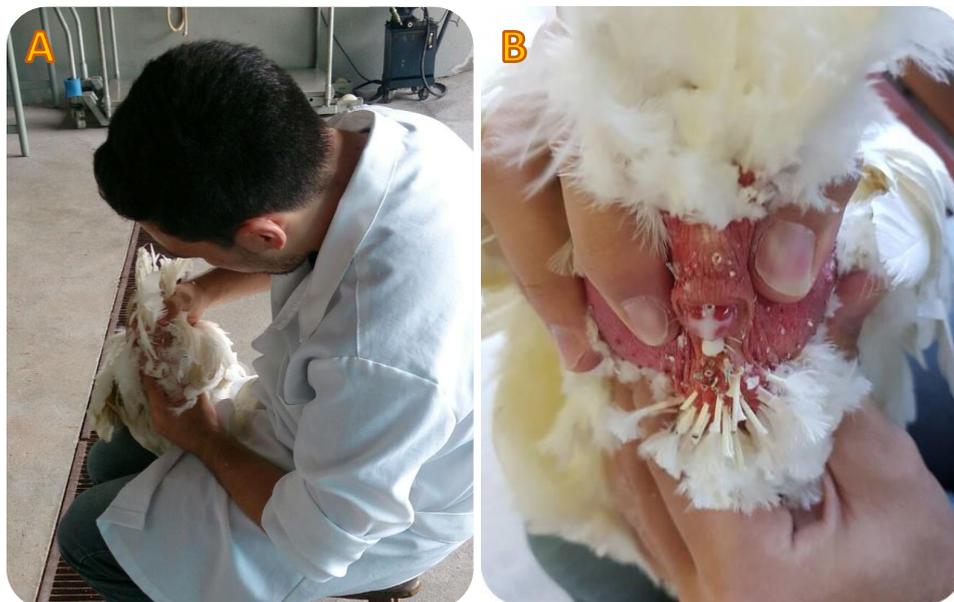
Legenda: (A) Técnica para eversão do orifício vaginal pela cloaca; (B) Deposição do sêmen à cerca de 2 cm de profundidade com o auxílio de uma pipeta.

### 2.2.2 Técnicas para colheita seminal de aves domésticas

Atualmente três métodos podem ser utilizados para a colheita de sêmen em aves, a colheita cooperativa (GVARYAHU *et al.*, 1984; CHELMONSKA *et al.*, 2008, PEREIRA, 2014), a massagem digital (BURROWS; QUINN, 1937b) ou a eletroejaculação (LIERZ *et al.*, 2013; FISHER *et al.*, 2014; FREDIANI *et al.*, 2019). A massagem digital foi descrita por Burrows e Quinn, em 1937, e até os dias atuais é o

método de escolha para a aquisição de sêmen em aves domésticas. Para a realização desta técnica em galos e perus, o macho deve ser contido sobre uma superfície plana, ou sobre o colo do coletor, posicionando a ave entre as pernas, como demonstrado na figura 7A. Em seguida, o coletor deve estimular simultaneamente o dorso e o ventre do macho, através de uma massagem rítmica e vigorosa em direção à cauda do animal. Geralmente essa massagem resulta em reflexo ejaculatório, representado pela elevação da cauda e intumescimento do falo. Por conseguinte, para finalizar o procedimento é necessária uma leve pressão nas laterais da cloaca, num processo denominado “ordenha” do sêmen, como observado na figura 7B em galos, e na figura 8 em codornas. Adaptações na técnica de massagem foram realizadas para outras espécies de aves domésticas, como os patos, que possuem hemipênis (NISHIYAMA; NAKASHIMA; FUJIHARA, 1976) e as codornas, cuja espuma produzida pela glândula cloacal deve ser retirada antes da colheita (SHIT *et al.*, 2010).

Figura 7 - Procedimento para colheita de sêmen em galos (*Gallus gallus domesticus*)



Fonte: Acervo pessoal (2020)

Legenda: (A) Demonstração da técnica para contenção física do galo e da massagem digital para colheita do sêmen. (B) Demonstração do procedimento de ordenha do sêmen após massagem digital.

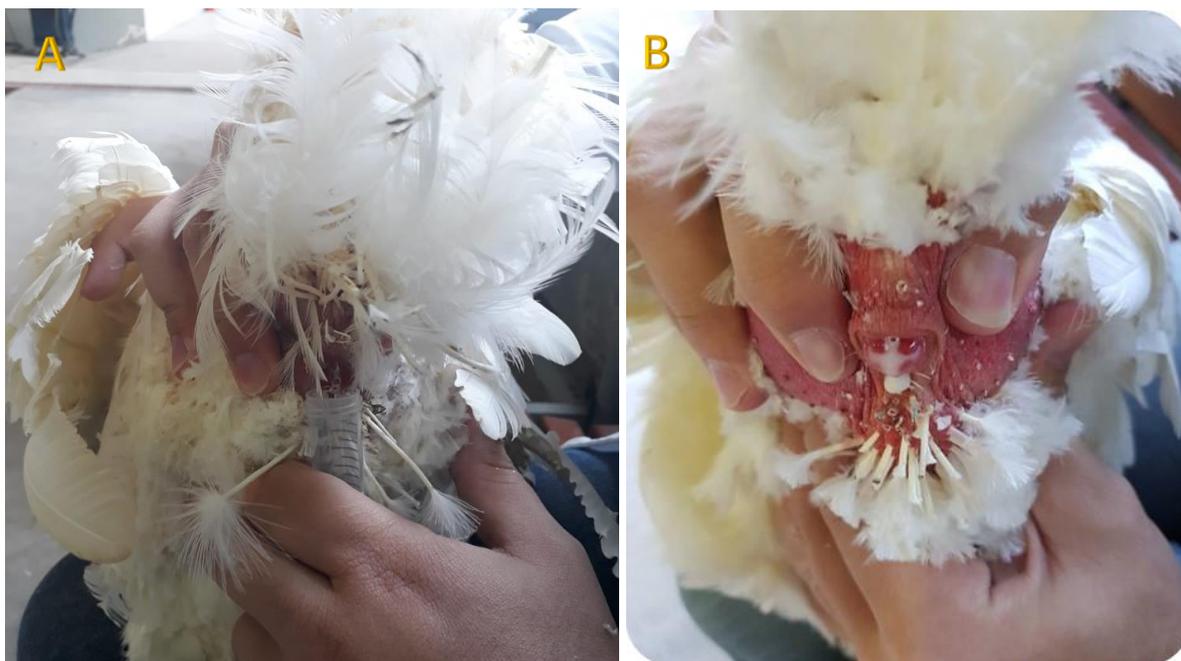
Figura 8 - Colheita de sêmen em codorna japonesa (*Coturnix japonica*)



Fonte: (CHELMONSKA *et al.*, 2016)

É importante ressaltar que alguns cuidados devem ser tomados antes da colheita, com o intuito de atenuar o risco de contaminação das amostras e garantir o máximo aproveitamento do potencial genético do macho reprodutor, dentre eles podemos citar: a higienização da região ao redor da cloaca do macho, afim de evitar a contaminação da amostra com as fezes que ficam acumuladas nas penas (fig. 9); o condicionamento dos machos à colheita algumas semanas antes do procedimento real, seguido de avaliações andrológicas afim de selecionar os reprodutores; o jejum hídrico e alimentar de 12 horas antes da colheita; a instalação nas granjas de programas eficientes de higienização pessoal dos coletores bem como do ambiente; e monitoramento e diagnóstico precoce de afecções (BURROWS; QUINN, 1937b; ALTHOUSE, 2008; MOHAN *et al.*, 2018).

Figura 9 - Importância da higienização das penas ao redor da cloaca dos machos antes da colheita seminal

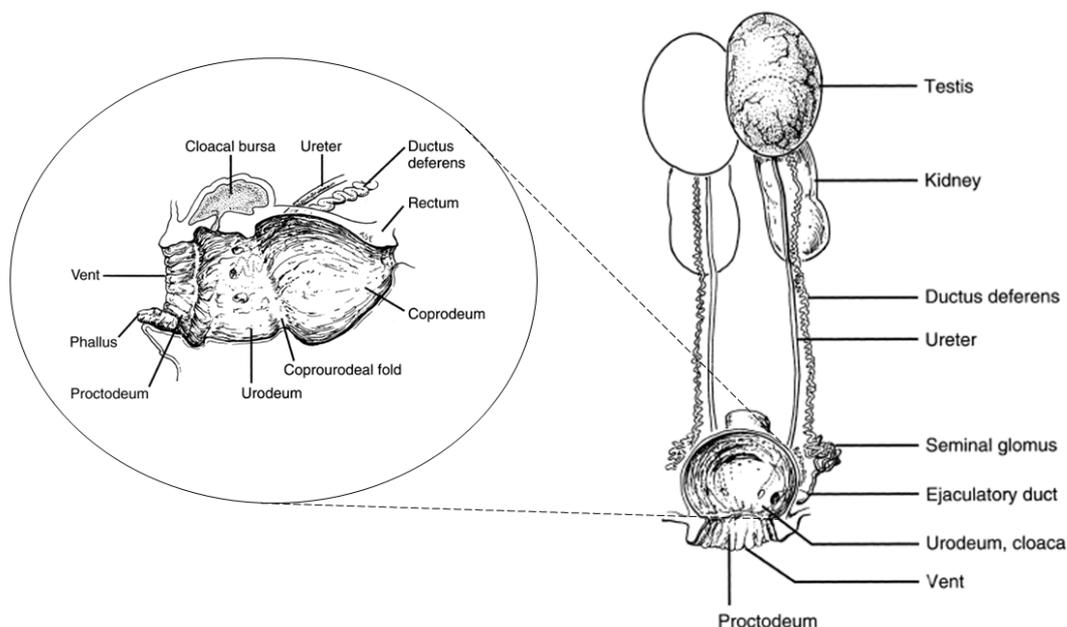


Fonte: Acervo pessoal (2020)

Legenda: (A) Colheita de sêmen em um reprodutor com a retirada das penas ao redor da cloaca em atraso; (B) Colheita seminal em um reprodutor com a higienização das penas em dia. Nota-se a dificuldade para visualização da cloaca e o risco maior de contaminação no reprodutor à esquerda.

Ainda que sejam tomados todos estes cuidados, como a cloaca é uma estrutura comum aos sistemas reprodutor, digestivo e urinário (fig. 10), a contaminação bacteriana possui alta prevalência no sêmen das aves, sendo relatados uma média de 2,2 milhões de bactérias por mililitro em galos (WILCOX; SHORB, 1958) e 1,3 bilhões de bactérias por mililitro nos perus (GALE; BROWN, 1961). As bactérias presentes no sêmen podem não só causar processos inflamatórios ou doenças graves às fêmeas quando inseminadas, mas também podem exercer um efeito negativo na qualidade do esperma, seja por competir diretamente com os espermatozoides por nutrientes fornecidos pelo diluente de sêmen ou pela produção de subprodutos metabólicos tóxicos e endotoxinas (HAINES *et al.*, 2013; MORELL; WALLGREN, 2014). Visando solucionar esta problemática, diferentes classes de antibióticos são adicionadas aos diluidores do sêmen. Em geral, há uma tendência ao uso de uma combinação de antibióticos de amplo espectro, visto que muitas vezes as concentrações inibitórias mínimas de cada antimicrobiano isoladamente apresentam efeito espermicida e alteram a capacidade fertilizante do sêmen (WILCOX; SHORB, 1958; GALE; BROWN, 1961). Os riscos desta prática para a saúde pública, bem como a importância da inseminação artificial como uma fonte de transmissão de patógenos entre aves e seres humanos serão discutidos no tópico a seguir.

Figura 10 - Anatomia do sistema reprodutor masculino de aves domésticas



Fonte: Modificado de POLLOCK *et al.*, 2012.

### 2.2.3 Inseminação Artificial em aves x Saúde pública

De acordo com o Ministério da Saúde (MS) as doenças transmitidas por alimentos (DTA) são aquelas de natureza infecciosa ou tóxica causadas pela ingestão de alimentos ou água contaminados por agentes biológicos, químicos e físicos, representando um sério risco à saúde pública (BRASIL, 2010). *Salmonella spp.* e *Campylobacter spp.* são dois dos principais gêneros de patógenos de origem alimentar epidemiologicamente ligados ao consumo de frango e ovos que, juntos, são responsáveis pela maioria dos casos confirmados em laboratório de gastroenterite bacteriana nos Estados Unidos (SCALLAN *et al.*, 2011). Segundo dados publicados pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC), 48 milhões de casos de DTA são registrados anualmente, e destes casos, 3 mil pessoas têm a morte como desfecho final, acumulando um total de 77.7 bilhões de dólares em perdas econômicas para os cofres do país (CDC, 2015; ARSI *et al.*, 2019). No Brasil, por sua vez, os principais agentes envolvidos em surtos de DTA nos últimos 17 anos, foram *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (BRASIL, 2018).

Um fato que se torna preocupante do ponto de vista sanitário e reprodutivo é que a transmissão via sêmen de grande parte destes patógenos causadores de surtos de DTA já

foi comprovada em matrizes de galos e perus, sendo os mais comuns *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Mycoplasma* (SMITH, 1949; WILCOX; SHORB, 1958; COX *et al.*, 2002, DHAMA *et al.*, 2014). Outro fator inquietante é que alguns destes microrganismos podem agir de forma silenciosa, por exemplo o *Campylobacter* e as *Salmonellas* do grupo paratifóide, os quais raramente causam sinais clínicos aparentes nas aves adultas (HARGIS *et al.*, 2001; NEWELL; FEARNLEY, 2003), entretanto quando transmitidos aos seres humanos podem ocasionar sintomas graves e até levar ao óbito (tabela 1). Desta forma, a contaminação do sêmen e a transmissão para as fêmeas reprodutoras pode ocorrer sem sinais aparentes no desempenho do lote. Ainda, patógenos como *Mycoplasma meleagridis*, *Escherichia Coli*, *Campylobacter spp.* e *Salmonella spp.* podem ser transmitidos por via vertical, ou seja, da reprodutora para os ovos embrionados e conseqüentemente para os pintinhos e, caso a infecção persista, estes patógenos serão difundidos para os estratos inferiores da pirâmide produtiva da avicultura (linhagens puras ➔ bisavós ➔ avós ➔ matrizes ➔ produto final-carne ou ovos), podendo o produto final chegar contaminado ao consumidor (BAKER; GOFF; TIMONEY, 1980; McGARR *et al.*, 1980; COX *et al.*, 2002; RANTA; MAIJALA, 2002; DHAMA *et al.*, 2014).

Como citado anteriormente, na tentativa de atenuar o risco de transmissão de patógenos via sêmen, diferentes classes de antibióticos são adicionadas aos diluidores comerciais (SEXTON; JACOBS; MCDANIEL, 1980; HERNÁNDEZ-AVILÉS *et al.*, 2020, SCHULZE *et al.*, 2020). Essa prática é comum a outras espécies de animais domésticos, como bovinos equinos e suínos, no entanto em aves os empecilhos provenientes da anatomia reprodutiva e da colheita das amostras seminais em pools intensifica os riscos de contaminação (DONOGUE, 1999; DONOGUE *et al.*, 2004). As principais classes de antimicrobianos utilizadas nos diluidores para sêmen de aves são as gentamicinas e as tilosinas (ALTHOUSE, 2008). Em geral opta-se por agentes potentes de amplo-espectro combinados em doses inferiores à concentração inibitória mínima, com o intuito de reduzir a toxicidade às células espermáticas (MORELL; WALLGREN, 2014). Dados do número de doses inseminantes e volume de diluidor utilizados na avicultura não foram encontrados na literatura, no entanto na suinocultura, Morell e Wallgren (2011), estimam que 4 milhões de litros de diluidores para sêmen contendo antibióticos são utilizados anualmente na União Européia. Ainda, Thibier e Guerin (2000) relatam que, na bovinocultura, 264 milhões de doses de sêmen foram produzidas em todo o mundo no ano de 1999, o que representa 66 mil litros de diluente contendo antibióticos,

levando em consideração doses de 0.25 ml. Não é difícil perceber que este procedimento representa um risco não apenas para as pessoas que manipulam os extensores de sêmen, mas também para o ambiente após o descarte de resíduos de diluidores ou doses de IA não utilizadas, fator que contribui para a seleção e propagação de bactérias multirresistentes.

Desde seu descobrimento, em meados do século 20, os antimicrobianos vêm sendo utilizados intensivamente tanto para o tratamento de diversas condições clínicas em humanos e animais (POWERS, 2004; BENNANI *et al.*, 2020), como através de aditivos na alimentação de animais de produção com o intuito de prevenir afecções e promover o crescimento (CASTANON, 2007). Este uso descomedido dos antibióticos contribuiu para a seleção e a propagação de cepas de bactérias resistentes, dentre elas podemos citar as cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), os membros da família *Enterobacteriaceae* produtores de beta-lactamase de espectro estendido, como *E. coli*, *Salmonella spp.* e *Shigella spp.*, e as cepas de *Clostridium perfringens* resistentes às tetraciclina (THRELFALL, 2000; GHOLAMIANDEHKORDI *et al.*, 2009; PRICE *et al.*, 2013; AGERSØ *et al.*, 2014; BENNANI *et al.*, 2020). Sabe-se que os animais de produção são um importante reservatório de bactérias carreadoras de genes de resistência e, podem transmiti-las para os seres humanos de forma direta através do contato com as secreções biológicas (fezes, urina, sangue...), ou indiretamente através do consumo de sua carne ou derivados (POWERS, 2004; SMITH *et al.*, 2013; CHANTZIARAS *et al.*, 2014; AARESTRUP, 2015; ABEBE; GUGSA; AHMED, 2020).

O tema “resistência bacteriana” tem sido pauta de discussão em diversos países e, todos os anos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) em conjunto com a Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO) e a Organização Mundial para a Saúde Animal (OIE), coordenam a Semana Mundial de Conscientização sobre o Uso de Antimicrobianos (WHO, 2020), cujos principais objetivos são a conscientização sobre a resistência antimicrobiana global e o incentivo para as melhores práticas entre o público em geral, profissionais de saúde e formuladores de políticas para evitar ou atenuar o surgimento e a propagação de infecções resistentes a medicamentos. Esta iniciativa faz parte de um plano de ação global para enfrentar o problema crescente de resistência a antibióticos e outros medicamentos antimicrobianos, o qual foi endossado na Sexagésima Oitava Assembleia Mundial da Saúde em maio de 2015, em resposta a estatísticas pouco encorajadoras e preocupantes. Estimativas da Comissão Europeia apontaram que os patógenos multirresistentes sejam responsáveis por 25 mil mortes por ano na União

Europeia (UE) e 700 mil mortes por ano em todo o mundo (EC, 2017). Estima-se ainda que esse número possa chegar a 10 milhões até 2050 se nenhuma ação for tomada (O'NEILL, 2016). Em relação aos custos ligados aos patógenos resistentes, é estimado que apenas na UE seja de 1,5 bilhões de euros por ano, incluindo gastos com saúde e perdas de produtividade. Em nível global, calcula-se que a resistência bacteriana poderá acarretar um custo cumulativo para a produção econômica global de 100 trilhões de dólares até 2050 (O'NEILL, 2016; EC, 2017). Visto isso, diversas medidas começaram a ser tomadas em diversos países com o intuito de conter a disseminação das bactérias multirresistentes. Por exemplo, na UE a utilização de antibióticos na pecuária como promotor de crescimento está proibida desde 2006 (EUROPEAN UNION, 2003). Recentemente, no Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimentos (MAPA) proibiu a importação, a fabricação, a comercialização e o uso de antibióticos importantes na medicina humana (tilosina, lincomicina e tiamulina) como promotores de crescimento em animais de produção (BRASIL, 2020). Na Bélgica foi fundado, em 2012, o Centro Belga de Especialização em Consumo e Resistência Antimicrobiana em Animais (AMCRA), cujo principal objetivo era reduzir em 50% o consumo de antibióticos em medicina veterinária até 2020 (DAESELEIRE *et al.*, 2016). Desta forma, com o intuito de não caminhar na contramão dos demais âmbitos da pecuária, é de extrema importância o desenvolvimento de alternativas ao uso de antibióticos na Reprodução Animal. Uma técnica que vêm despertando o interesse de diversos pesquisadores e profissionais da área de medicina veterinária, medicina humana, dermatologia e odontologia é a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT).

Patógenos	Sinais clínicos		Referências
	Aves	Humanos	
<b>Salmonella paratifóide</b>	<i>S. Enteritidis</i>	Morbidade e mortalidade podem ser altas durante as primeiras 2 semanas de vida, com perda de peso corporal ou retardo de crescimento, mas sinais de doença são raros em aves adultas.	Geralmente apresenta-se como uma gastroenterite autolimitante, todavia algumas cepas invasivas podem acessar a corrente sanguínea e causar quadros septicêmicos graves, com risco de óbito em adultos e crianças.
	<i>S. Typhimurium</i>		
	<i>S. Infantis</i>		
	<i>S. Newport</i>		
<b>Campylobacter spp.</b>	<i>C. jejuni</i>	Flora normal do trato intestinal, produzem mínima ou nenhuma doença em aves. Embora ambos já foram encontrados em casos de hepatite vibrionica em poedeiras e avestruzes, trabalhos afirmam que o <i>Campylobacter</i> sozinho não é capaz de provocar a doença.	Diarreia aquosa e/ou sanguinolenta autolimitante, cólicas abdominais e possível febre. A infecção por <i>Campylobacter</i> também está associada à síndrome de Guillain-Barre, uma doença autoimune pós-infecciosa caracterizada por paralisia neuromuscular aguda e progressiva.
	<i>C. coli</i>		
<b>Mycoplasma spp.</b>	<i>M. gallisepticum</i>	Em galos os sintomas mais frequentes são secreção nasal, tosse, estertores traqueais, redução no consumo de ração, perda de peso, redução na produção de ovos e queratoconjuntivite. Perus são mais suscetíveis e comumente desenvolvem sinais clínicos mais graves, incluindo sinusite, dificuldade respiratória, apatia, diminuição do consumo de ração e perda de peso.	Patógeno exclusivo de aves, sem importância na medicina humana.

GAST, 2013; JAJERE, 2019.

SHANE, 1992; ZHANG; SAHIN, 2013; WIECZOREK; WOLKOWIKZ; OSEK, 2018.

Continuação abaixo



<i>Clostridium spp.</i>	<i>C. colinum</i>	Causador da enterite ulcerativa (EU) das aves. Codornas costumam apresentar fezes brancas e aquosas. Conforme a EU avança, pássaros infectados tornam-se apáticos e corcovados, com olhos parcialmente fechados e penas opacas e arrepiadas. Um notável emagrecimento, com atrofia do músculo peitoral é observado em aves infectadas há uma semana ou mais. A mortalidade pode chegar a 100% em codornas jovens e 2 a 10% em galos.	Patógenos exclusivos de aves, sem importância na medicina humana.	
	<i>C. botulinum</i>	Causador do botulismo das aves. Os sinais clínicos em galinhas, perus, faisões e patos são semelhantes, envolvendo paralisia flácida de pernas, asas, pescoço e pálpebra, penas eriçadas, diarreia com excesso de flocos de urato e dispneia. As altas taxas de mortalidade resultam da insuficiência cardíaca e respiratória.	As infecções humanas com toxinas do botulismo aviário tipo C são pouco relatadas e documentadas, portanto a importância para a saúde pública é considerada mínima.	IMMERSEEL <i>et al.</i> , 2010; LOGUE, 2013; MWANGI <i>et al.</i> , 2019.
	<i>C. septicum</i>	Causador de dermatite gangrenosa em galos e perus. Os sintomas incluem depressão, incoordenação, inapetência, fraqueza nas pernas, ataxia e febre alta.	A importância para a saúde pública é considerada mínima, pois quase todas as aves afetadas sucumbem rapidamente à infecção e não chegam à idade de processamento.	
	<i>C. perfringens</i>	Causador da enterite necrótica das aves. A infecção clínica é caracterizada por início súbito, alta mortalidade e necrose da membrana mucosa do intestino delgado. A doença também é conhecida como enterite clostridial ou enterotoxemia.	Produtor de enterotoxinas que podem causar diarreia e enterite necrótica em humanos.	

Tabela 1: Comparação entre os sinais clínicos em aves e humanos associados às principais bactérias relatadas em sêmen de aves domésticas e de relevância na avicultura industrial.

### 2.3 TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA

A terapia fotodinâmica (PDT) é uma abordagem terapêutica que associa um composto químico reativo à luz, conhecido como fotossensibilizador, uma fonte de luz visível e não ionizante e o oxigênio molecular, com o objetivo de produzir espécies reativas de oxigênio (EROS) e levar as células alvo à morte por estresse oxidativo (HUANG *et al.*, 2012; HAMBLIN, 2016). A PDT não é uma técnica recente, existem relatos em documentos antigos (papiros e livros sagrados) comprovando que desde os primórdios, no antigo Egito, na China e na Índia, as civilizações utilizavam substâncias vegetais reativas à luz para o tratamento de doenças de pele como psoríase, vitiligo ou câncer (WYSS, 2000; WEIS *et al.*, 2012). O primeiro relato científico da PDT com o propósito de inativação microbiana ocorreu há mais de um século, quando Oscar Raab, um estudante de Medicina da Faculdade de Munique, e seu orientador Herman Von Tappeiner, descobriram acidentalmente uma alta taxa de mortalidade de protozoários ao expor à luz solar uma cultura de paramécios associada a um corante denominado acridina (RAAB, 1900). Nos anos seguintes, Von Tappeiner cunhou o termo “ação fotodinâmica” e atestou que a presença de oxigênio é essencial para o efeito antimicrobiano da terapia (TAPPEINER, 1909). Apesar da ação comprovada da PDT contra diferentes espécies de microrganismos, durante muitos anos a mesma foi utilizada e aprimorada apenas com o propósito antitumoral, sendo a principal explicação para isso a descoberta da penicilina em 1928, por Alexander Fleming, a qual foi utilizada intensivamente para o tratamento das condições infecciosas (LOBANOVSKA; PILLA, 2017).

Todavia, os primeiros sinais de resistência às penicilinas tornaram-se aparentes logo após a sua descoberta, através de relatos *in vitro* de cepas de *Escherichia coli* capazes de produzir a enzima penicilinase (ABRAHAM; CHAIN, 1940). Em 1942, a disseminação da resistência às penicilinas tornou-se uma realidade, quando quatro cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes foram encontradas em pacientes hospitalizados (RAMMELKAMP; MAXON, 1942). Nos anos seguintes, as proporções de infecções causadas por *S. aureus* resistentes expandiram rapidamente, sendo que no final da década de 60, mais de 80% das cepas isoladas de comunidades e hospitais apresentavam resistência às penicilinas (LOWY, 2003). Esta alta aquisição de resistência às penicilinas da primeira geração associada ao desenvolvimento, por Theodore Maiman, dos primeiros dispositivos Lasers (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) na década de 60 (SPYROPOULOS, 2011), facilitou e estimulou a aplicação da PDT não apenas

com o propósito antitumoral, mas também com a finalidade de inativar microrganismos. Foi então que, em 1960, foi introduzido pela primeira vez o termo Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT – GHORBANI *et al.*, 2018) e, a partir de então, uma série de pesquisas vêm sendo realizadas, fazendo uso de diferentes fotossensibilizadores e fontes de luz, com o intuito de adequar a aPDT como uma alternativa à antibioticoterapia em diferentes âmbitos da saúde, inclusive na Medicina veterinária (HAMBLIN, 2016; SELLERA; NASCIMENTO; RIBEIRO, 2016; CIEPLIK *et al.*, 2018).

As principais vantagens da aPDT em relação aos antibióticos incluem: pouca seletividade quando comparada aos antibióticos, uma vez que os fotossensibilizadores podem atuar em diversos grupos de microrganismos, como bactérias, vírus, protozoários e fungos (HAMBLIN, 2016; GHORBANI *et al.*, 2018); eficaz inclusive na inativação de bactérias que carregam genes de resistência a antimicrobianos (SABINO *et al.*, 2020); diversos trabalhos comprovam que devido ao seu mecanismo de ação, os microrganismos não desenvolvem resistência à técnica mesmo após inúmeras repetições da terapia (GIULIANI *et al.*, 2010; MAISCH, 2015); e efeitos adversos e danos ao tecido do hospedeiro são observados com menor frequência e intensidade (GHORBANI *et al.*, 2018). No entanto, é importante ressaltar que a eficácia da aPDT é considerada multifatorial, variando de acordo com a estrutura do microrganismo alvo (NITZAN *et al.*, 1992; HUANG *et al.*, 2012), das características do tecido circundante (quantidade de proteína, sangue, lipídeos...) (DAI; HUANG; HAMBLIN, 2009), com as propriedades físico-químicas da substância fotossensibilizadora utilizada (GHORBANI *et al.*, 2018), bem como dos parâmetros de pré-irradiação (FURTADO *et al.*, 2020) e da dosimetria da luz (potência, energia e tempo de irradiação) empregada (KIM; DARAFSHEH, 2020), o que explica a variedade de resultados encontrados na literatura. A seguir, nos próximos tópicos, serão discutidos o mecanismo de ação da aPDT e as propriedades do azul de metileno como fotossensibilizador.

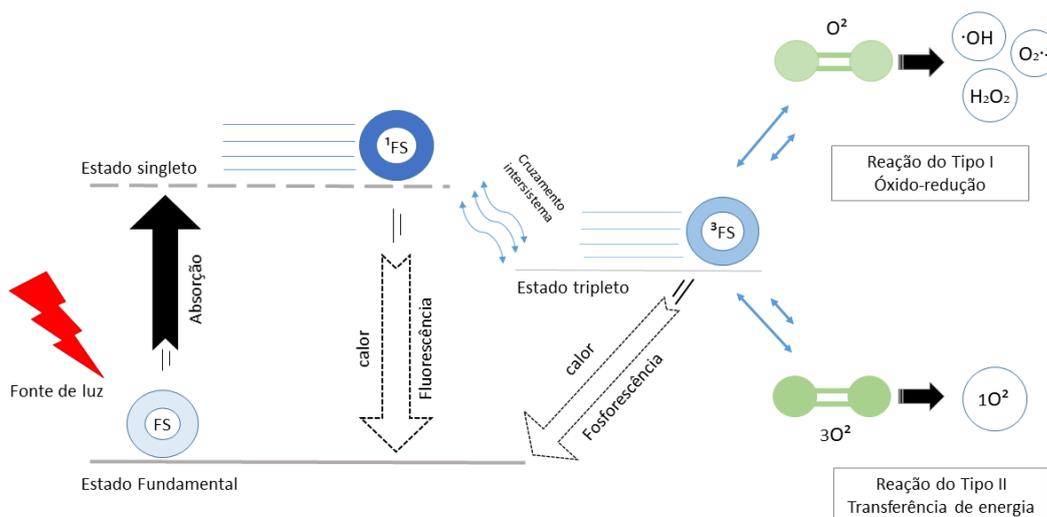
### 2.3.1 Mecanismo de ação da aPDT

O mecanismo de ação da PDT ocorre quando o fotossensibilizador absorve os fótons de uma fonte de luz com comprimento de onda ressonante à sua banda de absorção e seus elétrons passam a um estado excitado, denominado singlete. O estado singlete é altamente reativo e, portanto, tem uma meia vida muito curta, podendo ou retornar ao estado fundamental por meio de perda de energia na forma de fluorescência ou calor (conversão

interna), ou interagir com o substrato ao seu redor no que chamamos de cruzamentos intersistemas, levando a molécula a um estado tripleto metaestável e de meia vida mais longa. A energia no estado tripleto pode ser dissipada pelo processo de fosforescência ou calor (conversão interna), fazendo a molécula retornar para seu estado fundamental, ou dar origem a dois tipos de reações, conforme esquematizado no diagrama de Jablonski modificado na figura 11 (HUANG *et al.*, 2012; HAMBLIN, 2016).

