

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

André Luis Almeida Souza

**Estudo Estrutural e da Atividade Biocida da Temporizina: Um Peptídeo Híbrido com atividade antiparasitária contra o *Trypanosoma cruzi*.**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

**Orientador:** Prof. Dr. Salvatore Giovanni De Simone

**RIO DE JANEIRO**

2012

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

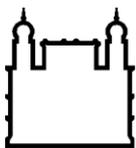
S729 Souza, André Luis Almeida

Estudo estrutural e da atividade biocida da Temporizina: um peptídeo híbrido com atividade antiparasitária contra o *Trypanosoma cruzi* / André Luis Almeida Souza. – Rio de Janeiro, 2012.  
xi, 139 f. : 25 il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2012.  
Bibliografia: f. 76-89.

1. Peptídeos antimicrobianos. 2. Temporizina. 3. Temporizina-1.  
4. *Trypanosoma cruzi*. 5. Doença de Chagas. I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**AUTOR: André Luis Almeida Souza**

**Estudo Estrutural e da Atividade Biocida da Temporizina: Um Peptídeo Híbrido  
com atividade antiparasitária contra o *Trypanosoma cruzi*.**

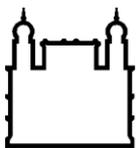
**ORIENTADOR: Prof. Dr. Salvatore Giovanni De Simone**

**Aprovada em: 29/05/2012**

**EXAMINADORES:**

**Profa. Dra Leonor Laura Leon - Presidente**  
**Profa. Dra. Kátia da Silva Calabrese.**  
**Profa. Dra. Helena Carla de Castro**  
**Profa. Dra. Solange Lisboa de Castro**  
**Prof. Dr. Heberth Leonel de Mattos Guedes**

Rio de Janeiro, 29 de Maio de 2012



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

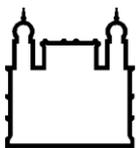
**Estudo Estrutural e da Atividade Biocida da Temporizina. Um Peptídeo Híbrido com atividade antiparasitária contra o *Trypanosoma cruzi*.**

### **RESUMO**

#### **TESE DE DOUTORADO**

André Luis Almeida Souza

Os peptídeos antimicrobianos têm se mostrado uma boa alternativa para as terapias antiparasitárias. Neste trabalho descrevemos a estrutura e a atividade biológica da temporizina (FLPLWLWLWLWKLK) e sua ação contra formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*. A temporizina é um peptídeo híbrido, sintetizado a partir de outros três peptídeos antimicrobianos: a temporina A (FLPLIGRVLSGIL-NH<sub>2</sub>), a sapecina B (KLKLLLLLKLK-NH<sub>2</sub>) e a gramicidina A (HCO-VGALAVVVWLWLWLW-NHCH<sub>2</sub>). Os efeitos da temporizina sobre o *Trypanosoma cruzi* e sua toxicidade para células de mamíferos foram analisados utilizando as metodologias de citometria de fluxo, microscopia de fluorescência e liberação da lactato desidrogenase (LDH). O valor concentração efetiva de temporizina para lisar 50% das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (EC<sub>50</sub>), foi determinado em um ensaio de viabilidade celular através do método de metabolização do brometo azul de tetrazólio (MTT). Para determinar a liberação de hemoglobina e quantificar a porcentagem de hemólise causada pela temporizina em doses letais para o *Trypanosoma cruzi*. Utilizamos o método colorimétrico. Os dados sobre a EC<sub>50</sub> e a capacidade hemolítica da temporizina foram então utilizados para a determinação do índice terapêutico do peptídeo. O mapeamento da estrutura da temporizina e a determinação de suas características foram obtidos através da metodologia de dicroísmo circular em um ambiente hidrofóbico que mimetizou as bicamadas das biomembranas. Submetemos a sequência da temporizina à plataforma *Itasser* para modelagem de proteínas e *softwares*, com o objetivo de realizar predições teóricas sobre a sua estrutura e características conformacionais. Para avaliar os efeitos da temporizina sobre a eletrofisiologia de membranas, foi usada a técnica de *Patch-Clamp* em célula inteira ou célula ligada. Essa técnica associada com experimentos envolvendo captação de corantes com diferentes valores de massa molecular permitiu determinar o limite de exclusão dos poros formados pelo peptídeo. Tendo em vista, as características estruturais e a atividade tripanocida da temporizina, concluímos que este peptídeo é uma alternativa viável para o desenho racional de um novo fármaco para o controle da doença de Chagas.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Structural Study and Biocidal Activity of Temporizin. A Hybrid Peptide with Antiparasitic Activity against *Trypanosoma cruzi***

ABSTRACT

#### **TESE DE DOUTORADO**

André Luis Almeida Souza

The antimicrobial peptides have been shown to a good alternative for the therapy antiparasites. At this work, we describe the structure and the biological activity of temporizin (FLPLWLWLWLWKLK) and its action against epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. The temporizin is a hybrid peptide, synthesized from three other antimicrobial peptides: the temporin A (FLPLIGRVLSGIL-NH<sub>2</sub>), the sapecin B (KLKLLLLLKLK-NH<sub>2</sub>) and gramicidin A (HCO-VGALAVVVWLWLW-NHCH<sub>2</sub>). The effects of temporizin over *T. cruzi* and its toxicity for the mammalian cells were analyzed using flow cytometry, fluorescence microscopy and release of lactate dehydrogenase (LDH). The value of the effective concentration of temporizin to lyse 50% of epimastigotes forms of *T. cruzi* (EC<sub>50</sub>) was determined in a cell viability assay using the method of metabolism of tetrazolium blue thiazol methyl bromide (MTT). To determine the release of hemoglobin and to quantify the percentage hemolysis caused by lethal doses temporizin *T. cruzi*, we used the method colorimetric. The data about the EC<sub>50</sub> and the hemolytic capacity of temporizin were then used to determine the peptide's therapeutic index. The mapping of the structure of temporizin and the determining the characteristics were obtained through the method of circular dichroism (CD) in a hydrophobic environment that mimicked the bilayers of membranes. We submitted the sequence of the platform itasser and software for modeling proteins, with the purpose to make of theoretical predictions about the structure and conformational characteristics. To evaluate the effect of temporizin over membrane electrophysiology, was used the technique of patch-clamp in a whole cell or attached cell form. This technique associated with experiments involving uptake of dyes with different molecular mass values, allowed to determine the exclusion limit of the pores formed by the peptide. Given the structural characteristics and trypanocidal activity of temporizin, we concluded that this peptide is a viable alternative to the rational design of a new drug for the control of Chagas disease.

À Silene, pelos momentos subtraídos...

## **Agradecimentos**

Ao meu Orientador Dr. Salvatore Giovanni De Simone, que durante este trabalho e os anos de convívio sempre mostrou exemplos de amizade, de positivismo e alto grau de profissionalismo. Não conheci ainda, pessoa com tamanho espírito científico, aliado a um grande censo de cidadania e respeito ao patrimônio público.

Ao grande colaborador Dr. Robson Xavier Faria, pelo seu empenho e auxílio nos principais experimentos deste trabalho. Os quais foram imprescindíveis.

Ao Dr. Luiz Anastácio Alves por ter cedido à estrutura e instalações do Laboratório de Comunicação Celular e por ter sido um observador atento e cuidadoso do desenvolvimento do trabalho experimental.

A estudante de iniciação científica, bacharelado Bianca ..... pela ajuda com as culturas de parasitas.

Ao grande amigo Sr Genival Alves de Souza, pela ajuda incondicional com as culturas de parasitas.

Aos estudantes de iniciação científica do Laboratório de Comunicação Celular: Sr Leonardo Braga, Sr Leonardo Mendonça e Sr Dinard pela cessão das células de linhagem.

Ao querido amigo Dr. Hebert Leonel Guedes pelo auxílio com os estudos estruturais da temporizina e pelos esclarecimentos de dúvidas, de forma muito solícita quando requisitados.

A querida amiga Antônia Lúcia dos Santos pelo encorajamento e auxílio nas horas de dificuldades.

A minha querida esposa Professora e Historiadora Silene Orlando Ribeiro, pela compreensão em todos os momentos de fraqueza, de ausências e de dificuldades. Sempre se superando como uma grande companheira.

A minha querida e saudosa mãe D<sup>a</sup>. Maria da Penha (da Penha), que de onde estiver deve estar feliz por mais esta grande conquista.

A minhas irmãs Jaqueline e Úrsula, pelo encorajamento.

Aos meus colegas do Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos; Dr. Floriano Paes da Silva Jr; Dr<sup>a</sup>. Patrícia, Dr<sup>a</sup>. Adriana; Dr<sup>a</sup> Bruna; Dr. Mário; Dr<sup>a</sup> Alba; Biomédico Luiz André; Biomédica Paloma Pego Napoleão; Bióloga Verônica; Bióloga Carolina.

A Dona Maria por sua atenção velada e constante, cuidando sempre para que minha vida seja um jardim de rosas.

A minha querida madrinha Estelita que sempre está na torcida e sempre está ao meu lado em momentos difíceis.

Se vi mais longe do que outros, é  
porque estava apoiado nos  
ombros de gigantes.

*Sir Isaac Newton, Séc. XVII*

## **Lista de Abreviações**

Bz – Benznidazol.

D-PBS - Dulbecco com PBS

EPC - Ensaio de Permeabilização celular.

FACS - Citometria de Fluxo.

Gra-A – Gramicidina A

LIT - Liver Infusion Tryptose

MCFLU - Microscopia de Fluorescência.

MTT - metilbrometo de tiazolil azul de tetrazolio

PAM – Peptídeos antimicrobiano.

PI - Iodeto de propídeo.

SDS - Dodecil sulfato de sódio.

TFE - Tri- flúor-Etanol

Tp – Temporina A.

Tx - 100 – Triton X – 100.

Tz – Temporizina.

Tz-1 – Temporizina 1.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b>	Áreas de prevalência da Doença de chagas aguda nos últimos 10 anos.	Página 3
<b>Figura 2</b>	Prevalências das formas de transmissão de doença de Chagas nos últimos 10 anos.	Página 4
<b>Figura 3</b>	Rotas de migração da América Latina e o número estimado de indivíduos infectados com o <i>T. cruzi</i>	Página 4
<b>Figura 4</b>	Esquema dos mecanismos mais frequentes de interação de PAMs com biomembranas.	Página 18
<b>Figura 5</b>	Modelos esquemáticos dos dímeros estruturais e modelo de inserção em membrana da estrutura dimérica da Gra-A	Página 23
<b>Figura 6</b>	Fórmula estrutural da Tz	Página 39
<b>Figura 7</b>	Fórmula estrutural da Tz-1	Página 39
<b>Figura 8</b>	Predição das características físico-químicas de Tz.	Página 40
<b>Figura 9</b>	Espectro de dicroísmo circular de Tz.	Página 41
<b>Figura 10</b>	Estrutura 3D da Tz	Página 42
<b>Figura 11</b>	Projeção de inserção em membrana da Tz	Página 43
<b>Figura 12</b>	Efeito de Tz em <i>T. cruzi</i> .	Página 45
<b>Figura 13</b>	Efeito temporal de Tz e Gra-A em <i>T. cruzi</i>	Página 47
<b>Figura 14</b>	Atividade antimicrobiana dose dependente da Tz em <i>T. cruzi</i>	Página 49
<b>Figura 15</b>	Efeito da Tz sobre cultura de células J774.	Página 51
<b>Figura 16</b>	Efeito de Tz-1 sobre <i>T. cruzi</i> .	Página 53
<b>Figura 17</b>	Estudo dos efeitos da Tz-1 sobre cultura de células J774 e GH3 utilizando MCFLU	Página 55
<b>Figura 18</b>	Estudo dos efeitos da Tz sobre células de mamíferos por liberação de LDH.	Página 57
<b>Figura 19</b>	Comparação da atividade hemolítica da temporizina e da gramicidina A.	Página 58
<b>Figura 20</b>	EC50 de Tz sobre as formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .	Página 59
<b>Figura 21</b>	Efeitos da Tz Sobre a eletrofisiologia de membranas.	Página 60
<b>Figura 22</b>	Efeitos da Tz-1 Sobre a eletrofisiologia de membranas.	Página 61
<b>Figura 23</b>	Tz forma poros em células HEK 293.	Página 63
<b>Figura 24</b>	Tz-1 forma poros de maneira concentração dependente em células HEK 293.	Página 65
<b>Figura 25</b>	A temporizina induz a captação de corante pela célula.	Página 66

## Lista de Tabelas

- Tabela 1** - Composição química da membrana plasmática das formas epimastigotas de *T. cruzi*: Extraído de Franco daSilveira & Colli, 1981. ....Página 9
- Tabela 2** - Fosfolipídios presentes na membrana de *T. cruzi*: Extraído de Franco da Silveira & Colli, 1981. ....Página 9
- Tabela 3** - Relação de Temporinas já descritas em literatura. ....Página 22
- Tabela 4** - Sequências da Temporizina, Temporizina-1 e dos peptídeos utilizados do design racional da molécula. ....Página 38

## Sumário

### Capítulo 1 – Introdução

1.1 O <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	1
1.2 Ultraestrutura do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	1
1.2.1 A superfície do <i>T. cruzi</i> .....	1
1.2.3 Estrutura do flagelo.....	4
1.2.4. Organização Interna.....	4
Ultraestrutura do citoesqueleto.....	4
Complexo cinetoplasto-mitocôndria.....	5
Glicossomo.....	5
Acidocalcisomo.....	6
Vacúolo contrátil.....	6
Inclusões lipídicas.....	7
Organelas da via secretória.....	7
Organelas da via endocítica.....	8
Núcleo.....	8
<b>Capítulo 2 A doença de Chagas</b> .....	8
2.1 Aspectos epidemiológicos.....	9
2.2 Quimioterapia anti-chagásica.....	12
<b>Capítulo 3 – Peptídeos Antimicrobianos</b>	
3.1. Características gerais.....	16
3.2. Temporinas.....	21
3.3. Gramacidina-A.....	25
3.4. Sapecina B.....	26
3.5. Temporizina.....	27
<b>Capítulo 4. Justificativa</b> .....	29
<b>Capítulo 5. Objetivos</b> .....	29
5.1. Objetivos específicos.....	29
<b>Capítulo 6. Material e Métodos</b>	
6.1. Métodos de Estudo da Atividade Antimicrobiana.....	30
6.1.1. Cultivo de Parasitas.....	30
6.1.2. Ensaio de Atividade lítica com o metilbrometo de tiazolil azul de tetrazolio (MTT).....	30
6.1.3. Análise da Atividade Tripanocida.....	30

6.1.3a. Por fluorescência.....	31
6.1.3b. Por Citometria de Fluxo.....	31
6.2. Ensaio de toxicidade da Temporizina.....	31
6.2.1. Macrófagos peritoneais murinos.....	32
6.2.2. Células de Linhagem Contínua.....	32
6.2.3. Toxicidade Hemolítica.....	33
6.3. Síntese de Peptídeos.....	33
6.4. Cromatografia Líquida alta performance.....	34
6.5. Espectrometria de massas.....	34
6.6. Estudos sobre Eletrofisiologia de Biomembranas.....	34
6.7. Medidas da formação de canais dos peptídeos em Célula Inteira.....	36
6.8. Controle do Potencial de Membrana no Modo Célula Ligada.....	37
6.9. Estudo de Dicroísmo circular.....	37
6.10. Cálculos Estruturais.....	37
<b>Capítulo 7 – Resultados.....</b>	<b>38</b>
<b>Capítulo 8 – Discussão.....</b>	<b>67</b>
<b>Capítulo 9 – Conclusão.....</b>	<b>75</b>
<b>Capítulo 10 - Referências Bibliográficas .....</b>	<b>76</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>90</b>

## 1. Introdução

### 1.1 - O *Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma cruzi* é um protozoário, pertencente ao filo Mastigophora, ordem Kinetoplastida. Ele é o agente etiológico da doença de Chagas, enfermidade negligenciada que atinge milhões de indivíduos nas Américas e nos últimos anos vem se tornando um sério problema de saúde pública em países não endêmicos como os Estados Unidos, os países da Ásia e Europa. O *T.cruzi* tem um ciclo biológico complexo, envolvendo hospedeiros vertebrados e invertebrados, assim como diferentes formas morfológicas com fisiologia muito particular. No hospedeiro invertebrado, observamos as formas epimastigota e tripomastigota metacíclica, enquanto que no vertebrado, vemos a forma tripomastigota na corrente sanguínea e a amastigota no interior de células como: fibras musculares e macrófagos, onde ocupam um vacúolo parasitóforo (Brenner, 1973; Araujo et al., 2009; Clayton, 2010).

### 1.2 - Ultraestruturas do *Trypanosoma cruzi*

#### 1.2.1 - Superfície de *Trypanosoma cruzi*

A membrana plasmática do *T.cruzi* possui de 8 a 10nm e recobre toda a superfície do parasita, o flagelo e toda a bolsa flagelar. Cerca de 8nm abaixo da membrana pode-se observar uma fina camada de microtúbulos que se prolonga em todo o corpo celular. Observamos também na superfície do *T.cruzi*, uma depressão em forma de funil e alinhada pela membrana plasmática denominada citóstoma. Esta estrutura é fechada em direção ao ponto de localização do complexo de Golgi. As formas epimastigotas apresentam partículas intramembranas em toda a extensão da membrana, mas que estão ausentes no citóstoma e na bolsa flagelar (De Souza et al., 1978). Estas partículas intramembranas, são irregulares quando observadas em microscopia eletrônica de transmissão.

A membrana flagelar é estruturalmente diferente da membrana plasmática. Também foram observadas diferenças estruturais na composição química de vesículas de membrana

quando estas foram induzidas por estimulação química (De Souza et al., 1978; Franco da Silveira & Colli, 1981). Quanto à composição química, a membrana de epimastigotas é formada por uma bicamada lipídica, onde estão inseridas proteínas integrais e periféricas. Encontramos ainda uma molécula polimérica, formada por 60% de carboidratos neutros, 12,6% de Lipídeos, 9,5% de proteínas e os 17,9% restantes constituído de Lipopeptídeofosfoglicano (LPFG) (Lederkremer et al., 1977; 1993; Franco da Silveira & Colli, 1981; De Souza, 1995). Não foram encontrados traços de fosfatidilserina em nenhuma das porções da membrana plasmática ou nas membranas de organelas da forma epimastigota. Fosfatidiletanolamina é majoritário na composição da membrana seguido de fosfatidilcolina (Franco da Silveira & Coli, 1981). A composição química geral da membrana de epimastigotas está demonstrada nas tabelas 1 e 2.

A composição química da membrana plasmática das formas tripomastigotas e amastigotas tem diferenças insignificantes em relação à composição lipídica da membrana da forma epimastigota. No entanto, o perfil protéico é bastante característico de cada uma das formas evolutivas de *T. cruzi* (De Souza, 1995, Tyler et al., (2008).

Tabela 1 - Composição química da membrana plasmática das formas epimastigotas de *T. cruzi*: Extraído de Franco da Silveira & Colli, 1981.

Molécula	Concentração na Membrana Plasmática (mg/100mg de peso seco total)
Proteína	31,3 (30,0 - 32,0)
Carboidrato	16,4 (13,6 - 19,4)
Lipídeo	34,2 (33,0 - 35,0)
DNA	0,0
RNA	0,0
Fósforo total	1,0 (0,9 - 1,1)
Lipopeptídeofosfoglicano	3,2 (3,1 - 3,3)
Fosfolipídio	7,5 (7,0 - 8,0)
Esterol	9,2 (7,9 - 9,9)
Carboidratos ligados a Lipídeos	2,1
Fósforo ligado a Fósforo	0,3

Tabela 2 - Fosfolipídios presentes na membrana de *T. cruzi*: Extraído de Franco da Silveira & Colli, 1981.

Fosfolipídio	Concentração na Membrana Plasmática (mg/100mg de peso seco total)
Lisofosfatidilcolina	13,4 (11,6 - 15,2)
Esfingomielina	Traços
Fosfatidilcolina	11,4 (9,1 - 16,1)
Fosfatidiletanolamina	44,4 (45,1 - 47,1)
Lisofosfatidiletanolamina	6,0 (5,8 - 6,2)
Fosfatidilinositol	3,9 (3,5 - 4,5)
Ácido fosfatídico	Traços
Cardiolipina	10,9 (10,4 - 11,4)
Não Identificados	10,9 (10,7 - 11,0)

### 1.2.3 - Estrutura do Flagelo

A estrutura do flagelo é formada por um conjunto de nove pares de microtúbulos periféricos e um par de microtúbulos central. Estudos de microscopia eletrônica mostraram que existe uma particularidade na estrutura flagelar das formas epimastigotas de *T. cruzi*. Foi observada uma estrutura cilíndrica e filamentosa denominada vara paraaxial ou vara paraflagelar (Portman & Gull, 2010). Esta estrutura é constituída por um arranjo complexo de filamentos que se ligam ao axonema e está dividida em duas regiões: uma proximal e outra distal em relação a esta organela. A região proximal é formada por duas placas e a distal é composta por várias placas. O eixo paraflagelar é formado por várias proteínas que ainda não estão caracterizadas, com exceção de duas altamente antigênicas de 73kDa e 79kDa, denominadas PFR1 e PFR2, respectivamente. Utilizando microscopia eletrônica de força atômica em combinação com técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e escaneamento espectroscópico, foram mostradas algumas outras particularidades na estrutura íntima do flagelo de epimastigotas como uma cavidade sutil que separa o flagelo da região paraflagelar que não são encontradas nas outras duas formas evolutivas do *T. cruzi* (De Souza, 2002, 2009; Rocha et al., 2008).

### 1.2.4 - Organização Interna

#### Ultraestrutura do Citoesqueleto

Embora sejam encontrados genes responsáveis pela expressão de moléculas de actina e proteínas ligantes de actina, ainda não foi observada a presença de microfilamentos no citoplasma em nenhum dos estágios do *T. cruzi*. Existem evidências de um complexo actina - miosina que deve ter importância para a fisiologia do citóstoma e da citofaringe, observados nas formas epimastigotas (De Melo et al., 2008). Por outro lado, a presença de uma rede de microtúbulos é visualizada em todas as formas evolutivas do *T. cruzi*, sendo separada da membrana plasmática por uma distância de 12nm e de outras organelas por uma distância de

cerca de 44nm; além de ter sido observado que o retículo endoplasmático possui porções que estão entre microtúbulos e abaixo destes (De Souza, 2009).

#### Complexo Cinetoplasto - Mitocôndria

O cinetoplasto está situado perto do núcleo e sua forma e organização estrutural variam de acordo com a forma evolutiva do *T. cruzi*. A estrutura eletrodensa do cinetoplasto deve-se à presença de DNA. Atualmente, alguns autores registraram a presença de proteínas neutras que se ligam ao kDNA e parecem ter o mesmo papel das histonas nucleares, eliminando a influência das cargas negativas do DNA sobre a organização da organela. O cinetoplasto geralmente está localizado próximo ao corpo basal, dando a indicação de origem do flagelo, uma vez que um grupo especial de microfilamentos liga o cinetoplasto ao corpo basal. Dois tipos de anéis de DNA estão presentes no cinetoplasto: os minicírculos que variam entre 0,5 e 2,5kb e os maxi círculos que variam entre 20 e 40kb. Os maxi círculos são estruturalmente e funcionalmente análogos ao DNA mitocondrial dos eucariotos superiores que codificam rRNA e as subunidades do complexo respiratório (De Souza, 2009).

#### Glicossomo

A observação de cortes das formas epimastigotas de *T. cruzi* mostra a presença de organelas esféricas com matriz homogênea revestida por uma biomembrana de composição característica onde ocorrem alguns processos metabólicos como: glicólise, fixação de dióxido de carbono, reciclagem de purinas, biossíntese de pirimidina, alongamento de ácidos graxos, biossíntese de isoprenóides e biossíntese dos esteróis. Embora tenha um interessante arsenal protéico, o glicossomo não possui genoma isolado e todas as suas proteínas são codificadas por genes nucleares, traduzidos em ribossomos livres e pós-traducionalmente importados para a organela. (De Souza, 2009).

## Acidocalcismo

O acidocalcismo é uma organela de aspecto vacuolar com depósitos eletrodensos que anteriormente eram identificados como grânulos de volutina (Seufferheld et al., 2009). Esta organela é capaz de fazer transporte de prótons e cálcio (Docampo et al., 2005). Por mapeamento de raios X. Miranda e colaboradores em 2000 demonstraram que os depósitos eletrodensos são compostos de cálcio, fósforo, potássio, sódio e zinco.

Os acidocalcismos parecem estar envolvidos nos processos fisiológicos como o armazenamento de cálcio, magnésio, sódio, potássio, zinco, ferro e fósforo compostos, especialmente de pirofosfato inorgânico e polifosfato, homeostase do pH e osmorregulação. Foi observado ainda que esta organela tem uma estreita associação com o vacúolo contrátil (De Souza, 2009).

## Vacúolo Contrátil

O vacúolo contrátil é uma estrutura pouco observada em tripanosomatídeos. No entanto, as formas epimastigotas de *T. cruzi* apresentam um vacúolo contrátil junto à bolsa flagelar que é formada por um feixe de microfilamentos que ajuda na contratilidade da organela. Montalvetti e colaboradores (2004) demonstraram a presença de aquaporina nas formas epimastigotas nas membranas do vacúolo contrátil e do acidocalcismo, o que reforça o papel destas organelas na osmorregulação. Foi observado também por Rohloff e Docampo (2008) que a osmorregulação está diretamente ligada à fusão do vacúolo contrátil com o acidocalcismo, um processo que ocorre com mediação do AMP cíclico (De Souza, 2009).

## Inclusões Lipídicas

Existem muito poucas informações sobre a importância fisiológica ou metabólica de inclusões lipídicas em *T. cruzi*. Vários autores descreveram estruturas vesiculares circundadas

por uma monocamada de lipídeos anfipáticos quando vários estágios evolutivos de *T. cruzi* foram submetidos ao método clássico de microscopia eletrônica de transmissão (MET). No entanto, parecem ser estruturas transitórias, com função fisiológica insignificante ou pouco estudada até o momento (De Souza et al., 1978; De Souza, 2002; 2009; Rocha et al., 2008).

#### Organelas da Via Secretória

É observada nas formas celulares de *T. cruzi* uma rede de cisternas características do retículo endoplasmático (RE), como a observada em outras células eucarióticas. O RE em *T. cruzi*, em várias observações, utilizando técnicas básicas de MET, mostrou-se como um conjunto de cisternas membranosas que tem origem na membrana nuclear e se espalha por todo o citoplasma, sendo observado entre e sobre os microtúbulos que formam o citoesqueleto demonstrando que ocorre um intenso tráfico de vesículas entre o RE e o complexo de Golgi (CG). São observados os dois tipos de retículos em *T. cruzi*: RE rugoso e o liso, guardando as mesmas funções observadas em outros modelos eucariontes. Foi observado também um conjunto de cisternas características do complexo de Golgi, que está localizado na bolsa flagelar e parece estar associado ao citóstoma. É observado um conjunto de cisternas que se distribui em três posições, muito semelhantes ao CG observado em outros modelos eucarióticos. As vesículas originadas no CG se fundem à membrana na região da bolsa flagelar e liberam seu conteúdo para o meio extracelular (De Souza, 2009).

#### Organelas da Via Endocítica

A via endocítica do *T. cruzi* é composta por três organelas importantes e que ocorrem nas formas epimastigotas, porque todo o processo de trânsito celular está relacionado à região de bolsa flagelar e à função do citóstoma. A endocitose é muito sutil ou praticamente não ocorre na forma amastigota e tripomastigota. Embora nestas duas formas tenham sido observadas organelas semelhantes ao reservossoma, onde se encontra principalmente

cruzipaína H<sup>+</sup> - ATPase que não parece ter relação com a digestão de material extracelular, muito embora a localização também seja na porção posterior da célula (Porto - Carreiro et al., 2000).

## Núcleo

O núcleo de *T.cruzi*, é circundado por uma membrana porosa, típica de células eucarióticas. A cromatina está condensada e dispersa no carioplasma; pode-se observar um nucléolo nas células epimastigotas, mas não em células amastigotas ou tripomastigotas. Durante o processo de divisão celular, a membrana parece permanecer intacta e o número de cromossomos parece variar com a espécie de tripanosomatídeo. Existem evidências da formação de um aparelho mitótico formado por placas densas de microtubulos, como nos outros modelos eucariontes (De Souza, 2009).

## 2 - A doença de Chagas

A doença de Chagas é uma entidade clínica em que são observadas três fases distintas, a fase aguda, a de latência e a crônica. A fase aguda ocorre logo após o período de incubação. Dependendo da forma de contaminação, o período de incubação pode durar de uma a três semanas ou até dois meses, se a transmissão ocorrer através de transfusão sanguínea. Na doença de Chagas aguda, a ausência ou o tratamento ineficaz, pode determinar o aparecimento de uma parasitemia intensa, que persiste por cerca de quinze a trinta dias de acordo com algumas características intrínsecas do paciente, associadas às características biológicas da cepa do protozoário. A partir do nível de parasitemia, o quadro clínico pode ir de uma síndrome clínica silenciosa e assintomática até uma síndrome multifatorial com febre persistente, cefaléia e outros sintomas menos frequentes. (Brito, 2009; Clayton, 2010). Até que se estabeleça um quadro crônico da doença, o paciente passa por um período que determina a fase de latência onde não são observadas as alterações clínicas que caracterizam a

doença aguda e também não são evidentes as consequências da ativação imunitária. Este período é classificado como fase crônica indeterminada (Brito, 2009; Coura e Viñas, 2010; Coura e Borges-Pereira, 2011).

A doença de Chagas crônica tem o mais longo período de evolução da patologia, após a infecção com *T. cruzi*. Em 30% dos pacientes que desenvolvem a doença de Chagas crônica, são observadas complicações digestivas e cardíacas, até 30 anos após o contato inicial com o parasita. Outros 30% desenvolvem cardiomiopatia chagásica com cerca de 70% de morte súbita entre estes indivíduos. Ainda não se entende muito bem a patogênese da doença crônica por esta apresentar vários pontos contraditórios, um deles seria a ausência de parasitas sanguícolas e teciduais em números expressivos durante esta fase. Embora como observados por Coura e Borges – Pereira em 2011, os casos mais severos de doença crônica em sua grande maioria se originam de doença aguda severa em que é muito grande a carga parasitária (Brito, 2009; Coura e Borges-Pereira,2011).

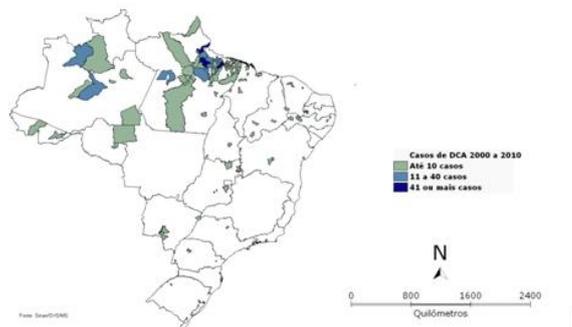
## 2.1 - Aspectos Epidemiológicos

Estima-se que, atualmente nas Américas, cerca de 100.000 pessoas corram o risco de serem infectadas pelo *T.cruzi*, 8.000.000 de pessoas estão infectadas, com 56.000 novos casos anuais por todas as formas de transmissão, causando 12.000 óbitos por ano em decorrência da doença de Chagas em todas as suas formas (WHO, 2012).

No Brasil atualmente há uma predominância dos casos crônicos de doença de Chagas, decorrentes de infecções adquiridas há mais de 15 anos atrás, com uma prevalência de 3.000.000 de indivíduos infectados encontrados em áreas endêmicas estudadas há mais de 30 anos. Nos últimos 10 anos há um crescente número de casos de doença de Chagas aguda ocorrendo na Amazônia legal, além de continuarem a ocorrer de forma estável nas zonas endêmicas, já demarcadas e abrangendo 18 estados já conhecidos desde o final da década de 60, como área de grande risco para a transmissão vetorial (Coura & Castro, 2002; Coura &

Dias, 2009; Coura & Viñas, 2010; Coura & Borges-Pereira, 2011). A partir da década de 90, o perfil epidemiológico da doença de Chagas aguda passou a ter um novo cenário provocado pelos surtos hoje notificados em regiões descartadas para a transmissão vetorial e que hoje são importantes pontos de disseminação da doença de Chagas aguda por transmissão vetorial e oral. Com isso, nós podemos evidenciar duas áreas com padrões de transmissão diferenciados: (i) a região originalmente de risco para a transmissão vetorial em que ações de vigilância epidemiológica, entomológica e ambiental devem ser concentradas, com objetivo de fazer a manutenção e a sustentabilidade da interrupção de surtos causados pela presença de vetores passíveis de domiciliação; (ii) A região amazônica, onde anteriormente não havia dados que indicassem uma possibilidade de surtos de doença de Chagas como um grave problema de saúde pública e onde estratégias para a contenção do avanço do número de casos devem ser estruturadas com medidas já conhecidas. Visto que a biodiversidade da região favorece a ocorrência de vários vetores e reservatórios silvestres passíveis de domiciliação devido ao processo de ocupação de vários nichos pelo homem (Coura & Viñas, 2010). Outro ponto que tem chamado a atenção de pesquisadores em doença de Chagas para a região da Amazônia legal são os casos crescentes de doença de Chagas aguda por transmissão extra vetorial, envolvendo a ingestão de alimentos contaminados (caldo de cana, açaí, entre outros comuns na região). Outro fato foi que a ocorrência de mais de mil casos destes, 70% se deu por transmissão oral, 7% por transmissão vetorial e os outros 22% por meio indeterminado. Alguns aspectos elucidativos da epidemiologia da doença de Chagas no Brasil nos últimos 10 anos podem ser observados nas figuras 1 e 2.

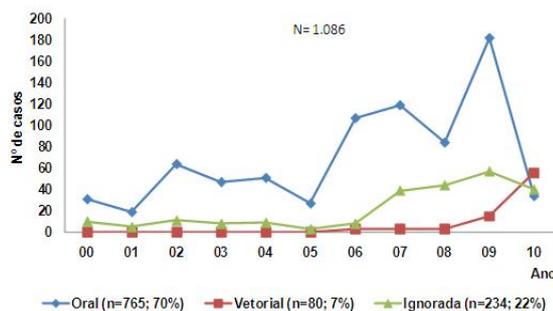
Casos de doença de Chagas aguda por município. Brasil, 2000 a 2010.



Fonte: SVS/MS. Dados sujeitos à modificação.  
Dados atualizados até agosto 2011

Figura 1 - Prevalência da doença de Chagas aguda no Brasil nos últimos 10 anos. (www.ministeriodasaude.gov.br/sus/datasus).

Casos confirmados de DCA segundo ano de notificação e forma de transmissão. Brasil, 2000 a 2010



Fonte: SVS/MS. Dados sujeitos à modificação. Dados atualizados até agosto 2011

Figura 2 - Notificação dos casos de doença de Chagas aguda de 2000 a 2010.

Outro aspecto importante para a transmissão da doença de Chagas no século XXI é o fato de existir atualmente uma população crescente de pessoas que viajam entre a América Latina e vários países que não são endêmicos para doença de Chagas como Estados Unidos, Canadá, Japão, Austrália e alguns países da Europa. Tem-se uma estimativa de 300.000 casos nos Estados Unidos, 5.500 casos no Canadá, 80.000 na Europa e 4.500 na região do pacífico, como se pode observar na figura 3 (Coura & Viñas, 2010).

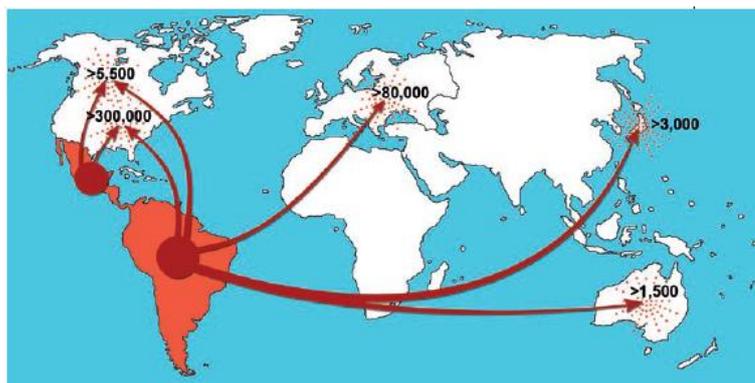


Figura 3 - Possíveis rotas de disseminação da doença de Chagas na América Latina e países não endêmicos.

### 2.3 - Quimioterapia anti – Chagásica

Desde a descoberta em 1909 até a década de 1960, a doença de Chagas foi tratada, com a utilização de diversos grupos de drogas. Nos três primeiros anos da década de 60, Ferreira e colaboradores (1963) relataram os primeiros casos de doença de Chagas aguda tratada com nitrofuranos, obtendo bons resultados na resposta terapêutica e índice de efeitos colaterais a níveis toleráveis, mas cinco dos casos apresentaram xenodiagnóstico positivo após o tratamento. Na mesma época, Coura e colaboradores (1962) trataram quatorze pacientes crônico, com um esquema terapêutico de longo período, mas tiveram que abandonar o protocolo, devido ao grande número de efeitos colaterais apresentados, inclusive neuropatia, quando chegaram à dose de 30mg/Kg/dia. Packchianian e colaboradores (1957) publicaram os resultados de suas pesquisas com camundongos infectados pelo *T. cruzi*, tratados por 53 dias consecutivos com nitrofuranos, observando a cura de 95,4% dos animais tratados. Duas drogas passaram a ser usadas como uma alternativa viável na terapêutica contra a doença de Chagas: o Nifurtimox e o Benznidazol. A partir daí, vários estudos envolvendo a quimioterapia para doença de Chagas foram desenvolvidos até que em 1998, a Organização Mundial de Saúde (WHO), reuniu um grupo de quinze especialistas da América Latina e determinou os requerimentos básicos para um composto ser candidato ao desenvolvimento de

uma droga contra a doença de Chagas: (i) Cura parasitológica em casos de doença aguda e crônica; (ii) Eficácia em dose única ou poucas doses; (iii) Baixo custo; (iv) Ausência de efeitos colaterais e teratogênicos; (v) Administração e tratamento ambulatorial e domiciliar e (vi) Não induzir resistência (Coura & Castro, 2002).

#### Nifurtimox

O Nifurtimox (Nif) (3-metil-4-(5'-nitrofurfurilideno-amino)-tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1-dioxido) (Lelchuk et al., 1977), tem duas hipóteses que podem explicar o seu mecanismo de ação. Uma envolve a capacidade deste agente para formar um nitroanion que reage com os ácidos nucleicos do parasita, causando uma quebra significativa no ácido desoxirribonucleico (DNA) em um mecanismo semelhante ao que foi proposto para a ação antibacteriana de outros nitrofuranos (Murcia et al., 2012). A outra envolve a produção de superóxido, e, portanto, o peróxido de hidrogênio (ambos são muito tóxicos para o parasita) e inibição da tripanotona redutase, que é uma enzima do parasita, específica para a defesa contra radicais livres oxigenados (Fairlamb & Cerami, 1992, Jockers-Scherübl et al., 1989). Outra enzima, a ascorbato - peroxidase também está presente, mas em níveis relativamente baixos na célula (Piacenza et al., 2008) A falta destas enzimas leva à acumulação de peróxido de hidrogênio a níveis citotóxicos, resultando na morte do parasita. Os efeitos colaterais mais frequentes no tratamento com o Nif são: a anorexia, a perda de peso, alterações psíquicas, excitabilidade ou sonolência e perturbação gastrointestinal como náuseas, vômito e ocasionalmente cólicas intestinais e diarreia (Coura & Castro, 2002).

#### Benznidazol

O Benznidazol (Bz) tem como principio ativo o 2-nitroimidazol (N-benzil-2-nitroimidazol) acetamida, comercializado com o nome de Rochagan no Brasil e Radanil na Argentina. O mecanismo de ação do Bz parece estar relacionado à sua ligação aos

componentes da célula do parasita ou a ligações de Bz a proteínas, lipídeos ou ao DNA (Wilkinson et al., 2008). Os efeitos colaterais provocados pelo Bz podem ser classificados em três grupos: (1) sintomas de hipersensibilidade, dermatite com erupções cutâneas que aparecem entre o sétimo e o décimo dia de tratamento; edema, febre e linfadenopatia generalizados; dores articulares e musculares; (2) Agranulocitose, púrpura trombocitopênica e depressão da medula óssea; (3) polineuropatia, parestesia e polineurite dos nervos periféricos (Coura & Castro, 2002).

As duas complicações mais sérias induzidas pelo Bz são a agranulocitose, iniciada por neutropenia, febre e septicemia e a púrpura trombocitopênica, caracterizada pela redução plaquetária, petéquias, bolhas hemorrágicas e sangramento de mucosas (Coura e Castro, 2002). A resistência do parasita aos nitrofurânicos deve estar associada à expressão de uma nitroredutase do tipo I, que está envolvida em mecanismos de resistência já descritos há mais de 35 anos (Wilkinson et al., 2008).

As recomendações terapêuticas para doença de Chagas foram estabelecidas por um comitê de treze especialistas reunidos em 1997 pelo Ministério da Saúde do Brasil e foram publicadas em um boletim (OPAS/OMS, 1998). Ficou determinado que as drogas disponibilizadas para tratamento, em especial o Bz, fossem incluídas em protocolos terapêuticos para uso curativo ou quimioprofilaxia nos casos de doença de Chagas em fase aguda, ou seja, aqueles indivíduos que quando testados para a DC, apresentem parasitemia detectada em exame direto de gota espessa, tenha títulos de IgM, consideráveis quando da testagem sorológica para DC; Infecção congênita, crianças de mães infectadas com diagnóstico de *T. cruzi* em sangue de cordão umbilical e taxas de IgM e IgG compatíveis para doença de Chagas, e no caso de IgG, níveis consideráveis após seis meses; Infecção acidental, técnicos ou pesquisadores que tenham tido trabalhado com culturas de *T. cruzi* feriram-se com agulhas ou outro objeto contaminados ou podem ter acidentalmente ingerido cultura com formas tripomastigotas metacíclicas (Coura & Castro, 2002; Pethrick, 2012); Pacientes,

inclusive crianças, que tenham sido expostos à doença de Chagas por 10 a 12 anos por contato com o inseto vetor ou através de transfusão de sangue são denominados pacientes crônicos recentes; Pacientes com mais de 10 anos de infecção chagásica são denominados doentes crônicos tardios; transplantados, o transplante de órgãos de chagásicos pode transmitir o parasita ao receptor, principalmente durante a fase de imunossupressão; 40% de pacientes chagásicos transplantados tiveram reativação da doença durante a fase de depressão imunológica dos transplantes cardíacos (Coura & Castro, 2002).

A avaliação de resposta terapêutica deve ser feita a partir dos exames clínicos e de imagem. A avaliação laboratorial é realizada com auxílio da reação de polimerase em cadeia (PCR), demonstrando bons resultados, inclusive fazendo uma boa distinção entre os pacientes crônicos tardios e pacientes curados (Coura & Castro, 2002; Britto, 2009).

Existem atualmente duas principais linhas a seguir para o desenvolvimento de novas drogas contra a doença de Chagas. Uma linha é a estratégia baseada em alvos terapêuticos, requerendo o estudo da fisiologia do *T. cruzi* para a descoberta de moléculas alvo envolvidas em vias metabólicas essenciais à sobrevivência do protozoário e outra é a modificação química de moléculas já utilizadas na clínica e que possuem algum tipo de efetividade na terapia antiparasitária (Lannes-Vieira et al., 2010).

### **3 - Peptídeos Antimicrobianos**

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são moléculas frequentes em todos os grupos de seres vivos como efetoras do mecanismo de defesa. Aspectos evolutivos mostram que peptídeos catiônicos são os mais rudimentares mecanismos de imunidade desenvolvidos por seres vivos. Uma vez que estas moléculas são efetivamente o componente principal da resposta imune inata, estando várias classes de peptídeos já descritos como essenciais ao desenvolvimento de defesa primária, como por exemplo, a grande família de defensinas ocorre desde o sistema digestivo de artrópodes até os grânulos leucocitários de humanos

(Saidenberg et al., 2011; Garcia et al., 2011). Outro ponto interessante é a especificidade de PAMs com relação ao tipo de invasão microbiana. Em *Drosophyla melanogaster* a infecção por diferentes espécies microbianas induz à produção de PAMs como, por exemplo, a drosomicina que tem mecanismo muito parecido com o encontrado em mamíferos com relação à síntese de NF -  $\beta$  nos sistemas Toll e Toll-like respectivamente (Cudic & Otvos Jr, 2002). Também em drosófilas foram observadas as produções de diptericina e drosocina que não são Toll dependentes como os grânulos de defensina encontrados em leucócitos de mamíferos que independem da regulação imune (Hancock & Rozek, 2002; Cudic e Otvos Jr., 2002). Em 1987 foram iniciados os primeiros estudos sobre a utilização de PAMs em formulações, pela oftalmologia, uma vez que nesta época começaram a emergir um grande número de microorganismos resistentes aos antibióticos usuais e que causavam sérias infecções oftalmológicas (Gordon et al., 2005). A toxicidade de PAMs é resolvida pelas células por mecanismos inerentes à própria síntese destes peptídeos, como por exemplo, o armazenamento em forma de grânulos leucocitários e liberação por mediadores enzimáticos. Alguns ainda como as catalecidinas são sintetizados como propeptídeos que são processados por enzimas intracelulares e liberados de forma limitada a não causar danos aos tecidos. O controle da toxicidade extrínseco pode ser viabilizado pelo desenho racional da molécula antimicrobiana e pela mudança de posição de alguns resíduos de aminoácido com relação à molécula original, com base nas propriedades físico-químicas do peptídeo ou na dinâmica de sua interação com a membrana do microorganismo alvo.

O primeiro peptídeo antimicrobiano identificado foi o nisin Z, cujo modo de ação é mediado por um receptor nas células alvo. O mecanismo de ação proposto sugere que este peptídeo se ligue a um receptor de membrana que está relacionado a um domínio de inserção, que interage com a porção mais externa da bicamada lipídica. Após interagir com um ligante de membrana, o peptídeo começa a agir utilizando um mecanismo de permeabilização semelhante a outros PAMs. Percebeu-se que não somente a carga líquida da membrana, mas,

algumas características físico – químicas dos PAMs são imprescindíveis para que eles possam se ligar à membrana citoplasmática da célula alvo (Papo et al., 2003). Embora a capacidade de muitos PAMs, de interagir e formar poros em modelos de biomembranas seja um fator importante para sua função antimicrobiana, esse fenômeno isolado não garante a atividade biológica do peptídeo. Outras características do peptídeo e das células microbianas devem ser levadas em conta, para o desenvolvimento de um PAM (Shai, 1999).

Atualmente, os peptídeos antimicrobianos são classificados em quatro grupos de acordo com sua composição e características estruturais: (1) peptídeos geralmente helicoidais, com ausência de cisteína; (2) peptídeos lineares, com ausência de cisteína e repetição de resíduos como a leucina; (3) peptídeos não cíclicos contendo pelo menos uma ponte dissulfeto e (4) peptídeos formando mais de duas pontes dissulfeto, apresentando estrutura secundária em alfa-hélice ou folha pregueada – beta, apresentando estrutura super-secundária do tipo alfa-hélice – folha pregueada – beta. O grupo (1) é o mais estudado e suas características são utilizadas mais frequentemente para o desenvolvimento racional de novas moléculas de PAMs (Oren et al., 1997; 1999, Brogden, 2005, Hancock and Sahl, 2006, Fjell et al., 2012). A maioria dos peptídeos antimicrobianos é catiônica, ou seja, tem carga líquida igual ou maior que +1 o que contribui para uma maior afinidade por membranas compostas por grupos de fosfolipídios que emprestam a esta estrutura, carga líquida negativa. Os mecanismos de interação de PAMs com membranas biológicas apontam para dois principais modos de interação: aduelas e carpete. No modelo de interação do tipo aduela, cerca de três ou pouco mais de três moléculas de peptídeo são necessárias para interagir com a membrana e formar um poro semelhante a um barril que atravessa integralmente a membrana (figura 4). Teoricamente, as moléculas que se inserem na membrana para formação de poros devem ter estruturas secundárias que permitam ou facilitem sua interação com a porção hidrofóbica da bicamada lipídica. Sendo assim, a maioria destas moléculas ao interagir com biomembranas deve assumir a conformação de alfa-hélice ou folha pregueada – beta ou uma estrutura

supersecundária envolvendo estes dois níveis estruturais. Estas características dependem do tamanho e da composição do peptídeo. Tem-se observado que peptídeos contendo prolina são mais propensos à formação de poros, uma vez que forçam a formação de uma área semelhante à dobradiça na organização estrutural do peptídeo. Geralmente, os peptídeos que fazem este tipo de mecanismo de interação, podem ter atividade lítica sobre a célula microbiana em concentrações muito baixas, em torno de 0,1µg/mL. O mecanismo de carpete é caracterizado por uma adesão de várias moléculas de peptídeo sobre a superfície da membrana microbiana, até uma concentração em que começa a interagir com a monocamada de fosfolipídios mais externa e produz um efeito semelhante ao produzido por detergentes (Papo et al., 2003). Estes mecanismos causam o rompimento da membrana plasmática. A interação dos peptídeos com a camada interna da membrana é crucial para determinar o seu efeito deletério sobre o parasita e efetivar sua atividade antimicrobiana. No entanto, estes mecanismos de interação não são uma propriedade muito fácil de ser conseguida porque ao contrário da maioria das células eucariontes animais, as células microbianas, mesmo aquelas com padrão eucarionte, possuem em sua composição lipídeos poliônicos como: lipopolissacarídeo (LPS) e aminoglicanos que formam barreiras estéricas que dificultam as interações entre PAMs e a camada externa da membrana plasmática, sendo observados os mesmos padrões de dificuldades em células procariontes, onde vencer a barreira das paredes celulares é um pré-requisito na eficácia de uma droga que tenha atividade sobre a membrana plasmática ou sobre uma molécula ou processo que se encontre no espaço intracelular (Hancock et al., 2000; Papo et al., 2003).

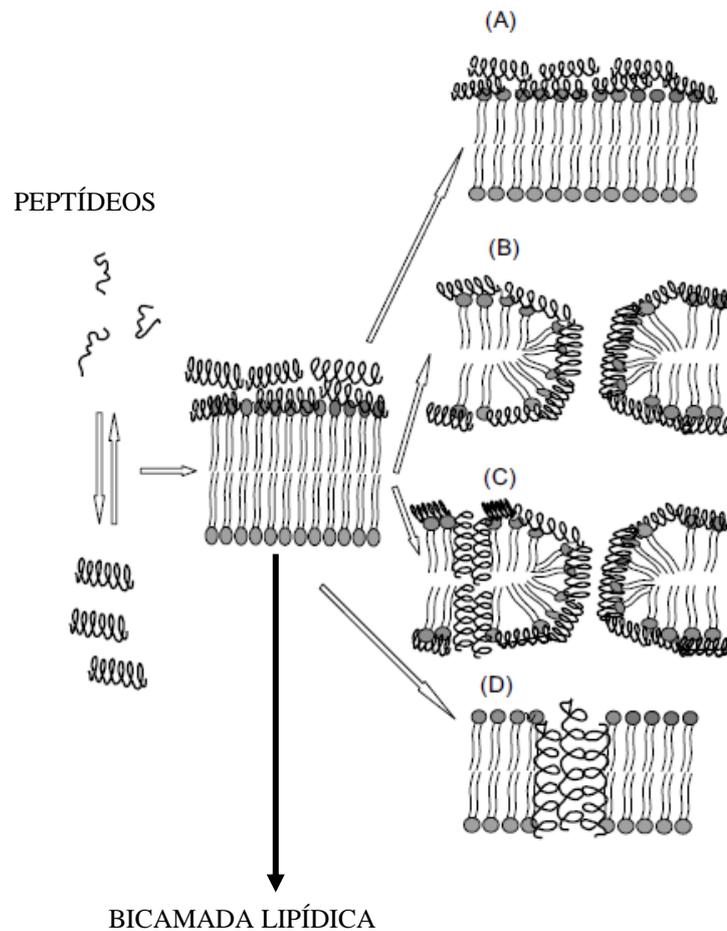


Figura 4 – Esquema dos mecanismos mais frequentes de interação de PAMs com a membrana plasmática. Na primeira etapa, todas as moléculas alinham-se paralelamente à monocamada externa da membrana. Esta etapa é influenciada principalmente por interações eletrostáticas entre o peptídeo e os principais grupos de fosfolipídios que formam a monocamada externa. Na segunda etapa, a inserção de uma molécula peptídica estará relacionada às características físico-químicas do peptídeo. (A) os peptídeos se alinham paralelamente à monocamada externa; (B) os peptídeos após se alinharem paralelamente à camada externa rompem o equilíbrio da membrana citoplasmática; (C) peptídeos se ligam de duas formas a bicamada lipídica, mimetizando a ação de um detergente e formando poros, efeitos característicos de biomembranas formadas por fosfolipídios zwitteriônicos e (D) os peptídeos interagem com a membrana formando um poro que a atravessa integralmente e um grupo de moléculas interage com a porção hidrofóbica da bicamada lipídica. (adaptado de Papo & Shai., 2003).

Além dos mecanismos de ação por ligação à membrana celular, alguns PAMs possuem alvos intracelulares. Este tipo de mecanismo pode não ser um modo de ação primário da molécula, sendo observado que a interação de alguns PAMs com a membrana plasmática está relacionada a um mecanismo de passagem para o meio intracelular, onde se ligará a um alvo no citoplasma (Cudic et al., 2002). Como exemplo, temos o trabalho de Friederich e colaboradores (2000) que observaram que o peptídeo CP26 é capaz de matar 90% de células em tratamento de cultura bacteriana, antes mesmo de completar a sua interação com a membrana. Outros peptídeos testados nas mesmas condições também demonstraram um mesmo padrão de atividade antimicrobiana (Friedrich et al., 2000). PAMs que têm atividade sobre alvos intracelulares podem mostrar vários mecanismos de ação como a estimulação de cascatas de enzimas autolíticas. Um efeito observado em experimentos utilizando a seminalplasma, um peptídeo isolado do esperma de boi, que tem efeito bactericida por ativar uma cascata autolítica na célula bacteriana (Chitnis et al., 1990). Outro mecanismo de ação para alvos intracelulares é a interferência na síntese de proteínas e do ácido desoxirribonucléico (DNA) de bactérias pelo peptídeo PR-39 (Linde et al., 2001).

O *T. cruzi* é lisado por polipeptídeos líticos produzidos por células efectoras da resposta imunológica, acionadas pela liberação de interferon  $\gamma$ , inclusive a liberação da molécula tripanocida de óxido nítrico (NO) ocorre a partir de um mecanismo perforina dependente (Garcia et al., 2005). Um modelo recente de estudo demonstrou que o *T. cruzi* pode ser eliminado com um sistema de sinergismo entre uma molécula formadora de poro e outra molécula que possa interferir nas reações celulares do protozoário. O polipeptídeo NK – lisina, isolado de células T e células *natural killer* (NK), é uma molécula interessante para a eliminação de vários patógenos intracelulares, entre estes, os tripanossomatídeos, mas este peptídeo e outros similares à saponina, em concentrações consideradas terapêuticas, também são líticos para as células do hospedeiro (Stenger et al., 1998; Andersson et al., 1995). No entanto, alguns peptídeos, como as defensinas, foram testados e apresentaram atividade

biocida em células de *Leishmania* e *Plasmodium* (Salzet, 2001; Zasloff, 2002). Entre os seres vivos, os maiores produtores e as maiores fontes de peptídeos antimicrobianos são os anfíbios anuros. Entre estes peptídeos, a família das temporinas é um extenso grupo com atividade lítica contra vários microorganismos e baixa toxicidade para as células de mamíferos.

As temporinas foram isoladas inicialmente em 1996, na pele de *Rana temporaria*, a rã vermelha europeia (Simmaco et al., 1996). Mais tarde também foram descobertos novos peptídeos desta família na pele de rãs da América do Norte e da Eurásia, assim como no veneno de algumas espécies de vespas (Krishnakumari et al, 1997; Argiolas & Pisano, 1984), semelhante a outros peptídeos da pele de anfíbios (Clarck et al., 1994; Kucchler et al., 1989) que têm efeitos farmacológicos. Várias temporinas sintetizadas são originadas a partir de precursores grandes que contêm uma única cópia do peptídeo maduro em uma região altamente conservada da sua porção C – terminal. Alguns destes precursores compreendem um peptídeo sinal (Simmaco et. al., 1996).

Os peptídeos do sinal são altamente similares e apresentam-se como precursores de PAMs em todas as espécies do gênero *Rana* (Clarck et al., 1994; Simmaco et. Al., 1994), bem como alguns precursores de opióides (dermorfinas e deltorfinas) e de alguns peptídeos fungicidas (dermaseptinas) que ocorrem na pele das rãs da subfamília *Phyllomedusinae* (Amiche et al., 1999). Assim, estas moléculas originaram-se provavelmente através da duplicação de um gene ancestral comum que sofreu mutações locais em contraste com outras famílias de peptídeos (brevininas, ranalexinas, ranatuerinas e esculentinas), obtidos a partir de secreções dérmicas ou extraídos da pele de outras espécies de rãs (Simmaco et.al., 1998; Conlon et.al., 2004).

### 3.1 - Temporinas

A família das temporinas (tabela 3) inclui mais de 40 peptídeos com propriedades que as tornam moléculas interessantes para a investigação de suas propriedades biológicas e

mecanismo de ação. Estas propriedades incluem as seguintes observações: Temporinas (1) são os menores peptídeos antimicrobianos, em  $\alpha$ -hélice, encontrados na natureza (10-14 aminoácidos); (2) sua carga positiva líquida em um pH neutro é baixa, variando de 0 a +3; (3) alguns deles agem eficientemente e rapidamente contra um grande número de microorganismos patogênicos (bactérias, vírus, fungos filamentosos e leveduras) e possuem baixo nível de toxicidade para as células de mamíferos; (4) seu modo de ação inclui a perturbação da membrana plasmática de uma forma diferente daquela proposta para a maioria dos outros peptídeos catiônicos em forma de  $\alpha$ -hélice (Skerlavaj et al., 1999; Oren et al., 1999); (5) algumas temporinas possuem efeitos imunomodulatórios (Chen et al., 2004); (6) preservam a sua função biológica no plasma (Mangoni et al., 2005), e (7) eficácia comprovada “in vivo” contra infecções localizadas e septicemias (Ghiseli et al., 2002; Cirioni et al., 2003). Alguns tipos de temporinas são eficazes contra bactérias e fungos saprofitos como: *Batrachochytrium dendrobatidis* e *Candida albicans* (Simmaco et al., 1996). Também foi observado por Rinaldi e colaboradores (2000) que a temporina L (carga líquida +3) tem um amplo espectro de atividade, tendo efeito antimicrobiano para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e leveduras, mostrando também efeito tóxico sobre células tumorais (Rinaldi et al., 2002). Parece que na maioria dos casos, há uma correlação direta entre a atividade antimicrobiana e a carga líquida positiva das temporinas. Vários pesquisadores demonstraram que as isoformas naturais, que possuem carga nula (temporina - 1Ja) ou +1 (temporinas-C, D, E, 1AUa, 1PRa, 1PRb), embora tenham homologia estrutural com temporinas biocidas são praticamente desprovidas dos efeitos antimicrobianos (Simmaco et al., 1996; Isaacson et al., 2002; Conlon et al., 2004; Conlon et al., 2005). Além de suas atividades antibacterianas e antifúngicas, algumas moléculas da família das temporinas foram capazes de inibir a infecção de células em cultura por várias espécies de vírus (Chinchar et al., 2004), assim como está bem reportada à ação antiparasitária das temporinas A, B e 1Sa contra leishmanias (Chadbourne et al., 2011) quando comparada com outros peptídeos com atividade

leishmanicida como: as dermaseptinas (Feder et al., 2000), o polipeptídeo YY da pele de rã (Vouldoukis et al., 1996), a indolicidina isolada dos grânulos de neutrófilos (Bera et al., 2003), a gomesina, isolada da hemolinfa de *Achantoscurria gomesiana* (Silva et al., 2000), e os peptídeos híbridos cecropina-melitina (Chicharro et al., 2001; Luque-Ortega et al., 2003). As temporinas são altamente ativas para os estágios promastigota e amastigota do parasita. Outro aspecto vantajoso na utilização das temporinas é a sua inocuidade para os macrófagos em doses que são letais às formas amastigotas de leishmania (Mangoni et al., 2005). Diferente da indolicidina e dos peptídeos da família das dermaseptinas, a maioria das temporinas não possui uma atividade hemolítica significativa e preserva sua função em condições eletrolíticas semelhantes à fisiológica (Mangoni et al., 2005).

A temporina A tem efeitos quimiotáticos sobre os fagócitos humanos, mediados presumivelmente por receptores específicos encontrados na membrana celular (Che et al., 2004). Esta ligação importante entre o sistema imune inato e adaptativo (recrutamento de células imunes para os locais da infecção) corrobora com a possibilidade de peptídeos da família das temporinas serem utilizados como candidatos ao desenvolvimento de drogas para fortalecimento do arsenal terapêutico contra doenças infecciosas.

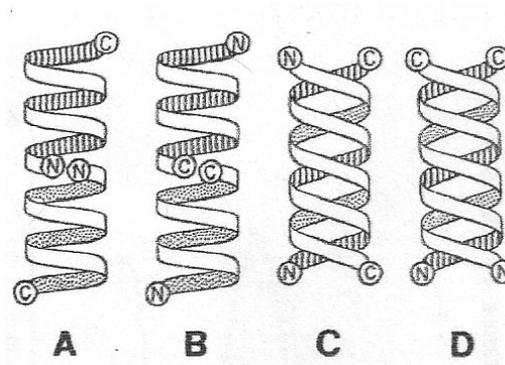
Tabela 3 - Relação de Temporinas já descritas em literatura (Mangoni, 2006).

Peptídeo	Fonte	Sequencia
Temporina A	R. temporaria	FLPLIGRVLSGIL - NH <sub>2</sub>
Temporina B	R. temporaria	FLPLIGRVLSSLL - NH <sub>2</sub>
Temporina C	R. temporaria	LLPIVGNLLKGLL - NH <sub>2</sub>
Temporina D	R. temporaria	LLPILGNLLNSLL - NH <sub>2</sub>
Temporina E	R. temporaria	VLPIIGNLLNSLL - NH <sub>2</sub>
Temporina F	R. temporaria	FLPLIGKVLSGIL - NH <sub>2</sub>
Temporina G	R. temporaria	FFPVIGRILNGIL - NH <sub>2</sub>
Temporina H	R. temporaria	LSP NLLKSLL - NH <sub>2</sub>
Temporina K	R. temporaria	LLPNLLKSLL - NH <sub>2</sub>
Temporina L	R. temporaria	FVQWFSKFLGRIL - NH <sub>2</sub>
Temporina 1ARa	R. aureolata	FLPIVGRLISGLL - NH <sub>2</sub>
Temporina 1AUa	R. aurora aurora	FLPIIGQLLSGLL - NH <sub>2</sub>
Temporina 1BYa	R. boyllii	FLPIIAKVLISGLL - NH <sub>2</sub>
Temporina 1Ca	R. clamitans	FLPFLAKILTGVL - NH <sub>2</sub>
Temporina 1Cb	R. clamitans	FLPLFASLIGKLL - NH <sub>2</sub>
Temporina 1Cc	R. clamitans	FLPFLASLLTKVL - NH <sub>2</sub>
Temporina 1Cd	R. clamitans	FLPFLASLLSKVL - NH <sub>2</sub>
Temporina 1Ce	R. clamitans	FLPFLATLLSKVL - NH <sub>2</sub>
Temporina 1Ec	R. sculenta	FLPVIAGLLSKLF - NH <sub>2</sub>
Temporina 1Ga	R. grylio	SILPTIVSFLSKVF - NH <sub>2</sub>
Temporina 1Gb	R. grylio	SILPTIVSFLSKFL - NH <sub>2</sub>
Temporina 1Gc	R. grylio	SILPTIVSFLTKFL - NH <sub>2</sub>
Temporina 1Gd	R. grylio	FILPLIASFLSKFL - NH <sub>2</sub>
Temporina 1Ja	R. japonica	ILPLVGNLLNDLL - NH <sub>2</sub>
Temporina 1La	R. luteiventris	VLPLISMALGKLL - NH <sub>2</sub>
Temporina 1Lb	R. luteiventris	NFLGTLINLAKKIM - NH <sub>2</sub>
Temporina 1Lc	R. luteiventris	FLPILINLIHKGLL - NH <sub>2</sub>
Temporina 1Oa	R. ornativentris	FLPLLASLFSRLL - NH <sub>2</sub>

### 3.2 - Gramicidina A

A Gramicidina A é um peptídeo antimicrobiano constituído de 15 resíduos, produzido por *Bacillus brevis*, composto por alternância de D e L aminoácidos. Em membranas, a gramicidina forma canais que são específicos para cátions monovalentes e facilitam o estudo da fisiologia de canais iônicos. Essas características permitem à gramicidina formar uma estrutura dimérica denominada  $\alpha$ - hélice. Nesse caso, ao entrar em contato com a bicamada de lipídeos, a molécula forma duas estruturas helicoidais, que podem ter quatro padrões de conformação: (a) Interação das hélices monoméricas a partir da porção N-terminal; (b) Interação carboxil-carboxil para a formação do dímero; (c) Uma dupla hélice antiparalela e (d) Uma dupla hélice paralela (figura 9).

(A)



(B)

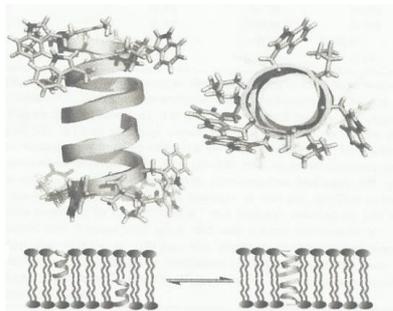


Figura 9 - (A) Modelo dos dímeros estruturais (Wallace, 1986); (B) modelo de inserção em membrana da estrutura dimérica da Gramicidina A (Wang et.al., 2012).

Os canais formados pela gramicidina A facilitam a difusão de água,  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , mas dificultam a passagem de grandes moléculas, incluindo os cátions polivalentes. Essa possibilidade de ser um canal íon seletivo fez da gramicidina A uma molécula modelo para o estudo da formação de poros em membranas. Essa propriedade lhe confere atividade

antimicrobiana, mas também um nível de toxicidade que impede sua utilização em formulações para administração oral ou injetável. Por isso, atualmente a gramicidina A é utilizada em formulações para uso tópico (Wang et. al., 2012). Embora seja comum à interação de peptídeos catiônicos com a membrana de microorganismos que são altamente aniônicas, não se pode desprezar as características de interação de alguns resíduos de aminoácidos com estruturas altamente anfipáticas como uma biomembrana. No caso da gramicidina, a presença de um cerne contendo triptofano e um N - terminal formilado podem explicar suas interações com membranas de padrão não eucariótico (Kang et. al., 2009).

### 3.3 - Sapecina B

A sapecina é uma proteína potencialmente antimicrobiana, que foi isolada pela primeira vez do sobrenadante de cultura de células embrionárias de *Sarcophaga peregrina*. Esta proteína é formada por cerca de quarenta resíduos de aminoácidos e possui ampla atividade biocida contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Yamada & Natori, 1994). A partir da sequência da sapecina B foi isolado um peptídeo com o grupamento carboxil protegido por amidação: **KLKLLLLLKLK - NH<sub>2</sub>** com atividade antimicrobiana de amplo espectro, inclusive com eficácia contra *Staphylococcus aureus*, resistente à meticilina e outros antibióticos. Estudos de NMR para esta molécula demonstraram que as características físico-químicas encontradas permitem interação com biomembranas. Em presença de biomembranas artificiais, mimetizando um modelo eucariótico, praticamente não foi observada interação entre o peptídeo e a bicamada lipídica e nem com nenhuma das monocamadas. Por outro lado, quando testada para modelos procarióticos, a interação se deu sob a forma de uma  $\alpha$ -hélice que atravessa integralmente a membrana. Estes resultados são consistentes com a possibilidade deste peptídeo somente se agregar, quando em contato com bicamadas neutras, validando assim o comportamento desta molécula quando testada em ensaios de hemólise. Por outro lado, em detrimento de sua carga líquida ser fortemente catiônica, este peptídeo

interage com membranas aniônicas assim como: radicais acil com carga líquida negativa. Como as membranas procarióticas, inclusive a membrana externa de bactérias Gram-positivas têm carga líquida negativa, geralmente conferida pelas moléculas de fosfolipídios de maior frequência, mas também pelas moléculas lipídicas complexas como o Lipopolissacarídeo (LPS) ou Lipooligossacarídeo (LOS), pode-se extrapolar que a atividade antimicrobiana desta polileucina está relacionada à perturbação da fisiologia e integridade de membrana (Matsuyama & Natori, 1990; Yamada & Natori, 1994; Alvarez-Bravo et. al., 1995; Fernandez et. al., 2011).

### 3.4 - Temporizina

A temporizina é um peptídeo híbrido, sendo que o desenho racional baseou-se na estrutura e características físico-químicas dos três peptídeos apresentados anteriormente e já bem descritos na literatura quanto às suas propriedades biológicas e estruturais. Com isso, projetamos uma molécula com extensão de 16 resíduos de aminoácidos, todos em sua forma L. Assim sendo, projetamos um peptídeo com N - terminal, comum aos peptídeos da família das temporinas, formados por três resíduos de aminoácidos apolares, o que facilita a interação do peptídeo com moléculas lipopolissacarídicas complexas, geralmente encontradas na superfície de microorganismos: LPS e LOS nas membranas bacterianas e LPFG nas membranas de alguns protozoários e outros eucariontes inferiores. O cerne da molécula foi desenhado a partir da seqüência da gramicidina A, levando em conta que uma repetição leucina - triptofano assegura a conformação helicoidal à molécula quando em interação com uma estrutura em bicamada anfipática, característica de biomembranas (Chen et.al., 2005; Kang et. al., 2009). A região N-terminal foi projetada com a mesma estrutura dos derivados da Sapecina B, uma vez que conferem carga líquida positiva à molécula e facilitam sua interação com biomembranas aniônicas, constantemente presentes na superfície de microorganismos. Por outro lado, esta estrutura do N-terminal foi projetada também com o

objetivo de emprestar seletividade à molécula, uma vez que as biomembranas em eucariontes superiores tendem a ter carga líquida neutra ou positiva, devido à presença de alguns fosfolípidios mais frequentes nestes modelos de bicamada lipídica, além da presença do colesterol (Sundriyal et.al., 2008).

A atividade biocida contra bactérias e fungos, destes três peptídeos está bem reportada em literatura (Yamada & Natori, 1994, Mangoni, 2006, Wang et al., 2012). Além disso, a gramicidina é utilizada em formulações tópicas.