Na reação do tipo I, o fotossensibilizador no estado tripleto reage com biomoléculas e com o oxigênio presente ao seu redor, através de reações de óxido-redução (transferência de elétrons), que culminarão na formação das EROS: ânion superóxido, peróxidos e radical hidroxila. Na reação do tipo II o fotossensibilizador no estado tripleto transfere energia diretamente para o oxigênio molecular, dando origem ao oxigênio singleto. Os dois tipos de reação podem ocorrer concomitantemente e, a razão entre as reações e, portanto, entre os produtos formados é influenciada pelas características do fotossensibilizador, pela concentração de oxigênio e pelos substratos intracelulares (HUANG *et al.*, 2012). Apesar do oxigênio singleto ser a principal espécie desejada durante a aPDT, ambos os radicais formados são capazes de acarretar danos a praticamente todas as biomoléculas presentes em células eucarióticas e procarióticas (proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos...), resultando em morte microbiana (GHORBANI *et al.*, 2018), conforme esquematizado na figura 12. Essa propriedade do mecanismo de ação da aPDT, de apresentar múltiplos alvos, é uma das principais explicações para a não aquisição de resistência contra a terapia pelos microrganismos (SABINO *et al.*, 2020).

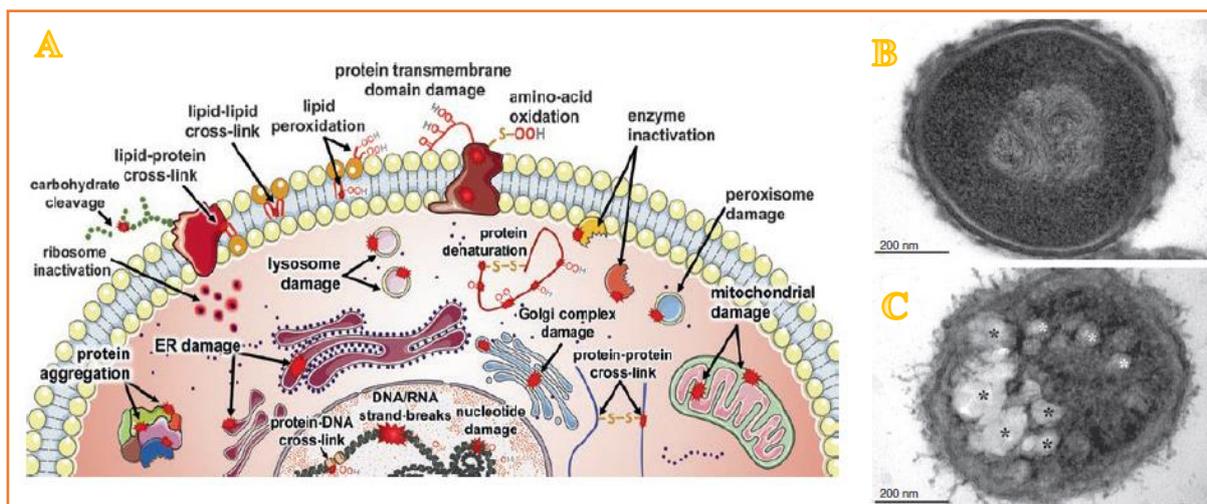
Figura 11 - Mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica (diagrama de Jablonski modificado)



Fonte: Modificado de GHORBANI *et al.*, 2018.

Legenda: Quando a energia (fóton) da luz é absorvida pela molécula do fotossensibilizador no estado fundamental (FS), esta passa para um estado altamente energético denominado estado singlete ( $^1\text{FS}$ ). O estado singlete é altamente reativo e possui meia vida muito curta, podendo perder a energia de forma radioativa (fluorescência) ou não radioativa (conversão interna), voltando para o estado fundamental. A molécula no estado singlete pode também realizar um processo conhecido como cruzamento intersistema, o qual envolve a inversão do spin de seus elétrons de alta energia, levando a molécula a um estado ligeiramente menos excitado e de meia vida mais longa chamado estado tripleto ( $^3\text{FS}$ ). Neste estado a molécula pode novamente perder energia de forma radioativa (fosforescência) ou não (conversão interna), voltando para o estado fundamental ou, na presença de oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ), as espécies reativas ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e radical hidroxila ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) podem ser formadas na reação do tipo I, ou o oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) pode ser formado na reação do tipo II.

Figura 12 - Danos intracelulares ocasionados pela Terapia Fotodinâmica



Fonte: (SABINO; HAMBLIN, 2016).

Legenda: (A) Impactos da Terapia Fotodinâmica sobre as biomoléculas e organelas presentes nas células eucarióticas; (B-C) Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de seções transversais de uma bactéria Gram-negativa (*Klebsiella pneumoniae*) antes (B) e depois (C) de exposição à PDT mediada por azul de metileno. As regiões claras indicadas por asterisco (\*) representam grandes agregados de proteínas formados por intensa oxidação imposta pela PDT.

#### 2.4.1 Terapia Fotodinâmica com Fenotiazinas

Para um composto ser considerado ideal como fotossensibilizador na aPDT precisa apresentar baixa ou nenhuma toxicidade no escuro, ou seja, antes da exposição à luz, uma alta absorção de energia em comprimentos de onda no espectro visível e infra-vermelho próximo, um bom rendimento quântico na formação de EROS, deve mostrar maior seletividade às células microbianas em relação às células do hospedeiro em curtos períodos de incubação, apresentar carga catiônica (positiva) e, além disso, deve ser puro, hidrossolúvel, facilmente sintetizado e ser rapidamente eliminado pelo organismo do hospedeiro (SHARMA *et al.*, 2012; HAMBLIN, 2016; GHORBANI *et al.*, 2018). Dentre as moléculas fotossensibilizadoras, com certeza as fenotiazinas como o Azul de Toluidina (AT) e o Azul de Metileno (AM) são as mais estudadas na aPDT, uma vez que apresentam alta absorção dos fótons no espectro da janela-terapêutica (550 a 700 nm), possuem carga elétrica positiva, tendem a se ligar e interagir com bactérias gram-positivas e gram-negativas com alta afinidade e diversos estudos demonstram que as doses necessárias para a morte bacteriana são menores que as doses causadoras de danos às células dos hospedeiros, tais como fibroblastos, queratinócitos e neutrófilos (SOUKOS *et al.*, 1996; HADDAD *et al.*, 1999; TARDIVO, 2005; TANAKA *et al.*, 2012; GHORBANI *et al.*, 2018).

Os compostos catiônicos (carga elétrica positiva), como as fenotiazinas, agem desorganizando e enfraquecendo a membrana celular, tornando-as mais permeáveis e facilitando o acesso para o meio intracelular (promoção da “auto-captação”), conforme demonstrado no trabalho de George e colaboradores utilizando como modelo de estudo as bactérias *Enterococcus faecalis* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (GEORGE; HAMBLIN; KISHEN, 2009). Como as espécies formadas durante a aPDT são extremamente reativas e possuem uma meia vida muito curta, o local em que estas são formadas torna-se fundamental para a eficácia da terapia, e nesse sentido, os FS catiônicos, os quais se ligam e permeiam a membrana celular são mais eficazes que os compostos aniônicos (MINNOCK *et al.*, 2000; HAMBLIN, 2016). Uma gama de estudos vem comprovando que a aPDT utilizando o AM como fotossensibilizador é eficaz na eliminação tanto de bactérias gram-positivas quanto bactérias gram-negativas, inclusive as mais prevalentes na avicultura industrial e causadoras de DTAs em humanos. Peli *et al.* (2008) relatam uma redução de mais de 93.05%, 93.7% e 93.33% no crescimento de colônias de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*,

respectivamente, ao submeter os patógenos a diferentes concentrações de AM e um diodo emissor de luz vermelha (LED – 663 nm). Tanaka *et al.* (2012) associaram 100 uM de AM e 20 J/cm<sup>2</sup> de uma fonte de luz vermelha (665 nm), e observaram eficácia na inativação do patógeno *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina e, ao mesmo tempo, mais de 80% dos neutrófilos suspensos nas amostras mantiveram-se viáveis. Sabino *et al.* (2020), por sua vez, investigaram a eficácia da aPDT utilizando a associação de AM (100µM) e luz vermelha (660 nm – 100mW/cm<sup>2</sup>) contra patógenos de importância global na saúde pública, os quais conhecidamente apresentavam resistência a mais de 50 antimicrobianos testados. Os autores obtiveram com as irradiações uma redução superior a 5 log<sub>10</sub> em menos de 75 seg. de exposição à luz para *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*, e em menos de 7 min. para *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. Todavia, apesar da eficácia antimicrobiana da PDT comprovada em variadas condições *in vitro* e em ensaios clínicos *in vivo* (p.e. pele, mucosa oral, sangue, etc.), apenas um artigo na literatura avalia a eficácia dessa tecnologia sobre aspectos seminais (EAGLESOME *et al.*, 1994). Os referidos autores avaliaram a eficiência da aPDT com derivados de porfirina para a descontaminação de determinados patógenos presentes no sêmen de touros, entretanto, nas condições experimentais utilizadas, não obtiveram os resultados esperados, todavia ressaltaram a relevância do aperfeiçoamento da técnica e da elaboração de novos protocolos. Desta forma, no presente estudo, investigamos a associação do fotossensibilizador AM, em diferentes concentrações e tempos de pré-incubação, e uma fonte de luz vermelha (660 nm), com variadas irradiâncias (mW/cm<sup>2</sup>) e doses (J/cm<sup>2</sup>), quanto aos seus efeitos sobre os espermatozoides e coliformes presentes no plasma seminal de galos domésticos. Os resultados obtidos estão apresentados no capítulo 2, a seguir, em formato de artigo científico.

## REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M. The livestock reservoir for antimicrobial resistance: a personal view on changing patterns of risks, effects of interventions and the way forward. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1670, p. 20140085, 2015.

ABEBE, E.; GUGSA, G.; AHMED, M. Review on major food-borne zoonotic bacterial pathogens. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2020, 2020.

ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**, v. 146, n. 3713, p. 837-837, 1940.

AGERSØ, Y., JENSEN, J. D.; HASMAN, H.; PEDERSEN, K. Spread of extended spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* clones and plasmids from parent animals to broilers and to broiler meat in a production without use of cephalosporins. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 11, n. 9, p.740-746, 2014.

ALEXANDRATOS, N.; BRUINSMA, J. World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision. **ESA Working paper**, n. 12-03, Rome, FAO, 2012.

ALTHOUSE, G. C. Sanitary procedures for the production of extended semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 374-378, 2008.

ARSI, K.; DONOGHUE, D. J.; VENKITANARAYANAN, K.; DONOGHUE, A. M. Reducing Foodborne Pathogens in Organic Poultry: Challenges and Opportunities. In: VENKITANARAYANAN, K.; THAKUR, S.; RICKE, S. **Food Safety in Poultry Meat Production. Food Microbiology and Food Safety**. Switzerland: Springer Nature, 2019. p. 25-46.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). **Relatório Anual 2020**. São Paulo: Associação Brasileira de Proteína Animal, 2020. p. 92-107. Disponível em: [https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa\\_relatorio\\_anual\\_2020\\_portugues\\_web.pdf](https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa_relatorio_anual_2020_portugues_web.pdf).

BAKER, R. C.; GOFF, J. P.; TIMONEY, J. F. Prevalence of *Salmonellae* on eggs from poultry farms in New York State. **Poultry Science**, v. 59, n. 2, p. 289-292, 1980.

BAKST, M. R.; DONOGHUE, A. M.; YOHO, D. E.; MOYLE, J. R.; WHIPPLE, S. M.; CAMP, M. J.; LIU, G. Q.; BRAMWELL, R. K. Comparisons of sperm storage tubule distribution and number in 4 strains of mature broiler breeders and in turkey hens before and after the onset of photostimulation. **Poultry Science**, v. 89, p. 986–992, 2010.

BENNANI, H.; MATEUS, A.; MAYS, N.; EASTMURE, E.; STÄRK, K. D.; HÄSLER, B. Overview of evidence of antimicrobial use and antimicrobial resistance in the food chain. **Antibiotics**, v. 9, n. 2, p. 49, 2020.

BENOFF, F. H.; ROWE, K.; FUGUAY, J. I.; RENDEN, J. A.; SCOTT, A. R. Effect of sêmen collector on semen volume and sperm concentration in broiler breeder males. **Poultry Science**, v. 60, p. 1062-1065, 1981.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. **Manual Integrado de Vigilância, Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. p. 35-39.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil** Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2018. p. 06-12.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretária de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n. 1 de 13 de janeiro de 2020. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 23 jan. 2020. Seção 1, p. 6.

BRILLARD, J. P.; BAKST, M. R. Quantification of spermatozoa in the sperm-storage tubules of turkey hens and the relation to sperm numbers in the perivitelline layer of eggs. **Biology of Reproduction**, v. 43, n. 2, p. 271-275, 1990.

BRILLARD, J. P. Sperm storage and transport following natural mating and artificial insemination. **Poultry Science**, v. 72, p. 923-928, 1993.

BRILLARD, J. P. Practical aspects of fertility in poultry. **World's Poultry Science Journal**, v. 59, n. 4, p. 441-446, 2003.

BURKE, W. H.; OGASAWARA, F. X. Presence of spermatozoa in uterovaginal fluids of the hen at various stages of the ovulatory cycle. **Poultry Science**, v. 48, p. 408-413, 1969.

BURROWS, W. H.; QUINN, J. P. Artificial insemination of chicken and turkeys. **Poultry Science**, v. 14, p. 251-254, 1937a.

BURROWS, W. H.; QUINN, J. P. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. **Poultry Science**, v. 16, n. 1, p. 19-24, 1937b.

CASTANON, J. I. R. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. **Poultry Science**, v. 86, n. 11, p. 2466-2471, 2007.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Food Safety: Foodborne Germs and Illnesses**, 2015. Disponível em: <https://www.cdc.gov/foodsafety/foodborne-germs.html>. Acesso em: 24/04/2021.

CHANTZIARAS, I.; BOYEN, F.; CALLENS, B.; DEWULF, J. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 3, p. 827-834, 2014.

CHELMONSKA, B.; JERYSZ, A.; LUKASZEWICZ, E.; KOWALCZYK, A.; MALECKI, I. Semen collection from Japanese quail (*Coturnix japonica*) using a teaser female. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 32, n. 1, p. 19-24, 2008.

CHRISTENSEN, V. L.; JOHNSTON, N. P. Effect of time of day of insemination and the position of the egg in the oviduct on the fertility of turkeys. **Poultry Science**, v. 56, n. 2, p. 458-462, 1977.

CHRISTENSEN, H.; BACHMEIER, J.; BISGAARD, M. New strategies to prevent and control avian pathogenic Escherichia coli (APEC). **Avian Pathology**, p. 1-30, 2020.

CIEPLIK, F.; DENG, D.; CRIELAARD, W.; BUCHALLA, W.; HELLWIG, E.; AL-AHMAD, A.; MAISCH, T. Antimicrobial photodynamic therapy—what we know and what we don't. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 571-589, 2018.

COOPER, D. M. Artificial insemination. In: Gordon, R.F. **Poultry Disease**, London: Bailliere Tindall, 1977. p. 302-307.

COX, N.; STERN, N.; WILSON, J.; MUSGROVE, M.; BUHR, R.; HIETT, K. Isolation of Campylobacter spp. from semen samples of commercial broiler breeder roosters. **Avian Diseases**, v. 46, n. 3, p. 717-720, 2002.

DAESELEIRE, E.; DE GRAEF, E.; RASSCHAERT, G.; DE MULDER, T.; VAN DEN MEERSCH, T.; VAN COILLIE, E.; DEWULF, J.; HEYNDRICKX, M. Antibiotic use and resistance in animals: Belgian initiatives. **Drug testing and analysis**, v. 8, n. 5-6, p. 549-555, 2016.

DAI, T.; HUANG, Y. Y.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for localized infections—state of the art. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 6, n. 3-4, p. 170-188, 2009.

DONOGHUE, A. M. Prospective approaches to avoid flock fertility problems: predictive assessment of sperm function traits in poultry. **Poultry Science**, v. 78, n. 3, p. 437-443, 1999.

DONOGHUE, A. M.; BLORE, P. J.; COLE, K.; LOSKUTOFF, N. M.; DONOGHUE, D. J. Detection of Campylobacter or Salmonella in turkey semen and the ability of poultry semen extenders to reduce their concentrations. **Poultry Science**, v. 83, n. 10, p. 1728-1733, 2004.

DOUARD, V.; HERMIER, D.; LABBE, C.; MAGISTRINI, M.; BLESBOIS, E. Role of seminal plasma in damage to turkey spermatozoa during in vitro storage. **Theriogenology**, v. 63, n. 1, p. 126-137, 2005.

DHAMA, K.; SINGH, R.; KARTHIK, K.; CHAKRABORTY, S.; TIWARI, R.; WANI, M.; MOHAN, J. Artificial insemination in poultry and possible transmission of infectious pathogens: A review. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, n. 4, p. 211-228, 2014.

EAGLESOME, M.; BIELANSKI, A.; HARE, W.; RUHNKE, H. Studies on inactivation of pathogenic microorganisms in culture media and in bovine semen by photosensitive agents. **Veterinary Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 277-284, 1994.

EUROPEAN COMMISSION (EC). **A European One Health Action Plan Against Antimicrobial Resistance (AMR)**. Brussels: European Commission, 2017. p. 2-3. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:52017DC0339&from=EN>. Acesso em: 16/03/2021.

EUROPEAN UNION. The European Parliament and the Council of the European Union. Regulation (EC) n. 1831 of 22 September 2003. **Official Journal of the European Union**, v. 50, p. 29-43, 18 October 2003.

FERGUNSON-NOEL, N. Mycoplasmosis. In: SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**. 13 ed. Nova Jersey: Wiley-Blackwell, 2013. p. 875-941.

FISCHER, D.; NEUMANN, D.; PURCHASE, C.; BOUTS, T.; MEINECKE-TILLMANN, S.; WEHREND, A.; LIERZ, M. The use of semen evaluation and assisted reproduction in Spix's macaws in terms of species conservation. **Zoo biology**, v. 33, n. 3, p. 234-244, 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAOSTAT). **FAO Statistical Database**, 2021. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/CL>. Acesso em: 23/04/2021.

FREDIANI, M. H.; GUIDA, F. J.; SALGADO, P. A.; GONÇALVES, D. R.; BLANK, M. H.; NOVAES, G. A.; PEREIRA, R. J. Semen collection by electro-stimulation in a variety of bird orders. **Theriogenology**, v. 125, p. 140-151, 2019.

GALE, C.; BROWN, K. I. The identification of bacteria contaminating collected semen and the use of antibiotics in their control. **Poultry Science**, v. 40, n. 1, p. 50-55, 1961.

GAST, R. K. Paratyphoid Infections. In: SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**. 13 ed. Nova Jersey: Wiley-Blackwell, 2013. p. 693-706.

GEORGE, S.; HAMBLIN, M. R.; KISHEN, A. Uptake pathways of anionic and cationic photosensitizers into bacteria. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 8, n. 6, p. 788-795, 2009.

GETACHEW, T. A Review Article of Artificial Insemination in Poultry. **World's Veterinary Journal**, v. 6, n. 1, p. 25-33, 2016.

GHOLAMIANDEHKORDI, A.; EECKHAUT, V.; LANCKRIET, A.; TIMBERMONT, L.; BJERRUM, L.; DUCATELLE, R.; HAESBROUCK, F.; VAN IMMERSEEL, F. Antimicrobial resistance in *Clostridium perfringens* isolates from broilers in Belgium. **Veterinary Research Communications**, v. 33, n. 8, p. 1031-1037, 2009.

GHORBANI, J.; RAHBAN, D.; AGHAMIRI, S.; TEYMOURI, A.; BAHADOR, A. Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: an overview. **Laser Therapy**, v. 27, n. 4, p. 293-302, 2018.

GIULIANI, F.; MARTINELLI, M.; COCCHI, A.; ARBIA, D.; FANTETTI, L.; RONCUCCI, G. In vitro resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn (II)

phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 637-642, 2010.

GVARYAHU, G.; ROBINZON, B.; MELTZER, A.; PEREK, M.; SNAPIR, N. An improved method for obtaining semen from Muscovy drakes and some of its quantitative and qualitative characteristics. **Poultry Science**, v. 63, n. 3, p. 548-553, 1984.

HABIBULLAH, M.; HASHEM, M. A.; RANA, M. S.; ISLAM, M. H. Effect of Artificial Insemination on different production parameter in Hubbard classic broiler parent stock. **Journal of the Bangladesh Agricultural University**, v. 13, n. 1, p. 71-77, 2015.

HADDAD, R.; KAPLAN, O.; BRAZOVSKI, E.; RABAU, M.; SCHNEEBAUM, S.; SHNAPER, A.; SKORNICK, Y.; KASHTAN, H. Effect of photodynamic therapy on normal fibroblasts and colon anastomotic healing in mice. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, v. 3, n. 6, p. 602-606, 1999.

HAINES, M. D.; PARKER, H. M.; MCDANIEL, C. D.; KIESS, A. S. Impact of 6 different intestinal bacteria on broiler breeder sperm motility in vitro. **Poultry Science**, v. 92, n. 8, p. 2174-2181, 2013.

HARGIS, B. M.; CALDWELL, D. J.; BYRD, J. A. Microbial pathogens: live poultry considerations. In: SAMS, A. R. **Poultry Meat Processing**. Florida: CRC Press LLC, 2001. p. 121-136.

HERNÁNDEZ-AVILÉS, C., LOVE, C. C., SERAFINI, R., RAMÍREZ-AGÁMEZ, L., KELLEY, D. E., DE ANDINO, E. M., TEAGUE, S. R.; LACAZE, K. A.; BRINSKO, S. P.; VARNER, D. D. Inclusion of supplemental antibiotics (amikacin–penicillin) in a commercial extender for stallion semen: Effects on sperm quality, bacterial growth, and fertility following cooled storage. **Theriogenology**, v. 158, p. 209-217, 2020.

HUANG, L.; XUAN, Y.; KOIDE, Y.; ZHIYENTAYEV, T.; TANAKA, M.; HAMBLIN, M. R. Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: an in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 44, n. 6, p. 490-499, 2012.

IAFFALDANO, N.; MANCHISI, A.; GAMBACORTA, M.; DI IORIO, M.; PINA ROSATO, M. Effect of different sperm concentrations on the post-thaw viability and motility of turkey spermatozoa cryopreserved by the pellet method. **Italian Journal of Animal Science**, v. 8, n. sup2, p. 760-762, 2009.

IMMERSEEL, F. V.; BUCK, J. D.; PASMANS, F.; HUYGHEBAERT, G.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Clostridium perfringens in poultry: an emerging threat for animal and public health. **Avian Pathology**, v. 33, n. 6, p. 537-549, 2004.

JAJERE, S. M. A review of Salmonella enterica with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. **Veterinary world**, v. 12, n. 4, p. 504, 2019.

KIM, Y. B.; YOON, M. Y.; HA, J. S.; SEO, K. W.; NOH, E. B.; SON, S. H.; LEE, Y. J. Molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* from broiler chickens with colibacillosis. **Poultry Science**, v. 99, n. 2, p. 1088-1095, 2020.

KIM, M. M.; DARAFSHEH, A. Light sources and dosimetry techniques for photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 96, n. 2, p. 280-294, 2020.

LAKE, P. E. Historical perspective of artificial insemination technology. In: BAKST, M. R.; WISHART, G. J. **Proc. 1st International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry**. Poultry Science Association, Savoy, Illinois, 1995. p. 1–20.

LIERZ, M.; REINSCHMIDT, M.; MÜLLER, H.; WINK, M.; NEUMANN, D. A novel method for semen collection and artificial insemination in large parrots (Psittaciformes). **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2013.

LOBANOVSKA, M.; PILLA, G. Focus: drug development: Penicillin's discovery and antibiotic resistance: lessons for the future?. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 90, n. 1, p. 135, 2017.

LOGUE, C. M. Clostridial Diseases. In: SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**. 13 ed. Nova Jersey: Wiley-Blackwell, 2013. p. 943-970.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 9, p. 1265-1273, 2003.

ŁUKASZEWICZ, E. Artificial insemination in geese. **World's Poultry Science Journal**, v. 66, n. 4, p. 647–658, 2010.

MAISCH, T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 14, n. 8, p. 1518-1526, 2015.

McGARR, C.; MITCHELL, W. R.; CARLSON, H. C.; FISH, N. A. An Epidemiological Study of Salmonellae in Broiler Chicken Production. **Canadian Journal of Public Health**, v. 71, n. 1, p. 47-57, 1980.

MIAN, Z.; NASIM, A.; SHAKOOR, A.; QURESHI, M. S. Effect of dilution of fowl semen with normal saline on the fertility of RIR hens through Artificial Insemination. **Pakistan Journal of Agriculture**, v. 11, n. 3, p. 201-204, 1990.

MINNOCK, A.; VERNON, D. I.; SCHOFIELD, J.; GRIFFITHS, J.; PARISH, J. H.; BROWN, S. B. Mechanism of Uptake of a Cationic Water-Soluble Pyridinium Zinc Phthalocyanine across the Outer Membrane of *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 3, p. 522-527, 2000.

MOHAN, J.; MOUDGAL, R. P.; SASTRY, K. V. H.; TYAGI, J.; SINGH, R. Effects of hemicastration and castration on foam production and its relationship with fertility in male Japanese quail. **Theriogenology**, v. 58, n. 1, p. 29-39, 2002.

MOHAN, J.; KHANDAY, J. M.; SINGH, R. P.; TYAGI, J. S. Effect of storage on the physico-biochemical characteristics and fertility guinea fowl semen. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 1, n. 2, p. 65-68, 2013.

MOHAN, J.; SHARMA, S. K.; KOLLURI, G.; SINGH, R. P.; TYAGI, J. S.; KATARIA, J. M. Semen quality characteristics and seasonality in different varieties of male Guinea fowl. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 4, n. 6, p. 320-326, 2016.

MOHAN, J.; SHARMA, S. K. Recent advances in poultry semen diluents. **Proceedings of 26<sup>th</sup> Annual Conference of Society of Animal Physiologists of India**, Bidar: India, 2017. p. 103-108.

MOHAN, J.; SHARMA, S. K.; KOLLURI, G.; DHAMA, K. History of artificial insemination in poultry, its components and significance. **World's Poultry Science Journal**, v. 74, n. 3, p. 475-488, 2018.

MORRELL, J. M.; WALLGREN, M. Control of bacterial contamination in boar semen doses. In: MENDEZ-VILAS, A. **Science and Technology against Microbial Pathogens**. Singapore: World Scientific Publishing Co., 2011. p. 303–308.

MORRELL, J. M.; WALLGREN, M. Alternatives to antibiotics in semen extenders: a review. **Pathogens**, v. 3, n. 4, p. 934-946. 2014.

MOTTET, A.; TEMPIO, G. Global poultry production: current state and future outlook and challenges. **World's Poultry Science Journal**, v. 73, n. 2, p. 245-256, 2017.

MWANGI, S.; TIMMONS, J.; FITZ-COY, S.; PARVEEN, S. Characterization of *Clostridium perfringens* recovered from broiler chicken affected by necrotic enteritis. **Poultry Science**, v. 98, n. 1, p. 128-135, 2019.

NEWELL, D. G.; FEARNLEY, CJAEM. Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 4343-4351, 2003.

NISHIYAMA, H.; NAKASHIMA, N.; FUJIHARA, N. Studies on the Accessory Reproductive Organs in the Drake: 1. Addition to Semen of the Fluid from the Ejaculatory Groove Region. **Poultry Science**, v. 55, n. 1, p. 234-242, 1976.

NITZAN, Y.; GUTTERMAN, M.; MALIK, Z.; EHRENBERG, B. Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. **Photochemistry and Photobiology**, v. 55, n. 1, p. 89-96, 1992.

NOLAN, L. K.; BARNES, H. J.; VAILLANCOURT, J. P.; ABDUL-AZIZ, T.; LOGUE, C. M. Colibacillosis. In: SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**. 13 ed. Nova Jersey: Wiley-Blackwell, 2013. p. 751-805.

O'NEILL, J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. **Review on Antimicrobial Resistance**, p. 1-16, 2016. Disponível em: [https://amr-review.org/sites/default/files/160525\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf).

PELOI, L. S.; SOARES, R. R.; BIONDO, C. E.; SOUZA, V. R.; HIOKA, N.; KIMURA, E. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. **Journal of Biosciences**, v. 33, n. 2, p. 231-237, 2008.

PEREIRA, R. J. G. Reprodução das Aves. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2014. Volume 2, p. 2259-2263.

POLLOCK, C. G.; OROSZ, S. E. Avian reproductive anatomy, physiology and endocrinology. **The veterinary clinics of North America. Exotic animal practice**, v. 5, n. 3, p. 441-474, 2002.

POWERS, J. H. Antimicrobial drug development—the past, the present, and the future. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, p. 23-31, 2004.

PRICE, L.B.; STEGGER, M.; HASMAN, H.; AZIZ, M.; LARSEN, J.; ANDERSEN, P. S.; PEARSON, T.; WATERS, A. E.; FOSTER, J. T.; SCHUPP, J.; GILLECE, J. Staphylococcus aureus CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. **MBio**, v. 3, n. 1, p. e00305-e00311, 2012.

RAAB, O. Uber die wirkung fluorescirender stoffe auf infusorien. **Z. biol.**, v. 39, p. 524-546, 1900.

RAMMELKAMP, C. H.; MAXON, T. Resistance of Staphylococcus aureus to the Action of Penicillin. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 51, n. 3, p. 386-389, 1942.

RANTA, J.; MAIJALA, R. A probabilistic transmission model of Salmonella in the primary broiler production chain. **Risk Analysis**, v. 22, n. 1, p. 47-58, 2002.

SABINO, C. P.; HAMBLIN, M. R. Cellular Damage. In: SELLERA, F. P.; NASCIMENTO, C. L.; RIBEIRO, M. S. **Photodynamic Therapy in Veterinary Medicine: From Basics to Clinical Practice**. Switzerland: Springer Nature, 2016. p. 57-72.

SABINO, C. P.; WAINWRIGHT, M.; RIBEIRO, M. S.; SELLERA, F. P.; DOS ANJOS, C.; DA SILVA BAPTISTA, M.; LINCOPAN, N. Global priority multidrug-resistant pathogens do not resist photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 208, p. 111893, 2020.

SAEKI, Y.; NAGOMI, Y. Seasonal differences in fertility and hatchability of eggs produced by the natural mating and artificial insemination methods of chickens. **The Japanese Journal of Animal Reproduction**, v. 10, p. 37-43, 1964.

SASANAMI, T.; MATSUZAKI, M.; MIZUSHIMA, S.; HIYAMA, G. Sperm storage in the female reproductive tract in birds. **Journal of Reproduction and Development**, v. 59, n. 4, p. 334-338, 2013.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R. M.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R. V.; WIDDOWSON, M. A.; ROY, S. L.; JONES, J. L.; GRIFFIN, P. M. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 7-15, 2011.