Desde o final da década de 60, moléculas peptídicas vêm sendo descritas e utilizadas como antibióticos e como antifúngicos, sem, no entanto, ter sua atividade testada em modelos parasitários (unicelulares ou multicelulares). É notório que mais de 50% dos problemas de saúde pública da América Latina são as doenças negligenciadas causadas por protozoários e helmintos, principalmente aqueles que desenvolvem seus ciclos biológicos, em hospedeiros vertebrados, no ambiente vascular. Para estes parasitas, existe atualmente um arsenal terapêutico com pouca eficácia curativa e muitos efeitos colaterais. Entre estes parasitas, está o *T. cruzi*, como já mostrado agente etiológico da doença de Chagas, que embora já tenha praticamente um século de estudos, ainda não foi possível o desenvolvimento de uma droga com bom índice terapêutico. A partir dessa observação, ficamos motivados a testar a Temporizina "in vitro" contra formas epimastigotas do *T. cruzi*.

#### **4 - Justificativa**

Embora existam estudos sobre vários compostos químicos e protocolos terapêuticos desenvolvidos há mais de 40 anos para a doença de Chagas, estes ainda não são os ideais e as drogas utilizadas embora apresentem um grau de segurança, na sua utilização, apresentam ainda uma toxicidade indesejada, justificando a busca de novas moléculas que podem ser candidatas ao desenvolvimento de novas drogas que venham reforçar o arsenal terapêutico contra a doença de Chagas.

#### **5 - Objetivo geral**

Desenho racional de um peptídeo antimicrobiano com atividade biocida contra o *T. cruzi* e baixa toxicidade para as células de mamíferos.

##### **5.1 - Objetivos Específicos**

Síntese da Temporizina;

Testar a atividade microbicida da Temporizina “*in vitro*”;

Determinar seu mecanismo de ação usando membranas biológicas;

Estudar as mudanças estruturais da Temporizina por dicroísmo circular em TFE;

Propor o mecanismo de interação da Temporizina com biomembranas;

Construir análogos da Temporizina com base em seu mecanismo de interação.

## **6 - Material e Métodos**

### **6.1 – Métodos de Estudo da Atividade Antimicrobiana**

**6.1.1 – Cultivo de Parasitas** – Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, foram mantidas, em meio de cultura, LIT (Liver Infusion Tryptose) a 27°C. As células em fase logarítmica de crescimento, foram lavadas em PBS pH 7,4 estéril por três vezes a 6000g por 20 minutos, contadas em câmara de Neubauer.  $1,0 \times 10^4$  cels/mL foram transferidas para o meio D-PBS (Dulbecco com PBS) enriquecido com 10% de soro fetal bovino e incubadas a 27°C, sendo repicadas a cada três dias.

**6.1.2 – Ensaio de Atividade lítica com o metilbrometo de tiazolil azul de tetrazolio (MTT)**– Determinou-se a atividade anti-parasitária da temporizina contra o *T. cruzi* pela redução do azul de tetrazolio. Cultura de *T. cruzi* em D-PBS/SFB(10%) , foi lavada três vezes com PBS pH 7,4 por centrifugação a 1000g por 10 minutos. As células foram suspensas em D-PBS/SFB(10%), foram contadas e a suspensão de parasitas ajustada para  $1,5 \times 10^7$  cels/mL. 20µL da suspensão de parasitas foram transferidos para uma microplaca falcon de 96 poços (Becton Dickinson, USA), contendo 180µL do mesmo meio de cultura contendo temporizina em diluição seriada entre 0,001ng/mL a 250µg/mL. Foram reservados poços para controle de células vivas onde a mesma quantidade de células foi incubada com PBS. Para o controle de morte foi utilizado Benznidazol (Bz) a 500µmol (Wilkinson et al., 2008). Foram incluídos outros dois controles de morte utilizando Triton X-100 (Tx100) a 0,001% e formol (Fm) a 0,37%, respectivamente. As placas foram incubadas 28°C por 2 horas. Após esta primeira incubação, foram adicionados 10µL de uma solução de MTT a 10mg/mL em cada poço e incubadas por 4 horas a 28°C. Após este tempo foram adicionados 50µL de DMSO para solubilização dos cristais de formazana, produto formado a partir da redução do MTT pelas desidrogenases mitocondriais. A viabilidade dos parasitas foi determinada por leitura em espectrofotômetro a 540nm em um leitor de placas modelo Flexstation 3 (Molecular devices, USA). Todos os tratamentos foram feitos em triplicata e os experimentos repetidos por três vezes.

**6.1.3 – Análise da Atividade Tripanocida** – A atividade tripanocida da temporizina foi avaliada utilizando experimentos de microscopia de fluorescência, observando-se a inclusão de um fluorogênio, em dois métodos distintos:

#### **6.1.3a - Por fluorescência**

- **Inclusão do Iodeto de Propídeo (PI)** – Em uma placa de 96 poços, incubamos

20µL de suspensão de parasitas com 180µL de D-PBS/SFB10%, adicionado de temporizina (Tz), gramicidina A (Gra), temporina A (Tp) e temporizina 1 (Tz1), em diluições seriadas de 1ng/mL a 100µg/mL. Utilizamos como controle de morte celular Triton X-100 a 0,01% e Fm a 0,37%, assim como Bz a 500µmol. Incubou-se a placa por 1 hora a 28°C, ao final deste tempo, foi adicionado 0,5µL de PI, em cada poço e a placa foi incubada novamente a 28°C por 10 minutos. Os parasitas foram então observados por microscopia de fluorescência (vermelho) em um microscópio invertido (Nikon Eclipse, modelo TE – 2000 – S) e as imagens obtidas foram capturadas em uma câmera digital da marca Nikon, acoplada ao microscópio. Os resultados foram analisados com auxílio de um computador através do software Image J. Todos os tratamentos foram feitos em triplicata e o experimento repetido por 4 vezes.

- **Inclusão de calceína-** Em um ensaio paralelo, uma suspensão de *T. cruzi*, na forma epimastigota, foi marcada com Calceína (fluorescência em verde), segundo o protocolo descrito acima.

**6.1.3b – Por Citometria de Fluxo** -Uma suspensão contendo  $1,5 \times 10^7$  cels/mL de epimastigotas de *T. cruzi* marcadas ou não com Calceína (Calbiochemistry, USA) foi submetida ao tratamento com Tz, GraA, Tp e Tz1 em diluições seriadas de 1ng/mL a 100µL e incubadas por 60 minutos a 28°C. Como controle de morte utilizamos formol a 0,3%, Triton X-100 de 0,000001% a 0,1% e Bz a 500µmol/mL. Após o tratamento a cultura foi incubada com PI a 0,05µg/ml, por 10 minutos a 28°C. Cada tratamento em triplicata foi submetido a análise por citometria de fluxo utilizando um Citômetro FACS Calibur (Becton Dickinson, USA), acoplado a um computador, e a aquisição de dados foi executada pelo software Cellquest (Becton Dickinson, 1998). Os dados adquiridos foram analisados pelo software Windows Multiple Document Interface for Flow cytometry – WinMDI (Trotter, 1998).

**6.2 – Ensaio de toxicidade da Temporizina** na célula hospedeira– Utilizou-se, dois métodos para análise da toxicidade da temporizina para célula de mamíferos envolvendo macrófagos peritoneais, células de linhagem contínua e eritrócitos humanos soro tipo grupo A.

**6.2.1 – Macrófagos peritoneais murinos** – Macrófagos peritoneais primários foram obtidos e coletados de camundongos BALB/c, com seis semanas. Injetou-se 1ml de tioglicolato de sódio estéril na cavidade peritoneal dos animais. Após quatro dias a cavidade peritoneal foi lavada com salina de Hanks estéril (NaCl 0,137mol, KCl 5,4mmol, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,25mmol,

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,44mmol,  $\text{CaCl}_2$  1,3mmol,  $\text{MgSO}_4$  1,0mmol,  $\text{NaHCO}_3$  4,2 mmol e 0,001% de vermelho neutro), e os macrófagos coletados e crescidos em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma, Detroit), enriquecido com 10% de SFB, incubado a 37°C sob atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  (Hartney et al., 2011). Para o teste de toxicidade os macrófagos foram lavados três vezes com PBS 7,4 por centrifugação a 400xg por 10 minutos. Os macrófagos foram contados em câmara de Neubauer e ajustamos o cultivo para  $1,0 \times 10^5$  cels/mL. Foi adicionado D-PBS/SFB10% ao cultivo de macrófagos e 20µl desta cultura foram transferidos para uma placa de 96 poços contendo 180µl do mesmo meio de cultura contendo diluições seriadas entre 1ng e 100µg de Tz, Tz-1, Gra-A e TP. Os macrófagos foram incubados a 37°C por 60 minutos em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Foi realizado um ensaio de liberação de lactato desidrogenase (LDH), usando um *kit* de detecção de citotoxicidade (Sigma, USA). Segundo instruções do fabricante, 80µl de sobrenadante de cultura, de cada uma das concentrações dos peptídeos testados, foram transferidos para uma placa de 96 poços (Becton Dickinson, USA), e adicionados de 80µl do reagente para detecção de LDH contido no kit. A placa foi incubada a 25°C no escuro, por 30 minutos. A reação foi bloqueada pela adição de 10µl de uma solução de ácido clorídrico a 1N em cada poço. A concentração de LDH no mei foi detectada pela leitura a 490nm no leitor de placas Flexstation 3 (Molecular device, USA).

**6.2.2 - Células de Linhagem Contínua** – Células de linhagem do tipo macrófagos murino o tipo J774, células tumorais de glândula pituitária de rato (GH3) e linfoblastos humanos (JURKAT), foram cultivados em meio RPMI 1640 (Sigma, Detroit), enriquecido com 10% de SFB contendo 100UI/mL de penicilina a 100µg/mL de estreptomicina, incubadas a 37°C em atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$  durante três dias. As células foram lavadas com PBS, pH 7,4 por centrifugação a 1000g por 10 minutos e calibradas para obtenção de  $1,0 \times 10^5$  cels/mL. Após adição de meio novo, 20µL de suspensão de células foi transferido para uma placa de 96 poços contendo 180µL de D-PBS/SFB10% contendo diluições seriadas de Tz, Tz1, GraA e Tp de 1ng/mL a 100µg/mL. As células foram incubadas por 60 minutos a 37°C em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  e condições ideais de umidade. Após o tratamento, a liberação de LDH foi analisada como um critério de citotoxicidade com o mesmo protocolo utilizado para o experimento com macrófagos peritoneais.

Em outro experimento 20µl de cultura foram transferidos para uma placa de 96 poços contendo Tz, Tz-1, Gra-A e Tp nas mesmas concentrações já descritas e incubadas por 60 minutos a 37°C. Após este período foi adicionado 0,5µL de PI a 0,01% em cada poço e a placa foi novamente incubadas por 10 minutos nas condições de cultivo. As células foram

observadas por microscopia de fluorescência em um microscópio invertido (Nikon Eclipse, modelo TE – 2000 – S) e as imagens obtidas capturadas em uma câmera digital da marca Nikon, acoplada ao microscópio. Os resultados foram analisados com auxílio de um computador através do software Image J. Todos os tratamentos foram feitos em triplicata e o experimento repetido por 4 vezes.

**6.2.3 Toxicidade Hemolítica** — Eritrócitos humanos foram coletados de doador livre esclarecido, seguindo-se os procedimentos preconizados pelo comitê de ética e pesquisa da FIOCRUZ (CEP-FIOCRUZ).

Hemácias heparinizadas foram lavadas com PBS três vezes por centrifugação a 1000g por 10 minutos. As hemácias foram diluídas em PBS e uma solução contendo 2% de hemácias ( $1,0 \times 10^8$  cels/mL), foi incubada com várias concentrações da Tz e Gra - a 37°C por 60 minutos. Ao final do tratamento as hemácias foram centrifugadas a 1000g por cinco minutos. O sobrenadante (liberação de hemoglobina) foi lido em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540nm. Uma solução de 2% de hemácias lisadas por Triton X-100 a 0,1% foi utilizada como um controle de 100% de hemólise. Da mesma forma uma solução de hemácias contendo somente PBS foi utilizada como controle para ausência de hemólise.

**6.3 – Síntese de Peptídeos** – A sequência da molécula de temporizina foi construída a partir das características de três peptídeos já descritos na literatura e com base na refratariedade dos anfíbios anuros ao *T. cruzi*. (Diaz, 1940). A temporizina, a temporizina 1 e a temporina A foram sintetizadas em nosso laboratório pelo método de síntese de peptídeos em fase sólida utilizando a estratégia Fmoc (N-metoxicarbonil 9-fluorenil), em um sintetizador automático (PSSM8-Shymadzu, Japão). A pureza, dos peptídeos sintéticos, foi analisada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) utilizando uma coluna de fase reversa (C18-Sigma, USA), e a sequência e o peso molecular confirmados por espectrometria de massas.

**6.4 – Cromatografia Líquida alta performance (HPLC)** – As análises de HPLC, foram realizadas com auxílio de uma coluna de fase reversa C18-Sigma (5µm, 4,6 x 250mm), acoplada a um cromatógrafo analítico (Shimadzu, Japão). A coluna foi equilibrada com tampão aquoso contendo 10% de acetonitrila e 0,1% de ácido trifluoracético (TFA) e os peptídeos foram dissolvidos em água milli-Q na concentração de 1mg/mL. Os peptídeos foram eluídos em tampão aquoso contendo 0,1% de TFA com um gradiente linear de 10% a 80% de acetonitrila com fluxo de 1,0mL/min, sendo monitorado por detector de UV a 220nm.

**6.5 – Espectrometria de massas:** A espectrometria de massa tipo *electrospray*, foi realizada em um instrumento Q-TOF Ultima API (Evisa, Germany). As amostras de Temporizina foram analisadas em modo positivo (preferencialmente), após injeção manual em um injetor Rheodyne e carregadas por uma bomba LC-10AD Shimadzu sob fluxo constante de 20 $\mu$ L/min em uma solução 50% acetonitrila, contendo 0,5% ácido fórmico. O controle do equipamento e aquisição dos dados realizado pelo software MassLynx v 4.0. As deconvoluções dos espectros foram realizadas pelo módulo MaxEnt I deste software.

Para o sequenciamento “de novo” da temporizina, os íons de interesse foram selecionados em uma janela de massa de  $\pm 0,5$ Da e fragmentados por colisão induzida com argônio. O espectro dos fragmentos foi tratado pelo módulo MaxEnt III e depois analisado pelo módulo BioLynx de sequenciamento “de novo” de peptídeos.

As espectrometrias de massas tipo MALDI-TOF, foram realizadas em um instrumento MALDI-ToF/Pro (Amersham). As amostras de temporizina, em solução, foram misturadas na proporção 1:1 (v:v) com uma solução supersaturada de matriz para peptídeos (ácido cinâmico), depositadas sobre a placa de amostragem (0,4-0,8 $\mu$ L) e deixadas secar no ambiente.

**6.6 – Estudos sobre Eletrofisiologia de Biomembranas** – Utilizou-se a técnica de *patch clamp* que consiste em registrar correntes iônicas em condições de alta vedação elétrica entre a membrana da célula e o eletrodo utilizado para realizar os registros de correntes em poros. Uma micropipeta, contendo o eletrodo, preenchida com solução salina, foi utilizada para tocar a superfície celular e, posteriormente, foi aplicada sucção, esta configuração é denominada de célula ligada. Em condições apropriadas surgiu uma vedação de alta resistência com uma tensão de 1 a 10G $\Omega$ . A partir destas condições foi possível registrar correntes de canais unitários ou correntes macroscópicas de baixa condutância, após ter sido aplicada uma concentração variada de Tz (0,1ng a 10 $\mu$ g/mL) o que caracteriza a formação de poros na membrana.

Pipetas de borosilicato com filamento de 1,2mm (World Precision instruments, Inc; New Haven, U.S.A), foram utilizadas, para o experimento na configuração célula ligada. A temporizina foi colocada na solução intracelular a fim de, verificar-se o processo de formação e propriedades biofísicas dos poros. Nestes experimentos foram utilizadas células HEK-293 acondicionadas em placas de Petri de 35mm e incubadas com soluções salinas para realização das medidas eletrofisiológicas a temperatura ambiente. Foram preparadas cinco soluções salinas diferentes a fim de determinarmos as melhores condições experimentais para o estudo

dos efeitos eletrofisiológicos da Tz e Tz-1 sobre a membrana. Assim sendo as seguintes soluções foram preparadas:

**Solução salina A** composta por 150mM de NaCl, 5,1mM de KCl, 1,0mM de MgCl<sub>2</sub>, 1mM de CaCl<sub>2</sub> e 10mM de HEPES, pH 7.4 (condutividade 307mOsm);

**Solução salina B** composta por 150mM de KCl, 5,0mM de NaCl, 1,0mM de MgCl<sub>2</sub>, 1mM de CaCl<sub>2</sub>, 10mM de HEPES, e 0,1mM de EGTA, pH 7,4 (condutividade 295mOsm);

**Solução salina C** - 150mM de KCl, 5mM de NaCl, 1,0mM de MgCl<sub>2</sub>, 10mM de HEPES e 0,1mM de EGTA, pH 7,4 (condutividade 289mOsm),

**Solução salina D** - 132mM de KCl, 5mM de NaCl, 1,0mM de MgCl<sub>2</sub>, 15mM de EGTA (na solução para a pipeta foram adicionados 14mM de EGTA), 1,43 CaCl<sub>2</sub> (na solução para a pipeta foram adicionados 4,8nM de Ca<sub>2</sub>), e 10mM de HEPES, pH 7.4 (condutividade 306mOsm);

**Solução salina E** - 139mM de KCl, 5,0 de NaCl, 1,0mM de MgCl<sub>2</sub>, 8,0mM de EGTA (na solução para pipeta foram adicionados 6mM de EGTA), 1,93mM de CaCl<sub>2</sub> (na solução para pipeta foram adicionados 14nM de CaCl<sub>2</sub>), e 10mM de HEPES, PH 7.4 (condutividade 314 mOsm);

**Solução salina F** - 140mM de KCl, 5,0mM de NaCl, 1,0mM de MgCl<sub>2</sub>, 3,4mM de EGTA (1,0mM de EGTA solução para pipeta), 2,33mM de CaCl<sub>2</sub> (100nM de Ca<sup>+2</sup> solução para pipeta), e 10mM de HEPES, pH 7.4 (condutividade 313mOsm). Em todos os experimentos, a condutividade da solução foi verificada com um osmômetro de pressão de vapor modelo 5500 (Wescor, UT).

**6.7 – Medidas da formação de canais dos peptídeos em Célula Inteira** – Os experimentos, com configuração célula inteira, foram realizados a temperatura entre 30°C e 37°C, com um potencial de +60mV. As pipetas utilizadas neste experimento foram confeccionadas com capilares de borosilicato de 1,2mm (World Precision Instruments, New Haven, USA) com auxílio de um puxador modelo PC-10 (Narishige, USA). Para o estabelecimento de uma vedação de alta resistência, com cerca de 1 a 10 gigaohms aplicou-se uma sucção suave na membrana da célula e um fragmento da membrana foi retirado com sucção adicional. Deste modo foi Formado um canal de baixa resistência entre a pipeta e o interior da célula. Transferiu-se a célula para uma câmara montada sobre a mesa de observação de um microscópio invertido, próprio para a técnica de *patch clamp*. Nestes experimentos as correntes obtidas na presença das diferentes concentrações de Tz e Tz-1 não foram corrigidas para um *background* de corrente, porque este foi insignificante. Os registros de corrente de condutância através da membrana estavam dentro de uma faixa de 1 a 5% dos valores do

controle após a aplicação dos peptídeos. Indicando que o aumento exacerbado da condutância não era devido a ruptura celular ou a perda da região de grampeamento. Aplicou-se resistência em série na razão de 8 a 12M $\Omega$ , para todos os experimentos utilizando solução A, e não foi feita compensação para quando aplicadas correntes acima de 400pA. Abaixo deste nível a corrente aplicada foi compensada em 82% (Faria et al, 2005). Os experimentos em que foi observada um aumento substancial da resistência em série durante as medições, foram descartados. Mediu-se a capacitância da célula aplicando-se um pulso hiperpolarizante de 20mV com um pulso de segurança de -20mV. Então o transiente capacitivo foi integrado e dividido pela amplitude da etapa de voltagem (20mV).

Os protocolos de grampeamento de voltagem foram aplicados com potenciais de segurança entre -80mV e 80mV. Potenciais reversos foram calculados a partir de uma curva padrão. Os dados experimentais foram registrados em um amplificador Axopatch-1D (Axon Instruments, Palo Alto, CA, USA) e corrigidos com frequência de 5kHz (8-pole Bessel filter) e transformados em sinais digitalizados entre 20 a 50kHz com uma interface Digidata (Axon Instruments, Palo Alto, CA, USA). Todos estes dados foram adquiridos em computador pessoal utilizando-se o programa Axoscope and pCLAMP 9.0 (Axon Instruments, Palo Alto, CA, USA).

**6.8 – Controle do Potencial de Membrana no Modo Célula Ligada** – Para registrarmos o mais simples sinal de corrente neste protocolo utilizou-se solução salina A para o preenchimento da pipeta e solução salina B para o meio extracelular. A racionalidade para este experimento seguiu duas linhas de raciocínio: 1) o preenchimento da pipeta com solução salina A, garantiu um fluxo de íons através do ponto de contato entre a pipeta e a membrana que muito se assemelha às condições fisiológicas e isso nos proporcionou a possibilidade de estudarmos a formação de poros por Tz e Tz-1 de forma bastante eficaz; 2) O banho estando preenchido com solução B nos deu a possibilidade de despolarização total da membrana (~0mV), o que permitiu a observação de um valor real de voltagem potencial ter sido aplicado através do ponto de contato entre a pipeta e a membrana e corresponder a um potencial de segurança, que nos deu certeza de correspondência à formação de poros pelos peptídeos aplicados.

**6.9 – Estudo de Dicroísmo circular** – Os estudos estruturais dos peptídeos foram iniciados com a utilização do dicroísmo circular, que permitiu avaliar o conteúdo de estrutura secundária da temporizina. Os espectros foram obtidos em um espectropolarímetro JASCO-715, com o uso de uma cubeta de quartzo de 0,1cm de caminho ótico (JASCO, Japão).

**6.10 – Cálculos Estruturais** – Os cálculos da estrutura foram realizados em computadores no Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, no IOC. Estes cálculos foram realizados a partir de informações de restrições, que são geradas nos espectros de NOESY. Estes serão colocados como “input” para o cálculo usando o programa CNS\_solve (Brunger *et al.*, 1998). A visualização da estrutura calculada foi feita usando o programa MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996).

## 7 - Resultados

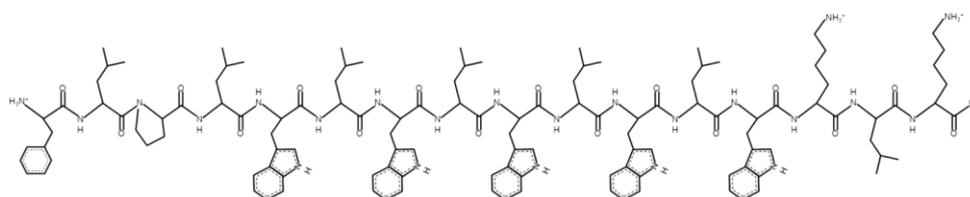
### Desenho Racional e Propriedades Estruturais

O desenho racional da Tz teve como base a estrutura de três peptídeos antimicrobianos descritos na literatura quanto as suas propriedades biológicas e estruturais (tabela 4).

**Tabela 4** - Sequências da TZ e Tz-1 e dos peptídeos antimicrobianos usados para o desenho racional das moléculas.

Peptídeo	Fonte	Sequência	Carga
Temporizina	Este trabalho	FLPLW <sup>5</sup> LWLWL <sup>10</sup> WLWKLK <sup>16</sup>	+2
Temporizina – 1	Este trabalho	FLPLW <sup>5</sup> LWLWR <sup>10</sup> KLK <sup>13</sup>	+3
Temporina A	<i>Rana temporaria</i>	FLPLIGRVLSGIL-NH <sub>2</sub>	+1
Gramicidina A	<i>Bacillus brevis</i>	HCO-VGALAVVVWLWLWLW-NHCH <sub>2</sub>	0
Sapocina B	<i>Sarcophaga peregrina</i>	KLKLLLLLKLK-NH <sub>2</sub>	+4

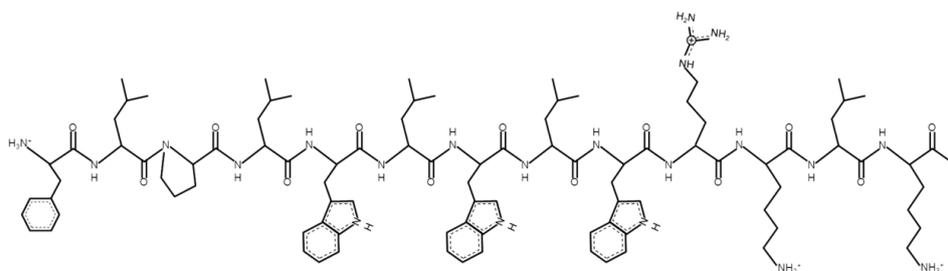
A estrutura primária destes PAMs nos permitiu projetar a estrutura da Tz, com extensão de 16 resíduos de aminoácidos todos em sua forma L, cuja carga líquida foi igual a +2 (Figura 6). Durante os estudos de dicroísmo e helicidade, observamos que Tz possui um alto grau de hidrofobicidade que pode conferir ao peptídeo, toxicidade. Assim, foi projetado um novo peptídeo, denominado Temporizina 1 (Tz-1). Nesta nova estrutura o par **LW** das posições 10-11 foi substituído por um resíduo básico de arginina e o par hidrofóbico **LW** das posições 12-13 subtraído da sequência (Figura 7). Como a classe dos PAMs apresentam entre si algumas características estruturais, procuramos seguir estas propriedades. A caracterização físico-química das moléculas foi realizada utilizando várias ferramentas de bioinformática descritas na seção de material e métodos. As fórmulas estruturais brutas de Tz e Tz-1 estão simuladas nas figuras 6 e 7 respectivamente. Podemos observar do lado superior um cerne hidrofílico, enquanto no lado inferior observamos um cerne hidrofóbico.



#### Propriedades da Temporizina

Sequência:	FLPLWLWLWLWKLK
Comprimento:	16
Massa molecular:	2240.3028
Ponto isoelétrico (pI):	10.57
Carga Líquida:	+2
Hidrofobicidade:	-7.27 Kcal * mol <sup>-1</sup>
Coefficiente de Extinção <sup>1</sup> :	27500 M <sup>-1</sup> * cm <sup>-1</sup>
Coefficiente de Extinção <sup>2</sup> :	27500 M <sup>-1</sup> * cm

**Figura 6** – Fórmula estrutural da Tz de acordo com a projeção de Fisher e quadro contendo as propriedades físico-químicas básicas do peptídeo.

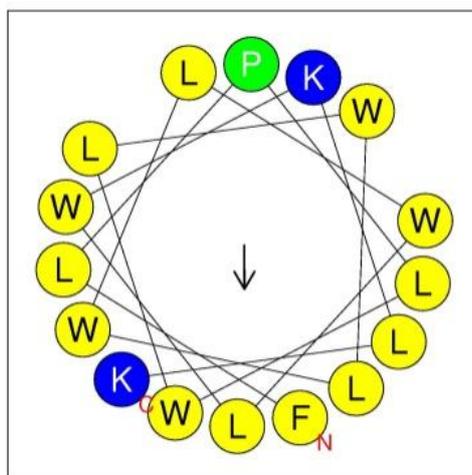


#### Propriedades da Temporizina-1

Sequência:	FLPLWLWLWRKLK
Comprimento:	13
Massa molecular:	1798.0779
Ponto isoelétrico (pI):	11.68
Carga líquida:	+3
Hidrofobicidade:	+1.22 Kcal * mol <sup>-1</sup>
Coefficiente de extinção <sup>1</sup> :	16500 M <sup>-1</sup> * cm <sup>-1</sup>
Coefficiente de extinção <sup>2</sup> :	16500 M <sup>-1</sup> * cm <sup>-1</sup>

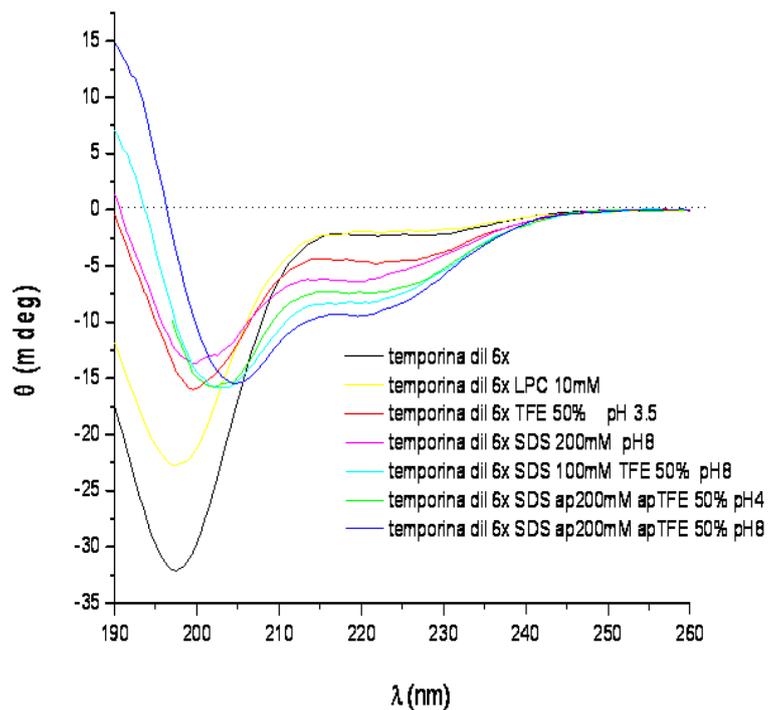
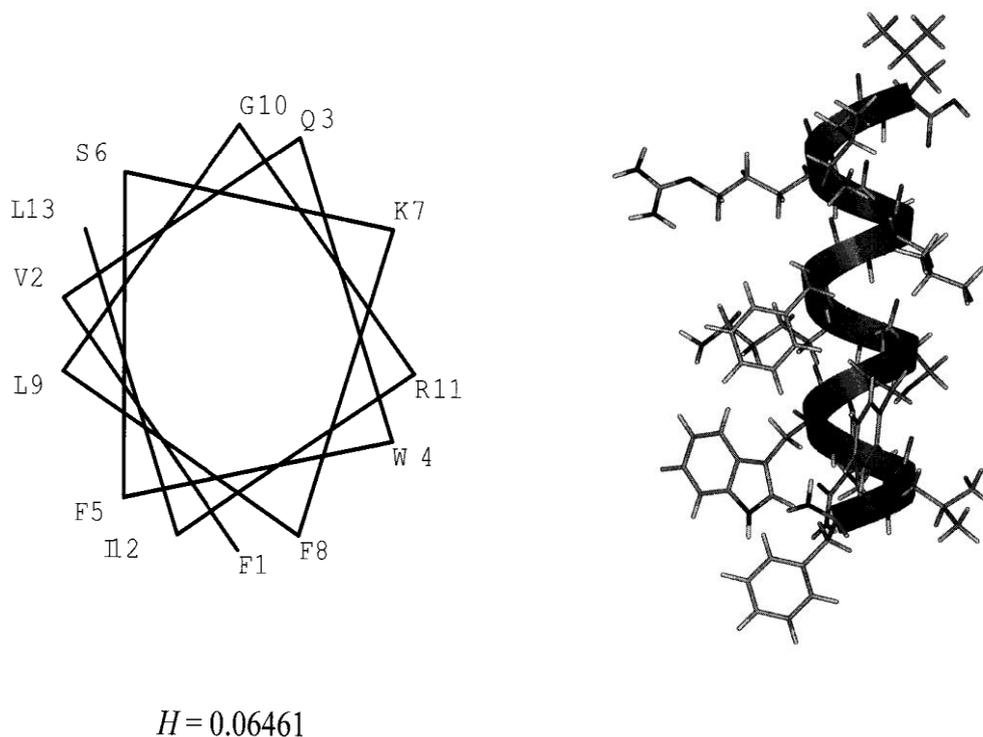
**Figura 7** – Fórmula estrutural da temporizina – 1 em projeção de Fisher e quadro contendo as propriedades físico-químicas básicas do peptídeo.

A projeção espacial de estrutura secundária foi realizada, com ferramentas que determinam gráfico do tipo *helical wheel*. O grau de hidropaticidade da Tz apresentou um valor satisfatório para a atividade antimicrobiana (Figura 8). A análise espectroscópica por dicroísmo circular usando TFE 50% e concentrações de SDS entre 100mM e 200mM com valor de pH entre 4,0 e 8,0 forneceu o valor de elipticidade de  $[\theta] = -16739 \text{ deg. cm}^2/\text{dmol}$ , considerado médio para um peptídeo com estrutura em hélice (Figura 9). Estes dados preditos indicam que o peptídeo possui estrutura secundária, compatível com a formação de  $\alpha$  – hélice em condições de hidrofobicidade e pH fisiológico.



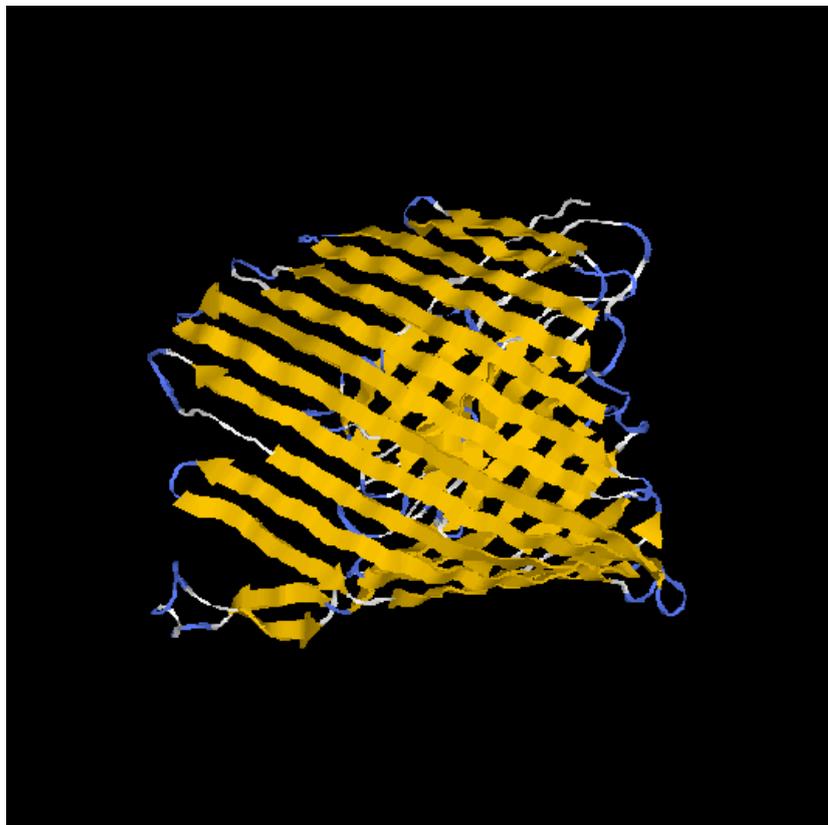
**Propriedades Físico-Químicas**  
**Hidrofobicidade <H>: 1.480**  
**Momento Hidrofóbico < $\mu$ H>: 0.242**  
**Carga Líquida z: +2**

**Figura 8** – Características físico químicas da Tz, determinadas utilizando o software *Heli-Quest (Expasy)*. A distribuição dos aminoácidos por gráfico do tipo *helical wheel*, mostra duas regiões altamente anfipáticas (aminoácidos em amarelo) que estão separadas por dois aminoácidos polares de carga positiva (aminoácidos em azul). As duas lisinas (K), contribuem para a carga líquida positiva e um resíduo de prolina reforça a hidropaticidade da molécula embora em grau médio, como indicado pelo vetor no centro do gráfico.

**A****B**

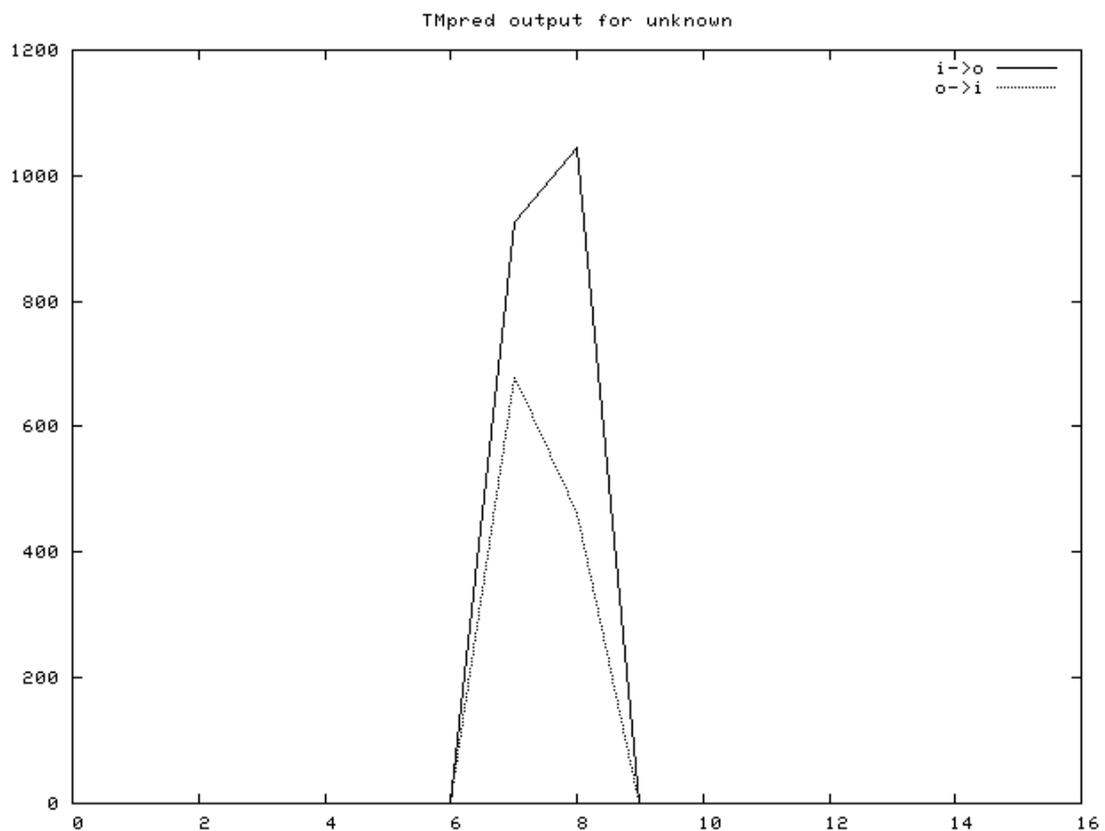
**Figura 9** – Dicroísmo circular (A) e possível estrutura 3D da TZ (B). Os espectros foram executados em 50% de TFE e SDS 100 e 200mM em pH 4,0 e pH 8,0. (A) O gráfico de elipticidade gerou um valor de 0,06461(B) A predição teórica da estrutura 3D da molécula está mostrada ao lado direito em B.

Para confirmar as predições de estruturas secundárias obtidas dos estudos de dicroísmo circular da Tz, foi construída uma molécula polipeptídica com 28 repetições de unidades da Tz, uma vez que os programas existentes não fazem a predição da estrutura 3D de pequenas moléculas. Além disso, por ser uma molécula híbrida projetada em laboratório, a modelagem de sua estrutura deveria seguir o método *ab initio* e demandaria muito tempo. Assim projetamos o híbrido e realizamos os estudos estruturais em uma plataforma automatizada para predição de estrutura e função das proteínas, denominada I-Tasser. Os resultados apresentaram uma estrutura tridimensional de folhas beta que se arranjam em uma projeção semelhante a um barril (Figura 10). Este tipo de conformação foi descrito para peptídeos que possuem atividade sobre a membrana plasmática (Lavery et al., 2011). Podemos notar que as estruturas betas estão em repetição e cada uma das estruturas em setas amarelas representa sequências de Tz.



**Figura 10** – Estrutura 3D de um híbrido formado com 28 repetições da molécula de temporizina e submetido a plataforma I-Tasser. Este foi o melhor modelo obtido para este híbrido e corrobora o arranjo esperado da interação do peptídeo com uma camada de fosfolípido. (<http://zhanglab.ccmb.med.temich.edu/I-TASSER/S98927>)

Uma vez feitas as predições estruturais, submetemos a sequência de temporizina a um estudo teórico de inserção em membrana utilizando o programa *TM pred* e observamos que Tz tem amplo potencial de inserção em bicamadas lipídicas de forma integral (Figura 11). Este estudo também indicou que o peptídeo pode se inserir na membrana tanto no sentido de dentro para fora quanto de fora para dentro. Outro aspecto observado seguindo-se os parâmetros determinados pelo programa em uma escala de *scores* aponta para a conformação em hélice inserida na bicamada fosfolipídica da membrana plasmática. Este resultado está de acordo com a projeção inicial para a estrutura da Tz. Valores maiores que 1000 indicam a inserção integral de proteínas na membrana sobre a forma de hélice; a curva em linha cheia indica a inserção de uma hélice no sentido de dentro para fora da bicamada lipídica; a curva em linha vazada indica a inserção de uma hélice na membrana no sentido de fora para dentro da bicamada lipídica.



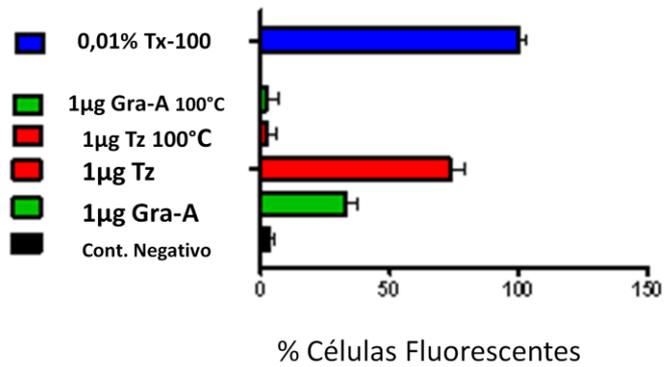
**Figura 11** – Projeção de inserção em membrana da Tz utilizando o programa *TMpred*.

### **Atividade Biológica**

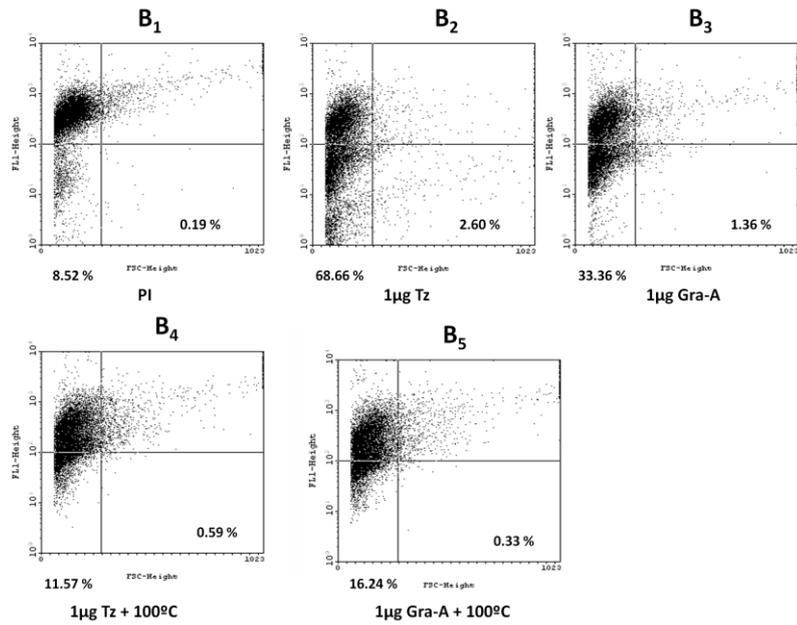
A atividade biocida da temporizina foi ensaiada no estágio epimastigota de *T.cruzi*. Inicialmente foi avaliada a atividade numa concentração de 1µg/mL de Tz e comparada com 1µg/mL de Gra- A. Foi utilizada microscopia de fluorescência para um ensaio de absorção do corante iodeto de propídio (PI) como marcador de células lisadas (dados não mostrados). Entretanto, como resultado desta marcação, pode-se observar na figura 12A que a Tz foi mais efetiva do que Gra-A contra o *T.cruzi*. Resultados semelhantes foram observados por citometria de fluxo (FACS) (Figuras 12B). A captação de corantes pelas células não ocorreu quando os peptídeos foram omitidos. A entrada do corante na célula está relacionada diretamente a um efeito do peptídeo sobre o parasita, porque quando foi utilizado peptídeo desnaturado (100°C), na mesma concentração não foi observado captação do corante. O tratamento dos parasitas com 0,01% de Triton X-100, um detergente que desestabiliza biomembranas propiciou a captação do corante em altas concentrações (Figuras 12A e 12C).

A

Ensaio de Permeabilização Celular – *T. cruzi*

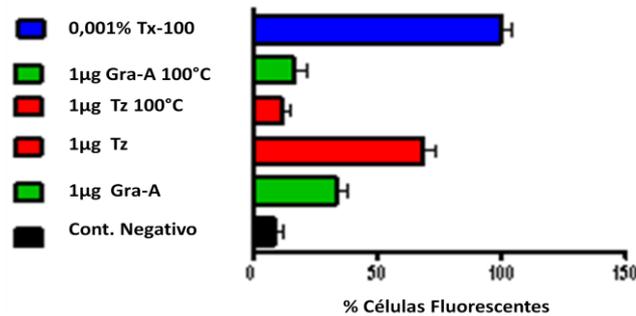


B



C

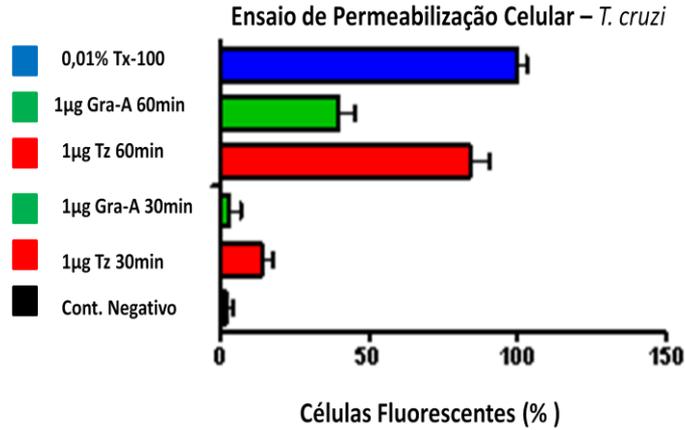
Citometria de Fluxo – *T. cruzi*



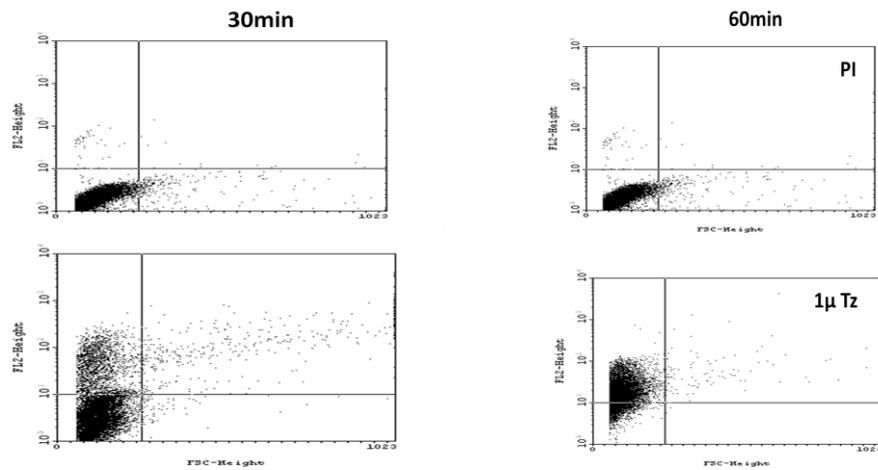
**Figura 12** – Efeito de Tz em *T. cruzi*. (A) Quantificação dos resultados obtidos nos ensaios de captação de PI utilizando microscopia de fluorescência. (B) Os tratamentos feitos para os ensaios utilizando microscopia de fluorescência foram repetidos e a cultura analisada por FACS. (C) Quantificação dos resultados obtidos por FACS. Os valores representam a média  $\pm$  SD de três a cinco experiências realizadas em dias diferentes. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  comparado com o correspondente controle negativo.

Uma vez determinada a atividade de Tz sobre o *T.cruzi* determinamos a cinética temporal do peptídeo. Os resultados estão mostrados na figura 13. O tratamento por 90 e 120 minutos, ocasionou uma grande destruição na integridade das membranas fato que dificultou a visualização e a obtenção de imagens das células marcadas. A figura 13A mostra os percentuais de fluorescência pela incorporação de IP dos tratamentos com 1µg/mL de Tz e Gra-A por 30min e 60min, respectivamente. Cerca de 80% dos parasitas foram marcados quando tratados com Tz por 60min e somente 15% das células foram marcadas quando incubadas por 30min. Quando os parasitas foram tratados nas mesmas condições experimentais e a análise realizada por FACS, observamos que o peptídeo Tz induziu um aumento da captação do corante de 0,56% para 10,40% em 30min e de 41,90% após 60min (Figura 13 B). Além disso, quando a cultura de epimastigotas foi tratada com 1µg/mL de Gra-A por 30min somente 5% de células de *T.cruzi* foram marcadas com PI. O tratamento na mesma concentração por 60min ocasionou uma marcação de 44% das células (Figuras 13B e 13C).

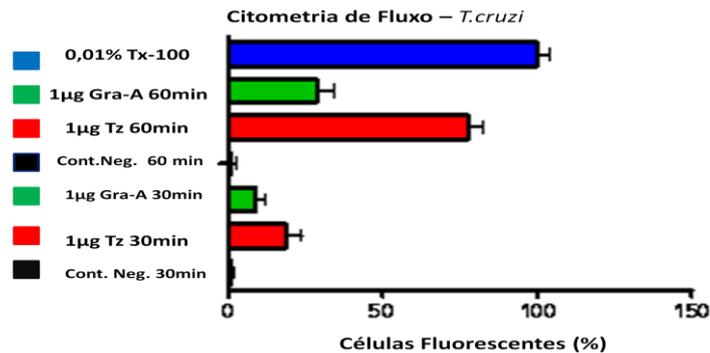
A



B



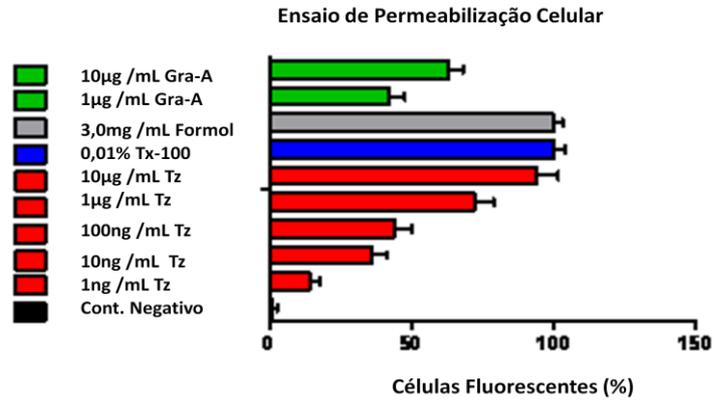
C



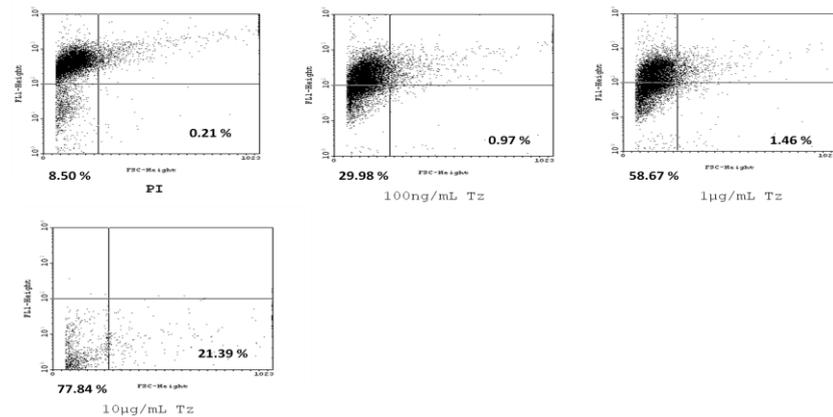
**Figura 13** – Efeito temporal de Tz e Gra-A sobre a viabilidade celular da cultura de *T. cruzi*. (A) Resultados quantitativos das análises de captação de corante realizadas por microscopia de fluorescência (MCFLU); (B) Efeito temporal realizado por FACS; (C) Resultados quantitativos dos experimentos de FACS. Nesta figura também estão os dados obtidos após tratamento com 1µg/mL de Gra-A para os mesmos tempos e controle positivo (0,01% de Tx-100). Os valores representam a média  $\pm$  SD de três a quatro experimentos realizados em dias diferentes.  $P < 0,05$ ,  $p < 0,01$  em comparação com os controles respectivos negativos.

O efeito microbicida da Tz sobre o *T. cruzi* também foi avaliado em análises de MCFLU (Figura 14A) e FACS (Figuras 14B e 14C) utilizando concentrações que variaram de 1ng/mL a 10µg/mL. A relação entre a emissão de fluorescência e o número de parasitas marcados foi dependente da concentração de peptídeos, sendo que a Gra-A mostrou um efeito tripanocida menor que da Tz, ou seja, uma menor porcentagem de parasitas marcados com PI foi observada quando as células foram tratadas com gramicidina (Figura 14A). A emissão de fluorescência nestes estudos foi também dose-dependente e maior quando se aumentou a concentração de Tz. Quando uma cultura foi submetida às mesmas condições experimentais e analisada por FACS, a temporizina se mostrou mais eficaz em lisar a membrana do *T. cruzi*, que a Gra-A, uma vez que 77,84% das células tratadas com Tz foram lisadas pelo peptídeo. Enquanto no tratamento com Gra-A, o gráfico de quantificação mostra que menos de 50% das células apresentaram lise, quando tratadas na mesma concentração (Figuras 14A e 14B).

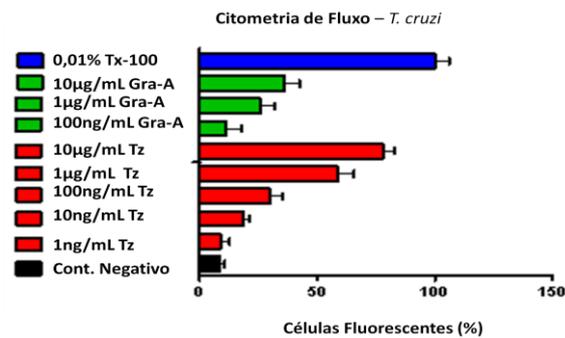
A



B



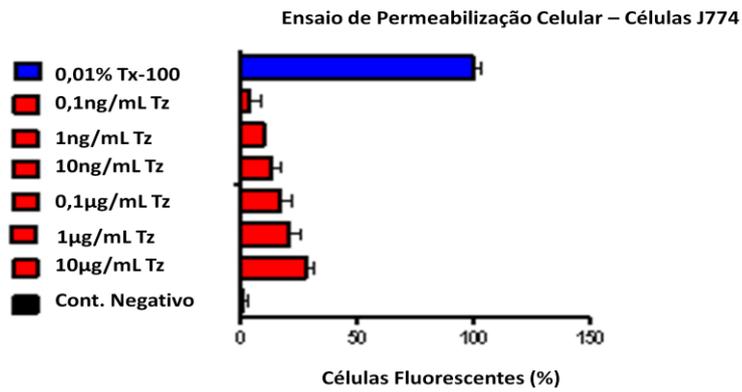
C



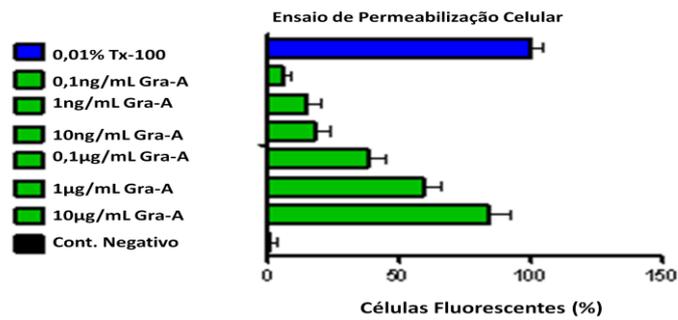
**Figura 14** – A atividade antimicrobiana dose dependente da Tz contra o *T. cruzi*. (A) Gráfico mostrando os efeitos de Tz em diferentes concentrações comparando ao efeito de Gra-A em duas concentrações efetivas e os controles positivos (Tx - 100 e 3,0mg/mL de Formol) no ensaio de permeabilização celular analisado por MCFLU. (B) Cultura de epimastigotas tratada com Tz a 0.1µg/ml, 1µg/ml e 10µg/mL, analisada por FACS (C) Gráfico mostrando os resultados de Quantificação em análise por FACS comparando os controles positivos e o tratamento da cultura com Gra-A em duas concentrações efetivas. Os valores representam a média  $\pm$  SD de cinco experimentos realizados em dias diferentes comparados com os controles negativos correspondentes.

Os peptídeos antimicrobianos podem ter um efeito indesejável sobre as células do hospedeiro. Assim, testamos a toxicidade da Tz “in vitro”, frente a células de linhagem J774. Uma baixa toxicidade da Tz foi observada em concentrações em que seu efeito antimicrobiano é efetivo em lisar o *T. cruzi* (Figura 15A). Este efeito foi evidente quando comparado com o controle positivo (0,1% de TX 100), e está em níveis aceitáveis para um antimicrobiano. A Gra-A nas mesmas concentrações de Tz apresentou um efeito lítico acentuado nas células J774 em concentrações muito baixas (Figura 15B). Para confirmarmos e validarmos os ensaios de permeabilização celular empregando a captação de um corante fluorescente (PI) foi utilizado um teste bioquímico, isto é, medimos a atividade de uma enzima constitutiva a LDH no sobrenadante. A Tz em concentrações de 10µg/mL de 100µg/mL induziu a liberação de 11% e 35% de LDH, respectivamente. No entanto o tratamento das culturas nas mesmas concentrações de Gra-A ocasionou a liberação de 66 e 84% de LDH (Figura15C).

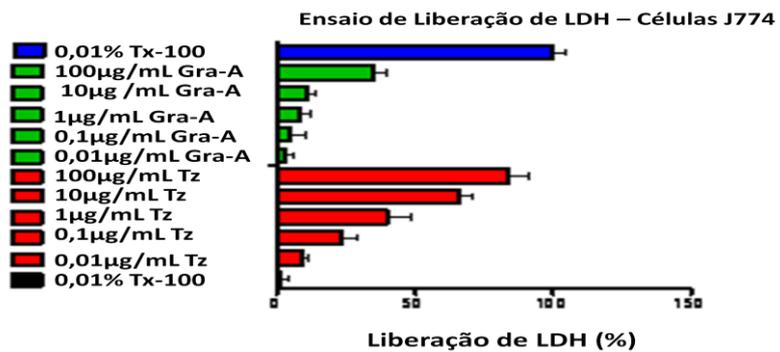
A



B



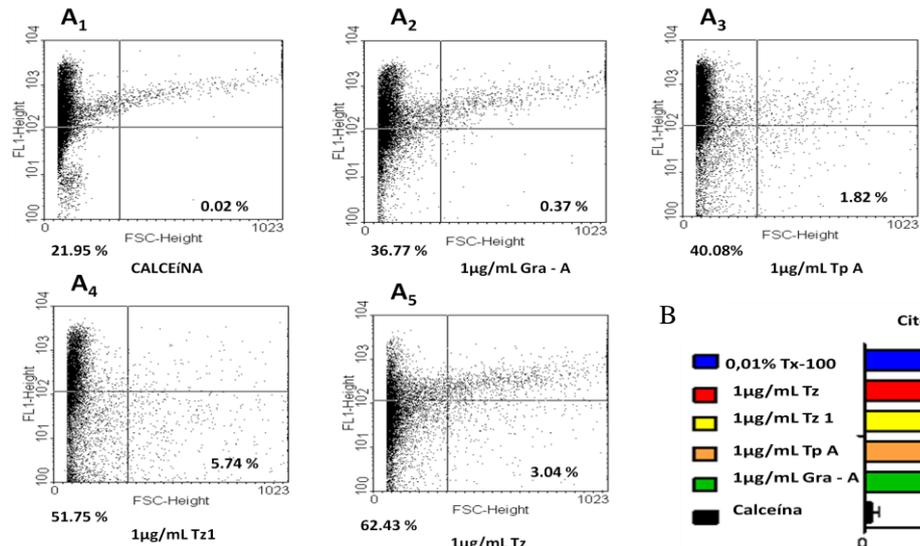
C



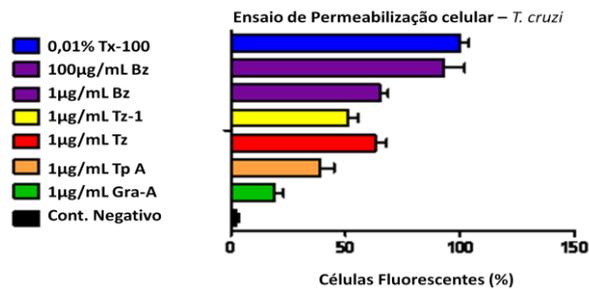
**Figura 15** – Efeitos da Tz sobre células de mamíferos. Em A e B observamos a quantificação dos efeitos de Tz e Gra-A, por MCFLU, sobre as células de linhagem J774 em seis diferentes concentrações, incubadas durante 60min a 37°C; Em C mostramos o gráfico de quantificação da liberação de LDH após o tratamento de culturas de J774 com Tz e Gra-A nas mesmas condições experimentais utilizadas no ensaio de permeabilização celular. Os valores representam a média  $\pm$  SD de seis experiências (Ensaio de permeabilização celular) e três experiências (ensaio de liberação de LDH), realizado em dias diferentes. Comparado com o controle negativo correspondente.

Como Tz apresentou alguma atividade tóxica para as células J774 resolvemos modificar a sua sequência para abolir esta atividade indesejável e o peptídeo resultante, denominamos Tz-1. Na figura 16A, numa análise por FACS de culturas de epimastigotas de *T. cruzi* 1µg/mL de Gra-A, Tp-A, Tz-1 e Tz temos: A1) cultura marcada com calceína sem tratamento; A2) tratamento com Gra-A foi observado uma lise de 36,77% das células; A3) a temporina-A induziu a lise de 40,8% das células; A4) tratamento com Tz-1 por 60min resultou numa lise de 51,75% ; A5) por outro lado Tz induziu a lise de 62,43%. A quantificação do FACS pode ser vista na figura 16B. Em outro teste de permeabilização foi empregada emissão de fluorescência pela captação de PI, foi comparado o efeito lítico dos quatro peptídeos com o efeito do Benznidazol. Os resultados mostraram que Tz tem potencial de lise semelhante ao de Bz (fig. 16C). No mesmo experimento foi observado que a Tz tem uma maior eficácia lítica do que Tz-1, Tp-A e Gra-A. A atividade tripanocida dos peptídeos, também foi avaliada em um ensaio clássico de captação de MTT. Culturas de epimastigotas foram tratadas com quatro concentrações diferentes (0,1µg/ml, 1,0µg/ml, 10µg/ml e 100µg/ml) e comparadas com Bz. Os resultados mostraram que Tz tem a melhor atividade tripanocida comparada aos outros peptídeos e uma atividade similar a do Bz. A exemplo se considerarmos como referência o tratamento com uma dose de 1µg/mL das drogas testadas concluímos que a atividade foi: Benznidazol > Tz > Tz-1 > Tp-A > Gra-A.

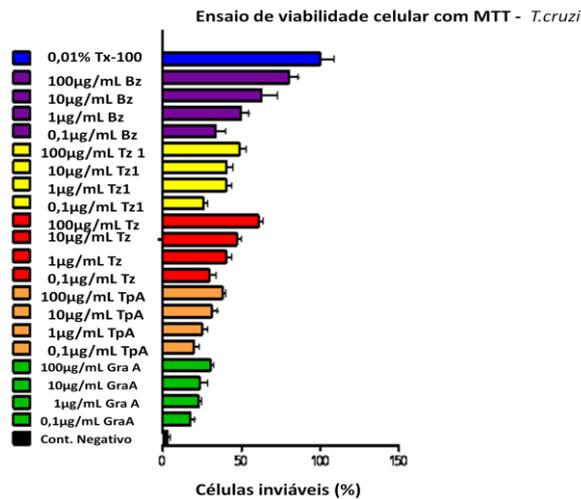
A



C

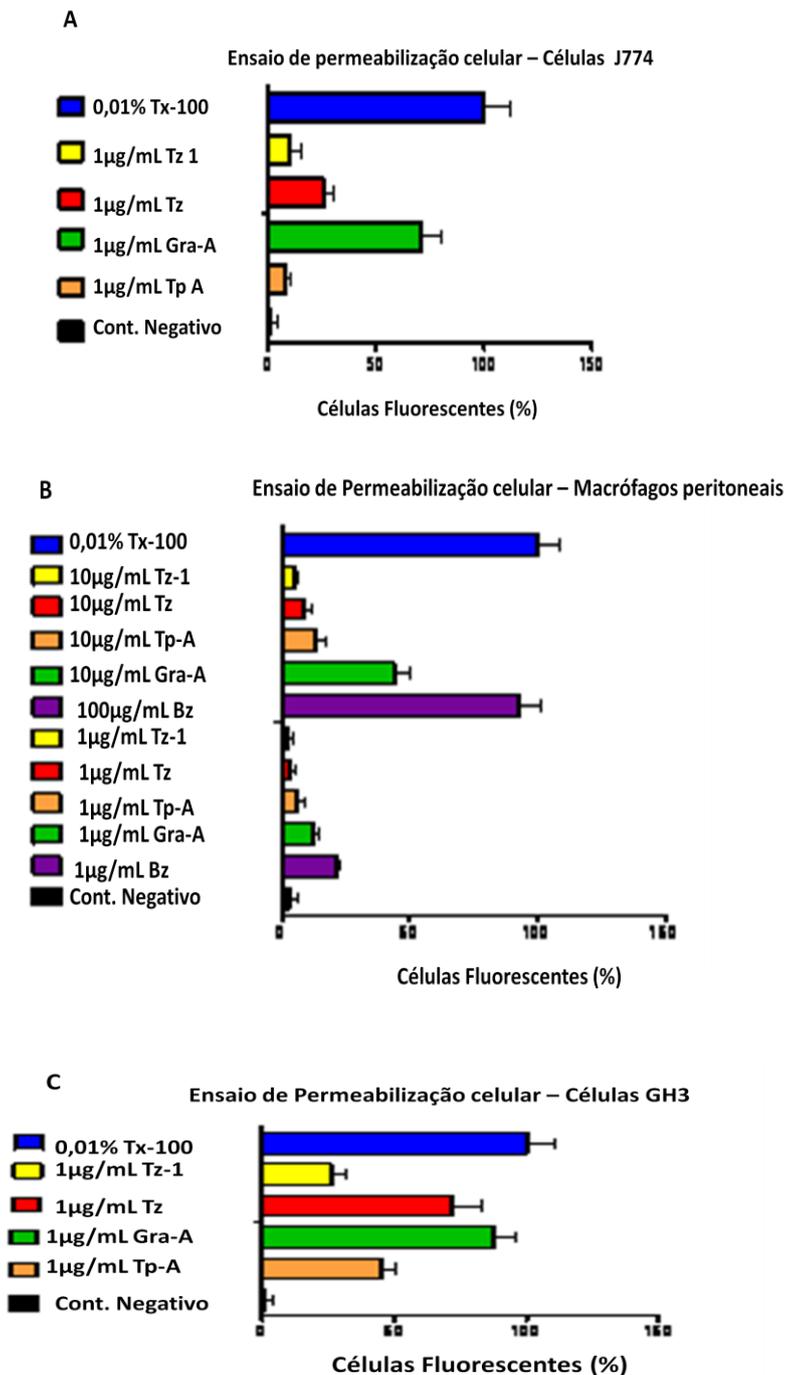


D



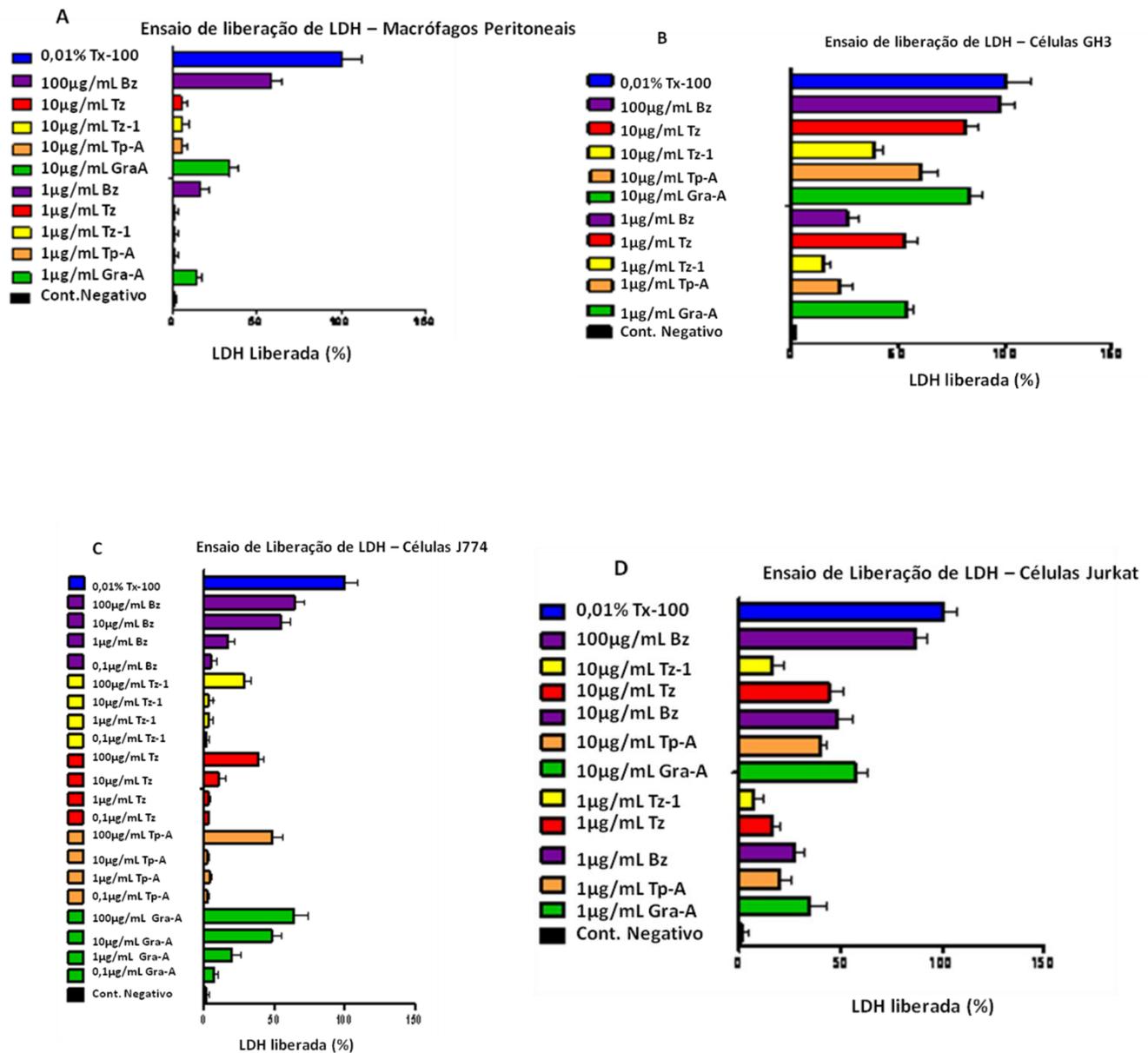
**Figura 16** – (A) Análise por FACS de culturas de epimastigotas de *T. cruzi* 1µg/mL de Gra-A, Tp-A, Tz-1 e Tz: (A1) cultura marcada com calceína sem tratamento; (A2) Células tratadas com 1µg/mL de Gra-A; (A3) Células tratadas com 1µg/mL de Tp-A; (A4) 1µg/mL de Tz-1; (A5) 1µg/mL de Tz. (B) Quantificação dos resultados analisados por FACS; (C) Ensaio de permeabilização celular de captação de PI (D) Ensaio de MTT utilizando várias concentrações dos PAMs e Bz. Os valores representam a média ± SD cinco experimentos (FACS e de EPC) e três experimentos (MTT), realizados em dias diferentes.