SCHULZE, M.; NITSCHKE-MELKUS, E.; HENSEL, B.; JUNG, M.; JAKOP, U. Antibiotics and their alternatives in Artificial Breeding in livestock. **Animal Reproduction Science**, p. 106284, 2020.

SELLERA, F. P.; NASCIMENTO, C. L.; RIBEIRO, M. S. Clinical Applications of Antimicrobial PDT. In: SELLERA, F. P.; NASCIMENTO, C. L.; RIBEIRO, M. S. **Photodynamic Therapy in Veterinary Medicine: From Basics to Clinical Practice**. Switzerland: Springer Nature, 2016. p. 169-196.

SEXTON, T. J. A new poultry semen extender: 1. Effect of extension on the fertility of chicken semen. **Poultry Science**, v. 56, n. 5, p. 1443-1446, 1977.

SEXTON, T. J.; JACOBS, L. A.; MCDANIEL, G. R. A New Poultry Semen Extender: 4. Effect of Antibacterials in Control of Bacterial Contamination in Chicken Semen. **Poultry Science**, v. 59, n. 2, p. 274-281, 1980.

SHANE, S. M. The significance of *Campylobacter jejuni* infection in poultry: a review. **Avian Pathology**, v. 21, n. 2, p. 189-213, 1992.

SHARMA, S. K.; MROZ, P.; DAI, T.; HUANG, Y. Y.; DENIS, T. G. S.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for cancer and for infections: what is the difference?. **Israel Journal of Chemistry**, v. 52, n. 8-9, p. 691-705, 2012.

SHIT, N.; SINGH, R. P.; SASTRY, K. V. H.; PANDEY, N. K.; MOHAN, J.; MOUDGAL, R. P. Development of artificial insemination technology in Japanese quail. **Indian Journal of Poultry Science**, v. 45, n. 1, p. 50-54, 2010.

SHOAIB, M. Mycoplasmosis in poultry, a perpetual problem. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2021, p. 1271-1275, 2021.

SINGH, B.; MAL, G.; GAUTAM, S. K.; MUKESH, M. Revolutionary Reproduction Biotechnologies in Livestock: An Overview. In: SINGH, B.; MAL, G.; GAUTAM, S. K.; MUKESH, M. **Advances in Animal Biotechnology**. 1. ed. Switzerland: Springer Nature, 2019. p. 83-96.

SMITH, A. U. The control of bacterial growth in fowl semen. **The Journal of Agricultural Science**, v. 39, n. 2, p. 194-200, 1949.

SMITH, T. C.; GEBREYES, W. A.; ABLEY, M. J.; HARPER, A. L.; FORSHEY, B. M.; MALE, M. J.; MARTIN, H. W.; MOLLA, B. Z.; SREEVATSAN, S.; THAKUR, S.; THIRUVENGADAM, M.; DAVIES, P. R. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs and farm workers on conventional and antibiotic-free swine farms in the USA. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63704, 2013.

SOUKOS, N. S.; WILSON, M.; BURNS, T.; SPEIGHT, P. M. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis*

evaluated in vitro. **Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery**, v. 18, n. 3, p. 253-259, 1996.

SPYROPOULOS, B. 50 years LASERS: in vitro diagnostics, clinical applications and perspectives. **Clinical Laboratory**, v. 57, n. 3-4, p. 131-142, 2011.

STIPKOVITS, L.; KEMPF, I. Mycoplasmoses in poultry. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 15, n. 4, p. 1495-1525, 1996.

TANAKA, M.; KINOSHITA, M.; YOSHIHARA, Y.; SHINOMIYA, N.; SEKI, S.; NEMOTO, K.; HIRAYAMA, T.; DAI, T.; HUANG, L.; HAMBLIN, M. R.; MORIMOTO, Y. Optimal photosensitizers for photodynamic therapy of infections should kill bacteria but spare neutrophils. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 1, p. 227-232, 2012.

TAPPEINER, H. V. Die photodynamische Erscheinung (Sensibilisierung durch fluoreszierende Stoffe). **Ergebnisse der Physiologie**, v. 8, n. 1, p. 698-741, 1909.

TARDIVO, J. P.; DEL GIGLIO, A.; DE OLIVEIRA, C. S.; GABRIELLI, D. S.; JUNQUEIRA, H. C.; TADA, D. B.; SEVERINO, D.; TURCHIELLO, R. F.; BAPTISTA, M. S. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 3, p. 175-191, 2005.

THIBIER, M.; GUERIN, B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1-3, p. 233-251, 2000.

THRELFALL, E. J. Epidemic Salmonella typhimurium DT 104—a truly international multiresistant clone. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 1, p. 7-10, 2000.

TRIPLETT, M.; PARKER, H.; MCDANIEL, C.; KIESS, A. Influence of 6 different intestinal bacteria on Beltsville Small White turkey semen. **Poultry science**, v. 95, n. 8, p. 1918-1926, 2016.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Poultry and Products Annual**. Brasilia: Global Agricultural Information Network, 2020. p. 01-06. Disponível em: [https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Poultry%20and%20Products%20Annual\\_Brasilia\\_Brazil\\_09-01-2019](https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Poultry%20and%20Products%20Annual_Brasilia_Brazil_09-01-2019)

UNITED NATIONS (UN). **World Population Prospects 2019: Highlights**. New York: United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division, 2019. p. 05-07. Disponível em: [https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019\\_Highlights.pdf](https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019_Highlights.pdf).

WEIS, S. A.; DEN BERGH, H. V.; GRIFFIOEN, A. W.; NOWAK-SLIWINSKA, P. Angiogenesis inhibition for the improvement of photodynamic therapy: the revival of a promising idea. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1826, n. 1, p. 53-70, 2012.

WILCOX, F. H.; SHORB, M. S. The effect of antibiotics on bacteria in semen and on motility and fertilizing ability of chicken spermatozoa. **American journal of veterinary research**, v. 19, n. 73, p. 945-949, 1958.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World Antimicrobial Awareness Week**, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/campaigns/world-antimicrobial-awareness-week/2020>. Acesso em: 23/03/2021.

WYSS, P. History of Photomedicine. In: WYSS, P.; TADIR, Y.; TROMBERG, B. J.; HALLER, U. **Photomedicine in gynecology and reproduction**. 2 ed. Switzerland: Karger Publishers, 2000. p. 4-11.

WIECZOREK, K.; WOŁKOWICZ, T.; OSEK, J. Antimicrobial resistance and virulence-associated traits of *Campylobacter jejuni* isolated from poultry food chain and humans with diarrhea. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1508, 2018.

ZHANG, Q.; SAHIN, O. Campylobacteriosis. In: SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**. 13 ed. Nova Jersey: Wiley-Blackwell, 2013. p. 737-751.

### 3. CAPÍTULO 2: EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM AZUL DE METILENO SOBRE OS ESPERMATOZOIDES E AS BACTÉRIAS PRESENTES NO PLASMA SEMINAL DE GALOS-DOMÉSTICOS

#### 3.1 INTRODUÇÃO

A adoção das biotécnicas reprodutivas na criação de animais domésticos representa um importante marco para o agronegócio global, uma vez que possibilitou uma maior produção de alimentos em um menor espaço demográfico e temporal (SINGH *et al.*, 2019; SCANES; BUTLER; KIDD, 2020). Neste sentido, a inseminação artificial (IA) é uma técnica que apresenta inúmeras vantagens, dentre elas a sua competência em intensificar o melhoramento genético, controlar doenças, possibilitar cruzamentos entre raças, racionalizar manejo reprodutivo, e permitir a obtenção de descendente de animais geneticamente superiores mesmo após seu falecimento, através da criopreservação do sêmen. Tendo em vista estes benefícios, a IA foi a primeira biotecnologia a ser amplamente empregada em animais domésticos (DONOGHUE; WISHART, 2000; DHAMA *et al.*, 2014). Na avicultura, o peru moderno é a espécie doméstica que mais utiliza a IA globalmente (100% das fêmeas alojadas), pois a seleção genética contínua para obter animais com peito robusto e musculatura avantajada resultou em indivíduos extremamente pesados e inaptos à cópula natural (DHAMA *et al.*, 2014; MOHAN *et al.*, 2018). Ainda que a IA venha proporcionando bons resultados aos criadores de perus (170 mil toneladas de carne produzidas em 2019 no Brasil, de acordo com a ABPA), a passagem do ejaculado pela cloaca durante a colheita seminal bem como a colheita das amostras em “pools” tornam a transmissão de microrganismos intestinais entre as matrizes um risco inerente à técnica de IA em aves, um limitante a maior disseminação desta biotécnica nas demais espécies de aves domésticas (HAINES *et al.*, 2013; DHAMA *et al.*, 2014).

Esta problemática torna-se particularmente inquietante sob o ponto de vista sanitário e epidemiológico se considerarmos a transmissão venérea de enfermidades expressivas na avicultura industrial tais como *Salmonella*, *Campylobacter* e *Mycoplasma* (REIBER; MCINROY; CONNER, 1995; COX *et al.*, 2002; TOMCZYK; MINTA, 2002; DONOGHUE *et al.*, 2004; VIZZIER-THAXTON *et al.*, 2006). Além disso, Haines *et al.* (2013) demonstraram que a presença de determinadas bactérias intestinais no plasma seminal de aves domésticas reduz significativamente a motilidade espermática. Na

tentativa de atenuar o risco de contaminação, diversos diluentes de sêmen disponíveis no mercado avícola exibem antibióticos em sua composição como, por exemplo, gentamicina e tilosina (ALTHOUSE, 2008). Contudo, o uso indiscriminado da antibioticoterapia representa uma das maiores ameaças à saúde pública, uma vez que contribui com a seleção e a propagação de microrganismos resistentes aos diferentes fármacos disponíveis atualmente na medicina humana (MATHEW; CISELL; LIAMTHONG, 2007; MARINHO, 2013). Desta forma, a procura por métodos alternativos para o controle de microrganismos no sêmen de aves domésticas sem a inclusão de antibióticos apresenta-se como um campo profícuo e aplicado para investigação científica.

Uma modalidade terapêutica que vem despertando o interesse de diversos pesquisadores é a Terapia Fotodinâmica (PDT), não só por seu potencial antimicrobiano (DAI; HUANG; HAMBLIN, 2009; NUÑEZ *et al.*, 2015; HAMBLIN, 2016; CIEPLIK *et al.*, 2018), mas também por sua ação antitumoral (SOUZA *et al.*, 2015; SETLIK; SILVA, 2016; TOSTI *et al.*, 2018). A técnica consiste na associação de uma substância fotossensibilizadora, uma fonte de luz visível e do oxigênio molecular, com o intuito de formar espécies reativas de oxigênio (EROS) e levar as células alvo à morte por estresse oxidativo (NUÑEZ *et al.*, 2015; HAMBLIN, 2016; SETLIK; SILVA, 2016). Em termos de terapêutica, o efeito fotodinâmico oferece dupla seletividade (luz e localização preferencial dos fármacos fotossensibilizadores nos microrganismos), funciona em organismos multirresistentes e não há relatos de indução de resistência devido ao seu mecanismo de ação (HAMBLIN, 2016; SABINO *et al.*, 2020).

Na Medicina Veterinária, o interesse pela PDT iniciou a partir de meados da década de 80, quando os autores Cheli *et al.* (1984) utilizaram a técnica para o tratamento de neoplasias superficiais de cães e gatos. A partir deste momento, a literatura sofreu uma notável ascensão e, atualmente, diversos autores afirmam que a PDT representa uma modalidade eficaz para o tratamento de diversas condições clínicas (AURELIANO *et al.*, 2014; NASCIMENTO *et al.*, 2015; SELLERA *et al.*, 2016). Além disso, estabelecidos a concentração e a classe do FS, o tempo de pré-irradiação e os parâmetros físicos da luz, a técnica se mostra eficaz na redução de uma ampla gama de microrganismos, tais como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, vírus e protozoários (PODBIELSKA *et al.*, 2006; PILEGGI *et al.*, 2013; AURELIANO *et al.*, 2014; NASCIMENTO *et al.*, 2015; SELLERA *et al.*, 2016).

Todavia, apesar dos esforços para compreender a interação da luz e dos fotossensibilizadores com os microrganismos cultivados *in vitro* ou em ensaios clínicos utilizando tecidos *ex vivo* (BEN-HUR *et al.*, 1995; MOHR *et al.*, 1997; SMIJS *et al.*, 2007; DAI; HUANG; HAMBLIN, 2009), somente um trabalho, publicado há mais de duas décadas, encontra-se disponível na literatura investigando os efeitos da PDT em amostras seminais (EAGLESOME *et al.*, 1994). Os autores relatam uma diferença na susceptibilidade dos patógenos quando irradiados isoladamente (meio de cultivo) e quando associados às amostras seminais de bovinos. Estes resultados indicam a existência de interação do fotossensibilizador e da luz com componentes presentes no sêmen que não os patógenos, o que reduziu a eficácia da terapia frente aos microrganismos. Apesar dos resultados antimicrobianos pouco satisfatórios, a irradiação das amostras associadas a derivados de porfirinas não condenou a motilidade progressiva e a integridade acrossomal dos espermatozoides. Os autores concluem o artigo ressaltando a relevância de pesquisas mais aprofundadas com o objetivo de tornar a PDT mais seletiva para os patógenos presentes no sêmen, enfatizando a importância da procura por novas classes de fotossensibilizadores. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar distintos protocolos de PDT, utilizando diferentes concentrações do fotossensibilizador AM e diferentes parâmetros físicos da luz (irradiância, dose e tempo de exposição), quanto aos seus impactos sobre os espermatozoides e coliformes presentes no plasma seminal de galos domésticos. Optamos pelo AM por ser um composto barato e acessível, duas características importantes na avicultura industrial, bem como por sua eficácia frente aos microrganismos, inclusive aqueles prevalentes na avicultura, ser amplamente comprovada em diversos estudos *in vitro* (WAINWRIGHT, 2005; FUMES *et al.*, 2018; GHORBANI *et al.*, 2018).

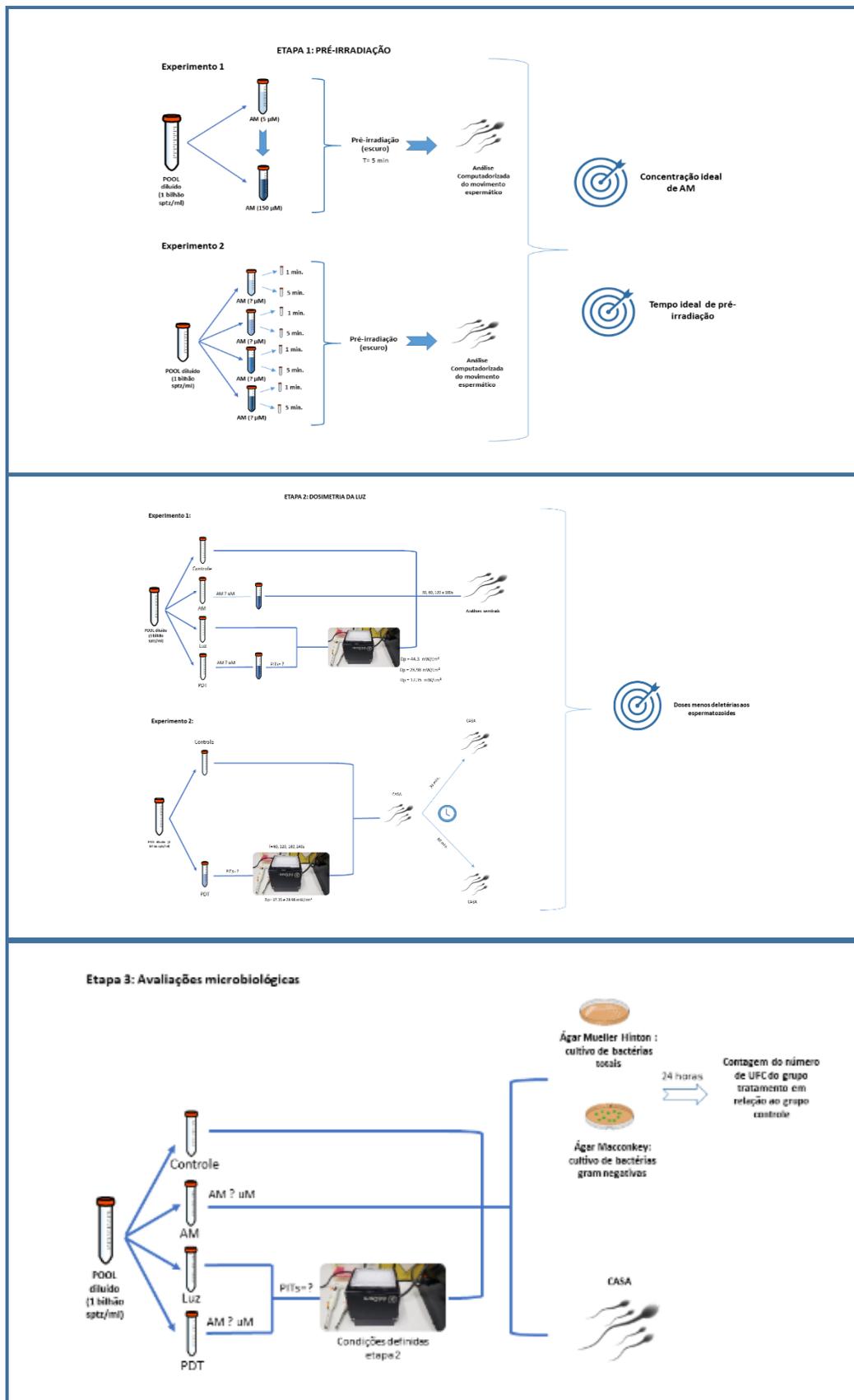
## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Delineamento Experimental

O presente estudo foi dividido em 3 principais etapas: pré-irradiação, dosimetria da luz e análises microbiológicas. Todos os procedimentos aqui realizados foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da FMVZ-USP (nº processo: 3579040418). No primeiro experimento da 1ª etapa, estabeleceu-se o grau toxicidade do AM sobre as células espermáticas de galos domésticos. Para isto um total

de 8 “pools”, contendo amostras seminais de 2 a 3 galos cada, foram incubados com diferentes concentrações do fotossensibilizador. Como as motilidades, total e progressiva, são os principais parâmetros diretamente relacionados com a fertilidade em aves, após 5 minutos de incubação com as diferentes concentrações de AM, foram avaliados os efeitos sobre as motilidades espermáticas através do equipamento CASA (Computer Assisted Sperm Analysis). Definida a faixa de concentração de AM menos tóxica aos espermatozoides, no segundo experimento avaliou-se o efeito do tempo de incubação (1 e 5 minutos) com estas concentrações sobre a cinética espermática, com o intuito de definir o tempo ideal de pré-irradiação a ser utilizado. Estabelecidos a concentração de AM e o tempo de pré-irradiação ideais, na 2ª etapa foram testados diferentes parâmetros físicos da radiação referentes à potência e à energia da fonte de luz, visando estabelecer aqueles menos impactantes à fisiologia espermática. Para isso, um total de 8 pools seminais foram divididos em 4 grupos: controle (sem AM, sem irradiação), AM (com AM, sem irradiação), Luz (sem AM, com irradiação) e PDT (com AM, com irradiação). Os grupos Luz e PDT foram irradiados através do equipamento Led Box 660 nm (luz vermelha) nos tempos de 30, 60, 120 e 180s nas irradiâncias de 44.3mW/cm<sup>2</sup>, de 28.98 mW/cm<sup>2</sup> e de 17.35 mW/cm<sup>2</sup>. O segundo experimento, por sua vez, teve como objetivo avaliar se os efeitos da PDT sobre os espermatozoides de galos, observado no experimento anterior, possuem um efeito residual e irreversível ou se ao longo do tempo as células espermáticas recuperam o seu padrão normal de movimento. Para tal, foram utilizadas as irradiâncias de 17.35 e 28.98 mW/cm<sup>2</sup> e os tempos de exposição à luz de 0 (controle), 60, 120, 180 e 240 segundos. Ao todo foram avaliados 6 pools de sêmen para cada irradiância. Definidos a concentração de AM e o tempo de pré-irradiação menos deletérios na 1ª etapa, e a dosimetria de luz ideal na 2ª etapa, a eficiência do protocolo estabelecido no que se refere à redução dos coliformes presentes no plasma seminal dos galos foi avaliado na 3ª etapa, através do cultivo bacteriológico das amostras nos meios Ágar Mueller Hinton (coliformes totais) e Ágar Macckonkey (bactérias gram-negativas), antes (controle e AM) e após o tratamento fotodinâmico (Luz e PDT). Foram utilizados 6 pools seminais em triplicata, totalizando 18 repetições nesta terceira etapa. O delineamento experimental deste trabalho está esquematizado na figura 13, a seguir.

Figura 13 - Delineamento experimental do estudo, evidenciando os experimentos realizados em cada etapa



### 3.2.2 Animais

Vinte galos da linhagem Dekalb White (33 semanas de idade), doados pela empresa Hendrix genetics Ltda., foram alojados em gaiolas individuais (25 x 45 x 44 cm) no Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ – USP). O fornecimento de água foi feito através de bebedouros do tipo nipple (*ad libitum*), enquanto que o arraçamento foi realizado 2 vezes ao dia. O fotoperíodo foi suplementado artificialmente usando-se lâmpadas fluorescentes a fim de se obter um total de 14 horas de luz e 8 horas de escuro, sem impedir que a luz natural ilumine o ambiente através de janelas laterais do aviário. Os animais foram coletados 2 vezes por semana 1 mês antes do começo do experimento, para condicionamento dos animais à técnica de colheita por massagem e análise macroscópica e microscópica do sêmen. Após o término do condicionamento, os animais que melhor responderam ao método de coleta seminal por massagem (sêmen com maior volume, maior concentração e livre de contaminantes) foram selecionados para compor o experimento.

### 3.2.3 Coleta e Processamento do Sêmen

Em todas as etapas do estudo, as amostras seminais foram coletadas por massagem digital de acordo com a técnica descrita por Burrows e Quinn (1937) e distribuídas em “pools”, contendo o sêmen de 2 a 3 galos. Após a coleta, as concentrações das amostras foram determinadas por espectrofotometria (Accuread photometer, IMV, França) e diluídas em meio Lake até uma concentração final de 1 bilhão de espermatozoides por mililitro. No primeiro experimento da 1ª etapa, cada pool (8 no total) foi subdividido em 10 alíquotas, cada uma contendo uma das concentrações de AM propostas (0, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100 e 150 uM). Após 5 minutos de incubação no escuro, as mesmas foram submetidas à análise computadorizada do movimento espermático (CASA). O AM utilizado neste e nos demais experimentos foi adquirido da marca Sigma-Aldrich e sua diluição, nas molaridades desejadas, foi realizada em meio Lake. No segundo experimento, 8 pools seminais foram incubados por 1 e 5 minutos, no escuro (caixa de isopor), com as concentrações de AM definidas no experimento anterior e, ao término de cada período de incubação, as amostras foram submetidas ao CASA para análise da cinética espermática. Na 2ª etapa deste projeto, os pools seminais foram subdivididos em 4 grupos, sendo 1 grupo controle (controle), e 3 grupos tratados (apenas AM, apenas Luz e PDT). Os grupos AM e controle não foram submetidos às irradiações, enquanto as amostras dos grupos Luz e PDT foram distribuídas em poços diferentes de uma placa de ensaio de 96 poços em volume final de 100 ul (Luz: 100 ul de amostra/ PDT: 90 ul de amostra + 10 ul de AM 100 uM), e submetidas à luz vermelha por 30, 60, 120 e 180s nas irradiâncias de 44.3, 28.98 e 17.35 mW/cm<sup>2</sup>. Imediatamente após o término de cada tempo de irradiação, os 4 grupos foram submetidos ao CASA, à análise de integridade de membrana plasmática através dos corantes Eosina/Nigrosina, à análise de integridade acrossomal pela coloração Fast-Green/ Rosa-Bengala (POPE) e análise da atividade mitocondrial pela técnica de 3’3 diaminobenzidina (DAB). No

segundo experimento, os pools foram subdivididos em 5 alíquotas, sendo uma controle e as demais submetidas à PDT por 60, 120, 180 e 240 segundos. Ao término de cada período de irradiação a cinética das amostras seminais foi avaliada através do CASA e as alíquotas foram imediatamente armazenadas em refrigerador (4–5°C), visto que conhecidamente espermatozoides de galos mantêm melhor suas características quando estocados em baixas temperaturas (CLARKE; SEXTON; OTTINGER, 1982; DUMPALA; PARKER; MCDANIEL, 2006), atenuando assim os efeitos da estocagem. A cinética das amostras de cada grupo experimental (controle e PDTs) foi novamente avaliada 30 e 60 minutos após as irradiações, com o intuito de determinar os efeitos residuais da PDT sobre os espermatozoides. Na 3ª etapa, os pools seminais foram subdivididos em 4 grupos, sendo 1 grupo controle (controle), e 3 grupos tratados (AM, Luz e PDT). Os grupos AM e controle não foram submetidos às irradiações, enquanto as amostras dos grupos Luz e PDT foram irradiados por 30 e 60 segundos, sobre as irradiâncias de 44.3, 28.98 e 17.35 mW/cm<sup>2</sup>. Ao término de cada período de irradiação as amostras foram submetidas ao CASA para análise da cinética espermática e, uma alíquota do grupo controle, uma alíquota do grupo AM, uma alíquota do grupo luz irradiada sob a maior irradiância e três alíquotas do grupo PDT (uma para cada irradiância) foram armazenadas em refrigerador (4 - 5°C) para posterior avaliação microbiológica.

#### 3.2.4 Irradiação das amostras seminais

A irradiação das amostras foi realizada através do equipamento LedBox 660 nm (Biolambda – São Paulo – Brasil), cedido pelo Departamento de Lasers e Aplicações (CLA – IPEN) representado pela Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro. O LedBox utilizado não apresenta a função de programar o valor exato de irradiância desejado, mas sim a porcentagem relativa à máxima irradiância do equipamento. Portanto, antes de iniciar as irradiações, através de um medidor de potência (Power Meter) analisamos as irradiâncias (mW/cm<sup>2</sup>) relativas às diferentes porcentagens configuradas no equipamento (Tabela 2 e Gráfico 1) e, em conjunto com a Profa. Dra. Martha e sua ampla expertise no assunto, decidimos utilizar as irradiâncias referentes a 40, 70 e 100% . Na figura 14 pode-se visualizar o sistema utilizado para irradiação das amostras seminais.

Tabela 2 - Irradiâncias (mW/cm<sup>2</sup>) do Led Box 660 nm relativos às diferentes porcentagens programadas no equipamento

Porcentagem (%)	Potência (mW)	Irradiância (mW/cm <sup>2</sup> )*
1	3.2	1.01
2	4.5	1.43
3	5.8	1.84
4	7.1	2.26
5	8.2	2.61
10	14.9	4.74
15	21.3	6.78
20	27.8	8.85
25	34.6	11.01
30	40.4	12.86
35	47.6	15.15
40	54.5	17.35
45	59	18.78
50	65	20.70
55	71.9	22.89
60	77.9	24.80
65	84.7	26.97
70	91.1	28.98
80	111.2	35.40
85	116.8	37.20
87	119.9	38.20
90	125.6	40.00
95	129.9	41.40
97	133.0	42.36
100	139.1	44.30

\*Irradiância= Potência/área; área do power meter= 3.14 cm<sup>2</sup>

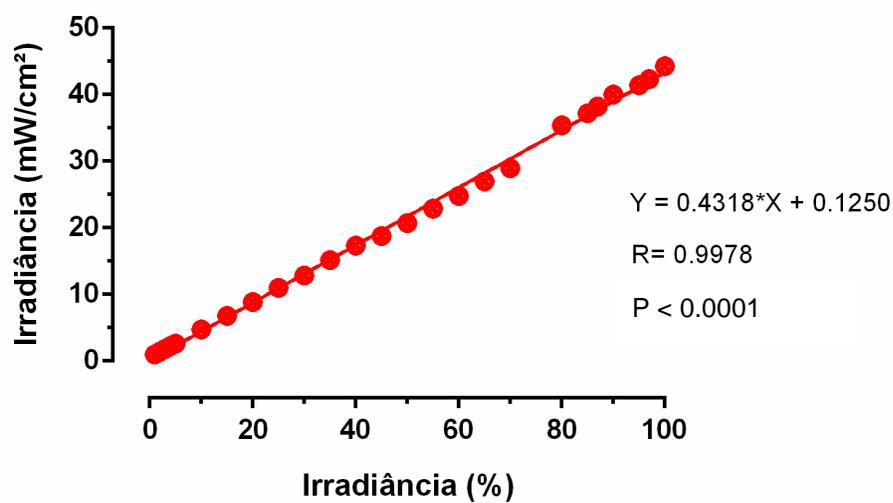
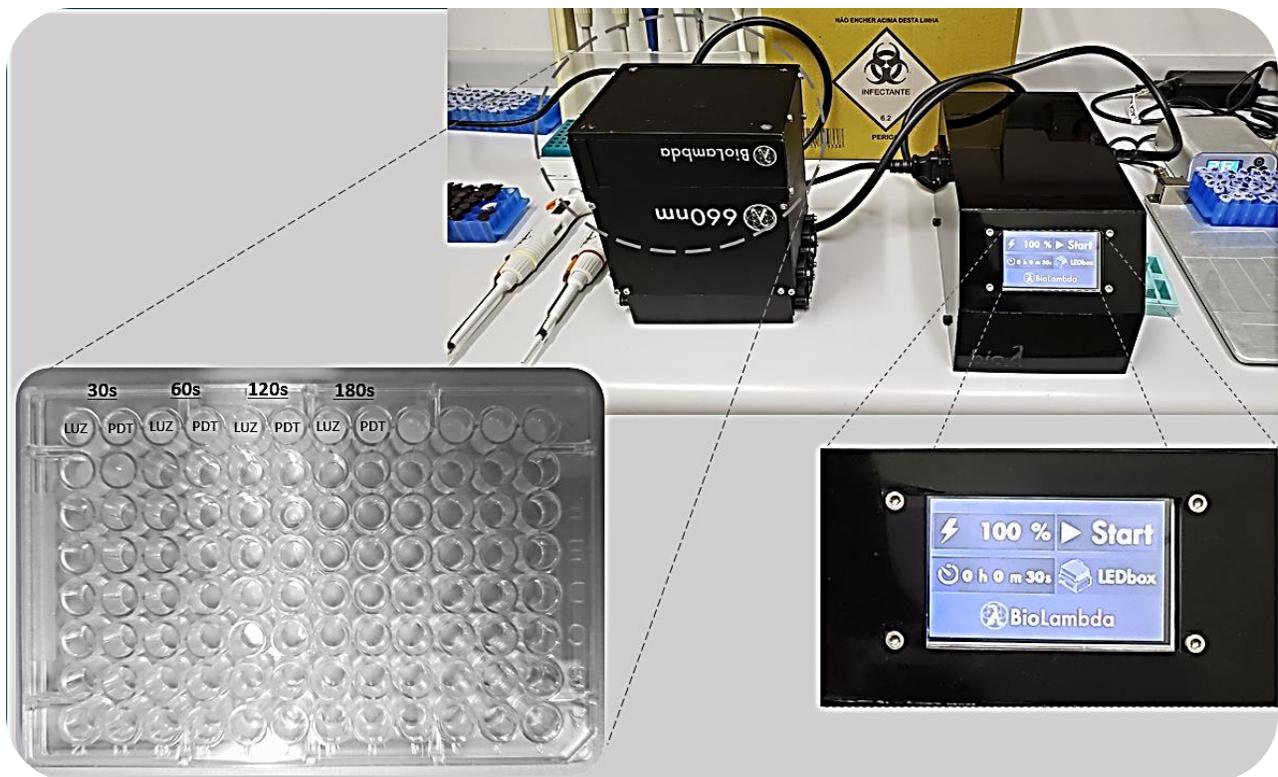
Gráfico 1 - Regressão linear da irradiância em mW/cm<sup>2</sup> medida pelo Power Meter versus as porcentagens programadas no equipamento Led Box 660 nm

Figura 14 - Sistema das irradiações com o Led Box 660 nm, evidenciando o compartimento das placas de ensaio de 96 poços e a form em que eram montadas e a tela de configuração do equipamento



Fonte: Acervo pessoal, 2020.