O efeito lítico de Tz-1 contra o *T. cruzi*, foi confirmado por metodologias distintas. Por isso, resolvemos investigar o seu grau de toxicidade para quatro diferentes linhagens de células. Células J774, macrófagos peritoneais de camundongos, células Jurkat e células GH3. Quando analisamos culturas tratadas com os peptídeos, observamos que a Gra-A apresentou maior toxicidade do que os outros peptídeos para as linhagens de células J774. Gra-A induziu uma lise em 71% das células enquanto Tz, Tz-1 e Tp-A provocaram uma taxa de lise de 10% (Figura 17A). Quando utilizamos as mesmas condições experimentais e testamos em macrófagos peritoneais foram encontrados resultados semelhantes aos encontrados para as células J774. Embora tenha sido observada diminuição dos efeitos líticos da Tz-1(4,5%) para esta linhagem celular, quando comparadas a Tz (10%) (Figura 17B). Por outro lado, Tz apresentou um efeito lítico acentuado para as células GH3 o que abre a possibilidade de utilizarmos este peptídeo como um protótipo antitumoral (Fig. 17C).



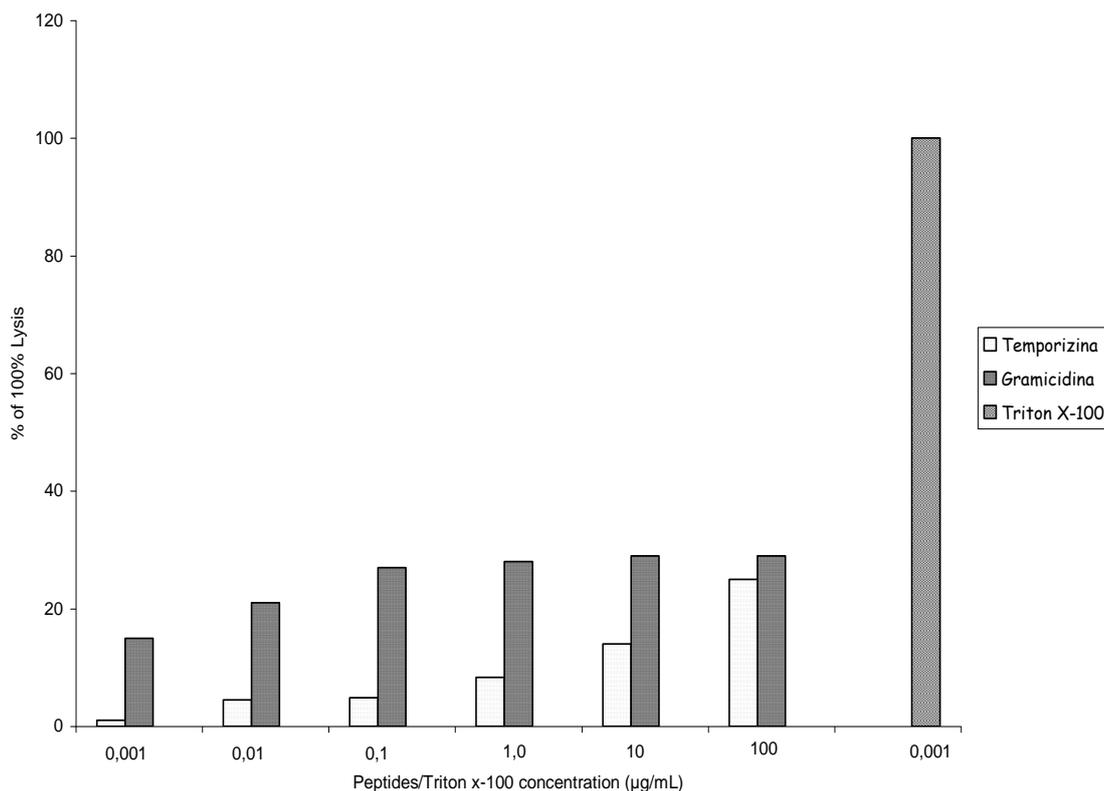
**Figura 17** – Efeitos de Tz e Tz-1 em células de mamíferos (A) Quantificação dos resultados obtidos por MCFLU e linhagem J774; (B) Atividade de Tz, Tz-1, Tp-A, Gra-A e Bz em ensaio de permeabilização celular em cultura de macrófagos peritoneais utilizando 1µg/mL e 10µg/mL; (C) Cultura de células GH3 tratadas com 1µg/mL e 10µg/mL de Tz, Tz-1, Tp-A, Gra-A e Bz e analisadas por ensaio de permeabilização celular. Os valores representam a média  $\pm$  SD de cinco experimentos realizados em diferentes dias.

Os experimentos, de liberação da LDH, entretanto evidenciaram em macrófagos peritoneais que a Tz, Tz-1 e Tp-A, induziram um efeito lítico abaixo de 10% nas duas concentrações testadas, enquanto Gra-A, apresentou efeito lítico acima de 10% para as duas concentrações testadas (Figura 18A). Usando as mesmas condições experimentais, usando as células GH3 (Figura 18B), a Tz mostrou efeito lítico sobre estas células confirmando os resultados obtidos no ensaio de permeabilização celular e Tz1 mostrou efeito lítico abaixo de 50% nas duas concentrações testadas. Enquanto Bz e Gra-A mantiveram altos níveis de lise (> 50%) nas duas concentrações testadas. Quando estudamos a liberação de LDH em uma cultura de células J774, observamos que Tz induziu um efeito lítico de 10% (Figura 18C). Como podemos observar nesta mesma figura a Tz-1 e a Tp-A também apresentaram baixa toxicidade sobre a cultura. O Benznidazol e a Gra-A foram mais tóxicos do que os peptídeos testados. A Tz induziu uma liberação de 30% da LDH a uma concentração de 10µg/mL, mas apresentou uma indução abaixo de 15%, quando a cultura foi tratada com 1µg/mL de Tz (Figura 18D). Em contrapartida em cultura de células Jurkat Tp-A, Bz e Gra-A, induziram altos níveis de liberação de LDH nas mesmas concentrações de Tz (Figura 18D). Nesta mesma figura podemos observar que a Tz-1 induziu uma menor liberação de LDH, quando utilizada nas mesmas concentrações que Tz.



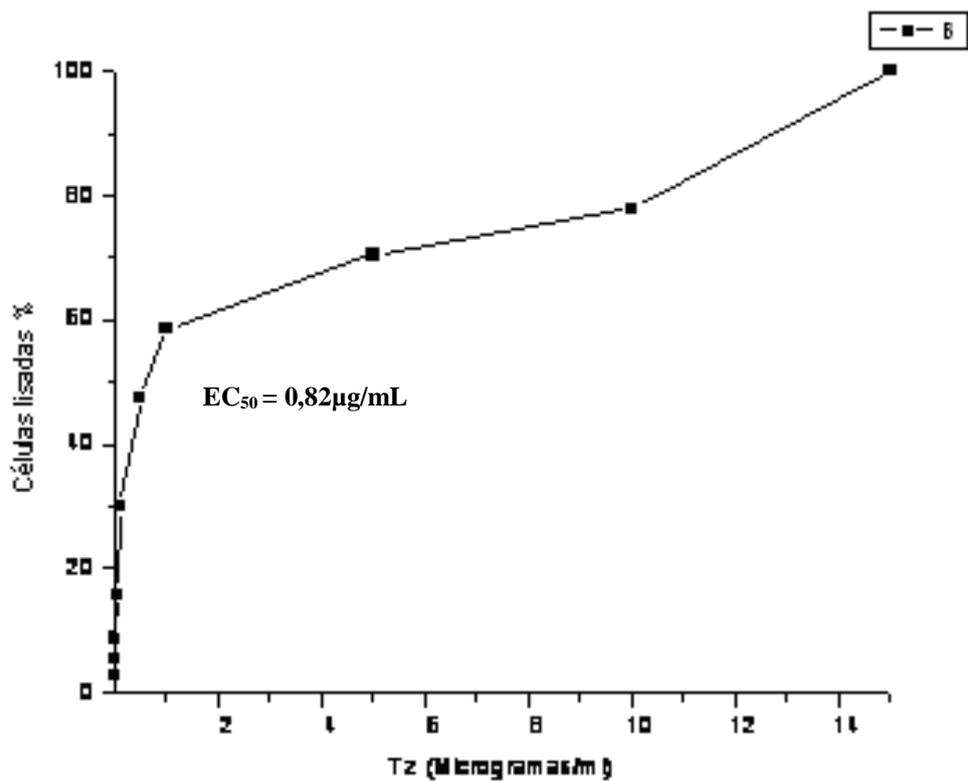
**Figura 18** – Efeitos de Tz e Tz-1 sobre células de mamíferos(A) Liberação da LDH em cultura de macrófagos peritoneais tratados com diferentes concentrações de Ta, Tz-1, Tp-A, Gra-A e Bz; (B) Liberação da LDH em cultura de células GH3 tratadas com diferentes concentrações de Tz, Tz-1, Tp-A, Gra-A e Bz; (C) Liberação da LDH de Células J774 tratadas com diferentes concentrações de Tz, Tz-1, Tp-A, Gra-A e Bz; (D) Liberação da LDH de células Jurkat tratada com diferentes concentrações de Tz, Tz-1, Tp-A, Gra-A e Bz. Os valores representam a média ± SD de cinco experimentos realizados em diferentes dias.

Como a Gra-A, é um peptídeo antimicrobiano de amplo espectro, que já é produzido em escala industrial, achamos importante avaliar e comparar a atividade hemolítica da Tz com a Gra-A em eritrócitos humanos. Na concentração de 100µg/mL a Tz produziu 22% de hemólise enquanto que na mesma concentração a Gra-A produziu 30% de hemólise. A correlação entre o valor da atividade hemolítica mínima e a concentração inibitória mínima, indicou um índice terapêutico de 75 para a Tz.



**Figura 19** – Comparação da atividade hemolítica da TZ e da Gra-A. O Triton – X100 a 0.001% foi utilizado como controle de 100% de hemólise.

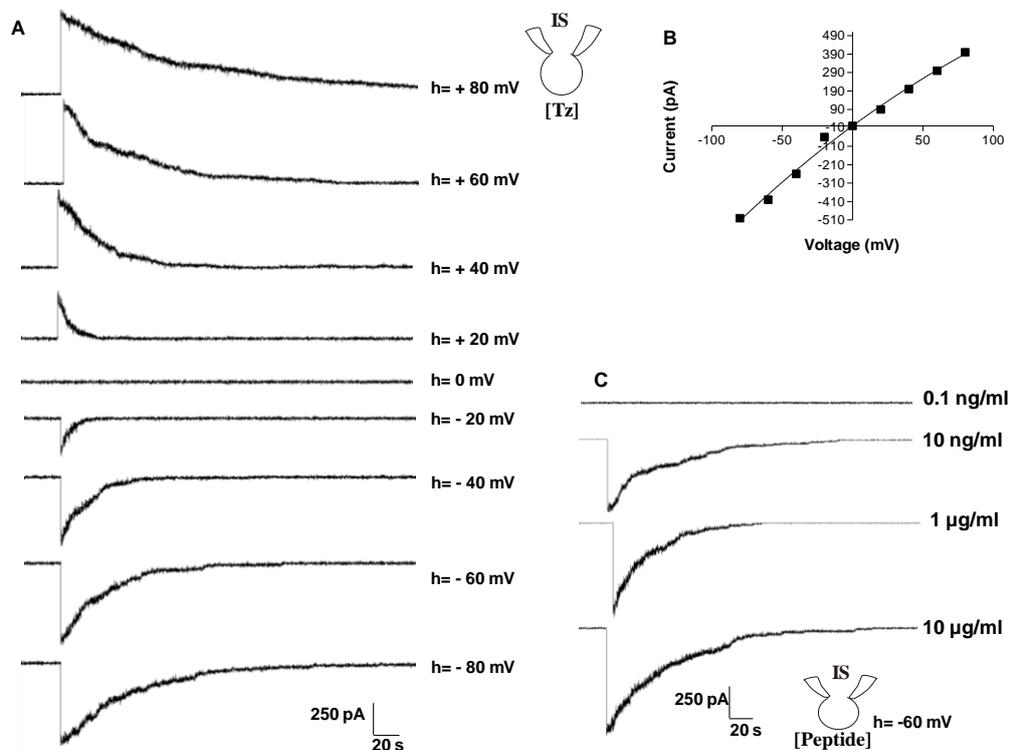
Para determinar a concentração inibitória mínima, uma cultura de epimastigotas de *T. cruzi* foi tratada com concentrações de 0,001µg/mL a 15µg/mL de Tz. Os resultados estão apresentados na figura 28 e a concentração efetiva capaz de lisar 50% dos parasitas (EC<sub>50</sub>) em fase logarítmica foi de 0,82µg/mL.



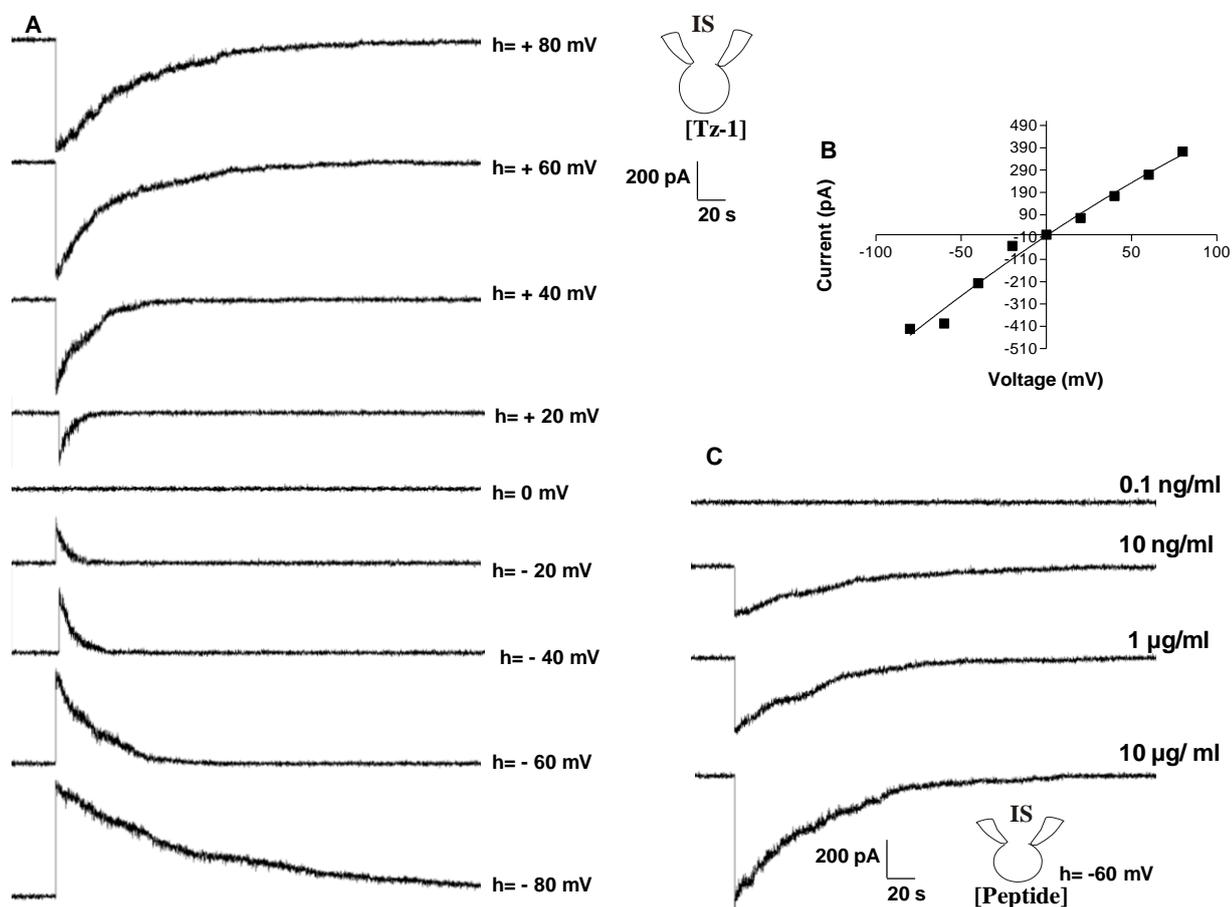
**Figura 20** – Efeito de diferentes concentrações de Tz sobre a viabilidade de células de epimastigotas de *T. cruzi*. A concentração efetiva (EC) lítica do peptídeo foi de 0,82µg/mL.

## Estudos Eletrofisiológicos

O mecanismo de ação dos peptídeos, TZ e TZ-1, foi avaliado usando a técnica de eletrofisiologia *patch clamp* na configuração de célula inteira. Células HEK-293 foram incubadas com 1 µg/mL de TZ em placas de Petri e aplicado um potencial de 80mV a -80mV (Figura 21). A Tz em concentração a partir de 10ng/mL induziu correntes iônicas macroscópicas, mas não foi observada tensão dependência em relação a variação de voltagem (Figuras 21A e 21B). No entanto, esta corrente iônica macroscópica foi dependente da concentração de peptídeo (Figura 21C). Os mesmos parâmetros foram aplicados para Tz-1 (Figura 22).

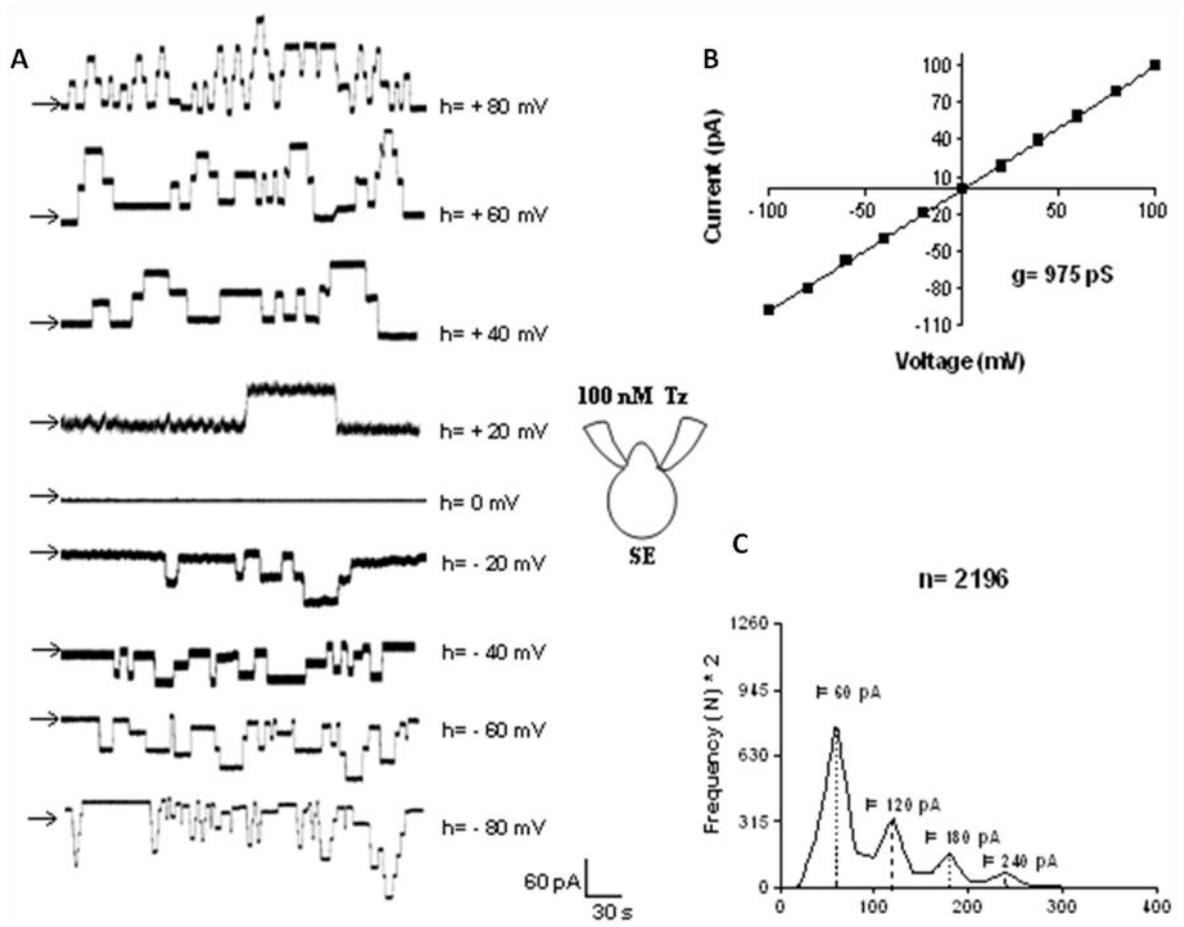


**Figura 21** – Células HEK – 293 tratadas com Tz. **(A)** Correntes iônicas, registradas a partir de grampeamento setorial pelo método *célula inteira*, em membrana plasmática de células HEK-293 induzidas por concentrações diferentes de Tz. O potencial de manutenção variou de 100mV a -100mV. **(B)** Relação média para a configuração de *célula inteira*. **(C)** Gravações de correntes em grampeamentos do tipo *célula inteira* obtido a partir de células HEK-293 em função de concentrações variadas de Tz. Os valores representam o SD de seis experiências realizadas em dias diferentes.



**Figura 22** – Efeito de diferentes concentrações de Tz-1 em células HEK-293 avaliadas na configuração “célula inteira”. **(A)** Correntes iônicas macroscópicas, em grameamento do tipo célula inteira, em célula HEK-293 induzidas por diferentes concentrações de Tz-1. O potencial de manutenção variou de 100mV a -100mV. **(B)** Relação média para a configuração de célula inteira. **(C)** Gravações de correntes, em grameamento do tipo célula inteira, obtidas a partir de células HEK-293 em função das concentrações variadas de Tz-1. Os valores representam o SD de seis experiências realizadas em dias diferentes.

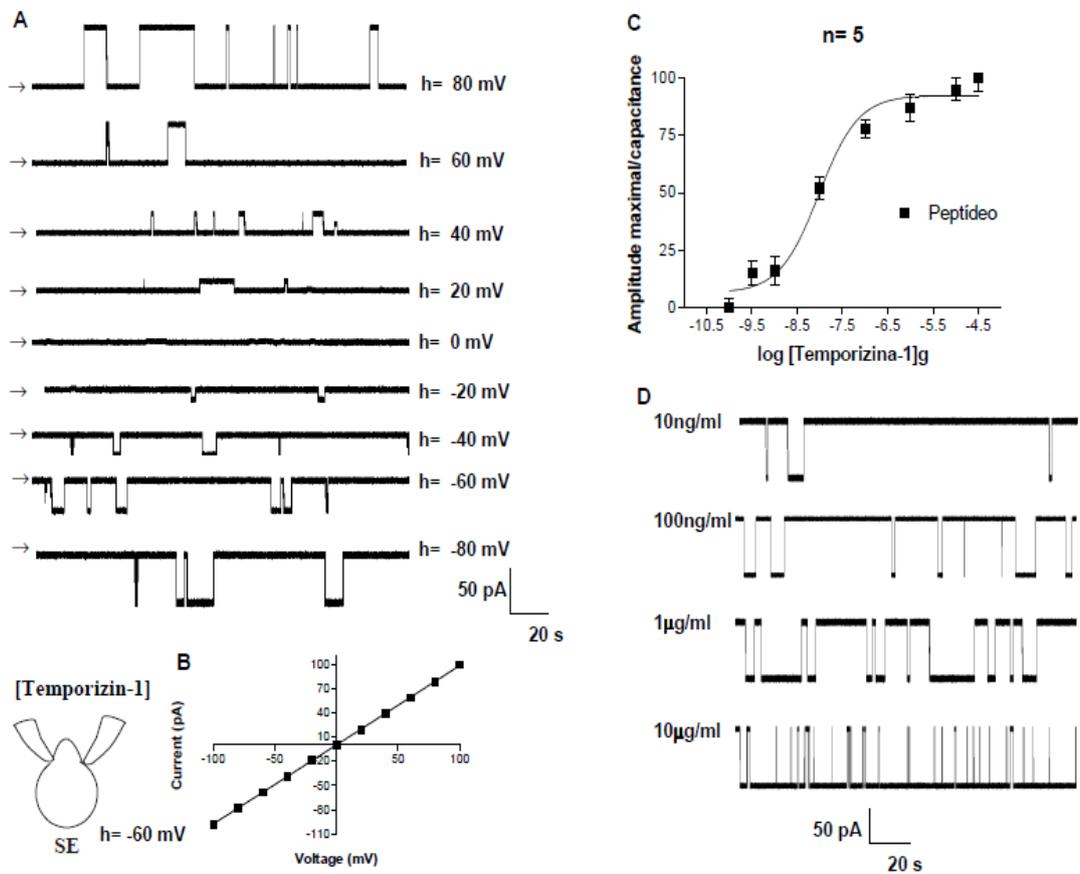
Uma vez identificada a formação de correntes iônicas em dois ensaios do tipo célula inteira, empregando as mesmas condições experimentais em células HEK-293 avaliamos a capacidade de Tz formar poros na configuração “célula ligada”. A temporizina apresentou uma capacidade de formar poros em biomembranas numa concentração limitante de 1ng/mL quando se aplicou diferentes potenciais de membrana (Figura 23A). O peptídeo foi adicionado a solução externa e logo após uma pipeta contendo esta solução foi encostada na superfície da membrana para o grampeamento. Nestas condições a Tz foi capaz de produzir pelo menos um poro na membrana da célula (Figura 23B) e três canais com amplitude de corrente entre 60 e 240pA (Figura 23C).



**Figura 23** – Estudos eletrofisiológicos mostrando a formação de poros pelo peptídeo TZ em células HEK 293 usando a “configuração célula ligada”; **(A)** Canal de corrente formado quando a célula foi tratada, com 1nmol/mL de Tz e aplicados diferentes potenciais de membrana; **(B)** Média da relação voltagem – corrente para um único poro; **(C)** Histograma de amplitude de todos os canais simples formados. Quatro curvas Gaussianas com 60, 120, 180 e 240pA foram observadas, respectivamente. As médias representam  $\pm$  SD de 10 experimentos independentes.

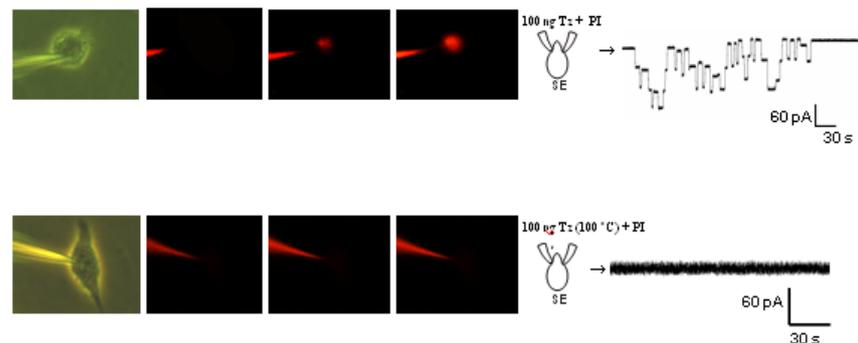
Quando aplicamos Tz-1 ao tampão externo e ao tampão de preenchimento da pipeta, em um ensaio de grampeamento setorial, célula ligada, foi observado que a Tz-1 tem a propriedade de formar poros em uma concentração limitante de 10ng e que essa propriedade é dependente de concentração. Uma vez que ao aumentarmos a concentração do peptídeo, observamos um aumento de amplitude do canal (Figura 24).

Comparando as figuras 23 e 24, observamos que tanto Tz quanto Tz1 são capazes de formar poros na membrana plasmática de células HEK-293 e esta atividade foi dependente da concentração. Quanto maior a concentração de peptídeo um número maior de poros são formados na região onde as moléculas se inserem na membrana. Estes estudos também demonstram que a Tz1 perde a toxicidade da TZ, mas não perde propriedade de formar poros na membrana.



**Figura 24** – Estudos eletrofisiológicos mostrando a formação de poros pelo peptídeo TZ-1 em células HEK 293 usando a “configuração célula ligada”; (A) Canal de corrente formado quando a célula foi tratada, com 1nmol/mL de Tz1 e aplicados diferentes potenciais de membrana; (B) Média da relação voltagem – corrente para um único poro; (C) Relação amplitude concentração de Tz1 para formação de um canal de corrente; (D) Formação de canal de corrente em diferentes concentrações de Tz1 aplicando-se um único potencial de membrana por 20 segundos. As médias representam  $\pm$  SD de 10 experimentos independentes

Na figura 25 estão apresentados os resultados da formação de poros pela Tz e os valores de exclusão do poro executados com células HEK-293 em modo “célula ligada” (banho externo com 100ng/mL de Tz ativa e inativada a 100°C). Para definir o tamanho dos poros foi realizado experimento na presença de quatro diferentes corantes com peso molecular até 3000 Da. O valor de exclusão dos poros foi de 636 Da e 100ng/mL de peptídeo foi suficiente para produzir o efeito sobre a membrana. Estes experimentos confirmam nossos resultados anteriores com epimastigotas de *T.cruzi*.



Corantes	Temporizina
EB (396 Da)	+
LY (457 Da)	+
PI (636 Da)	+
ROD-dextran (3000 Da)	-

**Figura 25** – Captação celular de diferentes corantes por células HEK 293; **(A)** 100ng de Tz foram adicionados ao meio contendo as células pela estratégia “célula ligada”. A direita é apresentado o gráfico indicando a formação de poros obtidos com o registro de um fluxo de corrente de 60pa por 30 segundos; **(B)** Tz tratada a 100°C aplicada nas mesmas condições experimentais de A. Nenhum efeito de formação de canal foi observado como indicada pelo gráfico a direita. O corante mostrado nos dois experimentos acima foi o iodeto de propídio (PI); **(C)** Tabela relacionando os corantes testados e o efeito positivo ou negativo obtido.

## 8 - Discussão

Os peptídeos antimicrobianos são uma boa alternativa aos fármacos convencionais. Entretanto, algumas características moleculares são uma das restrições a um investimento mais efetivo para o desenvolvimento de novas drogas baseadas em PAMs. No entanto várias das características restritivas podem ser contornadas com alterações da estrutura química da molécula com um simples desenho racional. No caso da Temporizina, um cerne contendo múltiplos resíduos de triptofano foi o bastante pra modificar a afinidade da molécula pela membrana de *T. cruzi*. Por outro lado, a inserção de um resíduo de arginina e a supressão do par leucina – triptofano na estrutura de Tz-1 foi importante para diminuição da toxicidade deste peptídeo e manteve sua atividade lítica contra o *T. cruzi*. Atualmente o Bz e o Nifurtimox são as únicas drogas disponíveis para o tratamento de pacientes em vários estágios da doença de Chagas. No entanto estas duas drogas têm várias limitações devido à sua alta toxicidade e eficácia limitada durante a fase crônica da doença (Urbina e Docampo, 2003), tanto que somente o Bz continua a ser produzido no Brasil e por um laboratório oficial.

O uso do Bz em quimioprofilaxia parece ter induzido o aparecimento de clones resistentes nas diferentes populações de *T. cruzi* nas diferentes regiões endêmicas (Coura & Castro, 2002). Por outro lado até o momento não foram desenvolvidas vacinas ou outros métodos terapêuticos que sejam eficazes contra a doença de Chagas (Croft et al, 2006; Delespaux e Koning, 2007). Estes fatos têm incentivado vários grupos de pesquisa a procurar novas alternativas que possam ampliar as possibilidades na terapia contra a doença de Chagas. Uma destas vertentes é a procura de novos princípios ativos que tenham atividade antiparasitária de amplo espectro, baixa ou nenhuma toxicidade para o paciente, não seja indutor de resistência microbiana e tenha baixo custo de produção. PAMs e pequenas proteínas com atividade microbicida possuem algumas dessas propriedades.

PAMs possuem atividade contra um largo espectro de microorganismos, incluindo bactérias, fungos, protozoários e raramente vírus. Apesar das variações na sua estrutura e

comprimento de cadeia, estes peptídeos partilham duas características principais importantes para o seu modo de ação: carga líquida positiva e um caráter anfipático (figuras 13 e 14) que induz as conformações de  $\alpha$ -hélice e ou estruturas de folha beta quando interagem com a membrana de fosfolipídio da célula alvo, que geralmente é carregada negativamente em microrganismos e possuem uma composição diferenciada com relação às membranas de células eucarióticas superiores. O que torna muito comum, os mecanismos de ação de PAMs ocorrerem pela inserção e permeabilização da membrana (Brogden, 2005). Este mecanismo de ação pode explicar por que PAMs não induzem resistência, possuem seletividade e são eficazes contra os microrganismos patogênicos resistentes aos antibióticos convencionais (Vizioli e Salzet, 2002).

A maior parte da literatura foca o modo de ação de PAMs sobre bactérias e fungos, poucos estudos se concentram em protozoários parasitas. De acordo com estes estudos, parece que a atividade de PAMs também é baseada em interações eletrostáticas, uma vez que os protozoários têm uma maior quantidade de fosfolipídios aniônicos na sua membrana celular em comparação com as células de mamíferos (McGwire et al, 2003). No *T. cruzi* a carga de superfície é específico da espécie e varia de acordo com os estágios de desenvolvimento. Tratamentos com tripsina e neuraminidase indicaram que o ácido siálico e um fosfolipopeptídeo contribuem para a carga negativa na superfície além das moléculas de carboidratos associados a glicoproteínas e glicolipídios (Souto-Padrón, 2002). Assim, sugerimos que PAMs catiônicos, podem ter uma atividade efetiva contra o *T. cruzi*. Por outro lado ao estudar os fenômenos de refratariedade foi observado que anfíbios anuros são naturalmente refratários ao *T. cruzi* (Diaz, 1940). Acreditamos que este fato pode estar associado aos PAMs isolados em secreções da pele dos anfíbios (Simmaco et al, 1998; Rinaldi, 2002). Entre os anuros, o gênero *Rana* possui distribuição cosmopolita com aproximadamente 250 espécies diferentes distribuídas por todo o globo (Conlon et al, 2004). A rã vermelha europeia, *Rana temporaria* produz uma secreção de pele, quando em perigo ou

quando estimulada por eletrodos, rica em uma grande variedade de PAMs que foram denominados temporinas. Estes peptídeos possuem propriedades específicas úteis a família *Ranidae* e todos são expressos a partir de um gene comum (Bradbury e Smyth, 1991). Além disso, temporinas são os menores peptídeos catiônicos, anfipáticos em conformação de  $\alpha$ -hélice, encontrados na natureza (10-14 resíduos); seu modo de ação inclui perturbações da membrana do micro-organismo provocando um extravasamento do conteúdo interno. Ainda não foram elucidados outros mecanismos, pelos quais os PAMs exerçam sua função biocida (Mangoni et al, 2000; Rinaldi et al, 2002; Splith & Neundorf, 2011). Um dos trabalhos mais completos sobre a atividade biocida de PAMs contra protozoários, foi o de Tempone e colaboradores (2004), que testaram oito peptídeos da secreção cutânea de anuros e 1 peptídeo da secreção cutânea de gimnofonte contra *Leishmania chagasi*, *T. cruzi* e *Toxoplasma gondii*. No entanto, embora os anfíbios sejam refratários ao *T. cruzi* ainda são escassos trabalhos mais aprofundados, sobre a atividade de uma grande família de PAMs, como as temporinas contra este protozoário. Assim começamos a estudar atividade tripanocida destes peptídeos em nosso laboratório. Nos primeiros estudos observou-se uma fraca atividade da Tp-A (dados não mostrados). Então projetamos e sintetizamos uma molécula híbrida, a partir da informação que tínhamos na literatura sobre: Tp-A, sapecina B e a Gra-A. Assim nosso peptídeo foi denominado temporizina (Tz) e sua porção N-terminal contém uma sequência com extensão de três resíduos (FLP), responsáveis pela inserção das temporinas na bicamada lipídica da membrana; seu cerne é formado por cinco pares de leucina e triptofano (LW), semelhantes ao observado em Gra-A e que são responsáveis pelas propriedades conformacionais, anfipaticidade e pela formação de um poro iônico ao entrar em contato com biomembranas; a porção C-terminal, é constituída por uma sequência com extensão de três resíduos (KLK), que confere carga ao peptídeo e possibilita a interação do peptídeo com os componentes eletricamente carregados da superfície da membrana como fosfolipídeos e compostos lipossacarídicos. Nosso objetivo foi projetar um peptídeo com o poder microbicida da Gra-A,

seletividade para células de micro-organismos e consequente baixa toxicidade para células eucariontes superiores.

Quando iniciamos os testes de atividade tripanocida da Tz, observamos que, a Tz foi capaz de lisar células epimastigotas de *T. cruzi*, após 60 minutos de tratamento e que era dependente da dose (Figuras. 12 a 14). Gra-A foi utilizado como um controle positivo, para comparar o seu efeito com Tz. Gra-A provocou lise em 100% de epimastigotas de *T. cruzi* após 2 horas de incubação, comparado a um controle com as mesmas concentrações de Tz e um controle em que se omitiu os peptídeos (dados não mostrados). Comparando-se o efeito de Gra-A com o efeito de Tz sobre as células de *T. cruzi* observou-se que a Tz em menor tempo mostrou-se mais eficaz que a Gra-A para a lise das células do protozoário. Analisando estes resultados, podemos observar que o tempo pode ser um dos fatores que influenciam a resposta máxima dos peptídeos. Embora a Tz tenha levado a morte celular em pouco mais de 60 minutos de tratamento, já foi demonstrado que não só a composição, mas a concentração e o tempo de exposição de uma bicamada lipídica ao contato com peptídeos podem influenciar na formação de poros ou perturbação na organização da membrana (Alvarez-Bravo et al., 1995). Isto parece depender da conformação de estrutura secundária que o peptídeo vai assumir quando inserido em uma bicamada fortemente hidrofóbica, se compararmos os modelos propostos para a Gra-A e Tz (Figuras 5 e 9) podemos extrapolar que o tempo de formação das estruturas é determinante para o efeito lítico do peptídeo. Por isso, resolvemos não utilizar um tempo maior para confecção de nossos experimentos uma vez que observamos um efeito deletério sobre a cultura após 2 horas de tratamento com temporizina. Estes resultados foram muito similares quando tratamos a cultura com baixas concentrações de detergentes por longo tempo (dados não mostrados).

A toxicidade eventual do Tz para células de mamíferos foi investigada inicialmente, em linhagens celulares derivadas de tecidos neoplásicos e foi observado que Tz e Gra-A foram tóxicos para a linhagem J774 (Figura. 15). Semelhante a outros peptídeos, Tz mostrou alguma

toxicidade para células hospedeiras, mas na concentração efetiva contra o *T. cruzi* esta toxicidade é relativamente baixa, demonstrando que este peptídeos são uma boa alternativa para o desenvolvimento de um novo composto ativo (Haines et al, 2003). No intuito de desenvolver um peptídeo mais eficaz projetamos outro peptídeo a partir da estrutura da Tz. Retiramos o par LW das posições 10 e 11 respectivamente, que foram substituídos por um resíduo de arginina (R) e o par LW das posições 12 e 13 respectivamente foram subtraídos da sequência (Figuras 6 e 7). Com isso, diminuimos a hidropaticidade da molécula e aumentamos sua anfipaticidade o que, segundo alguns autores, colaboram para o aumento do índice terapêutico do peptídeo (Fjell et al., 2012). Diminuimos sua EC<sub>50</sub> e sua taxa de hemólise ou efeitos deletérios sobre células eucariontes superiores. Chamamos este novo peptídeo de Temporizina 1 (Tz-1). Além disso, foram comparados os efeitos da Tz-1, Tz, Tp-A e Gra-A e do medicamento utilizado no tratamento da doença de Chagas, Bz. Todos os compostos mostraram atividade lítica sobre o *T. cruzi*, como podemos ver pelo ensaio permeabilização celular (Figura 16C), citometria de fluxo (Figuras 16A e 16B) e MTT (Figura 16D). Quando comparado com Tz, Tz-1 apresentou ligeira redução na sua atividade lítica sobre o *T. cruzi*. A Tp-A teve efeito semelhante ao Tz-1 no ensaio de permeabilização celular e no ensaio de viabilidade celular utilizando o MTT (Figuras. 16C e 16D), corroborando com o que foi observado na citometria de fluxo (Figuras. 16A e 16B). Demonstrando que os peptídeos projetados foram mais eficientes que Gra-A se compararmos a atividade lítica sobre o *T. cruzi* (Figuras 16B, 16C e 16D). No entanto, corroborando com os dados já descritos em literatura (Coura & Castro, 2002), Bz mostrou atividade deletéria sobre as culturas de epimastigotas em concentrações mais altas, em todos os experimentos em que foi comparada a sua eficiência com a dos peptídeos (Figuras 16C e 16D). Da mesma forma que Tz, testou-se a toxicidade da Tz-1 nas células J774 (Figura 17A), utilizando o ensaio de permeabilização celular Tz-1 apresentou menor toxicidade que Tz para as células J774. O mesmo foi observado quando fizemos os ensaios de permeabilização celular, utilizando

macrófagos peritoneais de camundongo e células GH3 (Figuras. 17B e 17C). Como se pode ver na figura 17C, a Gra-A teve um efeito lítico sobre as células GH3 ligeiramente maior que o observado para Tz. No entanto, como esperado a TZ-1 apresentou menor efeito lítico sobre estas células, mostrando que a supressão de resíduos de triptofano favoreceu sensivelmente a melhora do índice terapêutico de Tz-1. O efeito lítico dos peptídeos foi mais acentuado para as células GH3 e J774, quando comparamos com os resultados obtidos para os macrófagos peritoneais nas mesmas condições experimentais (Figuras 17A, 17B e 17C). Ao compararmos os resultados obtidos quando utilizamos o Bz, observamos que ele teve um maior efeito tóxico sobre as células de mamíferos. Entretanto, quando analisamos os resultados obtidos para Tz-1, observamos que este peptídeo mostrou os níveis mais baixos de toxicidade. Gra-A apresentou efeito lítico sobre todos os tipos celulares (Figuras 17A a 17C).

Os resultados de toxicidade sobre as células de mamíferos foram confirmados pelo ensaio de liberação de LDH. A Gra-A e o Bz mostraram alta toxicidade para as células J774 (Figura. 18C). A Tp-A, TZ e TZ-1 foram citotóxicos apenas na dose de 100µg (Figura 18C). Em células GH3 os resultados foram semelhantes ao obtidos no ensaio de permeabilização celular, em que a Tz mostrou níveis de toxicidade alta. Corroborando com estes resultados, quando testamos os peptídeos com as células Jurkat de linfoma humano, a Tz apresentou uma atividade lítica acima de 10% quando tratamos um cultivo na concentração de 1µg/mL (Figura 18D). Na dose de 10µg/mL apenas Tz-1 apresentou toxicidade abaixo de 20%. Todos os outros tratamentos liberados entre 40-60% de LDH (Figura 18D). Em macrófagos peritoneais, apenas Bz e Gra-A mostraram-se com níveis altos de toxicidade. Os peptídeos não apresentaram toxicidade considerável nas duas concentrações testadas (18<sup>a</sup>). Embora tenha sido menos tóxico que Tz, Tp-A, Gra-A e Bz para as células de mamíferos utilizadas. Tz-1, mostrou ter atividade lítica discretamente mais baixa também contra as formas epimastigotas de *T. cruzi*, quando comparada aos outros compostos testados. Tp-A, Tz e Tz-1 possuem carga líquida positiva (Tabela 4). Este fato pode estar relacionado com o mecanismo de ação do peptídeo uma vez que a membrana do *T. cruzi*, tem em sua superfície carga líquida negativa, favorecendo ação de peptídeos com carga líquida positiva (Souto-Padron, 2002). A interação entre o peptídeo e a membrana das formas epimastigotas de *T. cruzi*. Por outro lado em nossos resultados, observamos que a Gra-A mostrou atividade lítica sobre o *T. cruzi* em níveis muito parecidos com os da Tz e da Tz-1, mostrando que a

carga efetiva do peptídeo não foi o principal fator de interação entre a membrana do parasita e a molécula, uma vez a carga líquida da Gra-A, é igual a zero. Além disso, Tp-A, Tz e Tz-1 apresentaram toxicidade para as células neoplásicas (linhagens GH3 e Jurkat), as células neoplásicas superexpressam na sua membrana plasmática mucinas, fosfatidilserina e proteínas O-glicosiladas, tornando a sua superfície externa negativa mostrando um perfil diferente das células eucarióticas normais (Iwasaki et al, 2009; Dobrzynska et al, 2005). Estes dados podem explicar, em parte porque esses peptídeos tiveram maior especificidade para células neoplásicas utilizadas em nosso trabalho em detrimento das células primárias como os macrófagos peritoneais.

Devido a Tz-1 e Tz mostrarem baixa toxicidade em células primárias e toxicidade considerável para linhagens neoplásicas, sugerimos que estes peptídeos possam ser utilizados em experimentos *in vivo* para desenvolvimento de antitumorais. Neste contexto, há publicações relativas à utilização de peptídeos antimicrobianos para o tratamento de tumores (Ellerby et al, 2009; Leuschner et al, 2003). Em nossos experimentos, observamos que Tz e Tz-1 são capazes de lesar o *T. cruzi* e células de mamíferos. Nossos resultados corroboram com as características esperadas para peptídeos catiônicos ricos em triptofano. Já foi relatado em literatura que peptídeos com estas características podem ligar-se e permear bicamadas de fosfolípídeos tanto zwitteriônicos quanto aniônicos (Zhao et al, 2002). Apesar de outros mecanismos de ação não estejam esclarecidos de forma satisfatória, alguns trabalhos têm mostrado que não só a distribuição de carga, mas a sequência, a influência da estrutura secundária e também os efeitos de geometria das membranas, são fatores importantes para a interação dos PAMs com a membrana de microorganismos (Chen & Marck, 2011).

Observando na figura 10, a projeção da estrutura 3D, um mecanismo possível para a atividade de Tz e Tz-1 é a agregação e formação de oligômeros na membrana. Estes oligômeros são subsequentemente convertidos em uma estrutura em forma de barril muito semelhantes a fibras amilóides (Mahalka e Kinnunen, 2009). Estas estruturas possivelmente formam poros na bicamada lipídica. Para confirmar estas suposições, resolvemos utilizar estudos envolvendo eletrofisiologia de membranas, utilizando o método de *patch clamp*. Fazendo dois tipos de experimentos: na configuração célula inteira, que considera os efeitos de uma substância que se liga a membrana, sobre o conteúdo intracelular; na configuração célula ligada, que podemos descrever como um grameamento setorizado propriamente dito, e que considera os efeitos de uma substância e suas interações com a membrana celular estudando esses efeitos em tempo real. Resolvemos estudar funcionalmente o modo de ação dos peptídeos para fechar nossa hipótese quanto ao modo de ação de Tz e Tz-1. Na figura 21, submetemos células aos efeitos da Tz utilizando a configuração célula inteira variando o

potencial de manutenção decrescente de 80mV a -80mV, conseguimos observar a formação de um canal iônico capaz de se abrir quando estimulado pelo potencial decrescente aplicado. Como exploramos extremos de potenciais, foi possível observar que houve uma grande amplitude no número de canais abertos comparado com os registros quando não aplicamos potencial algum (Figura 21A). Quando aumentamos a concentração de Tz, observamos que amplificação do sinal, demonstrando a formação de canais é dose dependente (Figura 21C). Para fechar a hipótese que os resíduos de triptofano possuem influencia direta com relação ao efeito do peptídeo sobre a membrana, corroborando com os resultados achados por Kang e colaboradores (2009), que demonstraram que a presença de um único resíduo de triptofano é crítico para a interação de PAMs com as bicamadas lipídicas. Executamos experimentos com Tz-1 no modo célula inteira nas mesmas condições experimentais que Tz e obtivemos um padrão de resposta semelhante ao observado para Tz (dados mostrados na Figura 22).

A redução encurtando os quatro resíduos relacionadas com Gra-A para a formação de poros em Tz-1, diminuiu a toxicidade para as células de mamíferos, mas não diminuiu o efeito lítico do peptídeo para o *T. cruzi* em comparação a Tz. Para tentarmos estabelecer os parâmetros que se relacionam a estas características dos dois peptídeos, fizemos experimentos no modo célula-ligada onde podemos estudar isoladamente o ponto de interação entre os peptídeos e a biomembrana. Observamos que a condutância do canal formado pela Tz-1 é menor do que a condutância do canal formado por Tz, e isto pode explicar a ligeira redução da toxicidade, observada em Tz-1. O número de canais iônicos formados por Tz-1, usando a configuração de célula-ligada, foi menor em comparação com Tz. Esta propriedade parece interferir na toxicidade para células de mamíferos, porque a quantidade de pares LW é menor em Tz-1 e a adição de um resíduo de arginina (R), permite a Tz-1 ser mais catiônico que Tz. Os resultados obtidos em todos os experimentos, confirmam a nossa tese de que ao acrescentarmos outros elementos ao cerne repetitivo LW da Gra-A, conseguimos construir um peptídeo híbrido com atividade biocida sobre um protozoário flagelado e com baixa toxicidade para as células de mamíferos.

## 9 - Conclusão

Determinamos as características físico-químicas da temporizina e seu modo de ação biológica combinando técnicas de estudos espectroscópicos de dicroísmo circular, técnicas de estudo de eletrofisiologia de biomembranas e as técnicas de microscopia de fluorescência e citometria de fluxo.

A temporizina é um peptídeo catiônico com carga líquida igual a +2 e possui um grau de hidropaticidade compatível com um índice terapêutico satisfatório, ou seja. Esta molécula tem condições de ser apresentada como uma alternativa para a formulação de uma droga antimicrobiana ou antitumoral.

O mecanismo de ação da Tz é a interação com a membrana citoplasmática, onde se estabelece a formação de poros que são dose-dependente e permitem a passagem de moléculas com cerca de 496Da.

A estrutura de Tz quando entra em contato com um ambiente com características de hidrofobicidade compatíveis com o ambiente encontrado na superfície de membranas, assume conformação de alfa-hélice.

A temporizina possui atividade contra células tumorais, produzindo efeitos dose dependentes.

Quando substituímos resíduos de triptofano por um resíduo de arginina o peptídeo derivado de Tz apresenta baixa toxicidade para células de mamíferos.

## 10 - Referências Bibliográficas

- Adermann K, John H, Ständker L and Forssmann WG 2004. Exploiting natural peptide diversity: novel research tools and drugs leads. *Curr. Opin. Biotech.*; 15: 599 – 606.
- Alvarez-Bravo J, Kurata S and Natori S 1995. Mode of action of an antibacterial peptide, KLKLLLLLKLK-NH<sub>2</sub>. *J. Biochem.*; 117: 1312-1316.
- Amiche M., Seon A. A., Pierre T. N. and Nicolas P 1999. The dermaseptin precursors: a protein family with a common preproregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.*; 456: 352–356
- Andersson M, Gunne H, Agerberth B, Boman A, Bergman T, Sillard R, Jornvalil H, Mutt V, Olsson B, Wigzell H, Dagerlind A, Boman HG and Gudmundsson GH. 1995. NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumour activity. *EMBO J.* 14: 1615-1625
- Araújo A, Jansen AM, Reinhard K and Ferreira LF. 2009. Paleoparasitology of Chagas disease – A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104 (supl.1): 9-16.
- Argiolas A. and Pisano J. J 1984. Isolation and characterization of two new peptides, mastoparan C and crabrolin, from the venom of the European hornet, *Vespa crabro*. *J. Biol. Chem.*; 259: 10106–10111
- Bera A., Singh S., Nagaraj R. and Vaidya T 2003. Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. *Mol. Biochem. Parasitol.*; 127: 23–35
- Berg K, Zhai L, Chen M, Kharazmi A and Owen TC 1994. The use of water-soluble formazan complex to quantitate the cell number and mitochondrial function of *Leishmania major* promastigotes. *Parasitol. Res.*; 80: 235-239.
- Brener Z. 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Rev. Microbiol.* 27: 347-382.

- Britto CC. 2009 Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in chagas disease chemotherapy: value and limitations. *Mem. Instituto Oswaldo Cruz.*; 104 (suppl. 1): 122 – 135.
- Brogden KA. 2005. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 238-250.
- Brunger AT, Adams PD, Clore GM, Delano WL, Gros P, Grosse-Kunstleve RW, Jiang JS, Kuszewski J, Nilges N, Pannu NS, Read RJ, Rice LM, Simonson T & Warren GL 1998. Crystallography and NMR System (CNS): A new software system for macromolecular structure determination. *Acta Cryst.* D54, 905-921
- Casal OL; Zingales B; Colli W 1994. Structural features of LPPG and related compounds isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27(2):227-231.
- Chadbourne FL, Raleigh C, Ali HZ, Denny PW and Cobba SL. 2011. Studies on the antileishmanial properties of the antimicrobial peptides temporin A, B and 1Sa. *J. Pep. Sci.* 17: 751-755.
- Chen Q., Wade D., Kurosaka K., Wang Z. Y., Oppenheim J. J. and Yang D 2004. Temporin A and related frog antimicrobial peptides use formyl peptide receptor-like 1 as a receptor to chemoattract phagocytes. *J. Immunol.*; 173: 2652–2659
- Chen Y, Guarnieri MT, Vasil AI, Vasil ML, Mant CT and Hodges RS 2007. Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents. Chemother.*; 51(4): 1398-1406.
- Chen Y, Mant CT, Farmer SW, Hancock REW, Vasil ML and Hodges RS 2005. Rational design of  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. *J. Biol. Chem.*; 280(13): 12316-12329.
- Chicharro C., Granata C., Lozano R., Andreu D. and Rivas L 2001. N-terminal fatty acid substitution increases the leishmanicidal activity of CA(1-7)M(2-9), a cecropin-melittin hybrid peptide. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 45: 2441–2449

- Chinchar V. G., Bryan L., Silphadaung U., Noga E., Wade D. and Rollins-Smith L 2004. Inactivation of viruses infecting ectothermic animals by amphibian and piscine antimicrobial peptides. *Virology*; 323: 268–275.
- Chitnis S, Prasad ON and Bhargava P. 1990. Isolation and characterization of autolysis-defective mutants of *Escherichia coli* that are resistant to the lytic activity of seminalplasmin. *J. Gen. Microbiol.* 136: 463-469
- Cirioni O., Giacometti A., Ghiselli R., Dell'Acqua G., Gov Y. Kamysz W 2003. Prophylactic efficacy of topical temporin A and RNAIII-inhibiting peptide in a Subcutaneous rat Pouch model of graft infection attributable to staphylococci with intermediate resistance to glycopeptides. *Circulation*; 108: 767–771
- Clark D. P., Durell S., Maloy W. L. and Zasloff M. 1994. Ranalexin: a novel antimicrobial peptide from bullfrog (*Rana catesbeiana*) skin, structurally related to the bacterial antibiotic polymyxin. *J. Biol. Chem*; 269: 10849–10855
- Clayton J 2010. Chagas disease 101. *Nature-Outlook*. (Sppl): 54 – 55.
- Conlon J. M., Sonnevend A., Davidson C., Demandt A. and Jouenne T 2005. Host-defense peptides isolated from the skin secretions of the Northern red-legged frog *Rana aurora aurora*. *Dev. Comp. Immunol.*; 29: 83–90
- Conlon J. M., Sonnevend A., Patel M., Al-Dhaheri K., Nielsen P. F., Kolodziejek J 2004. A family of brevinin-2 peptides with potent activity against *Pseudomonas aeruginosa* from the skin of the Hokkaido frog, *Rana pirica*. *Regul. Pept.*; 118: 135–141.
- Coura JR 2009. Presente situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy-a proposal. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 104(4): 549-554.
- Coura JR and Borges-Pereira J 2011. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 106(6): 641-645.
- Coura JR and Castro SL 2002. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 97(1): 3-24.

- Coura JR and Dias JCP 2009. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. Mem. Inst. Oswaldo Cruz; 104(suppl.1): 31-40.
- Coura JR and Viñas PA 2010. Chagas disease: a new worldwide challenge. Nature Outlook (suppl); 56-57.
- Cudic M and Otvos Jr L 2002. Intracellular targets of antibacterial peptides. Curr. Drug Targ; 3(2): 101-106.
- De Melo LD, Sant'Anna C, Reis SA, Lourenço D, De Souza W, Lopes UG and Cunha e Silva NL. 2008. Evolutionary conservation of actin binding proteins in *Trypanosoma cruzi* and unusual subcellular localization of the actin homologue. Parasitology 135: 955-965.
- De Souza W 2002. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. Curr. Pharm. Des.; 8(4): 269 - 286.
- De Souza W, Palomo AM and Robles AG 1978. The cell surface of *Trypanosoma cruzi* cytochemistry and freeze-fracture. J. Cell. Sci. 33: 285-299.
- De Souza W. 1995. Structural Organization of the Cell Surface of Pathogenic Protozoa. Micron. 26: 405-430.
- De Souza. 2009. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 104 (suppl.1): 89-100.
- Diaz E 1940. Técnica do xenodiagnóstico na moléstia de Chagas. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.; 35 (2): 335-342.
- Docampo R, Cruz FS, Boveris A, Muniz RPA and Esquivel DMS 1978. Lipid peroxidation and the generation of free radicals, superoxide anion, and hydrogen peroxide in  $\beta$ -lapchone-treated *Trypanosoma cruzi* epimastigotas. Arch. Biochem. Biophys.; 186(2): 292-297
- Docampo R, De Souza W, Miranda K, Rohloff and Moreno SNJ 2005. Acidocalcisomes - Conserved from bactéria to man. Nat. Rev. Microbiol.; 3: 251-260.

- Dubin AE, Nasser N, Rohrbacher J, Hermans A, Marranes R, Grantham C, Rossem KV, Cik M, Chaplan SR, Gallacher D, Xu J, Guia A, Byrne NG and Mathes C 2005. Identifying modulators of hERG channel activity using the PatchXpress® planar patch clamp. *J. Biomol. Screen.*; 10 (2): 168-181.
- Estacion M, Choi JS, Eastman EM, Lin Z, Li Y, Tyrrel L, Yang Y, Dib-Hajj SD and Waxman SG 2010. Can robots patch-clamp as well as humans? Characterization of a novel sodium channel mutation. *J Physiol.*; 588: 1915-1927.
- Fairlamb AH and Cerami A. 1992. Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 695–729.
- Faria RX, Farias FP and Alves LA 2005. Are messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor?. *Am J Physiol Cell Physiol.*; 288: C260 – C271.
- Faria RX, Reis RAM, Casabulho CM, Alberto AVP, Farias FP, Henriques-Pons A and Alves LA 2009. Pharmacological properties of a pore induced by raising intracellular Ca<sup>2+</sup>. *Am J Physiol Cell Physiol.*; 297: C28 – C42.
- Feder R., Dagan A. and Mor A 2000. Structure-activity relationship study of antimicrobial dermaseptin S4 showing the consequences of peptide oligomerization on selective cytotoxicity. *J. Biol. Chem.*; 275: 4230–4238
- Fernandez DI, Sani MA, Gehman JD, Hahm KS, Separovic F 2011. Interactions of a synthetic Leu-Lys-rich antimicrobial peptide with phospholipid bilayers. *Eur. Biophys. J.*; 40: 471-480.
- Fjell CD, Hiss JA, Hancock RE, and Schneider G. 2012. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 11: 37-51
- Franco da Silveira J and Colli W. 1981. Chemical composition of the plasma membrane from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Biochim Biophys Acta.* 644: 341-350.

- Friedrich CL, Moyles D, Beveridge TJ, and Hancock REW. 2000. Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on Gram-positive bacteria. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 44: 2086-2092.
- Garcia S, Ramos CO, Senra JFV, Vilas-Boas F, Rodrigues MM, Campos-de-Carvalho AC, Ribeiro-dos-Santos R and Soares MBP 2005. Treatment with Benznidazole during the Chronic Phase of Experimental Chagas' Disease Decreases Cardiac Alterations. *Antimicrob. Agents. Chemother.*; 49 (4):1521–1528.
- Ghiselli R., Giacometti A., Cirioni O., Mocchegiani F., Orlando F., Kamysz W 2002. Temporin A as a prophylactic agent against methicillin sodium-susceptible and methicillin sodium-resistant *Staphylococcus epidermidis* vascular graft infection. *J. Vasc. Surg.*; 36: 1027–1030
- Gordon YJ, Romanowski EG and McDermott AM 2005. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Curr Eye Res*; 30 (7): 505 – 515.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sackmann B and Sigworth FJ 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell free membrane patches. *Eur. J. Physiol.*; 391: 85 – 100.
- Hancock REW and Rozek. 2002. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS. Microbiol. Let.* 206: 143-149.
- Hancock REW and Sahl HG. 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.* 24: 1551-1557.
- Hancock REW and Scott MG 2000. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *PNAS.*; 97 (16): 8853 – 8861.
- Hartney JM, Gustafson CE, Bowler RP, Pelanda R and Torres RM. 2011. Thromboxane receptor signaling is required for fibronectin-induced matrix metalloproteinase 9 production by human and murine macrophages and is attenuated by the arhgef1 molecule. *J. Biol. Chem.* 286: 44521-44531.

- Hasslocher-Moreno AM, do Brasil PE, de Sousa AS, Xavier SS, Chambela MC, Sperandio da Silva GM. 2012. Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. *J. Antimicrob. Chemoter.* 67: 1261-1266
- Hederos M; Konradsson P 2006. Synthesis of the *Trypanosoma cruzi* LPPG heptasaccharyl myo-inositol. *J. Am. Chem. Soc.*128(10): 3414-3419.
- Hofmann K and Stoffel W. 1993 TMBASE - A database of membrane spanning protein segments *Biol. Chem.* 374: 166-173.
- Isaacson T, Soto A, Iwamuro S, Knoop FC. and Conlon JM 2002. Antimicrobial peptides with atypical structural features from the skin of the Japanese brown frog *Rana japonica*. *Peptides.*; 23: 419–425
- Jacobs T, Bruhn H, Gaworski I, Fleischer B and Leippe M 2002. Nk – Lysin and Its Shortened Analog NK – 2 Exhibit Potent Activities Against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*; 47: 607 – 613.
- Jiang Z, Vasil AI, Gera L, Vasil ML and Hodges RS 2011. Rational design of  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides to target Gram-negative pathogens, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*; Total hydrophobicity, hydrophobe type and location as design parameters to improve the therapeutic ratio. *Chem, Biol. Drug Des.* 77: 225-240.
- Jockers-Scherürl MC, Schirmer RH and Krauth-Siegel. 1989. Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*: Catalytic properties of the enzyme and inhibition studies with trypanocidal compounds. *Eur. J. Biochem.* 180: 267-272.
- Kang SJ, Won HS, Choi WS and Lee BJ 2009. De novo generation of antimicrobial LK peptides with a single tryptophan at the critical amphipathic interface. *J. Pept. Sci.*; 15: 583-588.
- Krishnakumari V. and Nagaraj R 1997. Antimicrobial and hemolytic activities of crabrolin, a 13-residue peptide from the venom of the European hornet, *Vespa crabro*, and its analogs. *J. Pept. Res.* 50: 88–93

- Kuchler K., Kreil G. and Sures I 1989. The genes for the frog skin peptides GLa, xenopsin, levitide and caerulein contain a homologous export exon encoding a signal sequence and part of an amphiphilic peptide. *Eur. J. Biochem.* 179: 281–285
- Kumagai K, Maeda H and Ishida N 1966. Biological activity of neocarzinostatin and its derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 6: 546-550.
- Lannes-Vieira J, Araujo-Jorge T, Soeiro MNC, Gadelha P and Corrêa Oliveira R 2010. The centennial of the Discovery of Chagas disease: Facing the current Challenges. *Plos. Negl. Trop. Dis.*; 4(6): 1-4.
- Leaderkremer RM, Tanaka CT, Alves MJM and Colli W. 1977. Lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.* 74: 263-267.
- Lederkremer RM 1994. Free and protein-linked glycoinositolphospholipids in *Trypanosoma cruzi*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27(2):239-342.
- Lederkremer RM; Bertello LE 2001. Glycoinositolphospholipids, free and as anchors of proteins, in *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des*; 7(12):1165-1179.
- Lederkremer RM; Colli W 1995. Galactofuranose-containing glycoconjugates in trypanosomatids. *Glycobiology*; 5(6):547-552.
- Lelchuk R, Cardoni RL and Fuks AS. 1977. Cell-mediated immunity in Chagas' disease alterations induced by treatment with a trypanocidal drug (nifurtimox). *Clin. exp. Immunol.* 30: 434-438.
- Linde CM, Hoffner SE, Refai E and Andersson M. 2001. In vitro activity of PR-39, a proline-arginine-rich peptide, against susceptible and multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chem.* 47: 575-580

- Luque-Ortega J. R., Saugar J. M., Chiva C., Andreu D. and Rivas L. 2003. Identification of new leishmanicidal peptide lead structures by automated real-time monitoring of changes in intracellular ATP. *Biochem. J.* 375: 221–230.
- Mangoni ML 2006. Temporins, anti-infective peptides with expanding properties. *Cell. Mol. Life Sci.*; 63: 1060-1069.
- Mangoni ML., Saugar JM., Dellisanti M., Barra D., Simmaco M. and Rivas L 2005. Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. *J. Biol. Chem.* 280: 984–990
- Matsuyama K and Natori S 1990. Mode of sapecin, a novel antibacterial proteína of *Sarcophaga peregrina* (Flesh Fly). *J. Biochem.*; 108: 128-132.
- McGwire BS, Olson CL, Tack BF and Engman DM 2003. Killing of African *Trypanosomes* by antimicrobial peptides. *JID.* 188: 146 – 152.
- Menna-Barreto RFS, Salomão K, Dantas AP, Santa-Rita RM, Soares MJ, Barbosa HS and Castro SL 2009. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: An ultrastructural study. *Micron*; 40: 157-168.
- Merrifield RB. 1963. Solid phase peptide synthesis. I. the synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem.* 85: 2149-2154.
- Montalvetti A, Rohloff P and Docampo R. 2004. A functional aquaporin co-localizes with the vacuolar proton pyrophosphatase to acidocalcisomes and the contractile vacuole complex of *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 279: 3867-3882.
- Mosmann T 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65: 55-63.
- Muelas-Serrano S, Nogal-Ruiz JJ and Gómez-Barrio A 2000. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol. Res.* 86: 999 – 1002.

- Murcia L, Carrilero B, Viñas PA, and Segovia M. 2012. Nifurtimox chemotherapy: collateral effects in treated *Trypanosoma cruzi* infected patients. *Rev. Esp. Quimioter.* 25:74-75
- Oeltmann T; Carter C; Merkle R; Moreman K 1994. The alpha-mannosidase of *Trypanosoma cruzi*: structure and function. *Braz J Med Biol Res*; 27: 483-488.
- OPAS/WHO. 1998. Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas: Conclusiones de Reunión de especialistas. *Rev. Patol. Trop.* 28: 247-275.
- Oren Z, Hong J and Shai Y 1997. A repertoire of novel antibacterial diastereomeric peptides with selective cytolytic activity. *J. Biol. Chem*; 272: 14643 – 14649.
- Oren Z, Hong J and Shai Y 1999. A comparative study on the structure and function of a cytolytic  $\alpha$  - helical peptide and its antimicrobial  $\beta$  - sheet diastereomer. *Eur. J. BioChem.*; 259: 360 – 369.
- Oren Z., Lerman J. C., Gudmundsson G. H., Agerberth B. and Shai Y 1999. Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem. J.* 341: 501–513
- Palomo AM, De Souza W, and Robles AG 1976. Topographical differences in the distribution of surface coat components and intramembrane particles. *J. Cell. Biol.*; 69: 507-513.
- Papo N and Shai Y 2003. Can predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? *Peptides.* 24: 1693-1703.
- Papo N and Shai Y. 2003. Exploring peptide membrane interaction using surface Plasmon resonance: differentiation between pore formation versus membrane disruption by lytic peptides. *Biochemistry.* 42: 458-466.
- Petherick A. 2010. Country by country. 2010. *Nature Outlook (Suppl)*: S10-S11.