### 3.2.5 Análises seminais

#### ❖ *Avaliação Computadorizada do Movimento Espermático (CASA)*

Para a avaliação computadorizada da cinética espermática por meio do equipamento Hamilton Thorne (CASA; HTM-IVOS-Ultimate 12.3; Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, EUA), 6  $\mu$ l de sêmen rediluído ( $30 \times 10^6$  spz/ml) foram colocados em uma lâmina e seis campos ou 1000 células foram selecionados aleatoriamente para a análise das seguintes variáveis: caminho médio da velocidade (VAP), velocidade curvilínea (VCL), velocidade retilínea (VSL), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência cruzada de batimento (BCF), retidão (STR), linearidade (LIN), motilidade total (MOT) e motilidade progressiva (PROG). O esperma foi adicionalmente dividido em 4 populações com base na velocidade dos espermatozoides: rápido (RAP), médio (MED), lento (SLOW) e esperma estático (STATIC).

#### ❖ *Integridade de membrana plasmática e integridade acrossomal*

A integridade da membrana plasmática foi analisada através da coloração de eosina/nigrosina (BARTH; OKO, 1989), a qual possibilita a diferenciação das células com lesões ou com alterações de permeabilidade da membrana plasmática. Para tal, 5  $\mu$ L da amostra espermática e 5  $\mu$ L do corante eosina/nigrosina foram depositados na lâmina e após 30 segundos realizou-se o esfregaço. A lâmina foi analisada em microscópio óptico (Nikon® E200, Nikon, Tokyo, Japan), sob objetiva de imersão (1000x), mediante a contagem de 100 espermatozoides. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) de membrana lesionada e íntegra. A integridade acrossomal, por sua vez, foi avaliada através da coloração Fast-Green/Rosa-Bengala (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991), seguindo o protocolo validado para galos domésticos por Rui *et al.* (2017a). Para tal, uma gota de 5  $\mu$ L da amostra e 5  $\mu$ L do corante Fast-Green/Rosa-Bengala foram depositados na lâmina e após 90 segundos foi realizado o esfregaço. Analisou-se em microscópio óptico (Nikon® E200, Nikon, Tokyo, Japan) sob objetiva de imersão (1000x) e, após contagem de 100 espermatozoides, os resultados foram expressos em porcentagem (%) de acrossomos lesionados e íntegros.

### ❖ *Atividade mitocondrial*

A atividade mitocondrial foi mensurada através do método de Hrudka (1987), previamente validada para espermatozoides de galos por Rui et. al. (2017a), na qual a demonstração qualitativa e quantitativa da atividade da enzima da cadeia respiratória Citocromo C-oxidase é realizada pela oxidação da 3,3 diaminobenzidina (DAB). A avaliação da atividade mitocondrial da peça intermediária dos espermatozoides obedece a escala de quatro classes, onde:

- Classe I: Quase todas as mitocôndrias são ativas, ou seja, contêm um produto de reação colorida dando à bainha mitocondrial a coloração marrom escura.
- Classe II: A bainha mitocondrial aparece fragmentada, isto é, consiste em segmentos ativos e inativos com predominância dos ativos.
- Classe III: Espermatozoides com menos da metade da bainha mitocondrial ativa e com poucas mitocôndrias ativas dispersas.
- Classe IV: Espermatozoides completamente inativos e, portanto, a peça intermediária não apresenta-se corada.

Os resultados foram expressos na forma de Índice de Atividade Mitocondrial (IAM) de acordo com a equação descrita por Hrudka (1987):

$$IAM = \{(\% \text{ Classe I} * 1) + (\% \text{ Classe II} * 0.5) + (\% \text{ Classe III} * 0.25) + (\% \text{ Classe IV} * 0)\}$$

### ❖ *Análise microbiológica*

Aliquotas (~90 µL) das amostras seminais de cada grupo experimental (Controle, Azul de Metileno, Luz e PDTs) foram encaminhadas ao Laboratório de Terapia Óptica do Centro de Lasers e Aplicações (IPEN – USP), num período máximo de 3 horas após a coleta. No interior de um fluxo laminar, as amostras foram então distribuídas em poços de uma placa de ensaio e diluídas nas proporções de 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 e 1/100000 em água peptonada. Gotas de 10 µL das amostras sem diluição e de cada uma das diluições citadas foram semeadas em triplicata em placas de Petri, na forma de estria, conforme demonstrado na figura 15, de acordo com a metodologia de Jett *et al.* (1997). Ao se realizar a semeadura não houve mistura das gotas durante o escorrimento na placa de Petri, possibilitando assim, a contagem das colônias de acordo com o proposto pelo autor. Para o crescimento de bactérias totais utilizou-se o meio de cultura ágar Mueller

Hinton, e para o crescimento apenas de bactérias gram-negativas utilizou-se o meio ágar Macconkey. A seguir, as placas foram colocadas em estufa bacteriológica a 37°C, em atmosfera de 5 a 10% de CO<sub>2</sub>. A coleta de dados foi realizada entre 18 e 24h após o início da incubação. As UFC encontradas na placa de Petri foram multiplicadas pelo fator de diluição correspondente.

Figura 15 - Sistema de cultivo das amostras em formato de estria, seguindo a metodologia de JETT *et al.* (1997). Repare que todo o manejo foi realizado no interior de um fluxo laminar, evitando contaminações externas



Fonte: Acervo pessoal, 2020.

### 3.2.7 Análise estatística

As análises estatísticas deste projeto foram realizadas através do programa SAS System for Windows. Testes paramétricos e não paramétricos foram utilizados, respectivamente, para dados que obedeceram ou não às premissas estatísticas da normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. O nível de significância utilizado para rejeitar H<sub>0</sub> foi de 5% ( $p < 0,05$ ). Os dados foram descritos através da média e erro padrão da média.

### *1ª Etapa: Pré-irradiação*

Na primeira etapa deste projeto, realizou-se primeiramente o teste de Análises repetidas no tempo (Proc Mixed) para avaliar o efeito isolado dos fatores grupo (concentração de AM) e tempo de incubação (1 e 5 min.), bem como a interação estatística entre estes fatores. Como em nenhuma das variáveis de cinética estudadas ocorreu interação entre os fatores concentração de AM e tempo de incubação, bem como não foi observado um efeito isolado do tempo, decidimos avaliar apenas o efeito isolado da concentração de AM.

### *2ª Etapa: Dosimetria da luz*

Na segunda etapa, utilizou-se inicialmente a Análise de variâncias (Anova) para avaliar o efeito do grupo (controle, AM, luz e PDT) nas variáveis espermáticas propostas (cinética, integridade de membrana, integridade de acrossomo e atividade mitocondrial). Posteriormente, para as variáveis cujo efeito do grupo foi comprovado pela Anova ( $p < 0.05$ ), utilizamos o teste de Dunnett (Proc Dunnett) com o objetivo de comparar as médias dos três grupos tratamentos (AM, Luz e PDT) em relação ao grupo controle em cada tempo de irradiação separadamente, isto significa dizer que o tempo não foi considerado como um fator. No segundo experimento desta etapa, com o intuito de avaliar o efeito da PDT ao longo do tempo, realizou-se o teste de Análises repetidas no tempo (Proc Mixed), no qual determinou-se o efeito isolado dos fatores grupo (Controle e PDTs) e tempo (0, 30 e 60 min. pós irradiação), bem como a interação estatística entre estes fatores, em cada irradiância (17.35 e 28.98 mW/cm<sup>2</sup>).

### *3ª Etapa: Avaliação microbiológica*

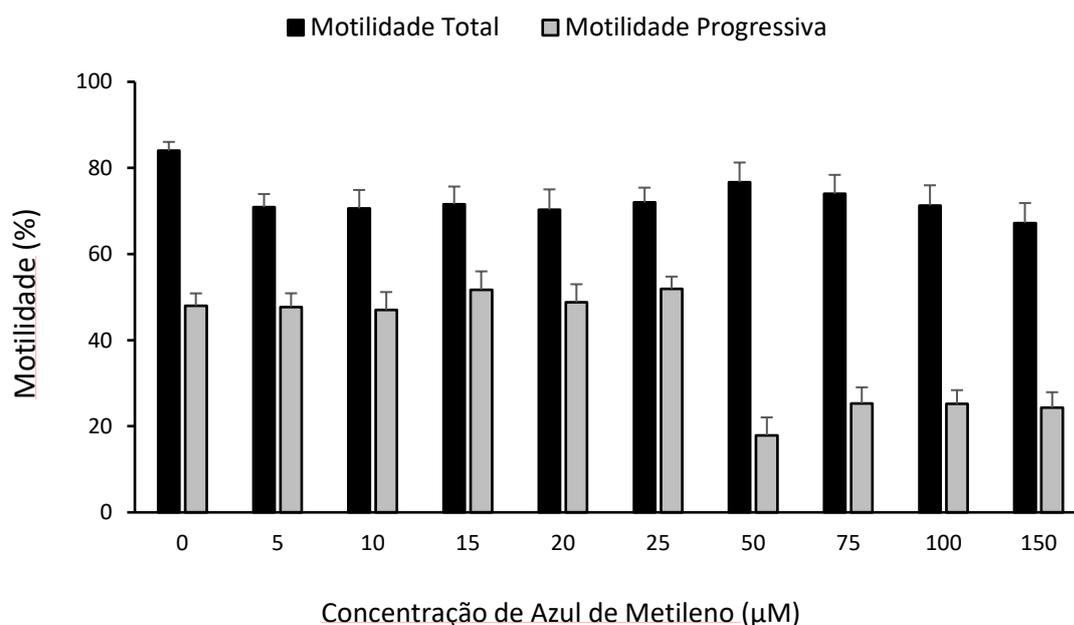
Com o intuito de avaliar o efeito do grupo (controle, AM, luz ou PDTs) sobre a quantidade de colônias de coliformes totais e negativos presentes nas amostras seminais bem como sobre os parâmetros de cinética espermática, utilizamos inicialmente a Análise de variâncias (Anova). Em seguida, para as variáveis cujo efeito do grupo foi significativo ( $p < 0.05$ ), comparamos os resultados microbiológicos e espermáticos dos grupos tratados (AM, Luz e PDTs) em relação ao grupo controle, através do teste de Dunnett (Proc Dunnet), em cada tempo de exposição à luz separadamente (30 e 60 segundos).

### 3.3 RESULTADOS

#### 1ª Etapa: Pré-irradiação

Os resultados encontrados no primeiro experimento indicam que, até a concentração de 25  $\mu\text{M}$ , o fotossensibilizador AM não exerce alta toxicidade às células espermáticas, o que pode ser facilmente observado no gráfico 2 utilizando as motilidades total e progressiva como referência. Entretanto, as concentrações superiores a 25  $\mu\text{M}$ , apesar de não condenarem a motilidade total, são visivelmente prejudiciais ao movimento progressivo das células, conforme observado no gráfico.

Gráfico 2 - Motilidades total e progressiva dos espermatozoides de aves após incubação por 5 minutos com diferentes concentrações do fotossensibilizador Azul de Metileno



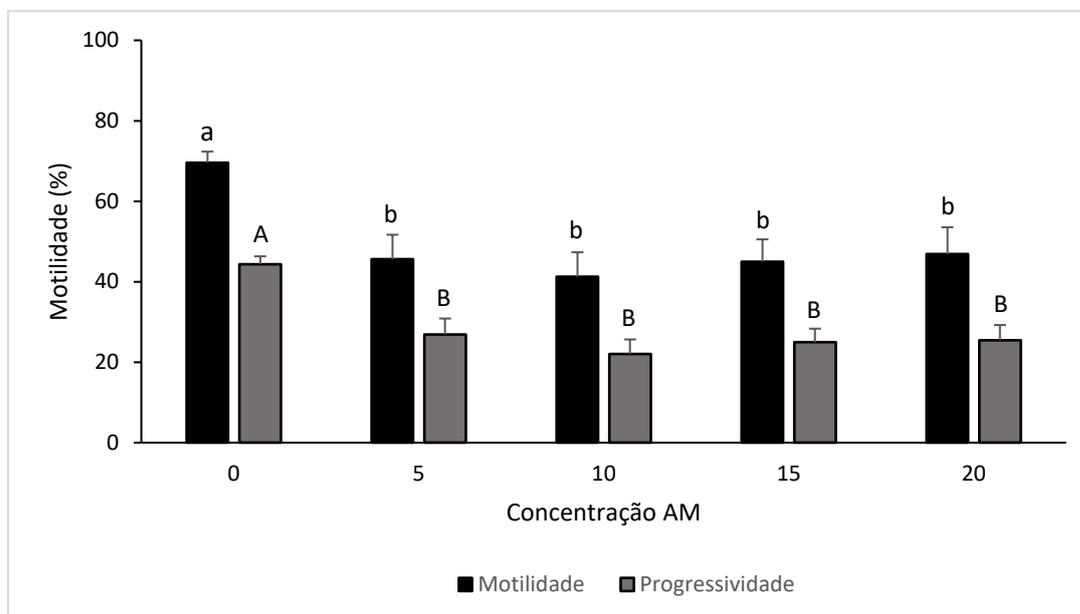
Estes achados demonstram a existência de um limiar de toxicidade do AM às células espermáticas, visto isso, no segundo experimento desta primeira etapa, decidimos avaliar concentrações inferiores a 25  $\mu\text{M}$  em dois tempos de incubação, visando entender o efeito do AM nos espermatozoides ao longo do tempo e, com isso, adquirir informações relevantes para definir a concentração do fotossensibilizador e o tempo de pré-irradiação a serem utilizados na próxima etapa deste projeto.

Os resultados das análises repetidas no tempo demonstraram que não há interação estatística entre os fatores “concentração de AM” e “tempo de incubação” em nenhuma das variáveis de cinética espermática avaliadas, como pode ser observado na tabela 3. Ainda na tabela, pode-se visualizar na terceira coluna que o fator tempo isoladamente não exerceu nenhuma influência sobre as variáveis estudadas. Por outro lado, a maioria das variáveis de cinética, com exceção da amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência cruzada de batimento (BCF) e retidão (STR), sofreram influência de acordo com a concentração de AM utilizada. No gráfico 3, novamente utilizando as variáveis motilidade e progressividade como referência, observa-se uma redução significativa em ambas as variáveis entre o grupo controle e os grupos incubados com AM, todavia essa redução não divergiu entre as concentrações de AM utilizadas (5, 10, 15 e 20  $\mu\text{M}$ ), ou seja, não existe uma característica de dose-dependência.

Tabela 3 - Resultados das análises repetidas no tempo referentes ao segundo experimento da etapa de pré-irradiação. Na segunda e na terceira coluna observa-se os níveis de significância (p) do efeito isolado dos fatores grupo (concentração de AM) e tempo (1 e 5 minutos), enquanto na quarta coluna estão representados os níveis de significância (p) da interação estatística entre estes fatores. O nível de significância considerado para rejeitar a hipótese nula ( $H_0$ ) foi de 5% ( $p < 0.05$ )

<b>Variável</b>	<b>Grupo</b>	<b>Tempo</b>	<b>Grupo x Tempo</b>
Velocidade média (VAP)	0.0014	0.4118	0.0926
Velocidade retilínea (VSL)	0.0005	0.5130	0.2295
Velocidade curvilínea (VCL)	0.0098	0.4034	0.0706
Amplitude do desloc. linear da cabeça (ALH)	0.9955	0.9333	0.3226
Frequência de batidas da cauda (BCF)	0.2650	0.2154	0.7892
Retilinearidade (STR=VSL/VAP)	0.0888	0.2195	0.3304
Linearidade (LIN=VSL/VCL)	0.0137	0.1951	0.5849
Motilidade (%)	0.0027	0.2112	0.1353
Progressividade (%)	<0.0001	0.0758	0.2278
Células rápidas (%)	0.0004	0.1741	0.1189
Células com média vel. (%)	0.7789	0.7009	0.3171
Células lentas (%)	0.1969	0.4000	0.3406
Células estáticas (%)	0.0137	0.0974	0.1835

Gráfico 3 - Efeito da incubação com diferentes concentrações de AM (0, 5, 10, 15 e 20  $\mu\text{M}$ ) na motilidade e na progressividade de espermatozoides de galos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0.05$ ) entre os resultados de motilidade das diferentes concentrações de AM. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0.05$ ) entre os resultados de progressividade das diferentes concentrações de AM.



### *Etapa 2: Dosimetria da luz*

Analisando os resultados obtidos com as três diferentes irradiâncias (tabelas 4 a 6), observa-se que o tratamento com AM e luz isoladamente não exercem nenhum efeito sobre as características espermáticas independente do tempo de exposição empregado, entretanto a associação de ambos na PDT impactam principalmente as velocidades média, retilínea e curvilínea, a frequência de batimentos da cauda, as motilidades total e progressiva, a população de células rápidas e estáticas, a integridade de membrana e a atividade mitocondrial dos espermatozoides de galos domésticos.

Ao irradiar as amostras com a irradiância máxima do equipamento ( $44.3 \text{ mW/cm}^2$ ), uma diminuição significativa em relação ao grupo controle das motilidades total e progressiva foi observada já aos 30 segundos de exposição à luz (Gráfico 4). A motilidade total dos espermatozoides do grupo PDT inesperadamente apresentou um ligeiro aumento aos 60 segundos de irradiação, no entanto acreditamos ser um artefato da técnica. As velocidades média, retilínea e curvilínea, a frequência de batimentos da cauda, e as populações de células rápidas e estáticas também foram diferentes entre os grupos

controle e PDT a partir dos 30 segundos de irradiação (tabela 4). A membrana plasmática e a mitocôndria dos espermatozoides foram igualmente afetadas pelas irradiações, sendo observados após 180 segundos, 80% de integridade de membrana e 84 de índice de atividade mitocondrial dos espermatozoides do grupo PDT, em relação a 91% e 89, respectivamente, do grupo controle. Por sua vez, a integridade acrossomal não apresentou diferença estatística em relação ao controle em nenhum dos 3 grupos tratados mesmo após 180 segundos de exposição à luz.

Diferente do ocorrido no experimento anterior, ao irradiar as amostras com 28.98 mW/cm<sup>2</sup> a queda na motilidade total dos espermatozoides foi significativa apenas após 120 segundos de exposição à luz (Gráfico 5). Em contrapartida, a queda na progressividade dos espermatozoides apresentou tendência estatística ( $p = 0.0621$ ) logo aos 30 segundos de irradiação. A velocidade média das células e a população de células rápidas, igualmente ao experimento anterior, apresentou queda significativa já aos 30 segundos de irradiação. Por outro lado, as velocidades retilínea e curvilínea e a frequência de batimentos da cauda foram diferentes entre os grupos controle e PDT apenas após 60 segundos (tabela 5). A integridade de membrana plasmática dos espermatozoides do grupo PDT apresentou queda gradativa, sendo observada diferença em relação ao grupo controle aos 60 segundos de irradiação e, após 180 segundos, enquanto o grupo controle apresentava aproximadamente 95% de integridade, a do grupo PDT caiu para 85%. As mitocôndrias do grupo PDT sofreram uma queda significativa em sua atividade logo após 60 segundos de irradiação e, aos 180 segundos, curiosamente apresentou uma ligeira melhora enquanto o grupo controle sofreu uma pequena queda, mas ainda assim observou-se uma tendência estatística entre estes grupos. A integridade acrossomal, seguindo o padrão do experimento anterior, não foi diferente do grupo controle em nenhum dos tempos de exposição estudados.

Ao submeter as amostras à menor irradiância (17.35 mW/cm<sup>2</sup>), diferente dos experimentos anteriores, a progressividade dos espermatozoides foi alterada significativamente somente após 60 segundos de irradiação, enquanto a motilidade total (Gráfico 6), apesar de apresentar diferença estatística em relação ao controle, manteve o resultado numericamente alto após 30 segundos de irradiação quando comparado às irradiâncias de 44.3 e 28.98 mW/cm<sup>2</sup> (80%, 65% e 70%, respectivamente), no entanto a partir de 60 segundos de exposição a queda foi bem similar às demais irradiâncias. As velocidades média, retilínea e curvilínea, e as populações de células rápidas e estáticas foram diferentes entre os grupos controle e PDT apenas após 60 segundos de irradiação.

Todavia, diferente do observado nos experimentos anteriores, a frequência de batimentos da cauda não foi alterada mesmo após 180 segundos. Por outro lado, a amplitude do deslocamento linear da cabeça sofreu um ligeiro decréscimo no grupo PDT a partir dos 60 segundos de exposição à luz (tabela 6). A integridade de membrana dos espermatozoides e a atividade mitocondrial apresentaram queda significativa apenas aos 180 segundos de irradiação. Indo de encontro aos experimentos anteriores, a integridade acrossomal não apresentou diferença estatística em relação ao controle em nenhum grupo tratado.

Tabela 4 - Resultados da etapa 2 referentes ao tratamento das amostras com a maior irradiância (44.3 mW/cm<sup>2</sup>). Controle: sem AM e sem luz; Azul de Metileno (AM): 10 uM de AM e sem luz; Luz: sem AM e 44.3 mW/cm<sup>2</sup> de luz; Terapia Fotodinâmica (PDT): 10 uM de AM e 44.3 mW/cm<sup>2</sup> de luz. As linhas que estão destacadas em negrito significam que foi observado efeito do tratamento pelo teste de Anova e os tratamentos que estiverem destacados com asterisco (\*) significa que foi observado diferença significativa em relação ao grupo controle pelo teste de Dunnett. O nível de significância considerado foi de 5% (p<0.05)

Tempo	0 seg.					30 seg.					60 seg.					120 seg.					180 seg.				
	Grupo	Controle	AM	P	Controle	AM	Luz	PDT	P	Controle	AM	Luz	PDT	P	Controle	AM	Luz	PDT	P	Controle	AM	Luz	PDT	P	
Velocidade média (VAP)	82.27 ± 5.87	76.82 ± 4.86	0.4862	<b>71.70 ± 3.52</b>	<b>71.97 ± 4.07</b>	<b>72.69 ± 3.35</b>	<b>49.74 ± 1.99*</b>	<0.001	<b>72.04 ± 2.68</b>	<b>73.44 ± 3.55</b>	<b>78.62 ± 2.79</b>	<b>59.10 ± 4.30*</b>	0.0029	63.00 ± 4.16	72.61 ± 1.97	68.80 ± 3.59	55.09 ± 2.96	0.1149	<b>72.45 ± 4.65</b>	<b>70.07 ± 4.96</b>	<b>70.37 ± 4.52</b>	<b>53.36 ± 3.08*</b>	0.0152		
Velocidade retilínea (VSL)	69.39 ± 5.25	61.90 ± 4.62	0.3024	<b>57.17 ± 3.83</b>	<b>56.42 ± 2.52</b>	<b>56.50 ± 2.12</b>	<b>41.01 ± 2.37*</b>	0.0006	<b>55.97 ± 2.14</b>	<b>56.30 ± 3.19</b>	<b>60.75 ± 3.25</b>	<b>47.11 ± 3.41*</b>	0.0287	52.32 ± 3.53	57.06 ± 2.38	55.82 ± 2.28	44.70 ± 2.39	0.0676	<b>58.77 ± 3.78</b>	<b>57.54 ± 4.54</b>	<b>56.39 ± 3.95</b>	<b>43.74 ± 2.08*</b>	0.0268		
Velocidade curvilínea (VCL)	119.14 ± 5.69	115.87 ± 3.78	0.6404	<b>116.97 ± 3.16</b>	<b>113.71 ± 5.14</b>	<b>115.35 ± 4.43</b>	<b>84.12 ± 2.85*</b>	<0.001	<b>114.51 ± 5.30</b>	<b>117.95 ± 4.08</b>	<b>122.29 ± 2.32</b>	<b>99.35 ± 5.92*</b>	0.0062	102.64 ± 5.19	115.72 ± 1.45	110.95 ± 5.58	90.51 ± 4.06	0.0732	<b>111.10 ± 5.96</b>	<b>111.50 ± 5.63</b>	<b>109.05 ± 6.15</b>	<b>87.09 ± 5.29*</b>	0.0146		
Amplitude do desloc. linear da cabeça (ALH)	4.84 ± 0.17	4.95 ± 0.16	0.6366	5.04 ± 0.13	4.86 ± 0.20	4.86 ± 0.14	4.49 ± 0.25	0.2283	4.93 ± 0.21	4.90 ± 0.07	5.02 ± 0.11	4.82 ± 0.15	0.7824	4.77 ± 0.07	5.05 ± 0.13	4.95 ± 0.15	4.60 ± 0.18	0.1268	4.76 ± 0.16	4.93 ± 0.14	4.80 ± 0.14	4.54 ± 0.09	0.3112		
Frequência de batidas da cauda (BCF)	32.14 ± 0.69	31.50 ± 0.43	0.4673	<b>32.94 ± 0.41</b>	<b>33.46 ± 0.59</b>	<b>33.45 ± 0.80</b>	<b>30.30 ± 0.80*</b>	0.0062	32.39 ± 0.88	33.80 ± 0.78	32.52 ± 0.68	31.61 ± 0.95	0.3167	<b>33.77 ± 0.80</b>	<b>33.15 ± 0.73</b>	<b>33.14 ± 0.63</b>	<b>31.04 ± 1.05*</b>	0.0326	<b>33.72 ± 0.16</b>	<b>32.31 ± 0.73</b>	<b>33.24 ± 0.53</b>	<b>31.74 ± 0.67*</b>	0.0258		
Retilinearidade (STR=VSL/VAP)	83.00 ± 1.32	79.37 ± 1.81	0.1285	78.50 ± 1.70	78.50 ± 2.13	77.62 ± 2.49	82.25 ± 1.85	0.4094	77.29 ± 1.81	76.37 ± 2.09	76.37 ± 2.44	79.75 ± 1.99	0.6301	82.75 ± 1.58	77.75 ± 1.64	80.75 ± 2.19	81.37 ± 1.70	0.2692	81.12 ± 2.36	81.37 ± 2.23	80.00 ± 3.18	82.37 ± 1.74	0.9219		
Linearidade (LIN=VSL/VCL)	57.50 ± 2.51	52.87 ± 2.63	0.2243	48.75 ± 2.26	49.75 ± 1.91	49.75 ± 2.06	50.37 ± 3.02	0.9694	49.57 ± 2.06	48.37 ± 2.03	49.87 ± 2.38	48.00 ± 1.87	0.9024	50.87 ± 1.73	49.37 ± 1.37	50.50 ± 1.85	50.62 ± 2.03	0.9337	53.75 ± 1.89	51.50 ± 2.16	52.37 ± 2.82	52.00 ± 2.04	0.9072		
Motilidade (%)	93.87 ± 0.39	92.25 ± 0.86	0.1087	<b>86.75 ± 4.51</b>	<b>86.50 ± 2.56</b>	<b>87.75 ± 2.39</b>	<b>65.62 ± 4.44*</b>	0.0003	88.43 ± 3.93	88.37 ± 2.83	83.50 ± 2.77	79.43 ± 1.31	0.1106	<b>84.12 ± 3.97</b>	<b>87.87 ± 2.70</b>	<b>86.87 ± 1.88</b>	<b>67.87 ± 2.94*</b>	0.0001	<b>83.75 ± 3.99</b>	<b>86.00 ± 2.72</b>	<b>84.75 ± 2.14</b>	<b>67.50 ± 4.48*</b>	0.0023		
Progressividade (%)	49.37 ± 5.38	41.00 ± 5.77	0.3064	<b>36.37 ± 6.32</b>	<b>32.12 ± 4.17</b>	<b>33.50 ± 3.02</b>	<b>11.75 ± 2.12*</b>	0.0002	<b>33.71 ± 3.75</b>	<b>31.50 ± 4.89</b>	<b>33.00 ± 5.19</b>	<b>18.62 ± 4.03*</b>	0.0370	<b>27.75 ± 5.25</b>	<b>37.25 ± 3.34</b>	<b>31.12 ± 3.87</b>	<b>14.25 ± 3.28*</b>	0.0031	<b>34.00 ± 5.38</b>	<b>31.75 ± 7.32</b>	<b>30.62 ± 3.90</b>	<b>14.50 ± 2.74*</b>	0.0460		
Células rápidas (%)	61.00 ± 6.20	56.75 ± 6.60	0.6462	<b>48.75 ± 6.79</b>	<b>46.00 ± 5.66</b>	<b>49.87 ± 4.67</b>	<b>14.37 ± 2.18*</b>	<0.001	<b>50.43 ± 5.10</b>	<b>48.00 ± 5.84</b>	<b>50.25 ± 5.02</b>	<b>25.75 ± 5.58*</b>	0.0073	<b>35.75 ± 6.44</b>	<b>52.87 ± 3.04</b>	<b>41.62 ± 5.51</b>	<b>18.50 ± 4.03*</b>	0.0004	<b>46.12 ± 7.12</b>	<b>40.00 ± 8.87</b>	<b>43.37 ± 4.72</b>	<b>18.75 ± 3.72*</b>	0.0220		
Células com média vel. (%)	13.25 ± 3.11	14.50 ± 2.65	0.5998	13.50 ± 1.16	12.14 ± 1.53	14.12 ± 2.37	18.87 ± 1.59	0.0563	<b>14.14 ± 1.64</b>	<b>11.37 ± 1.51</b>	<b>9.00 ± 1.25*</b>	<b>15.50 ± 1.38</b>	0.0158	19.75 ± 1.98	14.62 ± 1.46	15.14 ± 2.27	18.12 ± 2.71	0.2951	16.00 ± 1.83	12.50 ± 2.03	14.57 ± 2.75	18.00 ± 1.58	0.2885		
Células lentas (%)	19.75 ± 4.85	21.00 ± 4.74	0.7590	24.62 ± 3.60	26.12 ± 3.52	23.87 ± 1.98	32.62 ± 4.31	0.2853	23.57 ± 1.21	28.87 ± 2.33	24.50 ± 3.47	30.14 ± 2.27	0.2209	<b>28.75 ± 3.36</b>	<b>20.25 ± 1.67*</b>	<b>27.12 ± 2.68</b>	<b>31.25 ± 3.54</b>	0.0482	22.00 ± 2.50	21.00 ± 4.02	23.62 ± 1.56	30.62 ± 2.64	0.0762		
Células estáticas (%)	6.12 ± 0.39	7.75 ± 0.86	0.1087	<b>13.25 ± 4.51</b>	<b>13.50 ± 2.56</b>	<b>12.25 ± 2.39</b>	<b>34.37 ± 4.44*</b>	0.0021	11.57 ± 3.93	11.62 ± 2.83	16.50 ± 2.77	20.57 ± 1.31	0.1106	<b>15.87 ± 3.97</b>	<b>12.12 ± 2.70</b>	<b>13.12 ± 1.88</b>	<b>32.12 ± 2.94*</b>	0.0006	<b>16.25 ± 3.99</b>	<b>14.00 ± 2.72</b>	<b>15.25 ± 2.14</b>	<b>32.50 ± 4.48*</b>	0.0105		
Integridade de membrana (%)	93.29 ± 1.57	94.29 ± 1.69	0.6719	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	<b>91.14 ± 2.44</b>	<b>92.71 ± 1.17</b>	<b>95.71 ± 1.17</b>	<b>80.75 ± 5.37*</b>	0.0182	
Integridade acrossomal (%)	96.57 ± 0.84	97.57 ± 0.81	0.4092	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	97.14 ± 0.70	97.71 ± 0.36	96.29 ± 0.47	96.50 ± 0.71	0.3395	
Índice de atividade mitocondrial	90.83 ± 1.09	89.58 ± 1.61	0.5350	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	<b>88.82 ± 1.62</b>	<b>91.71 ± 1.21</b>	<b>89.64 ± 1.06</b>	<b>84.37 ± 1.57*</b>	0.0070	

Gráfico 4 - Resultados das irradiações das amostras seminais de galos com Led Box 660 nm na irradiância de 44.3 mW/cm<sup>2</sup> associada a 10 µM de Azul de Metileno nos 4 grupos (Controle, AM, Luz e PDT). (A) Motilidade total dos espermatozoides de galos; (B) Progressividade espermática; (C) Integridade de membrana plasmática dos espermatozoides; (D) Índice de atividade mitocondrial; (E) Integridade acrossomal. (\*) significa diferença estatística ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo controle, em cada tempo de irradiação separadamente.

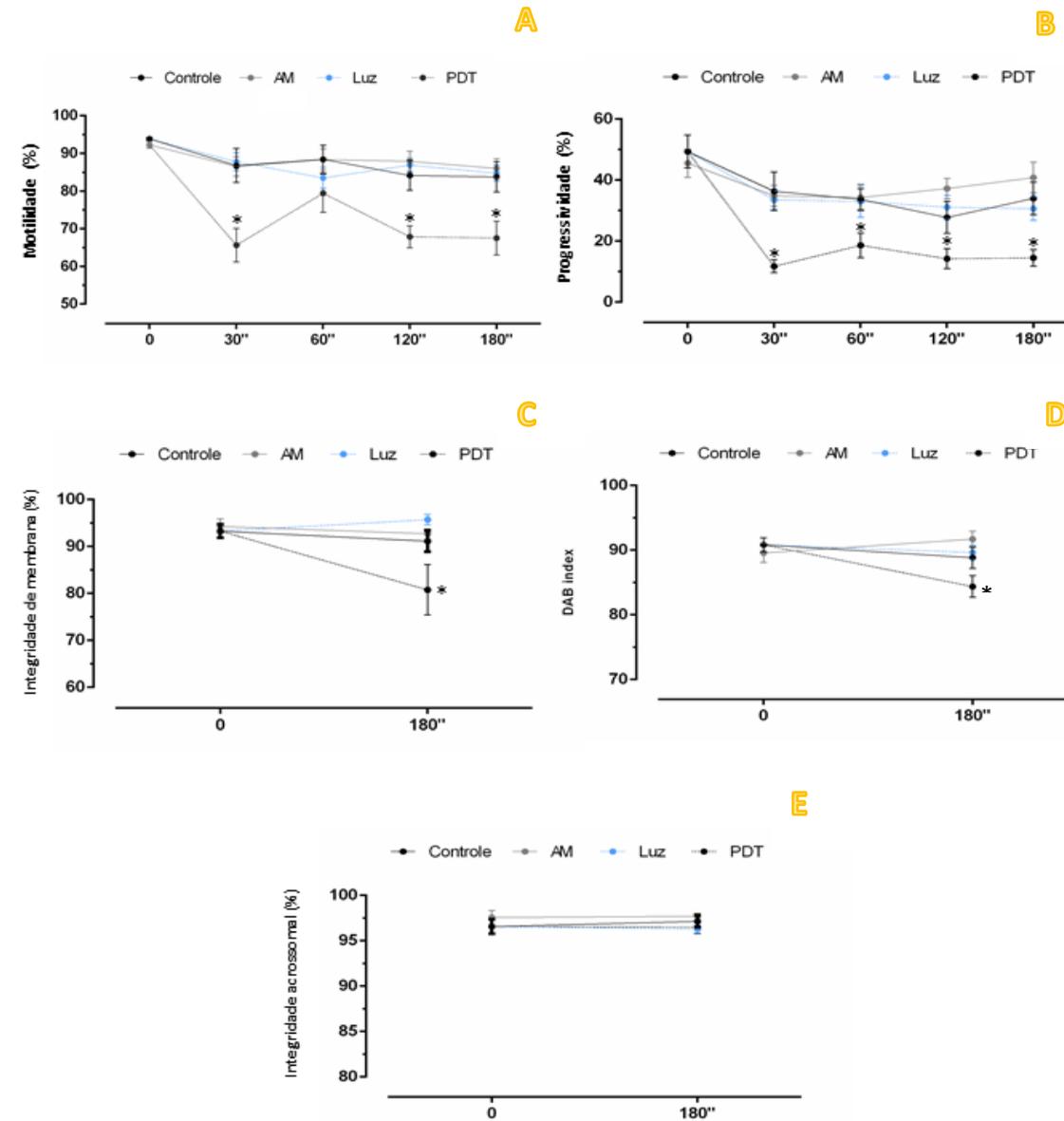


Tabela 5 - Resultados da etapa 2 referentes ao tratamento das amostras com a irradiância de 28.98 mW/cm<sup>2</sup>. **Controle:** sem AM e sem luz; **Azul de Metileno (AM):** 10 µM de AM e sem luz; **Luz:** sem AM e 28.98 mW/cm<sup>2</sup> de luz; **Terapia Fotodinâmica (PDT):** 10 µM de AM e 28.98 mW/cm<sup>2</sup> de luz. As linhas que estão destacadas em negrito significam que foi observado efeito do tratamento pelo teste de Anova e os tratamentos que estiverem destacados com asterisco (\*) significa que foi observado diferença significativa em relação ao grupo controle pelo teste de Dunnett. O nível de significância considerado foi de 5% (p<0.05)

Tempo	0 seg.			30 seg.					60 seg.					120 seg.					180 seg.					
	Grupo	Controle	AM	P	Controle	AM	Luz	PDT	P	Controle	AM	Luz	PDT	P	Controle	AM	Luz	PDT	P	Controle	AM	Luz	PDT	P
Velocidade média (VAP)	75.95 ± 4.62	67.81 ± 4.19	0.2129	<b>66.41 ± 3.00</b>	<b>66.77 ± 2.04</b>	<b>69.80 ± 3.32</b>	<b>54.24 ± 5.17*</b>	<b>0.0227</b>	<b>67.65 ± 3.28</b>	<b>63.01 ± 2.72</b>	<b>64.32 ± 2.49</b>	<b>55.81 ± 3.05*</b>	<b>0.0494</b>	<b>66.42 ± 2.56</b>	<b>63.49 ± 2.18</b>	<b>64.82 ± 3.69</b>	<b>54.31 ± 2.38*</b>	<b>0.0197</b>	63.36 ± 2.67	59.94 ± 2.33	68.34 ± 2.41	58.23 ± 3.99	0.1037	
Velocidade retilínea (VSL)	58.41 ± 2.98	52.04 ± 2.53	0.1254	52.45 ± 2.89	51.70 ± 2.40	53.46 ± 2.03	43.57 ± 4.32	0.1068	<b>52.77 ± 2.47</b>	<b>49.17 ± 2.03</b>	<b>50.06 ± 1.77</b>	<b>44.76 ± 2.73*</b>	<b>0.0251</b>	<b>51.87 ± 2.08</b>	<b>49.95 ± 1.69</b>	<b>50.17 ± 2.13</b>	<b>43.04 ± 2.58*</b>	<b>0.0342</b>	49.92 ± 2.16	46.85 ± 1.97	53.13 ± 1.94	46.93 ± 3.92	0.2953	
Velocidade curvilínea (VCL)	116.22 ± 6.69	104.24 ± 5.86	0.1992	102.49 ± 3.49	105.44 ± 2.90	107.02 ± 5.19	87.57 ± 7.75	0.0636	<b>109.40 ± 4.28</b>	<b>104.31 ± 3.03</b>	<b>104.29 ± 4.11</b>	<b>90.07 ± 4.12*</b>	<b>0.0106</b>	<b>109.55 ± 3.17</b>	<b>102.67 ± 3.06</b>	<b>104.67 ± 5.73</b>	<b>91.35 ± 3.57*</b>	<b>0.0154</b>	<b>103.76 ± 4.17</b>	<b>100.91 ± 3.06</b>	<b>110.07 ± 3.23</b>	<b>91.69 ± 3.63*</b>	<b>0.0139</b>	
Amplitude do desloc. linear da cabeça (ALH)	5.07 ± 0.19	4.66 ± 0.15	0.1101	4.75 ± 0.17	4.67 ± 0.18	4.70 ± 0.12	4.40 ± 0.17	0.4483	<b>4.96 ± 0.12</b>	<b>4.70 ± 0.11</b>	<b>4.74 ± 0.11</b>	<b>4.51 ± 0.12*</b>	<b>0.0159</b>	4.97 ± 0.18	4.79 ± 0.16	4.89 ± 0.17	4.70 ± 0.24	0.7072	4.90 ± 0.19	4.77 ± 0.09	4.99 ± 0.06	4.56 ± 0.19	0.2538	
Frequência de batidas da cauda (BCF)	30.34 ± 0.73	30.22 ± 0.83	0.9205	31.04 ± 0.65	31.62 ± 0.79	31.41 ± 0.76	32.09 ± 0.97	0.8269	<b>32.61 ± 0.63</b>	<b>32.74 ± 0.71</b>	<b>32.19 ± 0.53</b>	<b>29.06 ± 1.12*</b>	<b>0.0069</b>	<b>32.97 ± 0.25</b>	<b>32.20 ± 0.37</b>	<b>31.57 ± 0.63</b>	<b>30.07 ± 0.67*</b>	<b>0.0035</b>	31.66 ± 0.89	32.16 ± 0.77	32.14 ± 0.95	29.60 ± 0.69	0.1364	
Retilinearidade (STR=VSL/VAP)	76.75 ± 1.49	76.62 ± 1.76	0.9576	78.50 ± 1.52	77.00 ± 1.73	76.62 ± 1.82	80.00 ± 1.67	0.4872	77.75 ± 1.31	78.00 ± 1.56	77.87 ± 1.56	80.00 ± 1.53	0.6786	77.75 ± 0.99	78.37 ± 1.75	77.62 ± 1.73	79.25 ± 1.31	0.8592	78.25 ± 1.05	78.37 ± 1.88	77.86 ± 1.08	79.86 ± 1.35	0.7779	
Linearidade (LIN=VSL/VCL)	51.12 ± 1.20	50.75 ± 1.29	0.8348	51.75 ± 2.16	49.75 ± 2.18	50.87 ± 1.88	50.12 ± 2.28	0.8977	48.75 ± 0.99	46.14 ± 0.96	48.75 ± 1.48	50.25 ± 2.10	0.3132	48.37 ± 1.87	49.25 ± 1.81	48.75 ± 1.62	48.62 ± 2.82	0.9924	48.62 ± 1.45	47.37 ± 1.75	49.29 ± 1.37	52.14 ± 2.91	0.3780	
Motilidade (%)	93.00 ± 2.79	89.50 ± 2.53	0.3885	84.62 ± 5.16	87.87 ± 5.02	93.62 ± 1.75	79.00 ± 7.22	0.2670	90.75 ± 2.99	82.75 ± 5.61	87.50 ± 3.46	79.86 ± 5.41	0.3496	<b>92.00 ± 2.43</b>	<b>90.29 ± 2.83</b>	<b>92.43 ± 2.79</b>	<b>71.75 ± 6.61*</b>	<b>0.0048</b>	<b>84.25 ± 5.33</b>	<b>83.75 ± 2.83</b>	<b>91.71 ± 2.02</b>	<b>73.71 ± 3.94*</b>	<b>0.0303</b>	
Progressividade (%)	39.87 ± 4.01	26.75 ± 4.96	0.0587	<b>30.62 ± 4.03</b>	<b>28.87 ± 2.27</b>	<b>34.87 ± 2.38</b>	<b>19.37 ± 5.46*</b>	<b>0.0466</b>	<b>33.12 ± 3.37</b>	<b>24.50 ± 3.09</b>	<b>28.50 ± 3.46</b>	<b>17.62 ± 3.99*</b>	<b>0.0276</b>	<b>31.12 ± 3.22</b>	<b>24.12 ± 3.56</b>	<b>27.62 ± 3.98</b>	<b>14.12 ± 2.23*</b>	<b>0.0074</b>	<b>25.37 ± 3.63</b>	<b>20.62 ± 2.88</b>	<b>31.57 ± 2.26</b>	<b>17.71 ± 3.80*</b>	<b>0.0344</b>	
Células rápidas (%)	60.75 ± 6.94	42.12 ± 8.79	0.1185	<b>43.00 ± 5.11</b>	<b>43.75 ± 3.63</b>	<b>54.00 ± 5.05</b>	<b>26.62 ± 7.97*</b>	<b>0.0174</b>	<b>47.50 ± 5.07</b>	<b>35.12 ± 4.68</b>	<b>41.25 ± 5.58</b>	<b>23.37 ± 5.47*</b>	<b>0.0191</b>	<b>45.50 ± 4.89</b>	<b>35.00 ± 5.53</b>	<b>41.50 ± 7.12</b>	<b>19.37 ± 2.94*</b>	<b>0.0093</b>	<b>35.12 ± 5.49</b>	<b>29.37 ± 3.66</b>	<b>47.29 ± 3.76</b>	<b>23.71 ± 4.72*</b>	<b>0.0094</b>	
Células com média vel. (%)	12.62 ± 2.51	12.25 ± 2.22	0.9124	16.62 ± 2.55	17.75 ± 2.05	16.75 ± 2.05	14.57 ± 2.53	0.8115	18.25 ± 2.58	16.75 ± 2.11	17.87 ± 1.66	18.00 ± 2.69	0.9685	17.87 ± 1.81	19.62 ± 2.94	18.62 ± 2.69	18.62 ± 2.69	0.9714	18.37 ± 2.24	19.12 ± 1.39	17.86 ± 1.32	18.29 ± 1.19	0.9562	
Células lentas (%)	19.37 ± 2.71	22.12 ± 2.91	0.5003	25.12 ± 1.65	26.37 ± 0.86	22.50 ± 2.46	25.75 ± 4.59	0.7688	25.12 ± 2.21	30.62 ± 3.81	28.37 ± 2.76	31.25 ± 3.45	0.5103	28.62 ± 2.77	26.87 ± 2.99	27.00 ± 2.87	33.62 ± 4.13	0.4275	30.75 ± 3.56	35.12 ± 2.98	26.71 ± 2.83	31.57 ± 3.07	0.2294	
Células estáticas (%)	7.00 ± 2.79	10.50 ± 2.53	0.2696	15.37 ± 5.16	12.12 ± 5.02	6.37 ± 1.75	21.00 ± 7.22	0.5070	9.25 ± 2.99	17.25 ± 5.61	12.50 ± 3.46	20.14 ± 5.41	0.3458	<b>8.00 ± 2.43</b>	<b>9.71 ± 2.83</b>	<b>7.57 ± 2.79</b>	<b>28.25 ± 6.61*</b>	<b>0.0304</b>	15.75 ± 5.33	16.25 ± 2.83	8.29 ± 2.02	26.29 ± 3.94	0.9994	
Integridade de membrana (%)	93.62 ± 1.89	91.12 ± 1.53	0.3211	--	--	--	--	--	<b>93.00 ± 0.68</b>	<b>93.25 ± 1.08</b>	<b>93.14 ± 1.06</b>	<b>87.00 ± 1.80*</b>	<b>0.0023</b>	--	--	--	--	--	--	<b>94.62 ± 1.15</b>	<b>91.00 ± 1.31</b>	<b>93.75 ± 1.22</b>	<b>85.17 ± 2.36*</b>	<b>0.0009</b>
Integridade acrossomal (%)	94.87 ± 1.33	95.75 ± 1.45	0.6630	--	--	--	--	--	97.00 ± 1.34	94.75 ± 1.80	96.87 ± 1.08	96.37 ± 1.12	0.6347	--	--	--	--	--	--	96.00 ± 1.27	96.37 ± 1.32	97.00 ± 1.10	96.75 ± 0.98	0.9361
Índice de atividade mitocondrial	90.87 ± 1.08	89.69 ± 2.51	0.6710	--	--	--	--	--	<b>90.14 ± 2.46</b>	<b>91.64 ± 1.03</b>	<b>90.06 ± 2.09</b>	<b>82.12 ± 2.32*</b>	<b>0.0121</b>	--	--	--	--	--	--	<b>88.31 ± 1.75</b>	<b>90.25 ± 2.09</b>	<b>90.09 ± 1.08</b>	<b>83.00 ± 2.13*</b>	<b>0.0281</b>

Gráfico 5 - Resultados das irradiações das amostras seminais de galos com Led Box 660 nm na irradiância de 28.98 mW/cm<sup>2</sup> associada a 10 uM de Azul de Metileno nos 4 grupos (Controle, AM, Luz e PDT). (A) Motilidade total dos espermatozoides de galos; (B) Progressividade espermática; (C) Integridade de membrana plasmática dos espermatozoides; (D) Índice de atividade mitocondrial; (E) Integridade acrossomal. (\*) significa diferença estatística ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo controle, em cada tempo separadamente. (+) significa tendência estatística ( $0.06 \leq p \leq 0.09$ ).

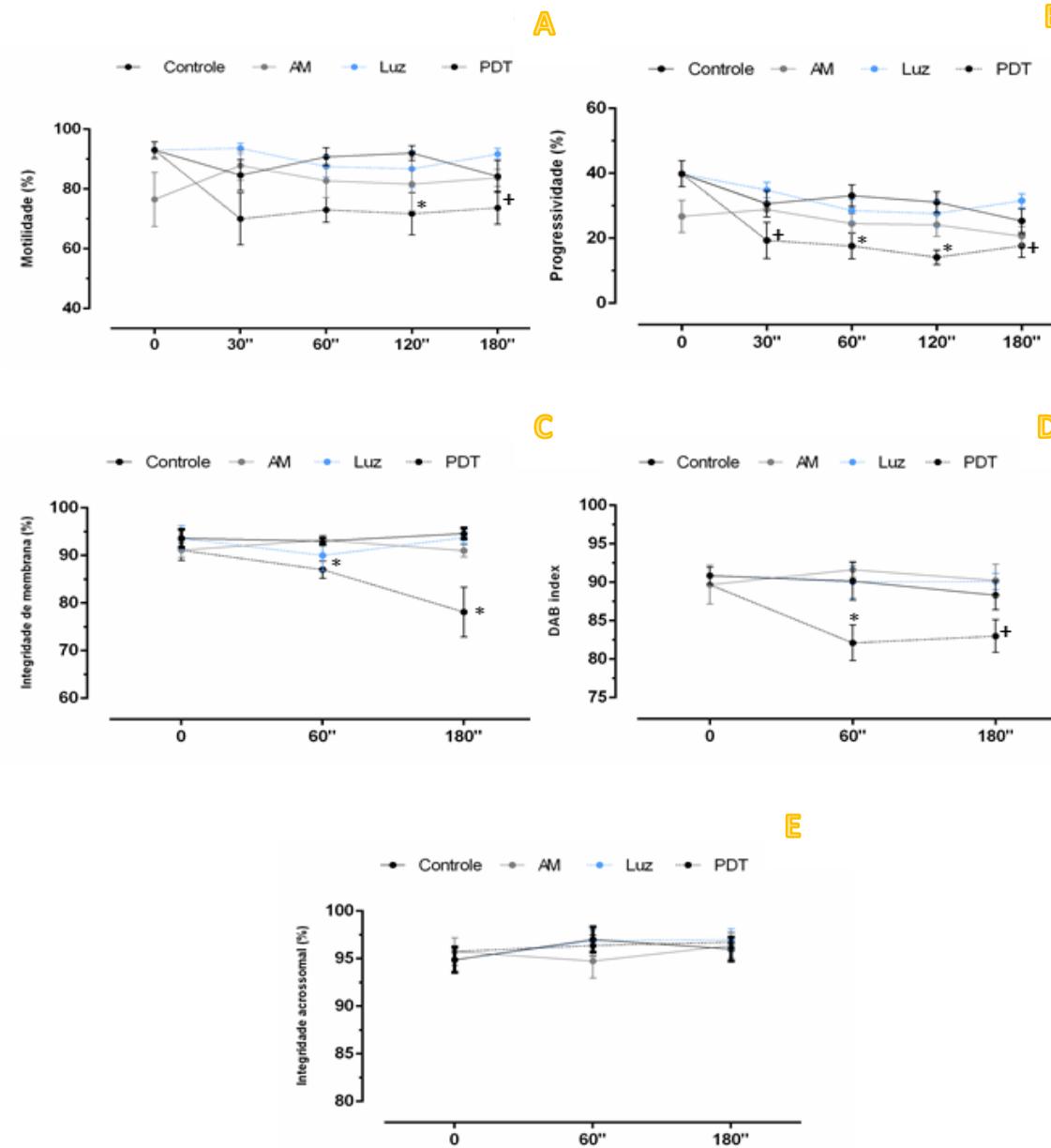
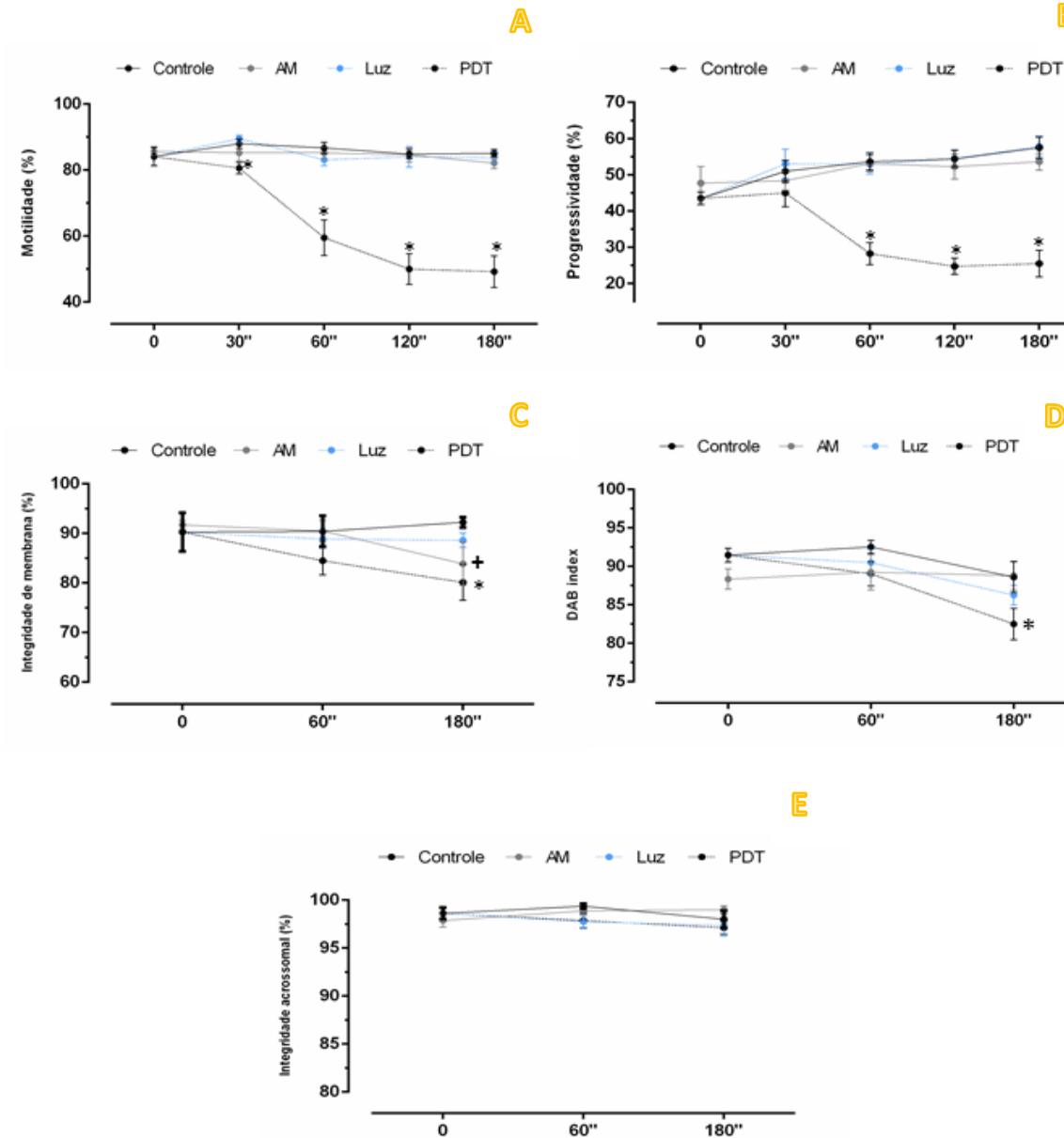


Tabela 6 - Resultados da etapa 2 referentes ao tratamento das amostras com a menor irradiância (17.35 mW/cm<sup>2</sup>). **Controle:** sem AM e sem luz; **Azul de Metileno (AM):** 10 uM de AM e sem luz; **Luz:** sem AM e 17.35 mW/cm<sup>2</sup> de luz; **Terapia Fotodinâmica (PDT):** 10 uM de AM e 17.35 mW/cm<sup>2</sup> de luz. As linhas que estão destacadas em negrito significa que foi observado efeito do tratamento pelo teste de Anova e os tratamentos que estiverem destacados com asterisco (\*) significa que foi observado diferença significativa em relação ao grupo controle pelo teste de Dunnett. O nível de significância considerado foi de 5% (p<0.05)