- Piacenza L, Peluffo G, Alvarez MN, Kelly JM, Wilkinson SR and Radi R. 2008. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *Biochem. J.* 410: 359–368
- Portman N and Gull K. 2010. The paraflagellar rod of kinetoplastid Parasites: from structure to components and function. *Int. J. Parasitol.* 40: 135–148
- Porto-Carrero I, Attias M, Miranda K, De Souza W and Cunha e Silva NL. 2000. *Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. *Eur. J. Cell. Biol.* 79: 858-869.
- Rinaldi A. C., Mangoni M. L., Rufo A., Luzi C., Barra D., Zhao H 2002. Temporin L: antimicrobial, haemolytic and cytotoxic activities, and effects on membrane permeabilization in lipid vesicles. *Biochem. J.* 368: 91–100.
- Risso MG, Sartor PA, Burgos JM, Briceño L, Rodríguez EM, Guhl F, Chavez OT, Espinoza B, Monteón VM, Russomando G, Schijman AG, Botasso AO and Leguizamón MS. 2011. Immunological Identification of *Trypanosoma cruzi* Lineages in Human Infection Along the Endemic Area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84: 78-84.
- Rocha GM, Miranda K, Weissmüller G, Bisch PM and De Souza W 2008. Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* revisited by atomic force microscopy. *Microsc. Res. Tech.*; 71: 133-139.
- Rohloff P and Docampo R. 2008. A contractile vacuole complex is involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* 118: 17-24.
- Saidenberg DM, Baptista-Saidenberg NB and Palma MS. 2011. Chemometric analysis of hymenoptera toxins and defensins: A model for predicting the biological activity of novel peptides from venom and hemolymph. *Peptides* 32: 1924-1933.
- Salzet M 2001. Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune defense. *Trends. Immunol.* 22: 285-288.

- Santa-Rita R, Barbosa HS and Castro SL 2006. Ultrastructural analysis of edelfosine-treated trypomastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.*; 100: 187-190.
- Seufferheld MJ, Kim KM, Whitfield J, Valerio A and Caetano-Anollés G. 2011. Evolution of vacuolar proton pyrophosphatase domains and volutin granules: clues into the early evolutionary origin of the acidocalcisome. *Biol. Direc.* 6: 1-15
- Shai Y 1999. Mechanism of the binding insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha – helical antimicrobial and cell non selective membrane – lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta*; 1462: 55 - 70.
- Silva P. I. Jr, Daffre S. and Bulet P 2000. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. *J. Biol. Chem.* 275:33464–33470.
- Simmaco M, Mignogna G and Barra D. 1998. Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us? *Biopol.* 47: 435-450
- Simmaco M., Mignogne G., Canofeni S., Miele R., Mangoni M. L. and Barra D 1996 Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. *Eur. J. Biochem.* 242: 788–792.
- Skerlavaj B., Benincasa M., Risso A., Zanetti M. and Gennaro R 1999 SMAP-29: a potent antibacterial and antifungal peptide from sheep leukocytes. *FEBS Lett.* 463: 58–62.
- Splith K and Neundorf I. 2011. Antimicrobial peptides with cell-penetrating peptides properties and vice versa. *Eur. Biophys. J.* 40: 387-397.
- Steinberg TH, Newman AS, Swanson JA and Silverstein SC 1987. ATP<sup>4-</sup> permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes. *J. Biol. Chem.* 1987 (18): 8884-8888.

- Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, Ganz T, Thomas-Uszynski S, Melián A, Bogdan C, Porcelli SA, Bloom BR, Krensky AM and Modlin RL. 1998. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Sci.* 282: 121-125.
- Sundriyal S, Sharma RK, Jain R and Bharatan PV 2008. Minimum requirements of hydrophobic and hydrophilic features in cationic peptide antibiotics (CPAs): pharmacophore generation and validation with cationic steroid antibiotics (CSAs). *J. Mol. Model*; 14: 265-278.
- Swanson JA, Yirinec BD and Silverstein, SC 1985. Phorbol esters and hoserardish peroxidase stimulate pinocytosis and redirect the flow of pinocytosed fluid in macrophages. *J. Cell. Biol* 100: 851 – 859.
- Tyler KM, Fridberg A, Toriello KM, Olson CL, Cieslak JA, Hazlett TL and Engman DM. 2008. Flagellar membrane localization via association with lipid rafts *J. Cell Sci.*122: 859-866.
- Vizioli J. and Salzet M 2002. Antimicrobial peptides versus parasitic infections? *Trends Parasitol.* 18: 475–476
- Vouldoukis I., Shai Y., Nicolas P. and Mor A 1996. Broad spectrum antibiotic activity of the skin-PYY. *FEBS Lett.* 380:237–240
- Wallace BA 1986. Structure of Gramicidin A. *Biophys J*; 49: 295-306.
- Wang F, Qin L, Pace CJ, Wong P, Malonis R and Gao J 2012. Solubilized Gramicidin A as potential systemic antibiotics. *ChemBioChem* 13: 51-55.
- Wilcox S 2004. The new antimicrobials: Cationic peptides. *Biotech. J*; 2: 88 – 91.
- Wilkinson SR, Taylor MC, Horn D, Kelly JM and Cheeseman L. 2008. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *PNAS.* 105: 5022–5027

- Wright EL, Quenelle DC, Suling WJ and Barrow WW 1996. Use of mono mac 6 human monocytic cell line and J774 Murine macrophage cell line in parallel antimycobacterial drug studies. *Antimicrob. Agents Chemother*; 40 (9): 2206 – 2208.
- Yamada K and Natori S 1994. Characterization of the antimicrobial peptide derived from sapecina B, an antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *Biochem J.*; 298: 623-628.
- Zampa MF, Araújo IMS, Costa V, Costa CHN, Santos-Jr JR, Zucolotto V, Eiras C and Leite JRSA 2009. Leishmanicidal activity and immobilization of dermaseptin 01 antimicrobial peptides in ultrathin films for nanomedicine applications. *Nanomed. J.*; 5: 352 – 358.
- Zasllof M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 415: 389 - 395.
- Zhang J and Thurbide KB 2007. Analysis of Ca<sup>2+</sup> binding with gramicidin double helices using subcritical fluid chromatography. *J. Chromatogr.*; 1171: 104 – 111.

## Anexos

Assunto: Your Submission  
De: "Peptides Editorial Office" <peptides@pbrc.edu>  
Data: Qua, 27 de Mar, 2013 12:09  
Para: dsimone@ioc.fiocruz.br

---

Ms. Ref. No.: PEPTIDES-D-12-00279R2  
Title: ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PLEUROCIDIN IS RETAINED IN PLC-2, A C-TERMINAL 12-AMINOACID FRAGMENT  
Peptides

Dear Giovanni,

I am pleased to confirm that your paper "ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PLEUROCIDIN IS RETAINED IN PLC-2, A C-TERMINAL 12-AMINOACID FRAGMENT" has been accepted for publication in Peptides.

We will complete final editorial processing and forward your manuscript for scheduled publication in the next available issue of the Journal. Minor changes, abbreviations, etc. will be made by our production editor and you will be able to check them at the time you receive the proofs.

With kind regards,

Abba J. Kastin  
Editor  
Peptides

P.S. Peptides authors are encouraged to join the International Neuropeptide Society for Biologically Active Peptides. Applications are available at <http://www.inps.org>

To receive e-mail table of content alerts for Peptides, register now by following the links at <http://www.sciencedirect.com/science/alerts>

\*\*\*\*\*

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

# 1 ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PLEUROCIDIN IS RETAINED IN PLC-2, A C- 2 TERMINAL 12-AMINOACID FRAGMENT

3  
4 Andre L A. Souza<sup>2</sup>, Paola Díaz-Dellavalle<sup>3</sup>, Andrea Cabrera<sup>3</sup>, Patricia Larrañaga<sup>3</sup>, Marco Dalla-  
5 Rizza<sup>3</sup> and Salvatore G. De-Simone<sup>1,2,\*</sup>

6  
7 <sup>1</sup>National Institute of Science and Technology on Innovation on Neglected Diseases (INCT-  
8 IDN)/Center for Technological Development in Health (CDTS), FIOCRUZ, <sup>2</sup>Laboratory of Protein  
9 and Peptides Biochemistry, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, <sup>3</sup>Laboratory of  
10 Proteins, Biotechnology Unit, INIA Las Brujas, Canelones, Uruguay

11  
12 \*To whom correspondence should be addressed (e-mail: [dsimone@ioc.fiocruz.br](mailto:dsimone@ioc.fiocruz.br))

13  
14 **Abbreviations used:** AMPs, antimicrobial peptides; BHI, brain heart infusion broth; CAN,  
15 acetonitrile; CDI, cellular damage index; CFU, colony-forming units; CFW, calcofluor  
16 white; EB, ethidium bromide; HPLC, high performance liquid chromatography; MALDI,  
17 matrix-associated laser desorption ionization; MFC, minimal fungicidal concentration;  
18 MIC, minimal inhibitory concentration; MHB, Muller-Hillton; PDA, potato dextrose agar;  
19 PDB, potato dextrose broth; TBS, tryptic soy broth; PBS, phosphate buffered saline; Plc,  
20 pleurocidin; SG, Sytox Green; TBS, tryptic soy broth; TFA, trifluoroacetic acid;

## 21 22 **ABSTRACT**

23 Through the analysis of a series of 5 peptides composed of various portions of the  
24 pleurocidin (Plc) sequence, we identified Plc-2, a C-terminus 12-amino-acid fragment of  
25 Plc, as the smallest fragment that retains antimicrobial activity comparable to that of the  
26 parent compound. In vitro MIC tests in low-ionic-strength medium showed that Plc-2 has  
27 potent activity against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus*  
28 *aureus* but not against *Enterococcus faecalis*. The antifungal activity of synthetic peptides  
29 against phytopathogenic fungi, such as *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum sp.*,  
30 *Aspergillus niger* and *Alternaria sp.*, identified Plc-2 as a biologically active peptide.  
31 Staining microscopy studies indicated that fungal cytoplasmic membranes were  
32 compromised and the nuclear membrane was also affected in all the phytopathogenic fungi  
33 tested. These results identify Plc-2 as a potential antimicrobial agent with similar properties  
34 to pleurocidin and the KHVGKAALTHYL residues, which are critical for its antimicrobial  
35 activity.

36  
37 **Key words:** pleurocidin, antimicrobial peptides, antifungal activity, cationic peptides, pore-  
38 forming, synthetic peptides, small active sequence

1

## 2 **1. Introduction**

3 Eukaryotic antimicrobial peptides (AMPs) are a class of molecular tools that have been a  
4 focus of intense research over the last few decades, especially related to their biosynthesis,  
5 activity against microorganisms, mechanism of action and potential clinical relevance [5].  
6 They are important components of the natural defenses of most living organisms and have  
7 been isolated from a wide variety of animals, plants and bacteria  
8 (<http://www.bbem.univ.triest.it/~tossi/search.htm>). Many of these AMPs are gene encoded, while  
9 others are secondary metabolites; however both types have a net charge of positive, zero, or  
10 negative in physiological pH. The positive charge of the vast majority of AMPs allows the  
11 initial interaction with the negatively charged LPS in the outer membrane, and later, with  
12 negatively charged phospholipids in the inner membrane. However, there are exceptions  
13 such as the magainins and cecropins which do not show any interaction with chiral centers  
14 in the membrane because the L and D enantiomers of these peptides have similar  
15 antimicrobial activity. In contrast, apidaecin kills bacteria by a mechanism that involves  
16 stereospecificity. The selectivity of these peptides for bacterial membranes over eukaryotic  
17 membranes has been ascribed to the lack of cholesterol and cationic lipids in the bacterial  
18 membranes and the limited amounts of anionic lipids in the eukaryotic membranes.

19 The skin and skin mucus of several fish species have been shown to contain AMPs  
20 and a number of them show sequence similarity to AMPs isolated from other organisms.  
21 Pleurocidin (Plc), a  $\alpha$ -helical cationic peptide isolated from the skin-secreted mucous of the  
22 winter flounder *Pleuronectes americanus* [5,6] is predicted as a 28-residue propeptide that  
23 undergoes proteolytic cleavage of its amino-terminal signal and carboxy-terminal anionic  
24 propiece to form the active peptide [7,8]. The activity of this peptide that has been  
25 extensively explored has been reported to show a broad spectrum of antimicrobial and  
26 hemolytic activity [13,30]. Its codifying gene is similar to the structural gene of the  
27 mammalian antimicrobial peptide PR-39 [14] and its primary structure shows some  
28 homology with the dermaseptins (frogs) [23] and ceratotoxins (medflies) [20] classes of  
29 AMPs [25,27]. The presence of common motifs in PR-39, dermaseptins and ceratotoxins,  
30 suggests that the antimicrobial activity of pleurocidin is due to only a fragment of the  
31 pleurocidin sequence. However to make Plc useful as a therapeutic drug requires

1 delineating the feature responsible for the AMP. There are examples of fragments of  
2 peptides or proteins that retain the antimicrobial activity of the parent molecule or whose  
3 activities even exceed that of a close relative molecule [4,17]. To facilitate the potential use  
4 of cationic AMPs as novel antibiotics, continuing studies are in progress with the goal of  
5 elucidating the mechanisms of their action. AMPs have been the object of attention in past  
6 years not only for human pathogens but also as candidates for plant protection, searching  
7 for more selective compounds, with lower intrinsic toxicity and reduced negative  
8 environmental impacts [22].

9       Therefore since many peptides, such as pleurocidin, may play a role in combating  
10 human, plant and animal pathogens, an analysis of its peptide fragments was undertaken. In  
11 this study, we examined the activity against bacteria and filamentous phytopathogenic  
12 fungi. We found that a small sequence of the 12 amino acid C-terminus  
13 (KHVGKAALTHYL) posses a high percentage ( $\geq 80\%$ ) of lytic activity against *P.*  
14 *aeruginosa*, *S. aureus* and *E. coli* and no effect or very small effect against *E. faecalis*. In  
15 addition, in fungi of agronomical interest, we found high activity in all the fungi evaluated,  
16 except *Aspergillus ochraceus*, with MIC values close to commercial fungicides. Four other  
17 synthetic peptides spanning the whole pleurocidin sequence were tested but a neglected  
18 growth inhibition was obtained for *P. aeruginosa* and for the three other bacteria species.

## 19 20 **2. Material and methods**

### 21 **2.1. Materials**

22 Amino acids for peptide synthesis were acquired from Calbiochem-Novabiochem Corp.  
23 (Germany) and the sequence reagent and the HPLC columns from Shimadzu (Kyoto,  
24 Japan). Piperidine, acetonitrile (ACN) and trifluoroacetic acid (TFA) were purchased from  
25 Fluke. Brain heart infusion broth (BHI), trifluoroethanol and all other analytical reagents  
26 were purchased from Merck (Darmstad, Germany). Sytox green (SG) was acquired from  
27 Molecular Probes, Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, USA and calcofluor white (CFW)  
28 (Fluorescent Brightener 28) from Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA. Potato dextrose  
29 broth (PDB) and potato dextrose agar (PDA) were purchased from HiMedia, Mumbai,  
30 India and Oxoid, Hampshire, England, respectively.

## 1 **2.2. Microorganisms**

2 The following bacteria were used for testing the AMP activity of the pleurocidin  
3 fragments; *Enterococcus faecalis* (ATCC-29212), *Escherichia coli* (ATCC-35218),  
4 *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25325). All  
5 bacteria were obtained from the National Institute of Health Quality Control (INCQS),  
6 Oswaldo Cruz Foundation, RJ, Brazil and maintained in tubes in brain heart infusion broth  
7 (BHI) at 37°C until reaching the exponential log phase. All strains were stored at -73°C  
8 until use and the cultures obtained in 3% (w/v) Trypticase Soy Broth (TBS) at 37°C.

9 Six fungal isolates, which were all plant pathogens, were also used for antifungal  
10 activity assays. The fungi *Alternaria* sp., *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*,  
11 *Aspergillus ochraceus*, *Cladosporium fulvum* and *Colletotrichum* sp. were supplied by the  
12 Department of Protección Vegetal of the Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria  
13 (INIA Las Brujas, Uruguay). Fungi were cultured on potato dextrose agar (PDA) at 27°C.  
14 Fungal spores were collected as described [2]. The concentration of the sporangial  
15 suspensions were estimated using a cell counting chamber and adjusted to  $2 \times 10^6$  spores  
16  $\text{mL}^{-1}$  [1], and were stored in 20% glycerol at -80°C until further use.

17

## 18 **2.3. Peptide synthesis**

19 Peptides were synthesized by the solid-phase synthesis method in a PSS-8 (Shimadzu,  
20 Kyoto, Japan) Pep Synthesizer according to fluoren-9-methyloxycarbonyl (Fmoc)-  
21 polyamide active ester chemistry [21]. The synthesized peptides were purified using a  
22 Vydac (Altech Associates, Inc, USA) reverse-phase C18 column (15 cm x 6 mm, I.D.)  
23 coupled on a HPLC system (Schimadzu, model 6A). Peptides were eluted at  $1\text{mL min}^{-1}$   
24 with a linear gradient of acetonitrile (7-40% in 30 min) in 0.1% trifluoroacetic acid. The  
25 purity was confirmed by matrix-associated laser desorption ionization (MALDI) mass  
26 spectroscopy (Kratos Kompact MALDI, Manchester, UK). The amino acid sequences of  
27 the peptides are listed in **Table 1**.

28 Before the biological assays, lyophilized peptides were solubilized in sterile Milli-  
29 Q water to a final concentration of 1 mM and filtered sterilized through a 0.22- $\mu\text{m}$  pore  
30 filter.

31

#### 2.4. Computational analysis and molecular moment calculation

The mean hydrophobic moment ( $\mu_H$ ) values for the pleurocidin peptide fragments at different angles ( $\delta$ ) were calculated as described [9,10] by the equation

$$(\mu_H(\delta)) = \sqrt{(\sum H_n \sin(\delta H))^2 + (\sum H_n \cos(\delta H))^2} / N$$

where  $N$  is the number of residues and  $n$  is the specific residue within the peptide sequence;  $H_n$  is the hydrophobic value, according to the normalized consensus hydropathy scale [28] assigned to residue  $n$ ; and  $\delta$  is the angle (in radians) between successive residues (e.g.,  $\delta$  is equal to  $100^\circ$  for an  $\alpha$  helix).

#### 2.5. Assay of bactericidal activity

Screening for the bacterial peptide effect was performed at  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  using the tube dilution method. Briefly, 0.9 mL of the bacterial suspension was incubated with 0.1 mL of peptide solution ( $1\text{mg mL}^{-1}$ ) at  $37^\circ\text{C}$  for 2 hours, aerobically. Growth controls were performed with brain heart infusion (BHI) and saline. Negative growth controls were performed under the same conditions at  $10\text{-}\mu\text{g mL}^{-1}$  of gentamicin. Colony formations units (CFU) were counted by streaking remaining bacteria in Mueller-Hinton Agar.

#### 2.6. Antimicrobial colony forming unit (CFU) assay and determination of MIC

$5 \times 10^5 \text{ CFU mL}^{-1}$  was incubated for 18 h at  $37^\circ\text{C}$  in a final volume of 100  $\mu\text{l}$  of MHB with 0.1-100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of peptides using 24-well polypropylene plates. Visual verification of microbial sedimentation as well as absorbance reading (600 nm) confirmed the minimal inhibitory concentration (MIC).

The minimal bactericidal concentration (MBC) was determined by streaking a 5- $\mu\text{L}$  aliquot of the microtiter plate reaction mixture onto a Mueller-Hinton (MHB) agar plate for the three serial dilution wells above and below the MIC and the SD was not greater than 8%. The lowest concentration of peptide that ablated the bacterial colony growth on the agar plate was deemed the MBC.

#### 2.7. Assay of antifungal activity

The *in vitro* antifungal activities of the peptide solutions were determined by a quantitative microspectrophotometric assay [2]. Inhibition of growth was measured in 96-well

1 microtiter plates at 595 nm. Routine tests were performed with 20  $\mu\text{L}$  of a peptide test  
2 solution, 10  $\mu\text{L}$  of a spore suspension ( $2 \times 10^6$  spores  $\text{mL}^{-1}$ ) and 70  $\mu\text{L}$  of potato dextrose  
3 broth (PDB) (HiMedia, Mumbai, India). Microcultures containing 20  $\mu\text{L}$  of sterile distilled  
4 water instead of test solution were used as negative control. The commercial fungicide  
5 Captan at  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$  [29] was used as positive control. The plates were allowed to stand  
6 for 30 min at  $27^\circ\text{C}$  to allow the spores to sediment, after which the absorbance was  
7 measured at 595 nm in a Multiskan Spectrum microplate reader (Thermo Electron  
8 Corporation, Varta, Finland). After 48 h of incubation at  $27^\circ\text{C}$ , growth was recorded by  
9 measuring absorbance. All assays for antifungal activity were carried out at least in  
10 triplicate. The growth inhibition percentage was determined based on the equation  $[(\Delta C -$   
11  $\Delta T)/\Delta C] \times 100$ , where  $\Delta C$  is the corrected absorbance of the control microculture at 595  
12 nm and  $\Delta T$  is the corrected absorbance of the test microculture. The corrected absorbance  
13 values equal the absorbance at 595 nm of the culture measured after 48 h minus the  
14 absorbance at 595 nm measured after 30 min.

15

## 16 **2.8. Determination of the fungal MIC and MFC**

17 A microplate method as previously described [12] was used with slight modifications to  
18 determine the MIC of peptide test solutions. Briefly, 20  $\mu\text{L}$  from a  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  stock  
19 solution was taken and put in the first column of the microplates. Then, double serial  
20 dilutions were made with distilled sterile water for the remaining columns. In each well 20  
21  $\mu\text{L}$  of peptide dilutions were mixed with 180  $\mu\text{L}$  of the fungal spore suspension ( $2 \times 10^6$   
22 spores  $\text{mL}^{-1}$  in fresh PDB). The microplates were incubated for 48 h at  $27^\circ\text{C}$ . All  
23 experiments were done in triplicate. The MIC readings were performed  
24 spectrophotometrically at 595 nm. MIC was defined as the lowest peptide concentration  
25 that inhibits 90% fungal growth. The *in vitro* minimal fungicidal concentration (MFC) was  
26 determined as described by Espinel-Ingroff *et al.* [11]. After 48 h of incubation, 20  $\mu\text{L}$  was  
27 subcultured from each well that showed no visible growth (growth inhibition upper than  
28 98%), from the last positive well (growth similar to that for the growth control well), and  
29 from the growth control well (peptide-free medium) onto PDA plates. The plates were  
30 incubated at  $27^\circ\text{C}$  until growth was seen in the growth control subculture. The MFC was

1 regarded as the lowest peptide concentration that did not yield any fungal growth on the  
2 solid medium used.

3

#### 4 **2.9. Microscopic visualization**

5 The mycelium of the different fungi grown for 48 h ( $2 \times 10^6$  spores  $\text{mL}^{-1}$  in PDB) were  
6 treated with peptide solutions at different concentrations for 48 h, and subsequently stained  
7 with two different fluorescent dyes [27]: Sytox green (SG) and calcofluor white (CFW)  
8 (Fluorescent Brightener 28). The peptide concentrations selected were around the previous  
9 determined MIC values. First, the SG stock solution ( $4 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) was added to a final  
10 concentration of  $0.2 \mu\text{mol L}^{-1}$ . After 5 min in the dark, 0.1% (w/v) CFW was added to a  
11 final concentration of  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , and incubated again for 5 min in the dark [24]. Finally,  
12 the mycelium was washed with sterile water, centrifuged and resuspended in 20% glycerol.  
13 Depending on the fungus evaluated and the mycelium structure, the wash step was  
14 established. The fluorescence was visualized using a fluorescence microscope OPTiphot-2  
15 (Nikon, Japan), with the corresponding filters.

16

#### 17 **2.10. Hemolytic activity**

18 Peptides were screened for hemolytic activity by treating a 1% suspension of freshly  
19 isolated and PBS, pH 7.4, washed human red blood cells ( $\text{O}^+$  donor), with peptide samples  
20 ( $10 \mu\text{L}$ ) at various concentrations ( $5\text{-}100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). After gentle mixing, the tubes were  
21 incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 30 min and then centrifuged at  $4,000 \text{ g}$  for 5 min. One hundred micro  
22 liters of the supernatants were taken, diluted to 1 ml with PBS, and the absorbance at 567  
23 nm was determined. The relative optical density, as compared with that of the cell  
24 suspension treated with 0.2% Triton X-100, was defined as % hemolysis.

25

### 26 **3. Results and Discussion**

#### 27 **3.1. Peptide design and identification of Plc-2 as the core pleurocidin fragment** 28 **retaining full antimicrobial activity**

29 Antimicrobial activities of derived pleurocidin peptides were evaluated using Gram-  
30 positive (*S. aureus* and *E. faecalis*) and Gram negative (*P. aeruginosa* and *E. coli*)  
31 representative bacteria. Detection and quantification of antimicrobial activity were

1 determined by reduction of Alamar Blue. An evaluation of the Plc-2 fragment began by  
2 testing the synthetic peptides Plc-1-5, which represent the N-terminal, middle, and C-  
3 terminal segments of pleurocidin (**Table 1**). Significant killing activity against *E. coli*, *S.*  
4 *aureus* and *P. aeruginosa* was retained only by Plc-2 and the Plc-4. The MIC ranged from  
5 4.0  $\mu\text{M}$  to 9.1  $\mu\text{M}$ . Peptides Plc-1, Plc-3, Plc-4 and Plc-5 presented a neglected activity  
6 with a MIC of 40.2 to 58.0 (**Table 2**).

7 The relationships of bacterial growth inhibition *versus* peptide dose are illustrated in  
8 **Figure 1**. Plc-2 and Plc-4 inhibited growth of *S. aureus* and *E. coli* at 2.5 (Fig. 1) and 5  $\mu\text{g}$   
9  $\text{mL}^{-1}$  (data not shown) peptide concentrations, respectively, whereas Plc-1, Plc-3, Plc-4 and  
10 Plc-5 did not exhibit any growth inhibition. Plc-3 and Plc-5 also failed to show any  
11 antimicrobial activities through all the tested concentrations. Notably, Plc-2 showed the  
12 highest antimicrobial activity in the experiment with *S. aureus*, and *E. coli* and it worked  
13 even at a 2.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  peptide concentration. Plc-2 and Plc-4 have the sequence  
14 KHVGKAAL in common. The antimicrobial activity of Plc-2 was comparable to the  
15 original peptide Plc.

### 17 **3.2. Antifungal activity**

18 Antimicrobial peptides target cytoplasmic membranes and intracellular macromolecules.  
19 As a general feature most antimicrobial peptides are amphipathic, and this property is a key  
20 role in their antimicrobial activity by microbial membrane interaction. However, microbial  
21 cell surfaces such as membranes or cell walls are composed of various components, and  
22 they exhibited significant differences in their surface components between prokaryote and  
23 eukaryote cells [16]. Previous studies have shown that the pleurocidin peptide presents a  
24 selective membrane-disruption effect in some fungi [31,32] but its mechanism of action  
25 remains to be determined.

26 The antifungal activities of the short pleurocidin peptides were screened *in vitro*  
27 against *Alternaria sp.* and *Fusarium oxysporum*. **Table 3** shows the MIC and MFC values  
28 for the different fungi. The MIC and MFC values of pleurocidin ranged from 0.79  $\mu\text{g mL}^{-1}$   
29 to  $>25 \mu\text{g mL}^{-1}$  and 3.12  $\mu\text{g mL}^{-1}$  to  $>50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. Whereas the MIC and MFC  
30 values of Plc-2 ranged from 3.12  $\mu\text{g mL}^{-1}$  to  $>50 \mu\text{g mL}^{-1}$  and 6.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  to  $>50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  
31 respectively. These values illustrated the relative antifungal potency of the two peptides,

1 with MIC values quite comparable to the conventional fungicide captan. The highest  
2 inhibitory activity of the two peptides was observed against *Colletotrichum* sp., and the  
3 lowest inhibition was noted against *Aspergillus ochraceus*. Plc-2 was less active than  
4 pleurocidin, except against *F. oxysporum*, for which the MIC and the MFC values were the  
5 same. Both peptides exhibited fungistatic and fungicidal activity for all the ascomycete  
6 fungi tested.

### 7 8 **3.3. Morphological alterations**

9 Antimicrobial peptides are known to induce abnormal morphological changes in the hyphae  
10 structure of phytopathogenic fungi [3] and human pathogenic fungi [18,19]. In our study,  
11 significant morphological changes were observed when the phytopathogenic fungi were  
12 exposed to pleurocidin and Plc-2 at concentrations that partially inhibit growth (**Fig. 2**).  
13 Most of these fungi exhibited increased branching (hyper-branching) and swelling of the  
14 hyphae in the presence of the peptides. Condensed hyphal aggregates were commonly  
15 observed when fungi were treated with peptides followed by staining with CFW. The  
16 fluorescent probe SG was used to assess cell permeation of fungi treated with both  
17 peptides. All the fungi showed identical fluorescent staining. Cellular membranes were  
18 compromised and also disrupted if the fungal structures were incubated with pleurocidin or  
19 Plc-2 (**Fig. 2**).

### 20 21 **3.4. Structural and compositional studies of Plc-2**

22 The fact that Plc-2 is reduced in size compared to pleurocidin might alter its structural  
23 properties. The Plc-2 peptide presented the smallest charge (+2) and pI (9.7) but the major  
24 molecular moment (0.16) from among the synthesized peptides (**Table 1**). Comparing the  
25 primary structure of Plc-2 with the structure of antimicrobial peptides with similar activity  
26 (dermaseptin-1, ceratotoxin and PR39) and the results obtained in this work (**Fig. 1 and**  
27 **Table 2**) it can be depicted that the sequence GKAAL is the critical amino acid sequence  
28 for the antimicrobial activity of the pleurocidin antimicrobial peptide.

29 The capacity to take on an amphipathic  $\alpha$ -helical structure (containing hydrophobic  
30 residues on one face of the helix and hydrophilic residues on the opposite face) is thought  
31 to be important for the antimicrobial activity of pleurocidin. The results are supported by

1 the amphipathic  $\alpha$ -helical conformation as the structural characteristic of pleurocidin, which  
2 is presented by the Schiffer–Edmundson helical wheel modeling and CD spectra.  
3 Moreover, the amphipathic  $\alpha$ -helical peptides, with antibacterial activity, exhibit  
4 membrane-disrupting activity and Plc-2 also displays  $\alpha$ -helical structure (**Fig. 3**).

#### 6 **4. Conclusions**

7 In this study, we investigated the antibacterial and antifungal activities and mechanisms of  
8 pleurocidin and short Plc derived peptides. Our results on Plc bacterial activity indicate that  
9 Plc-2 a C-terminal 12-amino-acid fragment of pleurocidin, include the critical amino acid  
10 for the cytolytic activity. The data also showed that following its strong antimicrobial  
11 activity against human pathogenic Gram-positive and Gram-negative bacteria, without  
12 damaging human erythrocytes, the pleurocidin and Plc-2 also exhibit a potent activity  
13 against fungicide-resistant pathogens. Staining experiments indicated that both pleurocidin  
14 and Plc-2 can compromise the integrity of the fungi membrane and, in addition bind to  
15 nuclear acid, thus affecting the nuclear membrane. The antifungal effects of Plc-2 are  
16 thought to be due to membrane disruption after the accumulation in the plasma membrane  
17 of the fungal cell. Thus, the important activity of this peptide may be helpful to form a  
18 leading model for developing new and of novel therapeutic agents.

19  
20 **Acknowledgements-** This work received financial assistance from the Science and  
21 Technology Ministry of Brazil (MCT), Research Foundation Carlos Chagas Filho of the  
22 State of Rio de Janeiro (FAPERJ), Coordination of Improvement of Higher Education  
23 Personnel (CAPES), the Brazilian Council for Scientific Research (CNPq) and DYCIIT  
24 (Uruguay). We thank the platform of peptide synthesis of FIOCRUZ (PDTIS) for the  
25 facilities. Thanks are also due to Dr M.C. Lourenço from the Microbiology Department  
26 (Instituto de Pesquisas Evandro Chagas -FIOCRUZ) for the bacterial assays and to Ms  
27 Nora Altier and Carolina Leoni from Department of Protección Vegetal (INIA Las Brujas)  
28 for the fungal isolates.

#### 30 **5. References**

- 1 [1] Abril M, Curry KJ, Smith BJ, Wedge DE Improved microassays used to test natural  
2 product-based and conventional fungicides on plant pathogenic fungi. *Plant Disease*  
3 2008; 92, 106-112.
- 4 [2] Broekaert WF, Terras FRG, Cammue BPA and Vanderleyden J An automated  
5 quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiol Lett* 1990; 69, 55-  
6 60.
- 7 [3] Cavallarin L, Andreu D, San-Segundo B Cecropin A-derived peptides are potent  
8 inhibitors of fungal plant pathogens. *Mol Plant-Microbe Interact.* 1998; 11, 218-227.
- 9 [4] Chen YH, Yang JT, Chau KH Determinations of the helix and beta forms of proteins in  
10 aqueous solutions by circular dichroism. *Biochemistry* 1974; 13, 3350-3359.
- 11 [5] Cole AM, Darouiche RO, Legarda D, Connell N, Diamond G Characterization of a fish  
12 antimicrobial peptide: gene expression, subcellular localization, and spectrum of  
13 activity. *Antimicrob Agents and Chemother* 2000; 44, 2039-2045.
- 14 [6] Cole AM, Weis P, Diamond G Isolation and characterization of pleurocidin, an  
15 antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *J Biol Chem* 1997;  
16 272, 12008-120013.
- 17 [7] Douglas SE, Gallant JW, Gonz Z, Hew C Cloning and development expression of a  
18 family of pleurocidin-like antimicrobial peptides from winter flounder,  
19 *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). *Dev Comp Immunol* 2001; 25, 137-147.
- 20 [8] Douglas SE, Patrzykat A, Pytuck J, Gallant JW Identification, structure and differential  
21 expression of novel pleurocidins clustered on the genome of the winter flounder,  
22 *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). *Eur J Biochem* 2003; 270, 3720-3730.
- 23 [9] Eisenberg D Three-dimensional structure of membrane and surface proteins. *Annu Rev*  
24 *Biochem* 1984; 53, 595-623.
- 25 [10] Eisenberg D, Weiss RM, Terwilliger TC The hydrophobic moment detects periodicity  
26 in protein hydrophobicity. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1984; 81, 140-144.
- 27 [11] Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Peter J, Rinaldi MG, Walsh TJ Testing conditions for  
28 determination of minimum fungicidal concentrations of new and established  
29 antifungal agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS Collaborative Study. *J Clin Microbiol*  
30 2002; 40, 3204-3208.

- 1 [12] Fernández-Andreu CM, Pimentel-Turino T, Martínez-Machín G, González- Miranda  
2 M Determinación de la concentración mínima inhibitoria de fluconazol frente a  
3 *Cryptococcus neoformans*. Rev Cubana Med Trop 1999; 51, 55-57.
- 4 [13] Fuchs PC, Barry AL, Brown SD In vitro antimicrobial activity of MSI-78, a magainin  
5 analog. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42, 1213-1216.
- 6 [14] Gudmundsson GH, Magnusson KP, Chowdhary BP, Johansson M, Anderson L,  
7 Boman HG Structure of the gene for porcine peptide antibiotic PR-39, a cathelin gene  
8 family member? Comparative mapping of the locus for the human peptide antibiotic  
9 FALL-39. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92, 7085-7089.
- 10 [15] Hancock RE, Sahl HG Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective  
11 therapeutic strategies. Nature Biotechnol 2006; 24, 1551-1557.
- 12 [16] Jung HJ, Park Y., Sung WS, Suh BK, Lee J, Hahm KS, Lee DG Fungicidal effect of  
13 pleurocidin by membrane-active mechanism and design of enantiomeric analogue for  
14 proteolytic resistance. Biochim Biophys Acta 2007; 1768, 1400–1405.
- 15 [17] Lee KHS, Hong SY, Oh JE, Kwon M, Yoon JH, Lee J, Lee BL, Moon HM  
16 Identification and characterization of the antimicrobial peptide corresponding to C-  
17 terminal beta-sheet domain of tenecin 1, an antibacterial protein of larvae of *Tenebrio*  
18 *molitor*. Biochem J 1998; 334, 99-105.
- 19 [18] Lee DG, Park Y, Nam HN, Kim HK, Kim PI, Choi BH, Hahm KS Antifungal  
20 mechanism of an antimicrobial peptide, HP(2–20), derived from N-terminus of  
21 *Helicobacter pylori* ribosomal protein L1 against *Candida albicans*. Biochem Biophys  
22 Res Commun 2002; 291, 1006–1013.
- 23 [19] Lee J, Lee DG Structure-antimicrobial activity relationship between pleurocidin and its  
24 enantiomer. Exp Molec Med 2008; 40, 370-376.
- 25 [20] Marchini D, Giordano AG, Amons R, Bernini LF, Dallai R Purification and primary  
26 structure of ceratotoxin A and B, two antibacterial peptides from the female  
27 reproductive accessory glands of the medfly *Ceratitis capitata* (insecta:Diptera).  
28 Insect Biochem Mol Biol 1993; 23, 591–598.
- 29 [21] Merrifield B Solid phase synthesis. Science 1986; 232:341-347.
- 30 [22] Montesinos E Antimicrobial peptides and plant disease control. FEMS Microbiol Lett  
31 2007; 270, 1-11.