Tempo	0 seg.			30 seg.					60 seg.					120 seg.					180 seg.				
	Grupo	Controle	AM	P	Controle	AM	Luz	PDT	p	Controle	AM	Luz	PDT	P	Controle	AM	Luz	PDT	P	Controle	AM	Luz	PDT
Velocidade média (VAP)	108.04 ± 4.63	114.79 ± 6.10	0.3876	109.05 ± 6.14	107.41 ± 6.35	122.45 ± 5.18	108.56 ± 4.99	0.2240	<b>107.69 ± 4.57</b>	<b>108.07 ± 5.59</b>	<b>112.11 ± 4.15</b>	<b>85.95 ± 2.37*</b>	<b>0.0003</b>	<b>114.56 ± 5.23</b>	<b>107.44 ± 4.61</b>	<b>111.96 ± 3.90</b>	<b>92.39 ± 4.57*</b>	<b>0.0093</b>	<b>107.69 ± 4.57</b>	<b>108.07 ± 5.59</b>	<b>112.11 ± 4.15</b>	<b>85.95 ± 2.37*</b>	<b>&lt;.0001</b>
Velocidade retilínea (VSL)	81.80 ± 4.14	89.03 ± 7.82	0.4119	87.56 ± 4.79	84.66 ± 3.96	95.14 ± 6.04	85.26 ± 5.79	0.4759	<b>88.84 ± 4.30</b>	<b>88.45 ± 4.53</b>	<b>94.01 ± 4.26</b>	<b>70.35 ± 2.77*</b>	<b>0.0016</b>	<b>95.09 ± 5.34</b>	<b>87.79 ± 4.99</b>	<b>93.60 ± 4.23</b>	<b>77.07 ± 4.74*</b>	<b>0.0180</b>	<b>88.84 ± 4.30</b>	<b>88.45 ± 4.53</b>	<b>94.01 ± 4.26</b>	<b>70.35 ± 2.77*</b>	<b>&lt;.0001</b>
Velocidade curvilínea (VCL)	156.07 ± 5.17	158.09 ± 4.18	0.7716	154.86 ± 5.38	151.61 ± 6.25	167.11 ± 3.76	152.09 ± 3.89	0.1130	<b>151.85 ± 3.25</b>	<b>149.39 ± 3.96</b>	<b>154.44 ± 2.29</b>	<b>129.99 ± 1.86*</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>159.06 ± 3.85</b>	<b>152.64 ± 2.77</b>	<b>154.17 ± 3.24</b>	<b>133.42 ± 3.46*</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>151.85 ± 3.25</b>	<b>149.39 ± 3.96</b>	<b>154.44 ± 2.29</b>	<b>129.99 ± 1.86*</b>	<b>&lt;.0001</b>
Amplitude do desloc. linear da cabeça (ALH)	6.32 ± 0.11	6.11 ± 0.14	0.2585	6.27 ± 0.12	6.37 ± 0.15	6.37 ± 0.06	6.10 ± 0.06	0.2076	<b>6.22 ± 0.09</b>	<b>6.20 ± 0.16</b>	<b>6.14 ± 0.12</b>	<b>5.79 ± 0.08*</b>	<b>0.0191</b>	<b>6.35 ± 0.09</b>	<b>6.15 ± 0.08</b>	<b>6.27 ± 0.07</b>	<b>5.62 ± 0.11*</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>6.22 ± 0.09</b>	<b>6.20 ± 0.16</b>	<b>6.14 ± 0.12*</b>	<b>5.79 ± 0.08*</b>	<b>0.0221</b>
Frequência de batidas da cauda (BCF)	25.35 ± 1.04	25.06 ± 0.91	0.8380	24.97 ± 1.04	25.21 ± 1.06	23.09 ± 0.91	26.61 ± 0.53	0.0773	25.21 ± 0.66	24.91 ± 0.68	26.34 ± 0.58	28.37 ± 0.72	0.9796	25.81 ± 1.02	25.86 ± 0.76	25.45 ± 1.26	28.52 ± 1.02	0.1533	25.21 ± 0.66	24.91 ± 0.68	26.34 ± 0.58	28.37 ± 0.72	0.9995
Retilinearidade (STR=VSL/VAP)	74.12 ± 2.14	75.57 ± 2.66	0.6757	78.12 ± 1.19	77.50 ± 1.28	75.87 ± 2.34	76.62 ± 2.12	0.8261	80.25 ± 1.03	79.62 ± 1.21	81.37 ± 0.90	80.00 ± 1.19	0.7016	80.25 ± 1.38	79.12 ± 1.79	81.12 ± 1.96	81.12 ± 1.94	0.8372	80.25 ± 1.03	79.62 ± 1.21	81.37 ± 0.90	80.00 ± 1.19	0.2671
Linearidade (LIN=VSL/VCL)	52.00 ± 2.27	55.43 ± 3.52	0.4170	55.37 ± 1.55	54.75 ± 0.70	56.37 ± 2.81	54.87 ± 2.32	0.9384	57.50 ± 1.84	56.62 ± 1.32	59.25 ± 1.96	53.00 ± 1.50	0.0828	58.37 ± 2.03	56.50 ± 2.33	59.62 ± 2.37	55.75 ± 2.90	0.6673	<b>57.50 ± 1.84</b>	<b>56.62 ± 1.32</b>	<b>59.25 ± 1.96</b>	<b>53.00 ± 1.50*</b>	<b>0.0101</b>
Motilidade (%)	86.43 ± 1.74	85.71 ± 1.44	0.7577	<b>88.00 ± 1.43</b>	<b>87.57 ± 1.11</b>	<b>89.50 ± 1.10</b>	<b>80.62 ± 1.69*</b>	<b>0.0004</b>	<b>86.75 ± 1.72</b>	<b>85.25 ± 1.87</b>	<b>83.12 ± 1.84</b>	<b>59.50 ± 5.40*</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>84.87 ± 1.35</b>	<b>84.62 ± 2.20</b>	<b>84.00 ± 3.09</b>	<b>50.00 ± 4.70*</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>86.75 ± 1.72</b>	<b>85.25 ± 1.87</b>	<b>83.12 ± 1.84</b>	<b>59.50 ± 5.40*</b>	<b>&lt;.0001</b>
Progressividade (%)	43.50 ± 1.74	43.33 ± 2.55	0.9563	51.00 ± 3.00	48.37 ± 2.60	53.00 ± 4.05	45.00 ± 3.86	0.4001	<b>53.62 ± 2.37</b>	<b>53.12 ± 2.18</b>	<b>52.87 ± 2.63</b>	<b>28.25 ± 3.07*</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>54.37 ± 2.34</b>	<b>52.25 ± 3.45</b>	<b>54.50 ± 2.39</b>	<b>24.75 ± 2.23*</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>53.62 ± 2.37</b>	<b>53.12 ± 2.18</b>	<b>52.87 ± 2.63</b>	<b>28.25 ± 3.07*</b>	<b>&lt;.0001</b>
Células rápidas (%)	72.57 ± 1.70	72.00 ± 2.53	0.8543	<b>71.00 ± 3.82</b>	<b>68.25 ± 4.78</b>	<b>78.62 ± 1.68</b>	<b>64.75 ± 2.53*</b>	<b>0.0275</b>	<b>70.37 ± 2.64</b>	<b>71.25 ± 2.43</b>	<b>67.37 ± 3.31</b>	<b>37.25 ± 4.41*</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>71.00 ± 2.17</b>	<b>70.37 ± 1.95</b>	<b>71.25 ± 3.22</b>	<b>31.75 ± 3.31*</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>70.37 ± 2.64</b>	<b>71.25 ± 2.43</b>	<b>67.37 ± 3.31</b>	<b>37.25 ± 4.41*</b>	<b>&lt;.0001</b>
Células com média vel. (%)	3.43 ± 0.61	3.86 ± 0.59	0.6378	<b>5.62 ± 0.98</b>	<b>4.57 ± 0.97</b>	<b>2.50 ± 0.42*</b>	<b>5.25 ± 0.67</b>	<b>0.0099</b>	5.62 ± 1.07	4.75 ± 0.86	5.37 ± 0.82	7.75 ± 0.79	0.1192	5.00 ± 0.94	4.37 ± 0.53	4.12 ± 0.81	6.00 ± 0.91	0.4020	<b>5.62 ± 1.07</b>	<b>4.75 ± 0.86</b>	<b>5.37 ± 0.82</b>	<b>7.75 ± 0.79*</b>	<b>0.0199</b>
Células lentas (%)	10.62 ± 1.08	9.57 ± 1.32	0.5452	9.71 ± 1.06	9.29 ± 0.81	8.25 ± 1.03	10.75 ± 0.99	0.3400	10.87 ± 1.35	9.25 ± 1.16	8.43 ± 0.87	14.62 ± 1.25	0.9991	9.12 ± 1.04	9.62 ± 0.70	8.37 ± 1.10	11.87 ± 1.63	0.2209	10.87 ± 1.35	9.25 ± 1.16	8.43 ± 0.87	14.62 ± 1.25	0.1838
Células estáticas (%)	13.57 ± 1.74	14.29 ± 1.44	0.7577	12.00 ± 1.43	12.43 ± 1.11	10.50 ± 1.10	19.37 ± 1.69	0.4194	<b>13.25 ± 1.72</b>	<b>14.75 ± 1.87</b>	<b>16.87 ± 1.84</b>	<b>40.50 ± 5.40*</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>15.12 ± 1.35</b>	<b>15.37 ± 2.20</b>	<b>16.00 ± 3.09</b>	<b>50.00 ± 4.70*</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>13.25 ± 1.72</b>	<b>14.75 ± 1.87</b>	<b>16.87 ± 1.84</b>	<b>40.50 ± 5.40*</b>	<b>&lt;.0001</b>
Integridade de membrana (%)	84.62 ± 6.70	87.37 ± 4.42	0.8066	--	--	--	--	--	90.43 ± 3.33	90.50 ± 2.16	88.87 ± 1.84	84.50 ± 2.85	0.3184	--	--	--	--	--	<b>90.43 ± 3.33</b>	<b>90.50 ± 2.16</b>	<b>88.87 ± 1.84</b>	<b>84.50 ± 2.85*</b>	<b>0.0244</b>
Integridade acrossomal (%)	98.62 ± 0.59	97.87 ± 0.69	0.4255	--	--	--	--	--	99.37 ± 0.26	98.87 ± 0.48	97.75 ± 0.73	98.57 ± 0.37	0.1488	--	--	--	--	--	99.37 ± 0.26	98.87 ± 0.48	97.75 ± 0.72	98.57 ± 0.37	0.3914
Índice de atividade mitocondrial	91.46 ± 0.96	88.34 ± 1.32	0.0861	--	--	--	--	--	92.53 ± 0.84	89.25 ± 2.31	90.50 ± 1.69	89.04 ± 1.68	0.4659	--	--	--	--	--	<b>92.53 ± 0.84</b>	<b>89.25 ± 2.31</b>	<b>90.50 ± 1.69</b>	<b>89.04 ± 1.68*</b>	<b>0.0320</b>

Gráfico 6 - Resultados das irradiações das amostras seminais de galos com Led Box 660 nm na irradiância de 17.35 mW/cm<sup>2</sup> associada a 10 uM de Azul de Metileno nos 4 grupos (Controle, AM, Luz e PDT). (A) Motilidade total dos espermatozoides de galos; (B) Progressividade espermática; (C) Integridade de membrana plasmática dos espermatozoides; (D) Índice de atividade mitocondrial; (E) Integridade acrossomal. (\*) significa diferença estatística ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo controle, em cada tempo separadamente. (+) significa tendência estatística ( $0.06 \leq p \leq 0.09$ ).



Nas tabelas 7 e 8 encontram-se os resultados do segundo experimento desta 2ª etapa, obtidos imediatamente após as irradiações das amostras e 30 e 60 minutos depois (sob refrigeração – 4°C), com as irradiâncias de 17.35 e 28.98 mW/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Observa-se nas tabelas que, independente do momento de avaliação, os grupos PDTs apresentam resultados inferiores ao grupo controle e, na maioria das variáveis estudadas, conforme eleva-se o tempo de exposição à luz, maior a toxicidade às células espermáticas, independente da irradiância empregada. Observa-se, também, que os valores dos grupos PDTs sofrem um ligeiro decréscimo conforme eleva-se o momento de avaliação, fato que em partes está relacionado aos danos atrelados à estocagem do sêmen, visto que os resultados do grupo controle decrescem concomitantemente, mas acreditamos também estar relacionado a um efeito residual das EROS e de seus subprodutos produzidos durante a PDT. De fato, os resultados das análises repetidas no tempo, representados nas tabelas 9 e 10, demonstram que embora não exista interação estatística entre os fatores grupo (controle e PDTs) e tempo em nenhuma das variáveis estudadas, ambos os fatores isoladamente exercem uma influência negativa sobre a maioria das variáveis de cinética avaliadas, em especial sobre os padrões de velocidade e sobre a progressividade das células (tabelas 7 e 8). Isto significa dizer que os danos da PDT à cinética dos espermatozoides possuem um caráter irreversível e que o tempo de exposição à luz possui um papel determinante. Visto isso, na terceira etapa decidimos utilizar os menores tempos de exposição à luz (30 e 60 segundos) e avaliar a eficácia antimicrobiana obtida ao submeter as amostras seminais à PDT nas três irradiâncias propostas (17.35, 28.98 e 44.3 mW/cm<sup>2</sup>), dando origem aos seguintes protocolos e doses de luz:

1. Tempo de pré-irradiação de 1 min. AM 10 uM. Irradiância de 17.35 mW/cm<sup>2</sup>. Tempo de exposição à luz de 30 seg. Dose = 0.01735 (W/cm<sup>2</sup>) x 30 (seg.) = 0.52 J/cm<sup>2</sup>\*.
2. Tempo de pré-irradiação de 1 min. AM 10 uM. Irradiância de 17.35 mW/cm<sup>2</sup>. Tempo de exposição à luz de 60 seg. Dose = 0.01735 (W/cm<sup>2</sup>) x 60 (seg.) = 1.04 J/cm<sup>2</sup>\*.
3. Tempo de pré-irradiação de 1 min. AM 10 uM. Irradiância de 28.98 mW/cm<sup>2</sup>. Tempo de exposição à luz de 30 seg. Dose = 0.02898 (W/cm<sup>2</sup>) x 30 (seg.) = 0.87 J/cm<sup>2</sup>\*.
4. Tempo de pré-irradiação de 1 min. AM 10 uM. Irradiância de 28.98 mW/cm<sup>2</sup>. Tempo de exposição à luz de 60 seg. Dose = 0.02898 (W/cm<sup>2</sup>) x 60 (seg.) = 1.74 J/cm<sup>2</sup>\*.
5. Tempo de pré-irradiação de 1 min. AM 10 uM. Irradiância de 44.3 mW/cm<sup>2</sup>. Tempo

de exposição à luz de 30 seg. Dose =  $0.0443 \text{ (W/cm}^2\text{)} \times 30 \text{ (seg.)} = 1.33 \text{ J/cm}^2\text{*}$ .

6. Tempo de pré-irradiação de 1 min. AM 10 uM. Irradiância de  $44.3 \text{ mW/cm}^2$ . Tempo de exposição à luz de 60 seg. Dose =  $0.0443 \text{ (W/cm}^2\text{)} \times 60 \text{ (seg.)} = 2.66 \text{ J/cm}^2\text{*}$ .

\*[Dose = Energia/Área ( $\text{J/cm}^2$ ) = Irradiância ( $\text{W/cm}^2$ ) x tempo (seg.)]

Tabela 7 - Resultados do segundo experimento da etapa 2, referentes às Análises computadorizadas do movimento espermático (CASA) nos tempo 0, 30 e 60 minutos após submissão das amostras seminais aos seguintes tratamentos: Controle (sem AM e sem Luz); PDT 1 (AM 10  $\mu$ M + 17.35 mW/cm<sup>2</sup> por 60 seg.); PDT 2 (AM 10  $\mu$ M + 17.35 mW/cm<sup>2</sup> por 120 seg.); PDT 3 (AM 10  $\mu$ M + 17.35 mW/cm<sup>2</sup> por 180 seg.); PDT 4 (AM 10  $\mu$ M + 17.35 mW/cm<sup>2</sup> por 240 seg.)

Tempo	0 min.					30 min.					60 min.				
	Grupo	Controle	PDT 1	PDT 2	PDT 3	PDT 4	Controle	PDT 1	PDT 2	PDT 3	PDT 4	Controle	PDT 1	PDT 2	PDT 3
Velocidade média (VAP)	112.46 ± 8.69	85.93 ± 9.07	83.33 ± 5.14	77.76 ± 3.87	66.16 ± 3.40	101.33 ± 6.63	76.07 ± 1.98	79.02 ± 2.10	69.53 ± 3.53	61.52 ± 3.44	90.37 ± 3.04	73.92 ± 4.52	67.97 ± 2.85	70.16 ± 4.95	55.34 ± 2.97
Velocidade retilínea (VSL)	92.47 ± 7.47	68.11 ± 7.89	63.91 ± 4.47	62.27 ± 4.30	53.06 ± 2.79	81.17 ± 4.08	61.72 ± 1.97	62.63 ± 2.13	54.95 ± 3.64	48.93 ± 3.13	77.69 ± 3.26	59.82 ± 3.78	53.64 ± 2.52	56.14 ± 4.29	43.66 ± 2.46
Velocidade curvilínea (VCL)	155.88 ± 9.43	133.64 ± 9.47	130.71 ± 5.34	125.51 ± 4.28	111.23 ± 5.35	147.43 ± 7.39	121.63 ± 3.16	129.13 ± 2.94	119.75 ± 2.42	107.02 ± 3.70	134.29 ± 3.31	119.95 ± 5.44	117.97 ± 3.30	118.70 ± 5.97	100.16 ± 5.07
Amplitude do desloc. linear da cabeça (ALH)	5.81 ± 0.27	5.74 ± 0.15	5.64 ± 0.15	5.70 ± 0.13	5.33 ± 0.15	6.01 ± 0.19	5.77 ± 0.17	5.88 ± 0.11	5.72 ± 0.17	5.73 ± 0.19	5.54 ± 0.15	5.67 ± 0.07	5.74 ± 0.11	5.70 ± 0.14	5.44 ± 0.21
Frequência de batidas da cauda (BCF)	29.11 ± 1.24	30.06 ± 0.53	30.99 ± 0.67	31.11 ± 0.55	29.76 ± 1.46	28.47 ± 0.95	31.15 ± 0.65	31.50 ± 0.65	31.38 ± 0.32	29.37 ± 0.75	31.23 ± 0.40	30.80 ± 0.32	31.50 ± 0.25	30.73 ± 0.72	30.20 ± 0.94
Retilinearidade (STR=VSL/VAP)	80.71 ± 1.92	77.86 ± 1.94	76.00 ± 2.06	78.43 ± 1.65	79.43 ± 1.07	79.29 ± 1.47	79.67 ± 1.23	78.17 ± 0.99	78.17 ± 1.33	78.50 ± 1.23	84.14 ± 1.48	80.00 ± 0.53	78.43 ± 0.83	79.00 ± 1.21	78.43 ± 0.94
Linearidade (LIN=VSL/VCL)	58.71 ± 2.45	49.86 ± 2.52	48.43 ± 1.98	49.00 ± 1.97	47.71 ± 1.48	54.42 ± 0.78	49.67 ± 1.19	48.33 ± 0.92	46.00 ± 2.48	46.00 ± 2.09	56.43 ± 2.03	49.00 ± 1.02	46.14 ± 1.13	47.14 ± 1.43	44.71 ± 1.12
Motilidade (%)	97.00 ± 0.49	89.71 ± 3.57	88.71 ± 1.72	87.00 ± 2.91	70.71 ± 7.21	95.14 ± 0.98	78.00 ± 6.23	83.33 ± 3.20	83.17 ± 3.03	59.67 ± 6.73	87.86 ± 4.39	83.67 ± 4.97	82.71 ± 3.34	75.00 ± 5.37	63.71 ± 5.97
Progressividade (%)	64.14 ± 3.04	42.71 ± 6.78	37.29 ± 2.01	37.14 ± 3.09	23.57 ± 4.76	54.86 ± 1.28	30.17 ± 3.17	35.17 ± 2.85	25.33 ± 3.45	16.33 ± 3.08	49.71 ± 3.77	32.33 ± 3.11	27.00 ± 3.06	25.43 ± 4.16	14.14 ± 3.12
Células rápidas (%)	84.86 ± 3.86	60.14 ± 9.16	56.86 ± 4.49	50.43 ± 3.76	30.86 ± 6.42	74.00 ± 3.86	39.83 ± 4.35	47.83 ± 3.69	34.83 ± 4.27	21.17 ± 4.27	59.43 ± 5.55	41.17 ± 4.45	36.00 ± 4.29	33.14 ± 6.02	17.71 ± 3.50
Células com média vel. (%)	5.86 ± 2.75	13.00 ± 2.64	13.14 ± 2.55	15.00 ± 1.54	15.71 ± 1.42	10.14 ± 2.11	15.83 ± 0.83	13.00 ± 0.49	16.33 ± 1.21	14.00 ± 1.48	13.14 ± 1.57	16.67 ± 0.74	18.57 ± 1.64	15.00 ± 1.01	16.86 ± 1.43
Células lentas (%)	6.14 ± 1.10	16.43 ± 3.11	18.43 ± 1.95	21.57 ± 1.60	24.29 ± 3.18	11.14 ± 1.60	22.17 ± 1.62	22.33 ± 0.78	32.00 ± 3.95	24.33 ± 4.98	15.43 ± 2.21	26.17 ± 2.19	28.14 ± 3.39	26.71 ± 2.34	29.29 ± 2.96
Células estáticas (%)	3.00 ± 0.49	10.29 ± 3.57	11.29 ± 1.72	13.00 ± 2.91	29.29 ± 7.21	4.86 ± 0.98	22.00 ± 6.22	16.67 ± 3.20	16.83 ± 3.03	40.33 ± 6.73	12.14 ± 4.39	16.33 ± 4.97	17.29 ± 3.34	25.00 ± 5.37	36.29 ± 5.97

Tabela 8 - Resultados do segundo experimento da etapa 2, referentes às Análises computadorizadas do movimento espermático (CASA) nos tempo 0, 30 e 60 minutos após submissão das amostras seminais aos seguintes tratamentos: Controle (sem AM e sem Luz); PDT 1 (AM 10  $\mu$ M + 28.98 mW/cm<sup>2</sup> por 60 seg.); PDT 2 (AM 10  $\mu$ M + 28.98 mW/cm<sup>2</sup> por 120 seg.); PDT 3 (AM 10  $\mu$ M + 28.98 mW/cm<sup>2</sup> por 180 seg.); PDT 4 (AM 10  $\mu$ M + 28.98 mW/cm<sup>2</sup> por 240 seg.)

Tempo	0 min.					30 min.					60 min.				
	Grupo	Controle	PDT 1	PDT 2	PDT 3	PDT 4	Controle	PDT 1	PDT 2	PDT 3	PDT 4	Controle	PDT 1	PDT 2	PDT 3
Velocidade média (VAP)	99.56 ± 8.14	62.62 ± 3.51	63.40 ± 1.84	62.16 ± 4.72	59.68 ± 3.38	83.02 ± 5.17	58.82 ± 2.90	61.36 ± 3.83	55.16 ± 4.77	55.24 ± 4.57	69.17 ± 3.31	57.26 ± 3.95	55.82 ± 1.43	49.94 ± 3.26	49.14 ± 4.14
Velocidade retilínea (VSL)	80.38 ± 8.26	48.66 ± 2.39	47.66 ± 1.64	47.92 ± 4.36	45.46 ± 2.43	70.50 ± 5.40	45.96 ± 2.31	49.46 ± 3.93	44.62 ± 4.13	42.02 ± 3.52	56.50 ± 3.19	45.24 ± 3.23	45.66 ± 1.74	40.24 ± 2.15	37.66 ± 3.38
Velocidade curvilínea (VCL)	148.78 ± 8.43	117.62 ± 6.08	108.94 ± 3.63	106.92 ± 5.77	103.56 ± 4.32	129.32 ± 4.57	105.58 ± 5.03	103.36 ± 3.86	96.42 ± 6.16	104.24 ± 8.78	115.60 ± 4.37	102.24 ± 6.66	95.36 ± 3.95	89.22 ± 7.26	90.98 ± 6.53
Amplitude do desloc. linear da cabeça (ALH)	5.86 ± 0.15	5.70 ± 0.16	5.48 ± 0.11	5.56 ± 0.12	5.52 ± 0.14	5.40 ± 0.14	5.76 ± 0.14	5.68 ± 0.35	5.36 ± 0.18	5.94 ± 0.23	5.22 ± 0.11	5.28 ± 0.20	5.10 ± 0.23	5.38 ± 0.32	5.06 ± 0.36
Frequência de batidas da cauda (BCF)	31.20 ± 0.93	28.94 ± 2.42	27.58 ± 0.98	29.70 ± 0.74	25.80 ± 1.13	31.66 ± 0.26	28.82 ± 1.46	28.62 ± 0.84	27.04 ± 0.95	29.98 ± 0.97	31.05 ± 1.09	29.02 ± 1.47	29.06 ± 0.43	26.72 ± 2.15	25.78 ± 1.87
Retilinearidade (STR=VSL/VAP)	78.80 ± 1.66	77.00 ± 2.08	75.00 ± 1.20	77.00 ± 1.02	76.00 ± 0.28	82.80 ± 1.56	78.40 ± 0.54	79.00 ± 1.20	80.60 ± 1.12	76.80 ± 1.03	80.25 ± 1.16	78.60 ± 1.04	81.60 ± 2.32	81.20 ± 1.99	77.40 ± 1.78
Linearidade (LIN=VSL/VCL)	53.20 ± 2.67	42.00 ± 1.41	44.80 ± 1.11	45.80 ± 1.37	44.60 ± 0.83	53.20 ± 2.88	45.20 ± 1.28	47.60 ± 1.99	47.20 ± 1.88	42.60 ± 1.82	48.75 ± 2.48	45.40 ± 0.92	49.40 ± 3.23	48.00 ± 3.20	43.60 ± 1.49
Motilidade (%)	95.20 ± 1.07	65.20 ± 13.74	55.00 ± 11.75	54.20 ± 11.78	47.80 ± 10.37	87.40 ± 5.25	58.00 ± 8.39	40.60 ± 10.47	50.60 ± 6.46	49.80 ± 4.61	87.00 ± 3.39	58.80 ± 4.38	48.40 ± 9.24	48.80 ± 11.27	43.40 ± 8.36
Progressividade (%)	57.80 ± 4.37	21.40 ± 7.69	20.40 ± 7.47	19.00 ± 8.00	13.40 ± 5.45	43.40 ± 2.68	16.60 ± 4.22	12.40 ± 4.38	10.40 ± 4.20	8.00 ± 1.72	36.25 ± 1.56	13.00 ± 3.33	11.40 ± 3.13	8.20 ± 3.39	6.80 ± 3.71
Células rápidas (%)	79.60 ± 4.08	32.00 ± 11.69	28.60 ± 9.59	26.40 ± 10.41	19.40 ± 8.00	52.40 ± 5.06	22.60 ± 5.60	15.60 ± 5.49	13.00 ± 4.95	12.00 ± 2.45	45.50 ± 0.92	17.60 ± 4.57	14.00 ± 4.17	11.60 ± 5.05	9.20 ± 5.16
Células com média vel. (%)	6.20 ± 1.31	10.60 ± 1.37	10.40 ± 2.79	10.00 ± 3.03	9.20 ± 1.58	14.40 ± 1.73	14.40 ± 1.56	10.40 ± 3.16	14.60 ± 4.53	13.00 ± 2.42	21.00 ± 1.97	14.00 ± 1.29	11.40 ± 2.66	15.20 ± 3.48	10.60 ± 2.31
Células lentas (%)	9.20 ± 2.25	22.60 ± 5.70	15.80 ± 2.19	17.60 ± 3.13	19.40 ± 2.96	20.40 ± 3.22	21.00 ± 2.73	14.60 ± 2.16	23.00 ± 3.87	24.60 ± 1.69	20.50 ± 0.67	27.60 ± 1.97	23.00 ± 4.36	22.20 ± 4.70	23.60 ± 3.93
Células estáticas (%)	4.80 ± 1.07	34.80 ± 13.74	45.00 ± 11.74	45.80 ± 11.78	52.20 ± 10.37	12.60 ± 5.25	42.00 ± 8.39	59.40 ± 10.47	49.40 ± 6.46	50.20 ± 4.61	13.00 ± 3.39	41.20 ± 4.38	51.60 ± 9.24	51.20 ± 11.27	56.60 ± 8.36

Tabela 9 - Resultados das análises repetidas no tempo das variáveis de cinética espermática analisadas através do CASA, referente ao segundo experimento da etapa 2, na irradiância de 17.35 mW/cm<sup>2</sup>. O nível de significância considerado foi de 5% ( $p < 0.05$ )

<b>Variável</b>	<b>Grupo</b>	<b>Tempo</b>	<b>Grupo*Tempo</b>
Velocidade média (VAP)	<.0001	0.0054	0.9812
Velocidade retilínea (VSL)	<.0001	0.0166	0.9665
Velocidade curvilínea (VCL)	<.0001	0.0142	0.9436
Amplitude do desloc. linear da cabeça (ALH)	0.2715	0.1761	0.8500
Frequência de batidas da cauda (BCF)	0.0784	0.4596	0.6319
Retilinearidade (STR=VSL/VAP)	0.0496	0.2764	0.6153
Linearidade (LIN=VSL/VCL)	<.0001	0.2102	0.9325
Motilidade (%)	<.0001	0.0229	0.8714
Progressividade (%)	<.0001	0.0015	0.9149
Células rápidas (%)	<.0001	0.0003	0.8430
Células com média vel. (%)	<.0001	0.0028	0.0151
Células lentas (%)	<.0001	0.0008	0.1605
Células estáticas (%)	<.0001	0.0042	0.5365

Tabela 10 - Resultados das análises repetidas no tempo das variáveis de cinética espermática analisadas através do CASA, referente ao segundo experimento da etapa 2, na irradiância de 28.98 mW/cm<sup>2</sup>. O nível de significância considerado foi de 5% ( $p < 0.05$ )

<b>Variável</b>	<b>Grupo</b>	<b>Tempo</b>	<b>Grupo*Tempo</b>
Velocidade média (VAP)	<.0001	0.0063	0.8507
Velocidade retilínea (VSL)	<.0001	0.0292	0.8202
Velocidade curvilínea (VCL)	<.0001	0.0071	0.8208
Amplitude do desloc. linear da cabeça (ALH)	0.9243	0.0398	0.6151
Frequência de batidas da cauda (BCF)	0.0067	0.5494	0.1687
Retilinearidade (STR=VSL/VAP)	0.0813	0.0300	0.7105
Linearidade (LIN=VSL/VCL)	0.0046	0.7401	0.6182
Motilidade (%)	<.0001	0.3544	0.9890
Progressividade (%)	<.0001	0.0314	0.9965
Células rápidas (%)	<.0001	0.0354	0.9264
Células com média vel. (%)	0.4075	0.0210	0.1772
Células lentas (%)	0.1388	0.0488	0.5519
Células estáticas (%)	<.0001	0.1139	0.9810

### *Etapa 3: Avaliação microbiológica*

Os achados das avaliações microbiológicas (tabela 11) demonstram que, nenhuma das doses utilizadas foi eficiente na redução dos coliformes totais e das bactérias gram-negativas presentes no sêmen de galos reprodutores, apresentando padrões de contaminação bem semelhantes entre os grupos experimentais. Nas figuras 16 e 17 pode-se observar que o crescimento das colônias foi bem similar, independentemente da irradiância ou do tempo de exposição à luz utilizado. Os resultados dos parâmetros espermáticos, também apresentados na tabela 11, estão em acordo com os experimentos anteriores, reforçando que isoladamente, a luz e o fotossensibilizador na concentração de 10  $\mu\text{M}$  empregada, não causam nenhum efeito sobre as características dos espermatozoides, por outro lado, após a associação de ambos na PDT, o padrão de movimento das células passa por uma alteração significativa.

Tabela 11 - Resultados da etapa 3, referentes às Análises computadorizadas do movimento espermático (CASA) e dos cultivos microbiológicos do sêmen de galos domésticos antes (controle e Azul de Metileno) e após tratamento fotodinâmico (Luz e PDTs) por 30 e 60 segundos, nas irradiâncias de 17.35 mW/cm<sup>2</sup> (PDT1), 28.98 mW/cm<sup>2</sup> (PDT2) e 44.33 mW/cm<sup>2</sup> (Luz e PDT3). As linhas que estiverem destacadas em negrito significa que foi observado efeito do tratamento pelo teste de Anova e os tratamentos que estiverem destacados com asterisco (\*) significa que foi observado diferença significativa em relação ao grupo controle pelo teste de Dunnett. O nível de significância considerado foi de 5% (p<0.05)

Tempo	30 segundos							60 segundos						
	Grupo	Controle	Azul de Metileno (AM)	Luz (44.33 mW/cm <sup>2</sup> )	PDT 1 (17.35 mW/cm <sup>2</sup> )	PDT 2 (28.98 mW/cm <sup>2</sup> )	PDT 3 (44.33 mW/cm <sup>2</sup> )	P	Controle	Azul de Metileno (AM)	Luz (44.33 mW/cm <sup>2</sup> )	PDT 1 (17.35 mW/cm <sup>2</sup> )	PDT 2 (28.98 mW/cm <sup>2</sup> )	PDT 3 (44.33 mW/cm <sup>2</sup> )
Bactérias Totais (x 10 <sup>3</sup> UFC/ml)	256.11 ± 71.18	241.55 ± 80.45	301.67 ± 112.66	209.44 ± 58.71	277.44 ± 94.14	241.83 ± 84.43	0.9991	420.00 ± 67.25	423.33 ± 58.04	431.33 ± 51.50	388.33 ± 72.07	445.28 ± 69.10	398.00 ± 53.49	0.9934
Bactérias gram-negativas (x 10 <sup>3</sup> UFC/ml)	1.36 ± 0.52	0.80 ± 0.38	0.97 ± 0.14	0.33 ± 0.20	0.60 ± 0.34	0.31 ± 0.17	0.2073	1.86 ± 0.64	1.87 ± 0.73	2.65 ± 0.99	2.07 ± 0.87	2.21 ± 0.54	1.53 ± 0.58	0.8819
Velocidade média (VAP)	95.18 ± 4.55	73.50 ± 0.10	81.20 ± 3.68	69.48 ± 9.48	77.82 ± 8.94	72.38 ± 8.05	0.2572	<b>77.05 ± 2.48</b>	<b>76.10 ± 3.08</b>	<b>74.80 ± 3.94</b>	<b>65.13 ± 2.93*</b>	<b>59.43 ± 4.11*</b>	<b>57.52 ± 2.17*</b>	<b>0.0001</b>
Velocidade retilínea (VSL)	80.32 ± 5.56	53.35 ± 2.05	59.15 ± 1.24	55.90 ± 10.13	61.74 ± 8.08	55.42 ± 6.69	0.1914	<b>56.93 ± 2.35</b>	<b>59.13 ± 4.70</b>	<b>55.40 ± 3.67</b>	<b>49.78 ± 2.64</b>	<b>45.35 ± 3.62*</b>	<b>42.62 ± 1.58*</b>	<b>0.0028</b>
Velocidade curvilínea (VCL)	138.14 ± 5.47	121.10 ± 6.00	131.00 ± 5.51	118.66 ± 8.98	120.72 ± 10.10	118.28 ± 9.54	0.5605	<b>125.00 ± 3.21</b>	<b>121.92 ± 4.46</b>	<b>125.00 ± 4.47</b>	<b>107.03 ± 3.06</b>	<b>95.94 ± 4.25</b>	<b>102.72 ± 4.64</b>	<b>&lt;.0001</b>
Amplitude do desloc. linear da cabeça (ALH)	5.32 ± 0.12	5.25 ± 0.05	5.50 ± 0.00	5.44 ± 0.14	5.38 ± 0.16	5.42 ± 0.16	0.9480	<b>5.55 ± 0.04</b>	<b>5.52 ± 0.15</b>	<b>5.55 ± 0.08</b>	<b>5.17 ± 0.11*</b>	<b>5.27 ± 0.14</b>	<b>5.42 ± 0.12</b>	<b>0.0455</b>
Frequência de batidas da cauda (BCF)	31.54 ± 1.09	31.00 ± 1.70	31.50 ± 0.64	29.26 ± 2.13	28.50 ± 1.49	29.90 ± 1.64	0.7930	30.30 ± 0.99	28.68 ± 1.32	30.55 ± 0.59	27.13 ± 1.26	26.65 ± 1.53	27.62 ± 0.86	0.0930
Retilinearidade (STR=VSL/VAP)	83.00 ± 2.24	72.50 ± 2.50	72.50 ± 1.77	77.60 ± 3.19	78.00 ± 2.79	75.40 ± 1.29	0.1896	73.33 ± 1.11	71.75 ± 0.85	73.50 ± 1.18	76.00 ± 1.00	75.83 ± 1.58	74.00 ± 0.45	0.1271
Linearidade (LIN=VSL/VCL)	<b>57.20 ± 3.12</b>	<b>44.50 ± 3.50</b>	<b>45.50 ± 1.06</b>	<b>45.60 ± 4.48*</b>	<b>50.20 ± 3.51</b>	<b>46.60 ± 2.38</b>	<b>0.0459</b>	46.00 ± 1.65	48.83 ± 4.03	44.50 ± 1.76	46.83 ± 1.72	44.67 ± 2.35	42.17 ± 0.54	0.4684
Motilidade (%)	<b>89.00 ± 2.07</b>	<b>85.50 ± 8.50</b>	<b>85.00 ± 2.83</b>	<b>65.00 ± 5.72*</b>	<b>71.00 ± 10.38</b>	<b>60.40 ± 11.65*</b>	<b>0.0302</b>	<b>87.67 ± 1.94</b>	<b>80.67 ± 3.23</b>	<b>86.50 ± 3.65</b>	<b>70.17 ± 4.36*</b>	<b>68.50 ± 4.69*</b>	<b>65.67 ± 6.04*</b>	<b>0.0008</b>
Progressividade (%)	<b>55.80 ± 1.39</b>	<b>36.50 ± 1.50</b>	<b>37.00 ± 5.66</b>	<b>24.40 ± 8.27*</b>	<b>30.40 ± 9.22*</b>	<b>22.60 ± 7.64*</b>	<b>0.0307</b>	<b>42.00 ± 2.91</b>	<b>40.00 ± 4.48</b>	<b>39.00 ± 5.16</b>	<b>28.67 ± 3.66</b>	<b>21.17 ± 5.69*</b>	<b>17.50 ± 3.87*</b>	<b>0.0008</b>
Células rápidas (%)	<b>69.60 ± 2.84</b>	<b>62.00 ± 9.00</b>	<b>68.00 ± 4.95</b>	<b>30.60 ± 8.48*</b>	<b>40.40 ± 11.92</b>	<b>31.80 ± 10.75*</b>	<b>0.0235</b>	<b>67.83 ± 4.32</b>	<b>58.83 ± 3.47</b>	<b>61.67 ± 6.71</b>	<b>41.17 ± 5.15*</b>	<b>30.67 ± 7.71*</b>	<b>27.17 ± 5.92*</b>	<b>&lt;.0001</b>
Células com média vel. (%)	8.40 ± 1.03	9.00 ± 1.00	8.00 ± 0.71	13.60 ± 1.69	10.80 ± 2.15	8.40 ± 1.83	0.2517	<b>8.50 ± 1.09</b>	<b>10.83 ± 1.25</b>	<b>10.83 ± 1.74</b>	<b>14.17 ± 1.40*</b>	<b>18.00 ± 1.57*</b>	<b>17.50 ± 1.61*</b>	<b>0.0002</b>
Células lentas (%)	<b>11.20 ± 0.58</b>	<b>14.50 ± 1.50</b>	<b>16.00 ± 3.53</b>	<b>20.60 ± 2.80*</b>	<b>22.25 ± 1.11*</b>	<b>20.20 ± 2.08*</b>	<b>0.0002</b>	<b>11.50 ± 1.76</b>	<b>11.33 ± 0.95</b>	<b>13.67 ± 2.25</b>	<b>15.00 ± 1.53</b>	<b>19.67 ± 2.22*</b>	<b>21.17 ± 1.72*</b>	<b>0.0012</b>
Células estáticas (%)	<b>11.00 ± 2.07</b>	<b>14.50 ± 8.50</b>	<b>15.00 ± 2.83</b>	<b>35.00 ± 5.72*</b>	<b>29.00 ± 10.38*</b>	<b>39.60 ± 11.65*</b>	<b>0.0340</b>	<b>12.33 ± 1.94</b>	<b>19.33 ± 3.23</b>	<b>13.50 ± 3.65</b>	<b>29.83 ± 4.36*</b>	<b>31.50 ± 4.69*</b>	<b>34.33 ± 6.04*</b>	<b>0.0004</b>

Figura 16 - Crescimento de colônias de coliformes totais (A) e bactérias gram-negativas (B) após cultivo de amostras seminais de galos submetidas aos tratamentos: CONT 3 (Controle); AM 3 (Azul de Metileno 10 $\mu$ M); LUZ 3 (44.33 mW/cm<sup>2</sup> por 30 seg.); 3PDT1 (AM 10  $\mu$ M + 17.35 mW/cm<sup>2</sup> por 30 seg.); 3PDT2 (AM 10  $\mu$ M + 28.98 mW/cm<sup>2</sup> por 30 seg.); 3PDT3 (AM 10  $\mu$ M + 44.33 mW/cm<sup>2</sup> por 30 seg.). Utilizando o método de estria descrito por JETT et al. (1997), as gotas foram semeadas da direita para a esquerda nas diluições: 0, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 e 1/100000. À direita das figuras pode-se observar os gráficos representando o número de colônias totais e gram-negativas (UFC/ml) contabilizadas em cada grupo experimental. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística (p<0.05) entre as médias dos grupos

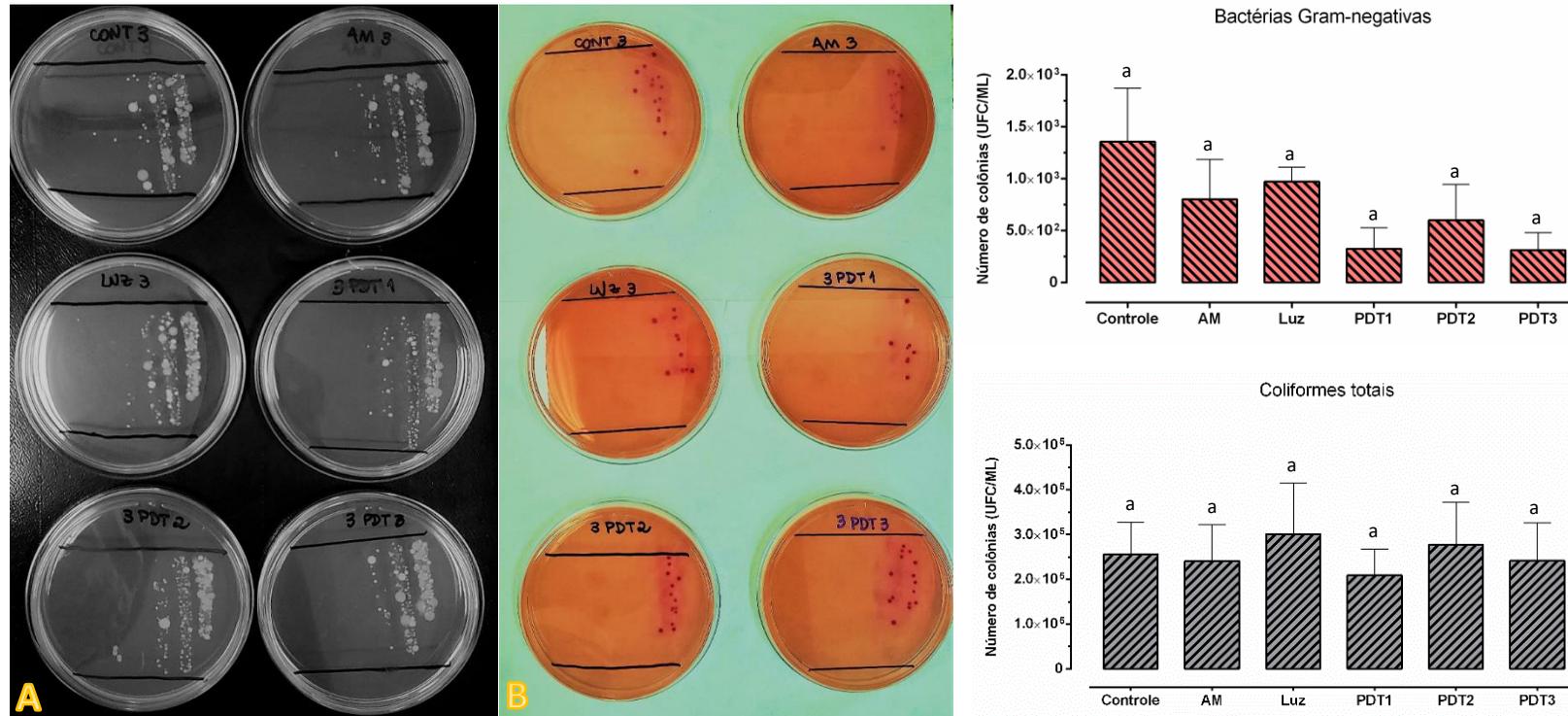
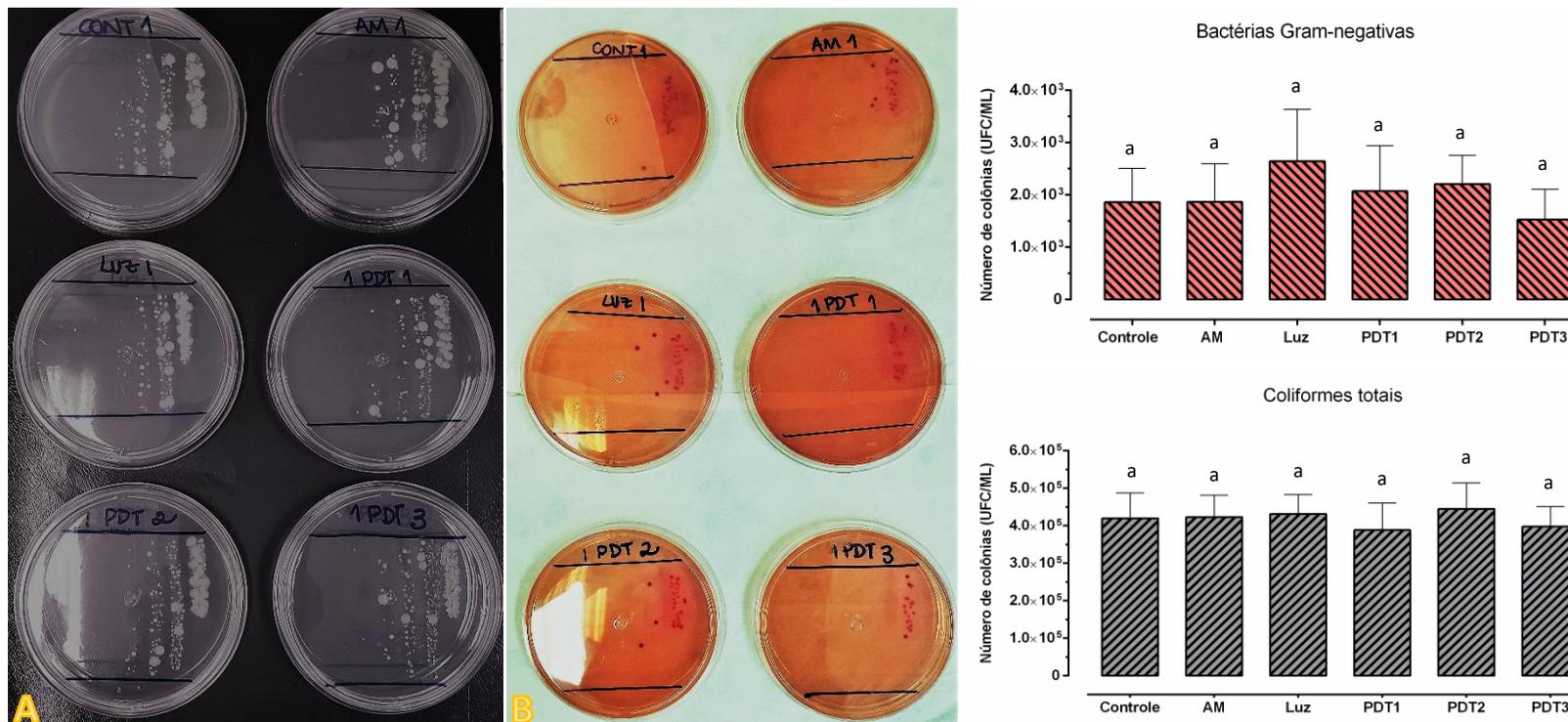


Figura 17 - Crescimento de colônias de coliformes totais (A) e bactérias gram-negativas (B) após cultivo de amostras seminais de galos submetidas aos tratamentos: CONT1 (Controle); AM1 (Azul de Metileno 10 $\mu$ M); LUZ1 (44.33 mW/cm<sup>2</sup> por 60 seg.); 1PDT1 (AM 10  $\mu$ M + 17.35 mW/cm<sup>2</sup> por 60 seg.); 1PDT2 (AM 10  $\mu$ M + 28.98 mW/cm<sup>2</sup> por 60 seg.); 1PDT3 (AM 10  $\mu$ M + 44.33 mW/cm<sup>2</sup> por 60 seg.). Utilizando o método de estria descrito por JETT *et al.* (1997), as gotas foram semeadas da direita para a esquerda nas diluições: 0, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 e 1/100000. À direita das figuras pode-se observar os gráficos representando o número de colônias totais e gram-negativas (UFC/ml) contabilizadas em cada grupo experimental. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0.05$ ) entre as médias dos grupos.



### 3.4 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

#### *1ª Etapa: Pré-irradiação*

O tempo de pré-irradiação é definido como o período entre a exposição do tecido ou célula alvo ao fotossensibilizador (no escuro) e o início das irradiações. Este período é necessário para que ocorra a difusão do fotossensibilizador através do organismo, tecidos ou células, e estudos demonstram que a eficiência da PDT é dependente do tempo de pré-irradiação utilizado (POGUE *et al.*, 2002; ANDRADE *et al.*, 2013). Alguns fotossensibilizadores, no entanto, podem apresentar citotoxicidade intrínseca, causando danos às células mesmo na ausência de luz, fazendo-se necessário um menor período de incubação. O AM vem sendo utilizado há vários anos na microbiologia e na farmacologia, desempenhando importantes funções como a de corantes em testes microbiológicos, tratamento de metahemoglobinemia e, mais recentemente, como substâncias fotossensíveis na PDT (TARDIVO *et al.*, 2005; WAINWRIGHT, 2005). Além disso, trabalhos demonstram que as concentrações de AM necessárias para a destruição de tumores ou inativação de microrganismos são significativamente menores do que aquelas causadoras de danos às células somáticas de mamíferos, como os fibroblastos, queratinócitos ou neutrófilos (SOUKOS *et al.*, 1996; HADDAD *et al.*, 1999; TANAKA *et al.*, 2012). Em relação às células espermáticas, os resultados do presente estudo demonstraram que a incubação com concentrações de AM superiores a 25  $\mu\text{M}$  são altamente tóxicas à motilidade progressiva dos espermatozoides de galos, enquanto concentrações inferiores, apesar de causar uma ligeira redução das motilidades total e progressiva, não condenam a qualidade das amostras seminais. Os resultados demonstraram, ainda, que o tempo de incubação (1 ou 5 min.) não exerce influência sobre a motilidade e a progressividade dos espermatozoides incubados com baixas concentrações de AM (5, 10, 15 e 20  $\mu\text{M}$ ). Estes resultados corroboram com os achados de Sheynkin *et al.* (1999) e Wood *et al.* (2003) em espermatozoides de humanos, os quais relatam uma redução na motilidade das células espermáticas quando incubados com altas concentrações de AM. Acreditamos que este efeito das concentrações mais elevadas do AM sobre a motilidade dos espermatozoides esteja relacionado com as características bioquímicas do fotossensibilizador. O estudo de Rashid e Horobin (1990), utilizando culturas de fibroblastos de ratos, demonstram que corantes lipofílicos e catiônicos, assim como o AM, apresentam a capacidade de ultrapassar facilmente a membrana plasmática

das células e tendem a se acumular no ambiente mitocondrial. Por sua vez, Visarius *et al.* (1997) observaram em seu estudo que concentrações de AM superiores a 5  $\mu\text{M}$  causaram um inchaço na estrutura da mitocôndria e um desacoplamento e diminuição da fosforilação oxidativa. Os espermatozoides de aves domésticas possuem de 25 a 30 mitocôndrias localizadas em sua peça intermediária, que consistem no principal local de transporte de elétrons e geração de energia para a mobilidade da célula (THURSTON; HESS, 1987; SETIAWAN *et al.*, 2020). A importância da função mitocondrial para a produção de energia e para a motilidade do espermatozoide de galos domésticos pode ser facilmente observada no estudo de Froman e Kirby (2005). Os autores demonstraram que quanto maior o número de espermatozoides com anormalidades na mitocôndria (inchaço e desorganização das cristas), menor o consumo de oxigênio e menor a motilidade e a velocidade em linha reta dos espermatozoides. Por outro lado, uma elevada integridade da estrutura e da função mitocondrial foi observada em amostras cuja a alta motilidade foi comprovada pelo CASA. Outra teoria foi proposta por Donnelly *et al.* (1997), os quais ao incubar amostras seminais de humanos em concentrações crescentes de AM (10 - 100  $\mu\text{M}$ ) observaram uma redução dose-dependente na produção de óxido nítrico (NO). Essa diminuição dos níveis endógenos de NO disponíveis para os espermatozoides, levou a uma inibição da motilidade progressiva e uma redução dos padrões de velocidades das células (VAP, VSL e VCL), indo de encontro aos nossos resultados. Devido a este efeito do AM sobre a integridade da mitocôndria e sobre a motilidade dos espermatozoides, observado neste estudo e corroborado pela literatura, optamos por utilizar inicialmente uma concentração intermediária de 10  $\mu\text{M}$  do fotossensibilizador, com o intuito de manter um equilíbrio entre inativação microbiana e sobrevivência dos espermatozoides na segunda etapa deste projeto. Quanto ao tempo de pré-irradiação, sabe-se que os microrganismos possuem um processo de absorção de moléculas menos complexo e tendem a absorver as moléculas do fotossensibilizador mais rapidamente do que as células somáticas (DAI; HUANG; HAMBLIN, 2009), portanto decidimos adotar o tempo de pré-irradiação mais curto (1 minuto), a fim de favorecer a absorção do AM pelas bactérias e minimizar a absorção pelos espermatozoides.

## 2ª Etapa: Dosimetria da luz

A dosimetria na PDT é um fenômeno complexo devido à natureza das interações dinâmicas entre luz, fotossensibilizador e oxigênio, o que varia de acordo com as características do tecido ou célula alvo (POGUE *et al.*, 2016; KIM; DARAFSHEH, 2020). Devido à ampla aplicação da PDT nas áreas da oncologia, dermatologia e odontologia, diversos ensaios clínicos vêm sendo realizados, utilizando materiais biológicos ou tecidos *ex vivo* de sangue, dente, pele, entre outros (BEN-HUR *et al.*, 1995; MOHR *et al.*, 1997; SMIJS *et al.*, 2007; DAI; HUANG; HAMBLIN, 2009), a fim de avaliar a capacidade dos diferentes fotossensibilizadores e fontes de luz interagirem com os tecidos *in vivo* e inativarem as células tumorais e os microrganismos sem acarretarem prejuízos ao tecido sadio do hospedeiro. Por outro lado, a interação entre os compostos fotoativos e as células espermáticas, bem como os efeitos ocasionados após a ativação das moléculas do fotossensibilizador pela luz são pouco conhecidos, uma vez que um único trabalho empregando a PDT em amostras seminais encontra-se disponível na literatura (EAGLESOME *et al.*, 1994). O autor investigou os fotossensibilizadores Hematoporfirina e Tiopironina quanto aos seus impactos sobre a motilidade progressiva e integridade acrossomal dos espermatozoides de bovinos após irradiação com diferentes fontes de luz. Os resultados demonstraram que a irradiação das amostras sem a presença dos fotossensibilizadores não ocasionou nenhum efeito sobre os parâmetros espermáticos avaliados, independente da fonte de luz utilizada, laser de hélio/neon (He/Ne – 632.8 nm) ou laser amarelo-verde (580 nm). Por outro lado, ao incubar os espermatozoides bovinos com Tiopironina e irradiar com luz em comprimento de onda de 580 nm (DE= 0.054, 0.135 e 0.27 J/cm<sup>2</sup>), uma redução significativa na motilidade progressiva e na integridade acrossomal dos espermatozoides foi observada. As amostras seminais associadas à Hematoporfirina e irradiadas com o laser de hélio/neon (DE = 0.068 J/cm<sup>2</sup>) apresentaram uma redução apenas na integridade acrossomal, enquanto a motilidade progressiva permaneceu inalterada. Indo de encontro aos resultados de Eaglesome *et al.* (1994), em nosso estudo, ao submeter o sêmen à luz (LedBox 660 nm) isoladamente não foi observado nenhum efeito sobre os parâmetros espermáticos avaliados. Por outro lado, ao irradiar as amostras incubadas com 10µM de AM, com exceção da dose de 0.52 J/cm<sup>2</sup> (17.38 mW/cm<sup>2</sup> por 30 segundos), a qual mostrou-se pouco deletéria aos espermatozoides, as demais doses avaliadas levaram a uma redução significativa principalmente dos parâmetros de cinética espermática, tais como os padrões de

velocidade (VAP, VSL e VCL), a frequência de batimento da cauda e as motilidades total e progressiva, danos estes que mostraram-se irreversíveis e diretamente proporcionais ao tempo de exposição à luz. A integridade da membrana plasmática e a atividade mitocondrial dos espermatozoides sofreram um ligeiro decréscimo ao se elevar os tempos de exposição à luz, independente da irradiância utilizada, todavia mesmo após 180 segundos de irradiação os valores mantiveram-se iguais ou superiores a 80%. Acreditamos que estes efeitos observados sobre a fisiologia espermática, esteja relacionado com a alta susceptibilidades dos espermatozoides às espécies reativas formadas durante o mecanismo de ação da PDT, indicando uma falha na seletividade dos protocolos utilizados. Durante a espermatogênese, as células germinativas são submetidas a um elevado grau de transformação e compactação, passando de uma célula convencional para uma célula extremamente especializada e móvel, o espermatozoide (THURSTON; KORN, 2000). No entanto, durante este processo as células germinativas perdem grande parte de seu citoplasma e de suas organelas, tornando-se conseqüentemente mais suscetíveis a bruscas alterações da homeostase celular, por exemplo ao estresse oxidativo. Os espermatozoides de aves, por sua vez, conhecidamente apresentam uma maior susceptibilidade às EROS do que os espermatozoides de mamíferos, dada a sua maior quantidade de ácidos graxos polinsaturados (PUFAs) na membrana plasmática (FUJIHARA; HOWARTH, 1978; WISHART, 1984, SURAI *et al.*, 2001; KAHN, 2011), bem como sua menor capacidade de carrear antioxidantes devido ao seu citoplasma diminuto (PARTYKA; NIZANSKI; LUKASZEWICZ, 2010; AGARWAL *et al.*, 2014; MEHAISEN *et al.*, 2020). No trabalho de Rui *et al.* (2017b) pode-se observar claramente os principais efeitos da incubação do sêmen de galos com as espécies reativas ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (espécies formadas na reação do tipo I do mecanismo de ação da PDT). Corroborando com os nossos resultados, os autores relataram uma toxicidade das espécies reativas radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), as quais impactaram os espermatozoides por vias e mecanismos diferentes. O  $\text{OH}^\cdot$  além de impactar os parâmetros de cinética (motilidade, progressividade, VCL, VAP, VSL e ALH), também comprometeu a integridade da membrana plasmática, do acrossomo e das mitocôndrias. Por outro lado, a incubação das amostras seminais com  $\text{H}_2\text{O}_2$  resultou em danos mais semelhantes aos observados em nosso estudo, alterando os parâmetros de cinética espermática (motilidade, progressividade, STR, LIN, VCL, VAP, VSL e ALH) sem condenar os resultados de integridade de membrana, acrossomo e mitocôndria. Os autores

sugerem, suportados por relatos anteriores em espermatozoides de humanos e javalis (LAMIRANDE; GAGNON, 1992; GUTHRIE; WELCH; LONG, 2008), que os impactos do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na cinética dos espermatozoides esteja relacionado a um comprometimento da funcionalidade do axonema, através da inibição da atividade de enzimas que participam do processo de produção de ATP (dineína-ATPase e enzimas glicolíticas), ou através de danos ao aparelho contrátil do flagelo. Outra hipótese para os efeitos observados em nosso estudo sobre os parâmetros espermáticos é uma absorção indesejada do AM pela mitocôndria dos espermatozoides, culminando numa produção exacerbada de EROs na matriz mitocondrial durante a PDT. Essa produção excessiva e não fisiológica de EROs no interior da mitocôndria dos espermatozoides, em especial de oxigênio singlete (produzido na reação do tipo II do mecanismo de ação da PDT), resultam na peroxidação lipídica das membranas mitocondriais, que conhecidamente pode levar a uma redução da motilidade e da viabilidade espermática em decorrência da diminuição do potencial de membrana mitocondrial interna (EVENSON; DARZYNKIEWICZ; MELAMED, 1982; WANG *et al.*, 2003; SŁOWIŃSKA *et al.*, 2018), bem como do estímulo para a produção de fatores pró-apoptóticos (p.e. enzimas caspases) (OLEINICK *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2003). Todavia, são necessárias análises mais aprofundadas para sustentar esta hipótese, visto que o teste utilizado em nosso estudo (3'3 diaminobenzidina DAB), não detectou maiores alterações na funcionalidade das mitocôndrias. Algumas das análises disponíveis são as probes fluorescentes para a avaliação do potencial de membrana e atividade mitocondrial (SHAHVERDI *et al.*, 2015; RUI *et al.*, 2017a), a quantificação indireta da peroxidação lipídica por TBARS (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979; RUI *et al.*, 2017b) e a quantificação de antioxidantes (glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase) (SURAI *et al.*, 1998; SURAI *et al.*, 2001).

### *3ª Etapa: Avaliações microbiológicas*

O potencial antimicrobiano da terapia fotodinâmica vem sendo amplamente estudado nas últimas 3 décadas, sendo empregados diferentes classes de fotosensibilizadores e distintas fontes e parâmetros de luz (SOUKOS *et al.*, 1998; SHACKLEY *et al.*, 1999; PODBIELSKA *et al.*, 2006; PILEGGI *et al.*, 2013; AURELIANO *et al.*, 2014; NASCIMENTO *et al.*, 2015; SELLERA *et al.*, 2016). Ainda que a maioria destes trabalhos tenham demonstrado a eficácia da PDT contra diversas classes de microrganismos, inclusive aqueles resistentes aos antibióticos, é importante

ressaltar que grande parte dos estudos investigou a inativação de culturas planctônicas *in vitro*, ou seja, uma suspensão contendo apenas células bacterianas em meio de cultivo celular. No presente projeto, avaliou-se a inativação de coliformes totais e bactérias gram-negativas presentes no sêmen de galos domésticos, uma amostra biológica complexa, contendo além dos microrganismos, células espermáticas envoltas por um fluido seminal composto por inúmeras biomoléculas (p.e. lipídios, vitaminas, antioxidantes...), os quais provavelmente lhe garantem propriedades diferentes de absorção do fotossensibilizador e interação com a luz, semelhante ao que ocorre por exemplo com os biofilmes (células bacterianas envoltas por uma matriz extracelular), que conhecidamente apresentam uma resistência maior à PDT quando comparados à sua forma planctônica (FONTANA *et al.*, 2009; GULÍAS *et al.*, 2020; LUKE-MARSHALL *et al.*, 2020). No trabalho de Eaglesome *et al.* (1994) pode-se visualizar claramente essa diferença na eficácia da PDT contra culturas isoladas e culturas de patógenos associados às amostras seminais de bovinos. Ao irradiar os patógenos suspensos em meio de cultivo, os autores observaram inativação dos patógenos Herpesvírus bovino tipo 1, vírus da diarreia viral bovina, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma canadense* e *Ureaplasma diversum*, independente do fotossensibilizador utilizado (hematoporfirina ou tiopironina). Já a irradiação dos patógenos suspensos nas amostras seminais foi eficiente apenas contra o Herpesvírus bovino tipo 1. Apesar dos resultados antimicrobianos pouco encorajadores, a PDT utilizando porfirinas não condenou a qualidade dos espermatozoides bovinos e um importante patógeno na bovinocultura foi inativado, indicando que a PDT pode ser uma potencial ferramenta como alternativa à antibioticoterapia. Os autores concluem que demais estudos que desenvolvam métodos de utilização desses e de outros agentes fotossensíveis para desinfecção de sêmen são extremamente relevantes. Em vista disso, em nosso estudo optamos pelo AM por ser um composto barato e acessível, duas características importantes na avicultura industrial, bem como por sua eficácia frente aos microrganismos ser amplamente comprovada em diversos estudos *in vitro* (TARDIVO *et al.*, 2005; WAINWRIGHT, 2005; FUMES *et al.*, 2018; GHORBANI *et al.*, 2018). No entanto, diferente do que esperávamos, a PDT utilizando as doses menos deletérias aos espermatozoides não se mostrou eficaz na inativação dos coliformes totais e negativos presentes no plasma seminal dos galos, sendo observados padrões de contaminação bem similar entre os grupos experimentais (controle, AM, luz e PDT). De acordo com Shi *et al.* (2019) a eficácia da PDT não depende apenas da quantidade de EROs produzidas, mas também do grau de seletividade das moléculas do fotossensibilizador em relação às

células alvo, sendo a escolha da classe do fotossensibilizador o elemento mais crítico para os autores. Os resultados das 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> etapas deste estudo sugerem fortemente uma falha na seletividade do AM frente aos coliformes presentes nas amostras seminais, o que pode estar relacionado à demasiada absorção das moléculas do fotossensibilizador pelos componentes intracelulares dos espermatozoides ou à capacidade de expulsão das moléculas de AM pelas bombas de efluxo da parede celular das bactérias presentes nas amostras seminais (KISHEN *et al.*, 2010), comprometendo assim os resultados de inativação. Visto isso, em nossa concepção, uma solução para otimizar os resultados antimicrobianos consiste ou na investigação de fotossensibilizadores mais específicos para os patógenos presentes no plasma seminal, ou a conjugação de compostos que aumentem a seletividade das moléculas do AM, por exemplo a associação das nanopartículas, dos polipeptídeos, e de proteínas que possuam como alvo receptores ausentes nos espermatozoides e presentes nas células bacterianas (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016; SHI *et al.*, 2019). De Freitas *et al.* (2018) relatam um aumento da seletividade e do potencial antimicrobiano do AM quando conjugado com peptídeos antimicrobianos (AMPs), os quais comprovadamente possuem maior afinidade por bactérias do que por células somáticas (MATSUZAKI, 2009). Outra técnica que, nas últimas décadas, vem ganhando um papel de destaque na PDT é a nanotecnologia, uma vez que a eficácia da fototerapia contra células tumorais e células bacterianas é comprovadamente otimizada quando o fotossensibilizador é associado às nanopartículas, por exemplo as nanopartículas de ouro, de sílica e os nanotubos de carbono (PLANAS *et al.*, 2015; KRAJCZEWSKI *et al.*, 2019). Os autores atribuem essa melhora na eficácia da PDT à uma maior facilidade de penetração em membranas biológicas e uma maior seletividade na produção de EROs quando as nanopartículas são associadas aos compostos fotossensíveis (CHATTERJEE; FONG; ZHANG, 2008; PERNI *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2012; HAMBLIN *et al.*, 2015). Desta forma, apesar da ineficácia antimicrobiana observada com os protocolos propostos em nosso estudo, reforçamos os resultados de Eaglesome *et al.* (1994), demonstrando que é possível a utilização da PDT em amostras seminais sem condenar a qualidade dos espermatozoides, ainda que sejam necessários estudos mais aprofundados para avaliar o comprometimento da terapia sobre a fertilidade *in vivo* das amostras. Além disso, os resultados aqui obtidos serão extremamente relevantes como um ponto de partida para novas pesquisas que busquem utilizar a PDT para o tratamento antimicrobiano do sêmen de aves e demais espécies.

### 3.5 CONCLUSÃO

- Conclui-se que o AM, em concentrações superiores a 25  $\mu\text{M}$ , apresenta elevada toxicidade à motilidade progressiva dos espermatozoides de galos mesmo na ausência de luz, enquanto em concentrações inferiores, apesar de causar certa redução das motilidades total e progressiva, não comprometem a qualidade das amostras seminais;
- Conclui-se que a associação de 10  $\mu\text{M}$  de Azul de Metileno e luz vermelha (660 nm) nas irradiâncias de 17.35, 28.98 ou 44.33  $\text{mW}/\text{cm}^2$ , durante 30 ou 60 segundos de exposição, apesar de eficientes na manutenção da qualidade dos espermatozoides de galos domésticos a níveis desejáveis, não foi eficaz na redução das bactérias presentes no plasma seminal dos mesmos;
- Por fim, conclui-se que a investigação de novas classes de fotossensibilizadores ou a conjugação de fatores que aumentem a seletividade do AM (p.e. nanopartículas ou peptídeos antimicrobianos), representa uma alternativa promissora para aumentar a eficácia da PDT no tratamento das amostras seminais.

### 3.6 AGRADECIMENTOS

Agradecemos primeiramente à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado De São Paulo (FAPESP) por todo apoio financeiro ao presente projeto, sem o qual não seria possível adquirir os insumos cruciais para o efetramento das pesquisas. À empresa Hendrix Genetics Ltda. pela doação dos dois lotes de galos utilizados neste estudo. Ao Laboratório de Lasers do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-USP), representado pela profa. Martha Símões Ribeiro, por compartilhar seu vasto conhecimento em terapias fotoinduzidas, bem como ceder o equipamento necessário para a irradiação das amostras. Agradecemos, também, ao Departamento de Reprodução Animal (VRA) e à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) por ceder toda a infraestrutura (laboratórios e equipamentos) necessária para o andamento dos experimentos.

### 3.7 REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). **Relatório Anual 2020**. São Paulo: Associação Brasileira de Proteína Animal, 2020. p. 92-107.

ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 4, p. 347-364, 2016.

AGARWAL, A.; VIRK, G.; ONG, C.; DU PLESSIS, S. S. Effect of oxidative stress on male reproduction. **The World Journal of Men's Health**, v. 32, n. 1, p. 1-17, 2014.

ALTHOUSE, G. C. Sanitary procedures for the production of extended semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 374-378, 2008.

ANDRADE, M. C.; RIBEIRO, A. P. D.; DOVIGO, L. N.; BRUNETTI, I. L.; GIAMPAOLO, E. T.; BAGNATO, V. S.; PAVARINA, A. C. Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of *Candida* spp. **Archives of Oral Biology**, v. 58, n. 2, p. 200-210, 2013.

AURELIANO, D. P.; RIBEIRO, M. S.; LINDOSO, J. A. L.; POGLIANI, F. C.; SELLERA, F. P.; SONG, D.; BAPTISTA, M. S. Treatment and control of leishmaniasis using photodynamic therapy. In: **Leishmaniasis-Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment**. IntechOpen, 2014. p. 393-412.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Iowa State University Press, 1989.

BEN-HUR, E.; GEACINTOV, N. E.; STUDAMIRE, B.; KENNEY, M. E.; HOROWITZ, B. The effect of irradiance on virus sterilization and photodynamic damage in red blood cells sensitized by phthalocyanines. **Photochemistry and Photobiology**, v. 61, n. 2, p. 190-195, 1995.

BURROWS, W. H.; QUINN, J. P. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. **Poultry Science**, v. 16, n. 1, p. 19-24, 1937.

CHATTERJEE, D. K.; FONG, L. S.; ZHANG, Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 15, p. 1627-1637, 2008.

CHELI, R.; ADDIS, F.; MORTELLARO, C. M.; FONDA, D.; ANDREONI, A.; CUBEDDU, R. Hematoporphyrin derivative photochemotherapy of spontaneous animal tumors: clinical results with optimized drug dose. **Cancer letters**, v. 23, n. 1, p. 61-66, 1984.

CIEPLIK, F.; DENG, D.; CRIELAARD, W.; BUCHALLA, W.; HELLWIG, E.; AL-AHMAD, A.; MAISCH, T. Antimicrobial photodynamic therapy - what we know and what we don't. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 571-589, 2018.

CLARKE, R. N.; SEXTON, T. J.; OTTINGER, M. A. Effects of holding temperature and storage time on respiratory rate, motility, and fertility of chicken and turkey semen. **Poultry Science**, v. 61, n. 9, p. 1912-1917, 1982.

COX, N.; STERN, N.; WILSON, J.; MUSGROVE, M.; BUHR, R.; HIETT, K. Isolation of *Campylobacter* spp. from semen samples of commercial broiler breeder roosters. **Avian diseases**, v. 46, n. 3, p. 717-720, 2002.

DAI, T.; HUANG, Y. Y.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for localized infections- state of the art. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 6, n. 3-4, p. 170-188, 2009.

DE FREITAS, L. M.; LORENZÓN, E. N.; SANTOS-FILHO, N. A.; ZAGO, L. H. P.; ULIANA, M. P.; DE OLIVEIRA, K. T.; CILLI, E. M.; FONTANA, C. R. Antimicrobial Photodynamic therapy enhanced by the peptide aurein 1.2. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-15, 2018.

DHAMA, K.; SINGH, R.; KARTHIK, K.; CHAKRABORTY, S.; TIWARI, R.; WANI, M.; MOHAN, J. Artificial insemination in poultry and possible transmission of infectious pathogens: A review. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, n. 4, p. 211-228, 2014.

DONNELLY, E. T.; LEWIS, S. E.; THOMPSON, W.; CHAKRAVARTHY, U. Sperm nitric oxide and motility: the effects of nitric oxide synthase stimulation and inhibition. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, n. 9, p. 755-762, 1997.

DONOGHUE, A.; WISHART, G. Storage of poultry semen. **Animal reproduction science**, v. 62, n. 1, p. 213-232, 2000.

DONOGHUE, A.; BLORE, P.; COLE, K.; LOSKUTOFF, N.; DONOGHUE, D. Detection of *Campylobacter* or *Salmonella* in turkey semen and the ability of poultry semen extenders to reduce their concentrations. **Poultry science**, v. 83, n. 10, p. 1728-1733, 2004.

DUMPALA, P. R.; PARKER, H. M.; MCDANIEL, C. D. The effect of semen storage temperature and diluent type on the sperm quality index of broiler breeder semen. **International Journal of Poultry Science**, v. 5, n. 9, p. 838-845, 2006.

EAGLESOME, M.; BIELANSKI, A.; HARE, W.; RUHNKE, H. Studies on inactivation of pathogenic microorganisms in culture media and in bovine semen by photosensitive agents. **Veterinary Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 277-284, 1994.

EVENSON, D. P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M. R. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. **Journal of Histochemistry and Cytology**, v. 30, p. 279-280, 1982.

FONTANA, C. R.; ABERNETHY, A. D.; SOM, S.; RUGGIERO, K.; DOUCETTE, S.; MARCANTONIO, R. C.; BOUSSIOS, C. I.; KENT, R.; GOODSON, J. M.; TANNER,

A. C. R.; SOUKOS, N. S. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. **Journal of Periodontal Research**, v. 44, n. 6, p. 751-759, 2009.

FROMAN, D. P.; KIRBY, J. D. Sperm mobility: phenotype in roosters (*Gallus domesticus*) determined by mitochondrial function. **Biology of Reproduction**, v. 72, n. 3, p. 562-567, 2005.

FUJIHARA, N.; HOWARTH, J. R. B. Lipid peroxidation in fowl spermatozoa. **Poultry Science**, v. 57, p. 1766-1768, 1978.

FUMES, A. C., DA SILVA TELLES, P. D., CORONA, S. A. M., BORSATTO, M. C. Effect of aPDT on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* present in the dental biofilm: Systematic review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 21, p. 363-366, 2018.

GHORBANI, J., RAHBAN, D., AGHAMIRI, S., TEYMOURI, A., BAHADOR, A. Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: An overview. **Laser Therapy**, v. 27, n. 4, p. 293-302, 2018.

GULÍAS, Ò.; MCKENZIE, G.; BAYÓ, M.; AGUT, M.; NONELL, S. Effective Photodynamic Inactivation of 26 *Escherichia coli* Strains with Different Antibiotic Susceptibility Profiles: A Planktonic and Biofilm Study. **Antibiotics**, v. 9, n. 3, p. 98, 2020.

GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R.; LONG, J. A. Mitochondrial function and reactive oxygen species action in relation to boar motility. **Theriogenology**, v. 70, n. 8, p. 1209-1215, 2008.

HADDAD, R.; KAPLAN, O.; BRAZOVSKI, E.; RABAU, M.; SCHNEEBAUM, S.; SHNAPER, A.; SKORNICK, Y.; KASHTAN, H. Effect of photodynamic therapy on normal fibroblasts and colon anastomotic healing in mice. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, v. 3, n. 6, p. 602-606, 1999.

HAINES, M.; PARKER, H.; MCDANIEL, C.; KIESS, A. Impact of 6 different intestinal bacteria on broiler breeder sperm motility in vitro. **Poultry science**, v. 92, n. 8, p. 2174-2181, 2013.

HAMBLIN, M. R.; CHIANG, L. Y.; LAKSHMANAN, S.; HUANG, Y. Y.; GARCIA-DIAZ, M.; KARIMI, M., RASTELLI, A. N. S.; CHANDRAN, R. Nanotechnology for photodynamic therapy: a perspective from the laboratory of Dr. Michael R. Hamblin in the Wellman Center for Photomedicine at Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School. **Nanotechnology Reviews**, v. 4, n. 4, p. 359-372, 2015.

HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 33, n., p. 67-73, 2016.

HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, v. 10, p. 809-828, 1987.

HUANG, Y. Y.; SHARMA, S. K.; DAI, T.; CHUNG, H.; YAROSLAVSKY, A.; GARCIA-DIAZ, M.; CHANG, J.; CHIANG, L. Y.; HAMBLIN, M. R. Can nanotechnology potentiate photodynamic therapy?. **Nanotechnology Reviews**, v. 1, n. 2, p. 111-146, 2012.

JETT, B. D., HATTER, K. L., HUYCKE, M. M., GILMORE, M. S. Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. **Biotechniques**, v. 23, n. 4, p. 648-650, 1997.

KHAN, R. U. Antioxidants and poultry semen quality. **World's Poultry Science Journal**, v. 67, n. 2, p. 297-308, 2011.

KIM, M. M.; DARAFSHEH, A. Light sources and dosimetry techniques for photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 96, n. 2, p. 280-294, 2020.

KISHEN, A.; UPADYA, M.; TEGOS, G. P.; HAMBLIN, M. R. Efflux pump inhibitor potentiates antimicrobial photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* biofilm. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, n. 6, p. 1343-1349, 2010.

KRAJCZEWSKI, J., RUCIŃSKA, K., TOWNLEY, H. E., KUDELSKI, A. Role of various nanoparticles in photodynamic therapy and detection methods of singlet oxygen. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 26, p. 162-178, 2019.

LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 13, n. 5, p. 379-386, 1992.

LUKE-MARSHALL, N. R.; HANSEN, L. A.; SHAFIRSTEIN, G.; CAMPAGNARI, A. A. Antimicrobial Photodynamic Therapy with Chlorin e6 Is Bactericidal against Biofilms of the Primary Human Otopathogens. **Mosphere**, v. 5, n. 4, p. e00492-20, 2020.

MARINHO, C. A. M. **Resistência a antibióticos em *Enterococcus* spp. e *Escherichia coli* de equinodermes: um problema ambiental e de saúde pública**. 2013. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2013.

MATHEW, A. G.; CISELL, R.; LIAMTHONG, S. Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 4, n. 2, p. 115-33, 2007.

MATSUZAKI, K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1788, n. 8, p. 1687-1692, 2009.

MEHAISEN, G. M.; PARTYKA, A.; LIGOCKA, Z.; NIŻAŃSKI, W. Cryoprotective effect of melatonin supplementation on post-thawed rooster sperm quality. **Animal Reproduction Science**, v. 212, p. 106238, 2020.

MOHAN, J.; SHARMA, S. K.; KOLLURI, G.; DHAMA, K. History of artificial insemination in poultry, its components and significance. **World's Poultry Science Journal**, v. 74, n. 3, p. 475-488, 2018.

MOHR, H.; BACHMANN, B.; KLEIN-STRUCKMEIER, A.; LAMBRECHT, B. Virus inactivation of blood products by phenothiazine dyes and light. **Photochemistry and Photobiology**, v. 65, n. 3, p. 441-445, 1997.

NASCIMENTO, C. L.; RIBEIRO, M. S.; SELLERA, F. P.; DUTRA, G. H. P.; SIMÕES, A.; TEIXEIRA, C. R. Comparative study between photodynamic and antibiotic therapies for treatment of footpad dermatitis (bumblefoot) in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 1, p. 36-44, 2015.

NUÑEZ, S. C.; YOSHIMURA, T. M.; RIBEIRO, M. S.; JUNQUEIRA, H. C.; MACIEL, C.; COUTINHO-NETO, M. D.; BAPTISTA, M. S. Urea enhances the photodynamic efficiency of methylene blue. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 150, n., p. 31-37, 2015.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

OLEINICK, N. L.; MORRIS, R. L.; BELICHENKO, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 1, n. 1, p. 1-21, 2002.

PARTYKA, A.; NIZAŃSKI, W.; ŁUKASZEWICZ, E. Evaluation of fresh and frozen-thawed fowl semen by flow cytometry. **Theriogenology**, v. 74, p. 1019-1027, 2010.

PERNI, S.; PROKOPOVICH, P.; PRATTEN, J.; PARKIN, I. P.; WILSON, M. Nanoparticles: their potential use in antibacterial photodynamic therapy. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 10, n. 5, p. 712-720, 2011.

PILEGGI, G.; WATAHA, J. C.; GIRARD, M.; GRAD, I.; SCHRENZEL, J.; LANGE, N.; BOUILLAGUET, S. Blue light-mediated inactivation of *Enterococcus faecalis* in vitro. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, n. 2, p. 134-140, 2013.

PLANAS, O.; BRESOLÍ-OBACH, R.; NOS, J.; GALLAVARDIN, T.; RUIZ-GONZÁLEZ, R.; AGUT, M.; NONELL, S. Synthesis, photophysical characterization, and photoinduced antibacterial activity of methylene blue-loaded amino- and mannose-targeted mesoporous silica nanoparticles. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6284-6298, 2015.

PODBIELSKA, H.; ULATOWSKA-JARZA, A.; BAUER, J.; WIELICZKO, A.; RAZIK, J.; STRĘK, W. The comparison of photodynamic activity of Photolon and Protoporphyrine on pathogenic bacteria in vitro. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, n., p. 147-151, 2006.

POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 1, p. 87-95, 1991.

POGUE, B. W.; O'HARA, J. A.; GOODWIN, I. A.; WILMOT, C. J.; FOURNIER, G. P.; AKAY, A. R.; SWARTZ, H. Tumor pO<sub>2</sub> changes during photodynamic therapy depend upon photosensitizer type and time after injection. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 132, n. 1, p. 177-184, 2002.

POGUE, B. W.; ELLIOTT, J. T.; KANICK, S. C.; DAVIS, S. C.; SAMKOE, K. S.; MAYTIN, E. V.; PEREIRA, S. P.; HASAN, T. Revisiting photodynamic therapy dosimetry: reductionist & surrogate approaches to facilitate clinical success. **Physics in Medicine & Biology**, v. 61, n. 7, p. R57, 2016.

RASHID, F.; HOROBIN, R. W. Interaction of molecular probes with living cells and tissues. Part 2. **Histochemistry**, v. 94, n. 3, p. 303-308, 1990.

REIBER, M.; MCINROY, J.; CONNER, D. Enumeration and identification of bacteria in chicken semen. **Poultry science**, v. 74, n. 5, p. 795-799, 1995.

RUI, B. R.; ANGRIMANI, D. S.; LOSANO, J. D. A.; DE CÁSSIA BICUDO, L.; NICHI, M.; PEREIRA, R. J. Validation of simple and cost-effective stains to assess acrosomal status, DNA damage and mitochondrial activity in rooster spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 187, p. 133-140, 2017a.

RUI, B. R.; SHIBUYA, F. Y.; KAWAOKU, A. J.; LOSANO, J. D.; ANGRIMANI, D. S.; DALMAZZO, A.; NICHI, M.; PEREIRA, R. J. Impact of induced levels of specific free radicals and malondialdehyde on chicken semen quality and fertility. **Theriogenology**, v. 90, p. 11-19, 2017b.

SABINO, C. P.; WAINWRIGHT, M.; RIBEIRO, M. S.; SELLERA, F. P.; DOS ANJOS, C.; DA SILVA BAPTISTA, M.; LINCOPAN, N. Global priority multidrug-resistant pathogens do not resist photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 208, p. 111893, 2020.

SCANES, C. G.; BUTLER, L. D.; KIDD, M. T. Reproductive management of poultry. In: **Animal Agriculture**. Academic Press, 2020. p. 349-366.

SELLERA, F. P.; GARGANO, R. G.; DELLA LIBERA, A. M. M. P.; BENESI, F. J.; AZEDO, M. R.; DE SÁ, L. R. M.; RIBEIRO, M. S.; DA SILVA BAPTISTA, M.; POGLIANI, F. C. Antimicrobial photodynamic therapy for caseous lymphadenitis abscesses in sheep: Report of ten cases. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 13, p. 120-122, 2016.

SETIAWAN, R.; PRIYADARSHANA, C.; TAJIMA, A.; TRAVIS, A. J.; ASANO, A. Localisation and function of glucose transporter GLUT1 in chicken (*Gallus gallus domesticus*) spermatozoa: relationship between ATP production pathways and flagellar motility. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 32, n. 7, p. 697-705, 2020.

SETLIK, J.; SILVA, R. C. O uso da terapia fotodinâmica como tratamento alternativo para o câncer de pele do tipo não-melanoma. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 7, n. 4, p. 195-206, 2016.

SHACKLEY, D. C.; WHITEHURST, C.; CLARKE, N. W.; BETTS, C.; MOORE, J. V. Photodynamic therapy. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 92, n. 11, p. 562-565, 1999.

SHAHVERDI, A.; SHARAFI, M.; GOURABI, H.; YEKTA, A. A.; ESMAEILI, V.; SHARBATOGHLI, M.; JANZAMIN, E.; HAJNASROLLAHI, M.; MOSTAFAYI, F. Fertility and flow cytometric evaluations of frozen-thawed rooster semen in cryopreservation medium containing low-density lipoprotein. **Theriogenology**, v. 83, n. 1, p. 78-85, 2015.

SHEYNKIN, Y. R.; STARR, C.; LI, P. S.; GOLDSTEIN, M. Effect of methylene blue, indigo carmine, and Renografin on human sperm motility. **Urology**, v. 53, n. 1, p. 214-217, 1999.

SHI, X.; ZHANG, C. Y.; GAO, J.; WANG, Z. Recent advances in photodynamic therapy for cancer and infectious diseases. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 11, n. 5, p. e1560, 2019.

SINGH, B.; MAL, G.; GAUTAM, S. K.; MUKESH, M. Revolutionary Reproduction Biotechnologies in Livestock: An Overview. In: **Advances in Animal Biotechnology**. Springer, Cham, 2019. p. 83–96.

SŁOWIŃSKA, M.; LISZEWSKA, E.; JUDYCKA, S.; KONOPKA, M.; CIERESZKO, A. Mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species in liquid stored and cryopreserved turkey (*Meleagris gallopavo*) spermatozoa. **Poultry science**, v. 97, n. 10, p. 3709-3717, 2018.

SMIJS, T. G.; BOUWSTRA, J. A.; SCHUITMAKER, H. J.; TALEBI, M.; PAVEL, S. A. Novel ex vivo skin model to study the susceptibility of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* to photodynamic treatment in different growth phases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 3, p. 433-440, 2007.

SOUKOS, N. S.; WILSON, M.; BURNS, T.; SPEIGHT, P. M. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. **Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery**, v. 18, n. 3, p. 253-259, 1996.

SOUKOS, N. S.; XIMENEZ-FYVIE, L. N.; HAMBLIN, M. R.; SOCRANSKY, S. S.; HASAN, T. Targeted Antimicrobial. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 10, p. 2595-2601, 1998.

SOUZA, V. L.; DE ALMEIDA, M. G. O.; SANTOS, S. O.; FONSECA, C. K. L. Avaliação da influência da radiação de diodos emissores de luz na solução fricte dopada com fotossensibilizadores de baixo custo. **Brazilian Journal of Radiation Sciences**, v. 3, n. 2, p. 1-9, 2015.

SURAI, P. F.; BLESBOIS, E.; GRASSEAU, I.; CHALAH, T.; BRILLARD, J. P.; WISHART, G. J.; CEROLINI, S.; SPARKS, N. H. Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avian semen. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 120, n. 3, p. 527–533, 1998.

SURAI, P. F.; FUJIHARA, N.; SPEAKE, B. K.; BRILLARD, J. P.; WISHART, G. J.; SPARKS, N. H. C. Polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant

protection in avian semen- Review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 14, n. 7, p. 1024-1050, 2001.

TANAKA, M.; KINOSHITA, M.; YOSHIHARA, Y.; SHINOMIYA, N.; SEKI, S.; NEMOTO, K.; HIRAYAMA, T.; DAI, T.; HUANG, L.; HAMBLIN, M. R.; MORIMOTO, Y. Optimal photosensitizers for photodynamic therapy of infections should kill bacteria but spare neutrophils. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 1, p. 227-232, 2012.

TARDIVO, J. P.; DEL GIGLIO, A.; DE OLIVEIRA, C. S.; GABRIELLI, D. S.; JUNQUEIRA, H. C.; TADA, D. B.; SEVERINO, D.; TURCHIELLO, R. F.; BAPTISTA, M. S. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 3, p. 175-191, 2005.

THURSTON, R. J.; HESS, R. A. Ultrastructure of spermatozoa from domesticated birds: comparative study of turkey, chicken and guinea fowl. **Scanning Microscopy**, v. 1, n. 4, p. 30, 1987.

THURSTON, R. J.; KORN, N. Spermiogenesis in commercial poultry species: anatomy and control. **Poultry Science**, v. 79, n. 11, p. 1650-1668, 2000.

TOMCZYK, G.; MINTA, Z. Elimination of mycoplasma from the turkey semen. **Bulletin-Veterinary Institute in Pulawy**, v. 46, n. 1, p. 11-16, 2002.

TOSTI, G.; IACOBONE, A. D.; PRETI, E. P.; VACCARI, S.; BARISANI, A.; PENNACCHIOLI, E.; CANTISANI, C. The role of Photodynamic Therapy in the Treatment of Vulvar Intraepithelial Neoplasia. **Biomedicines**, v. 6, n. 1, p. 6-13, 2018.

VISARIUS, T. M.; STUCKI, J. W.; LAUTERBURG, B. H. Stimulation of respiration by methylene blue in rat liver mitochondria. **FEBS Letters**, v. 412, n. 1, p. 157-160, 1997.

VIZZIER-THAXTON, Y.; COX, N.; RICHARDSON, L.; BUHR, R.; MCDANIEL, C.; COSBY, D.; WILSON, J.; BOURASSA, D.; ARD, M. Apparent attachment of Campylobacter and Salmonella to broiler breeder rooster spermatozoa. **Poultry science**, v. 85, n. 4, p. 619-624, 2006.

WAINWRIGHT, M. The development of phenothiazinium photosensitisers. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 4, p. 263-272, 2005.

WANG, X.; SHARMA, R. K.; GUPTA, A.; GEORGE, V.; THOMAS, A. J.; FALCONE, T. Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. **Fertility and Sterility**, v. 80, p. 844-850, 2003.

WISHART, G. J. Effects of lipid peroxide formation in fowl semen on sperm motility, ATP content and fertilising ability. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 71, p. 113-118, 1984.

WOOD, B. L.; DONCEL, G. F.; REDDY, P. R.; SOKAL, D. C. Effect of diltiazem and methylene blue on human sperm motility, viability and cervical mucus penetration:

potential use as vas irrigants at the time of vasectomy. **Contraception**, v. 67, n. 3, p. 241-245, 2003.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar dos resultados negativos de inativação microbiana, demonstramos no estudo a possibilidade do tratamento do sêmen com a PDT sem comprometer a integridade de membrana, a integridade acrossomal e a atividade mitocondrial dos espermatozoides de galos domésticos, embora análises dos impactos na fertilidade *in vivo* do sêmen sejam de extrema importância. Acreditamos que os resultados obtidos nesta dissertação serão de grande valia para novas pesquisas que busquem adaptar a PDT como uma terapia alternativa tanto para o sêmen de aves quanto de outras espécies. Em nossa compreensão, estudos mais aprofundados que investiguem a origem dos impactos negativos à cinética dos espermatozoides e pesquisas que busquem aumentar a seletividade do AM para os coliformes presentes no plasma seminal são extremamente relevantes.

#### REFERÊNCIAS

ALTHOUSE, G. C. Sanitary procedures for the production of extended semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 374-378, 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). **Relatório Anual 2020**. São Paulo: Associação Brasileira de Proteína Animal, 2020. p. 92-107. Disponível em: [https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa\\_relatorio\\_anual\\_2020\\_portugues\\_web.pdf](https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa_relatorio_anual_2020_portugues_web.pdf).

AURELIANO, D. P.; RIBEIRO, M. S.; LINDOSO, J. A. L.; POGLIANI, F. C.; SELLERA, F. P.; SONG, D.; BAPTISTA, M. S. Treatment and control of leishmaniasis using photodynamic therapy. In: **Leishmaniasis-Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment**. IntechOpen, 2014. p. 393-412.

DHAMA, K.; SINGH, R.; KARTHIK, K.; CHAKRABORTY, S.; TIWARI, R.; WANI, M.; MOHAN, J. Artificial insemination in poultry and possible transmission of infectious pathogens: A review. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, n. 4, p. 211-228, 2014.

EAGLESOME, M.; BIELANSKI, A.; HARE, W.; RUHNKE, H. Studies on inactivation of pathogenic microorganisms in culture media and in bovine semen by photosensitive agents. **Veterinary Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 277-284, 1994.

GALE, C.; BROWN, K. I. The identification of bacteria contaminating collected semen and the use of antibiotics in their control. **Poultry Science**, v. 40, n. 1, p. 50-55, 1961.

GHORBANI, J.; RAHBAN, D.; AGHAMIRI, S.; TEYMOURI, A.; BAHADOR, A. Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: an overview. **Laser Therapy**, v. 27, n. 4, p. 293-302, 2018.

HAINES, M. D.; PARKER, H. M.; MCDANIEL, C. D.; KIESS, A. S. Impact of 6 different intestinal bacteria on broiler breeder sperm motility in vitro. **Poultry Science**, v. 92, n. 8, p. 2174-2181, 2013.

HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 33, n., p. 67-73, 2016.

KHARAYAT, N. S.; CHAUDHARY, G. R.; KATIYAR, R.; BALMURUGAN, B.; PATEL, M.; UNIYAL, S.; RAZA, M.; MISHRA, G. K. Significance of artificial insemination in poultry. **Research & Reviews: Journal of Veterinary Science and Technology**, v. 5, n. 1, p. 1-5, 2016.

MAISCH, T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 14, n. 8, p. 1518-1526, 2015.

MARINHO, C. A. M. **Resistência a antibióticos em Enterococcus spp. e Escherichia coli de equinodermes: um problema ambiental e de saúde pública**. 2013. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2013.

MATHEW, A. G.; CISELL, R.; LIAMTHONG, S. Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 4, n. 2, p. 115-33, 2007.

MOHAN, J.; SHARMA, S. K.; KOLLURI, G.; DHAMA, K. History of artificial insemination in poultry, its components and significance. **World's Poultry Science Journal**, v. 74, n. 3, p. 475-488, 2018.

MOTTET, A.; TEMPIO, G. Global poultry production: current state and future outlook and challenges. **World's Poultry Science Journal**, v. 73, n. 2, p. 245-256, 2017.

NASCIMENTO, C. L.; RIBEIRO, M. S.; SELLERA, F. P.; DUTRA, G. H. P.; SIMÕES, A.; TEIXEIRA, C. R. Comparative study between photodynamic and antibiotic therapies for treatment of footpad dermatitis (bumblefoot) in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 1, p. 36-44, 2015.

O'NEILL, J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. **Review on Antimicrobial Resistance**, p. 1-16, 2016. Disponível em: [https://amr-review.org/sites/default/files/160525\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf).

PILEGGI, G.; WATAHA, J. C.; GIRARD, M.; GRAD, I.; SCHRENZEL, J.; LANGE, N.; BOUILLAGUET, S. Blue light-mediated inactivation of *Enterococcus faecalis* in vitro. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, n. 2, p. 134-140, 2013.

PODBIELSKA, H.; ULATOWSKA-JARŻA, A.; BAUER, J.; WIELICZKO, A.; RAZIK, J.; STRĘK, W. The comparison of photodynamic activity of Photolon and

Protoporphyrine on pathogenic bacteria in vitro. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, n., p. 147-151, 2006.

SABINO, C. P.; WAINWRIGHT, M.; RIBEIRO, M. S.; SELLERA, F. P.; DOS ANJOS, C.; DA SILVA BAPTISTA, M.; LINCOPAN, N. Global priority multidrug-resistant pathogens do not resist photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 208, p. 111893, 2020.

SCHULZE, M.; NITSCHKE-MELKUS, E.; HENSEL, B.; JUNG, M.; JAKOP, U. Antibiotics and their alternatives in Artificial Breeding in livestock. **Animal Reproduction Science**, p. 106284, 2020.

SELLERA, F. P.; NASCIMENTO, C. L.; RIBEIRO, M. S. Clinical Applications of Antimicrobial PDT. In: SELLERA, F. P.; NASCIMENTO, C. L.; RIBEIRO, M. S. **Photodynamic Therapy in Veterinary Medicine: From Basics to Clinical Practice**. Switzerland: Springer Nature, 2016. p. 169-196.

WILCOX, F. H.; SHORB, M. S. The effect of antibiotics on bacteria in semen and on motility and fertilizing ability of chicken spermatozoa. **American journal of veterinary research**, v. 19, n. 73, p. 945-949, 1958.