- 1 [23] Mor A, Nguyen VH, Delfour A, Migliore-Samour D, Nicolas P Isolation, amino acid  
2 sequence and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian  
3 skin. *Biochemistry* 1991; 30, 8824–8830.
- 4 [24] Muñoz A, Marcos JF Activity and mode of action against fungal phytopathogens of  
5 bovine lactoferricin-derived peptides. *J Appl Microbiol* 2006; 101, 1199-1207.
- 6 [25] Redondo-Lopez V, Cook RL, Sobel JD Emerging role of lactobacilli in the control and  
7 maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev Infec Dis* 1990; 12, 856-872.
- 8 [26] Reed JD, Edwards DL, Gonzalez CF Synthetic peptide combinatorial libraries: a  
9 method for the identification of bioactive peptides against phytopathogenic fungi.  
10 *Molec. Plant-Microbe Interact* 1997; 10, 537-549
- 11 [27] Romero-Vivas J, Rubio M, Fernandez C, Picazo JJ Mortality associated with  
12 nosocomial bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect*  
13 *Dis* 1995; 21, 1417-23.
- 14 [28] Saint NS, Cadiou H, Bessin Y and Molle G Antibacterial peptide pleurocidin from ion  
15 channels in planar lipid bilayers. *Biochim. Biophys Acta* 2002; 1564, 359-364.
- 16 [29] Satish S, Mohana DC, Ranhavendra MP, Raveesha KA Antifungal activity of some  
17 plant extracts against important seed borne pathogens of *Aspergillus* sp. *J Agric*  
18 *Technol* 2007; 3, 109-119.
- 19 [30] Shai Y, Fox J, Caratsh C, Shih YL, Edwards C, Lazarovici P Sequence and synthesis  
20 of pardoxin, a polypeptide from the real moses sole with inophore activity. *FEBS Lett*  
21 1988; 242, 161-166.
- 22 [31] Sung WS, Lee DG Pleurocidin-derived antifungal peptides with selective membrane-  
23 disruption effect. *Biochem Biophys Res Commn* 2008; 369, 858-861.
- 24 [32] Yang JY, Shin SY, Lim SS, Hahm KS, Kim Y. Structure and bacterial cell selectivity  
25 of a fish-derived antimicrobial peptide, Pleurocidin. *J Microbiol Biotechnol* 2006; 16,  
26 880-888.

27

28

29

30

31

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43

## Legends to Figures

**Fig.1-** Susceptibility of *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. fecalis* and *E. coli* to derived pleurocidin (Plc) peptides (Plc-1, Plc-2, Plc-3, Plc-4 and Plc-5) measured by the assay of antibacterial activity. The MBC values represent the means  $\pm$  SD of three experiments performed on different days.

**Fig. 2–** Microscopy visualization of *Alternaria sp.* (A) and *Fusarium oxysporum* (B) treated with the peptide Plc-2 *in vitro*. (A) Hyphal morphology of *Alternaria sp.* Panel A1-A3 shows the same area without Plc-2 treatment. A<sub>1</sub>: bright field; A<sub>2</sub>: treatment with CFW; A<sub>3</sub>: treatment with SG. Panel A4-A6 shows the same area after treatment with Plc-2. A<sub>4</sub>: bright field; A<sub>5</sub>: treatment with CFW; A<sub>6</sub>: treatment with SG. (B) Hyphal morphology of *Fusarium oxysporum*. Panel B1-B3 shows the same area without Plc-2 treatment. B<sub>1</sub>: bright field; B<sub>2</sub>: treatment with CFW; B<sub>3</sub>: treatment with SG. Panel B4-B6 shows the same area after treatment with pleurocidin. AB<sub>4</sub>: bright field; B<sub>5</sub>: treatment with CFW; B<sub>6</sub>: treatment with SG. CFW, calcofluor white; SG, sytox green.

**Fig. 3 -** Alignment of Plc-2 sequence and antimicrobial peptides with similar activity (A) and the Schiffer-Edmundson helical-wheel diagram projection demonstrating probable amphipathic  $\alpha$ -helical conformation of pleurocidin (B, left) and Plc-2 peptide (B, right). Diagrams of left helical-wheel and right helical net of five repeat KAALT sequence. When 2 and 6 positions on the helical-wheel and in the helical net were occupied by cationic residues, the  $\alpha$ -helix takes amphiphilic structures, and B stands for K. Diagrams of left B showed one hydrophobic face VAWAGFYGA in pleurocidin.

## TABLES

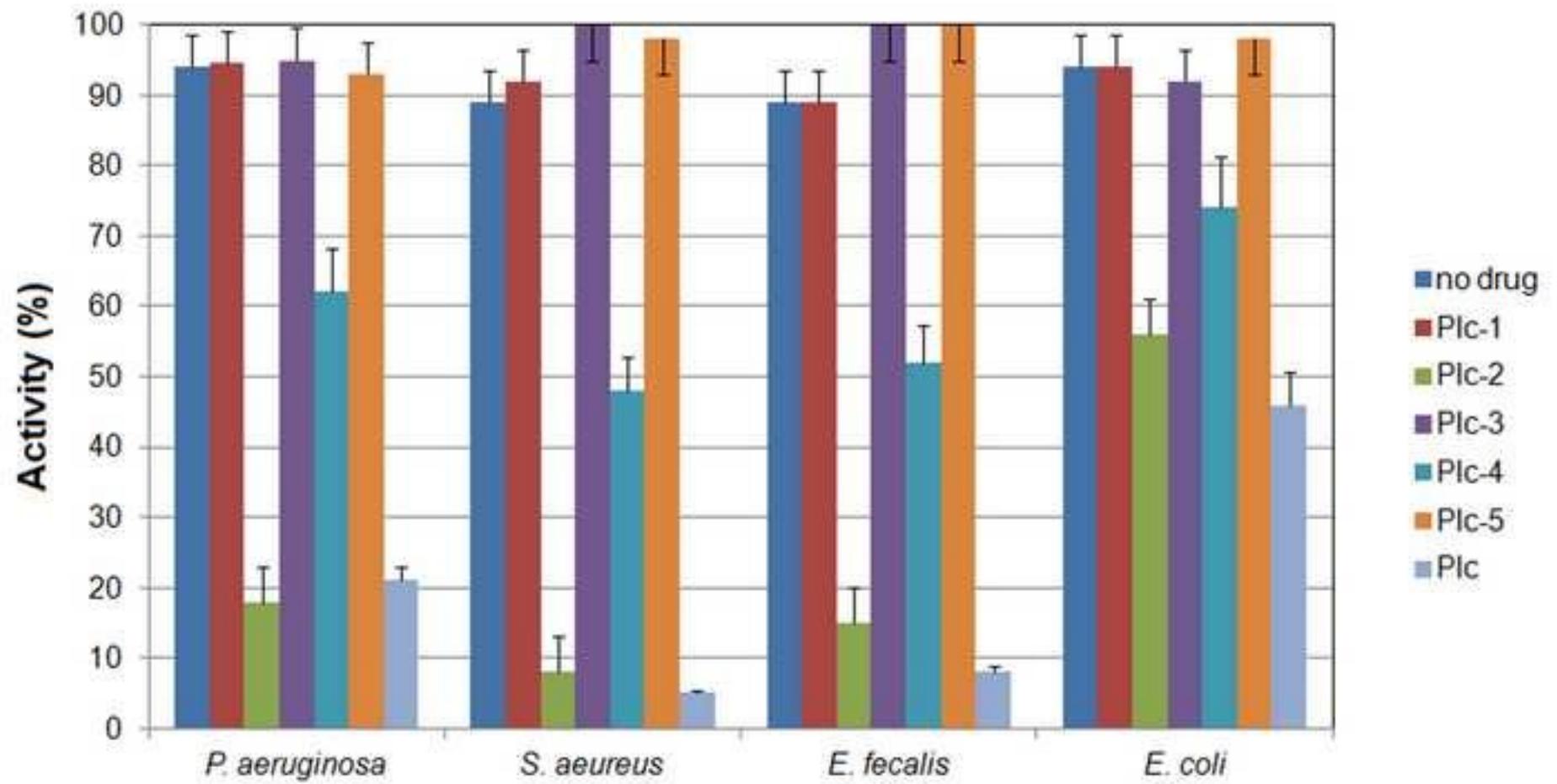
### Table 1- Peptides, sequences and properties

\*The molecular moment (Mm) was calculated by the method of Eisenberg et al., (1984), as described in Materials and Methods. Plc, pleurocidin peptide.

### Table 2- Antibacterial activity (MIC, $\mu$ M) of the different peptides

### Table 3- Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) of the different peptides

Figure  
[Click here to download high resolution image](#)



CFW

SG

Plc-2

Plc-2-...t~

# A

Plc-2

Pleurocidin

GWGSFFKKAHVGI

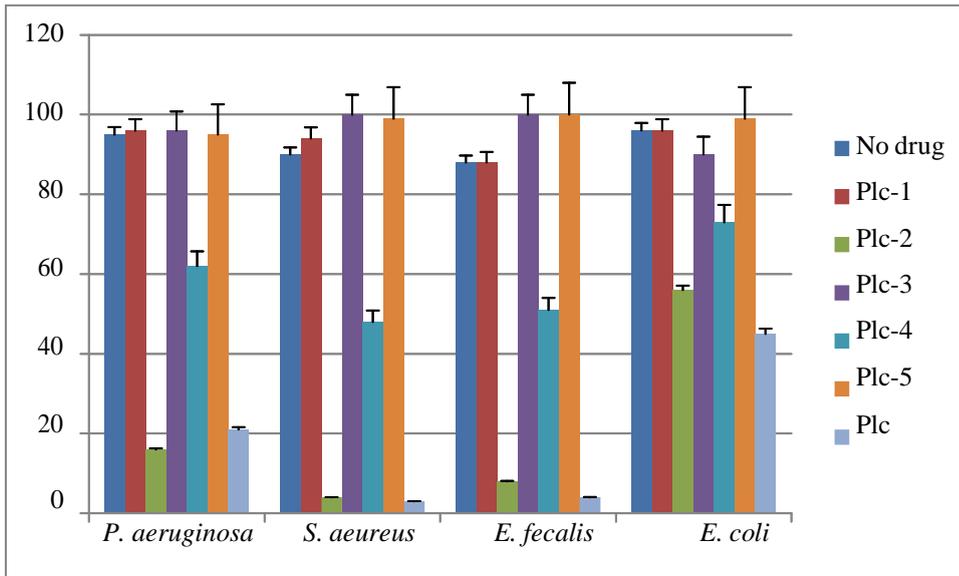
Dermaseptin-1

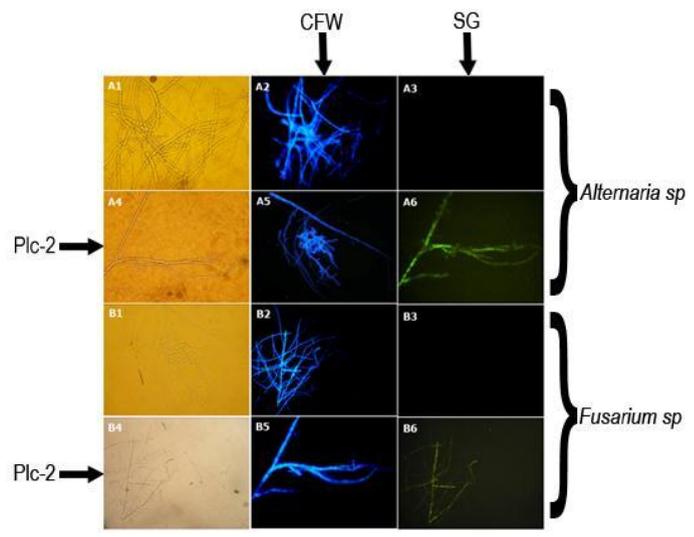
Ceratotoxin

SIGSALKKALP-

PR39

# B

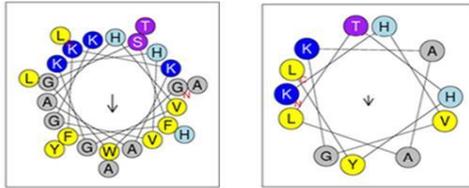




A

```
Plc - 2          KHVGGKALT---HYL
Pleurocidin     GWGSFFKKAH-VGKHVGKALT---HYL
Dermaseptin - 1 GLWSKIKETGKEAAKAGKALHK-IAEAV
Ceratotoxin     SIGSALKKALP-VAKKIGKTALP IAKAALP
PR39            WRERALRDEAHDGLDDLGRAIVT---VHSF
```

B



<b>Pep</b>	<b>Amino acid sequences</b>	<b>MMr</b>	<b>Mm*</b>	<b>Charge</b>	<b>Hn</b>	<b>pI</b>
<b>Plc</b>	GWGSFFKKAHVGGKHVGKAALTHYL	<b>2716.22</b>	<b>0.830</b>	<b>+4</b>	<b>4.43</b>	<b>10.02</b>
<b>Plc-1</b>	KLKHVGLHVGKLGK	<b>1456.84</b>	<b>0.015</b>	<b>+4</b>	<b>-0.06</b>	<b>10.48</b>
<b>Plc-2</b>	KHVGKAALTHYL	<b>1224.43</b>	<b>0.160</b>	<b>+2</b>	<b>0.66</b>	<b>9.70</b>
<b>Plc-3</b>	KKAHVGGKHVGXAAKK	<b>1529.43</b>	<b>1.383</b>	<b>+5</b>	<b>5.68</b>	<b>10.60</b>
<b>Plc-4</b>	KKAHVGGKHVGKAAL	<b>1514.84</b>	<b>1.283</b>	<b>+4</b>	<b>4.37</b>	<b>10.60</b>
<b>Plc-5</b>	GWGSFFKKAHVGG	<b>1391.60</b>	<b>0.727</b>	<b>+2</b>	<b>2.78</b>	<b>10.00</b>

<b>Clinical isolate</b>	<b>Plc-1</b>	<b>Plc-2</b>	<b>Plc-3</b>	<b>Plc-4</b>	<b>Plc-5</b>
<i>P. aeruginosa</i> ATCC-27853	56.0	9.1	52.0	29.5	52.0
<i>E. coli</i> ATCC-35218	43.4	4.0	56.1	16.1	43.6
<i>S. aureus</i> ATCC-25325	40.2	4.6	56.3	20.2	58.0
<i>E. faecalis</i> ATCC-29212	52.3	-	47.2	-	57.0

Fungal pathogens	MIC $\mu\text{g mL}^{-1}$		MFC $\mu\text{g mL}^{-1}$	
	Pleurocidin	Plc-2	Pleurocidin	Plc-2
<i>Alternaria</i> sp.	3.12	6.25	-	6.25
<i>Fusarium oxysporum</i>	3.12	3.12	6.25	6.25
<i>Aspergillus niger</i>	1.56	6.25	3.12	12.5
<i>Aspergillus ochraceus</i>	>25	>50	>25	>50
<i>Cladosporium fulvum</i>	6.25	12.5	25	>50
<i>Colletotrichum</i> sp.	0.79	3.12	3.12	6.25

# **Hybrid peptide Temporizin a novel candidate drug to kill Trypanosoma cruzi : a pore mediated process**

*Souza ALA<sup>1</sup>, Faria RX<sup>4</sup>, Alves LA<sup>4</sup> and Giovanni De Simone S<sup>1,2,3</sup>*

*1-Laboratory of Biochemistry of Proteins and Peptides, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.*

*2- Services Bacteriology Research Center, Hospital Evandro Chagas, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.*

*3- Departament of Cell and Molecular Biology, Biology Institute, Federal Fluminense University, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil.*

*4- Laboratory of Cellular Communication, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil.*

**Key words:** Temporin A, Gramicidin, Temporizin, Trypanosoma cruzi

## **Address Correspondence to:**

Giovanni Salvatore De Simone

Laboratory of Proteins and Peptides

Department of Immunology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ

Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

Av. Brazil, 4365 – Manguinhos

21045-900, Rio de Janeiro, Brazil

FAX: (55) (21) 3865-8101

E-Mail - [alveslaa@ioc.fiocruz.br](mailto:alveslaa@ioc.fiocruz.br)

**Acknowledgements:** This work was supported by grants from FAPERJ, PAPES V/CNPq and the Oswaldo Cruz Institute.

## Abstract

Tropical diseases caused by parasites continue to cause socioeconomic prejudice that affects the worldwide. Among them, Chagas disease caused by *Trypanosoma cruzi* has become a great concern due to globalization process. There is an increasing need to obtain new control measures for this Chagas disease since there is no specific treatment for it. A possible solution to this question is the antimicrobial peptides, which are effector molecules of the innate immune response of all pluricellular organisms, providing them with first-line defense against pathogens. Amphibian skin secretions represent one of the richest natural sources for antimicrobial peptides, in special Temporins, which are a large family and are among the smallest ones found in nature to date. Due to their functional role and modes of action presents unique properties; this family is a good candidate to be investigated more deeply. We investigated the anti-trypanosomal activity of Temporizin and Temporizin-1, the first is an artificial peptide comprising the N-terminal region of Temporin A, the pore forming region of the Gramicidin pore, and a C-terminal consists of alternating leucine and lysine. The second peptide suffered a reduction in the portion responsible for insertion in the membrane. We evaluated the peptides function using the Cell Permeabilisation Assay, Flow Cytometry, LDH Release Assay, MTT Assay and patch clamp experiments. Temporizin and Temporizin-1 showed toxicity against the T. cruzi using the Cell Permeabilisation Assay, Flow Cytometry and MTT Assay. In all methodologies the Temporizin was slight more potent than Temporizin-1 to kill the parasite. At concentrations low to 100ug both peptides had low toxicity at macrophage lineage- J774 cells. In mice primary peritoneal macrophages, these peptides did not show toxicity, nor in rat adenoma GH3 cells neither in human lymphoma Jurkat cells. In general, Temporizin exhibited toxicity higher than Temporizin-1. In summary, Temporizin-1, a shortened form of the hybrid Temporizin peptide was efficient to kill T.cruzi, while it was low toxic to mammalian cells. These data suggest that Temporizin-1 might be a candidate for therapy of Chagas disease.

## **Introduction**

*Trypanosoma cruzi* (*T. Cruzi*) is an intracellular protozoan parasite responsible for Chagas disease. This disease is endemic throughout regions of Mexico and Latin America where in turn of 11 million people are infected and 25 million are at risk (Dias et al., 2002). It is transmitted to humans and diverse domestic and wild animals mainly by large, blood-sucking reduviid bugs of the subfamily Triatominae (Deane, 1964). Chagas disease also can be transmitted by blood transfusion and vertically from mother to infant. Infected people, around 30%, develop debilitating or life-threatening medical conditions (Bern et al, 2008) which are heart arrhythmias, megaesophagus and megacolon.

*T. Cruzi* infection lasts for 4-8 weeks in the initial phase (acute), and for the host's lifespan in the chronic phase (WHO, 2002; Dias, 1984). In the case of exposition to infected triatomine bugs the symptoms appear 1-2 weeks, and in the transfusion with infected blood up to a few months. The initial phase is usually asymptomatic or might be present as a self-limiting febrile illness. In general, the clinical manifestations in this phase resolve spontaneously in turn of 90% of the infected and 60-70% of them will never develop clinically apparent disease. The remaining 30-40% of patients will subsequently develop a determinate form of chronic disease (cardiac, digestive or cardiodigestive).

Anti-trypanosomal treatment is recommended for all acute, congenital, children with infection, reactivated infection cases and patients up to 18 years of age with chronic disease (Ministério da Saúde, 2005; Bern et al, 2007). Although, currently there is not convincing therapeutic strategy for Chagas disease, it is treated with Benznidazole and Nifurtimox (Andrade et al, 1996; Fabbro et al, 2007), even though they are very toxic (Cerecetto and Gonzalez; 2002; Garcia et al, 2005; Bartel et al, 2007). In a general manner, the control of the disease depends on prophylaxis and therapeutic anti-parasite drugs (Barret et al, 2003). However, the inappropriate use of these drugs has led to an increase in parasite resistance, for example with African trypanosomes (Wilkinson and Kelly, 2009, Coura, 2009). Taken together, these facts indicated an urgent need for novel agents to prevent and cure this disease.

In keep with this idea, anti-microbial peptides (AMPs) are efficient molecules with long periods of functionality, in the evolution (Yeaman and Yount, 2007). They

participate of the innate immune system of plants and animals (Alvarez-Pellitero, 2008) with broad spectrum of activity against bacteria, fungi, parasites and virus (Mookherjee and Hancock, 2007). These peptides can affect the pathogens by interfering with cell functioning internally, affecting the microorganism's membrane potential or forming pores in the plasmatic membrane, in all options causing cell death by necrosis or apoptosis. In addition, they may exhibit diverse effectors functions modulating the host innate immune responses (Mookherjee and Hancock, 2007; Zhang and Falla, 2009).

Furthermore, recent studies have shown that AMPs as antibiotic substances are found in the cellular secretions produced by fungi and bacteria. Generally, antimicrobial peptides are synthesized as pre-pro-regions of proteins. Some originate from N-terminal signal sequences of proteins synthesized in the endoplasmic reticulum and other regions are conserved C-terminal sequence of protein hormones and enzymes (Rinaldi, 2002). These peptides have been grouped based on their primary structure, size and length. Among living beings, the biggest producer and the largest sources of antimicrobial peptides are the frogs (*Simmaco et al, 1998; Rinaldi, 2002*). Among these peptides is the family of Temporin a large group of peptides with lytic activity against various microorganisms and low toxicity to mammalian cells.

The refractoriness of frogs to the *Trypanosoma cruzi* (Diaz, 1940), and the diversity of antimicrobial peptides produced by this group of vertebrates (Clark et al. 1994; Kreil, 1994; Colon et al, 2004; Conlon et al, 2009) guided our laboratory to synthesize, using an automatic synthesizer, and to use a hybrid molecule formed by the Temporin A, Gramicidin and the Polileu peptide, named of Temporizin. Our proposal is to test the biocidal action of the Temporizine against the *T. cruzi* and test the possible toxicity of Temporizine in the mammalian cells through biological tests.

## **Material and methods**

### *Reagents*

Trypan blue was purchased from Allied Chemical (Detroit, MI, U.S.A) and BAPTA-AM was from Molecular Probes (Oregon, U.S.A). All other reagents were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, U.S.A.).

### *Cell culture*

Peritoneal macrophages were obtained from the intraperitoneal cavity of Swiss mice and were prepared in our laboratory as previously described (Faria et al. 2005); J774 cells, GH3 cells and Jurkat cells besides peritoneal macrophages were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% foetal calf serum, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml), and were plated on 35-mm Petri dishes for two to five days. The cells were incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere for the electrophysiological experiments.

### **Parasites culture and anti-parasitic assay**

Epimastigotes forms of the *T. cruzi* Y strain were maintained in the liver infusion tryptose (LIT) medium, and harvested at the log phase (5th day) by centrifugation (three times, 1500g, 30 min), in PBS. Immediately, the parasites were disrupted by 10 cycles of freezing and thawing, in the same buffer, and the pellet and supernatant were obtained by centrifugation (100,000g, 45 min, 4 °C).

### **Peptide synthesis.**

The construction of the molecule, Temporizin, was modeled based on three peptides described in the literature, including their activity on biological membranes. Although the antimicrobial activity of the Temporin on trypanosomatid was not reported, we produced a N-terminal structure similar to Temporin, which are peptides found in secretions of the frog, *Rana temporaria*, they are naturally refractory to the *Trypanosoma cruzi* (Diaz, 1940). The central region of the peptide, i.e., from the leucine at position 3, to the tryptophan at position 12, we built a structure similar to that functional portion of Gramicidin A using the portion which interact to biomembranes, responsible for the formation of pores (Quigley et al, 2000; Koeppe et al, 1995; Ketchem et al, 1993; Stankovic et al, 1990). The C - terminal was built from the

evidence of stability reported in the literature of a peptide segment in alternating leucine and lysine residues and it also seems to have some affinity with some polysaccharide surface structures of microorganisms. In addition, some reports show that arginine residues confer greater stability to peptide fragments and lower toxicity (Yamada and Natori, 1994). A comparison of the Temporin, Gramicidin, Polileu and Temporizin sequences is showed in figure 1.

*Production of Temporizine:* Temporizine was obtained by the methodology of solid phase synthesis using the F-moc strategy (**reference**) with the help of an automatic synthesizer (PSS-8 - Shimadzu, Japan). The synthesis was performed using the most modern resins, reagents and protected amino acids, commercially available. The purity was assessed by high performance liquid chromatography (HPLC) using the reverse phase column and the sequence confirmed by mass spectrometry or Edman degradation.

### **Measure the concentration of Temporizine**

The concentration of Temporizine was determined by measuring the optical density at 205nm using a molar extinction coefficient previously determined for peptides 12-15 residues. Alternatively the concentration was determined by automatic amino acid analyzer (Shimadzu) in collaboration with Dr. Philip Quirino (INCQS-FIOCRUZ) or by amino acid analysis using an HPLC system (Schimadzu, model 6A) followed by OPA derivatization (emission 450 nm excitation and 350 nm).

### **Mass spectrometry**

Mass spectrometry was held in collaboration with Dr. Jonas Peralez (Department of Pharmacodynamics, IOC / FIOCRUZ), Dr. B. Russollina Zingales (Institute of Biochemistry, UFRJ) and Dr. Enrico Di Cera (Washington University). The mass spectrometry electrospray kind was held on an instrument Q-TOF Ultima API (Micromass). Temporizine samples were analyzed in positive mode (preferably) after injection into a manual Rheodyne injector and carried by a pump LC-10AD Shimadzu 20 $\mu$ L/min under constant flow of a solution in 50% acetonitrile containing 0.5% formic acid. The control equipment and data acquisition were performed by the software MassLynx v 4.0. The deconvolutions spectra were performed by this module MaxEnt I software.

For the sequencing 'de novo' of Temporizine, the ions of interest were selected in a mass window of  $\pm 0.5$  Da and fragmented by collision induced with argon. The spectrum of

the fragments were handled by MaxEnt module III and then analyzed by sequencing module BioLynx 'new' peptides. The mass spectrometry MALDI-TOF, were performed on an instrument MALDI-ToF/Pro (Amersham). Temporizine samples in solution were mixed 1:1 (v: v) with a solution supersaturated matrix for peptides (cinnamic acid) or matrix for proteins (sinapic acid), deposited on the plate sampling (0, 4 to 0.8 mL) and dried in the environment. We used (preferably) the automatic control equipment and data acquisition software to control the equipment.

### **Lytic assay with erythrocytes**

The hemolytic activity of Temporizine was performed with a 1% suspension of human erythrocytes washed with PBS, pH 7.4, incubated (37°C, 30min) with different concentrations (0.1 to 1000  $\mu\text{mol mL}^{-1}$ ) and after centrifugation (4000 g, 5min), 100 $\mu\text{L}$  of supernatant was collected, diluted to 1ml with PBS and the absorbance was measured at 567nm. The percentage of lysis was determined by comparing the optical density obtained with the optical density (100%) of a suspension treated with Triton X-100 (0.2%).

### ***Analisis of the trypanocidal activity of Temporizin by fluorescence microscopy***

We evaluated the anti-tripanosomal activity of the peptides using  $1.0 \times 10^6$  ml of epimastigotes of the T. cruzi and they were treated with concentrations of 1ng to 100 $\mu\text{g/ml}$  and incubated at 28 ° C for 30 or 60 minutes. After the treatment, the culture was incubated with a final concentration of 0.05  $\mu\text{g/mL}$  PI for 10 mimutes to 28°C. Images were captured on Nikon digital camera attached to an inverted fluorescence microscope (Nikon eclipse TE-2000-S). The results were analyzed with the software Image J.

### ***Functional assay of the fluorescent-dye uptake by Flow Cytometry***

We evaluated the anti-tripanosomal activity of the peptides using  $1.0 \times 10^6$  ml of epimastigotes of T. cruzi and they were treated with concentrations of 1ng to 100 $\mu\text{g/ml}$  and incubated at 28 ° C for 30 or 60 minutes. After treatment the culture was incubated with a final concentration of 0.05  $\mu\text{g/mL}$  PI for 10 mimutes to 28°C. Each treatment was subjected to analysis by Flow Cytometry

on a FACSCalibur using the Cell Quest software for data acquisition. Data were analyzed with the program *Winmdi*.

In our negative controls, we used only the saline and Formol [0.3 mg/ml or 3 mg/ml] or Triton-X [0.0000001% - 0.1%] were used as positive controls. In the Cell Permeabilisation experiments, we used the iodide propidium (PI) to label the parasites. In the Flow Cytometry experiments, we used PI and Calcein in the same time or separated. In the figures of Flow Cytometry, we presented some results with PI and other with Calcein.

### **Electrophysiological measurements**

Patch clamp experiments were performed essentially as described elsewhere (Faria et al. 2005). Whole-cell experiments were performed at 30-37°C in a holding potential of +60 mV.

After establishing a high-resistance seal (1-10 G $\Omega$ ) by gentle suction, the cell membrane beneath the tip of the electrode was disrupted by an additional suction with the mouth (the whole-cell configuration) or not (cell-attached configuration). Cells were transferred to a chamber mounted in a microscope stage. Patch pipettes (with 1.2 mm o.d.) were pulled from IBBL borosilicate glass capillaries (World Precision Instruments, New Haven, U.S.A) with the puller PC-10 (Narishige, New York, U.S.A.).

In the whole-cell experiments, the ionic currents obtained in the presence of the agonist were not corrected for leakage because the leakage was negligible. The recordings were accepted if the current and membrane conductance returned to within 1-5% of the control values after agonist application, thus indicating that the large conductance increase was not due to cell lysis with the loss of the seal.

The series resistance was 8-12 M $\Omega$  for all experiments in saline solution A, and no compensation was applied for currents <400 pA. Above this level, currents were compensated by 82%. Experiments in which the series resistance increased substantially during the measurement were discarded. The cell capacitance ( $24 \pm 3.9$  pF, n= 68) was measured by applying a 20 mV hyperpolarizing pulse from a holding potential of - 20 mV; the capacitive transient was then integrated and divided by the amplitude of the voltage step (20 mV).

Voltage clamp protocols were applied from holding potentials of -80 to 80 mV. Reversal potentials were calculated from the I-V curves. The whole-cell configuration was performed with holding potential of +60 mV. Currents were recorded for the Axopatch-1D amplifier (Axon Instruments, San Mateo, U.S.A) and filtered with a

corner frequency of 5 kHz (8-pole Bessel filter), digitised at 20-50 kHz using a Digidata 1320 interface (Axon Instruments, Palo Alto, CA, U.S.A) and acquired on a personal computer using the Axoscope and pCLAMP 9.0 software (Axon Instruments, Palo Alto, CA, U.S.A).

### ***Membrane potential control in cell attached configuration***

Solution A was used inside the pipette and solution B in the bath in order to record single channel currents. The rationale for this procedure in the cell attached configuration was two-fold: 1) solution A inside the pipette warranted more physiological ion gradients across the patch, so we could study more efficiently the ionomycin-activated phenomena; 2) solution C in the bath should completely depolarize the cell membrane (~0 mV), so the real value of the voltage potential across the patch was the nominal holding potential applied. This circumvented the inconvenience of having to measure the cell potential to calculate the real holding potential.

### **Saline solutions for electrophysiology**

Different saline solutions were employed in the pipette or in the bath depending on the protocol: **solution SE** (in mM): 150 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub> and 10 HEPES, pH 7.4; **solution SI** (in mM): 150 KCl, 5 NaCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES and 0.1 EGTA, pH 7.4;

***LDH Release Assay.*** The presence of LDH at media was detected in all experiments using a cytotoxicity detection kit (Sigma kit for LDH) according to the manufacturer's instructions and compared with the total amount of LDH in the cells. Cell supernatants were tested for LDH, a reducer of NAD<sup>+</sup>, which then converts a tetrazolium dye to a soluble, colored formazan derivative. The initial rate of absorbance was measured in a plate reader at 490 nm. We incubated the peptides in the range from 0,001µg to 100µg (depending on peptide) for 1 hour in the presence of J774, GH3, Jurkat cells and peritoneal macrophages. Benzoniiazide was used in the concentration between 0, 1µM - 500µM for 1 hour.

### ***MTT Assay.***

Cultures of epimastigote forms of *T. cruzi* (strain Y) were grown at 28 °C in Schneider's and TC100 media, respectively, containing 5% of heat-inactivated FBS. The parasitocidal assay (5 h) was carried out in the absence of FBS (see below). Samples of *T. cruzi* were harvested on days 4 and 5 of culture, respectively, and the antiparasitic activity of the different peptides was determined by estimating the cell viability through the MTT method (Ellis et al., 1993). Briefly, parasites were washed twice by centrifugation (1000g for 10 min) with PBS (DIFCO) and resuspended in fresh culture medium to a known cell concentration ( $4 \cdot 10^7$  parasites/ml for the assays of 5 h incubation with the peptides). Fifty microliters of parasite suspension was incubated in 96-well microplates at 28 °C with an equal volume of the serially diluted peptides, or sterile Milli-Q water in controls, for 5 h, to evaluate the parasitocidal activity. After this time, each well received 30  $\mu$ l of an MTT solution (4 mg/ml) and the reduced formazan was solubilized by the addition of 50  $\mu$ l of isopropilic alcohol after 4 h for *T. cruzi*. Parasite viability was determined spectrophotometrically at 540 nm. In positive controls, the parasites were previously killed by 0,01% Triton X-100 (30 min), or by the parasitocidal compounds Rochagan (Benznidazol, 100  $\mu$ M) for *T. cruzi*. The results were normalized to those of the corresponding controls in the absence of the peptide and the percentage of viable parasites was determined.

### ***Drug Application.***

Experiments were carried out as described previously (Faria et al., 2009) under perfusion (RC-24 chamber, Warner Instrument Corporation, Hamden, USA). All drugs were dissolved in saline solution immediately before the use. The fluorescent-dye uptake and ion currents were studied by a single application of agonists (from 5 s to 30 s).

### ***Data analysis***

We normalised the fluorescence data for the maximal fluorescence value using the Microsoft Excel and plotted the results using the GraphPad Prism version 3.0 (San Diego, CA, U.S.A). The propidium iodide uptake maximal was quantified after the Temporizine stimulation. The basal values were subtracted, and the curves were

normalised against the maximal fluorescence intensity obtained for the 3mg/ml formol application. The data were expressed as the mean  $\pm$  SD (standard deviation) as indicated in the text. Fluorescence intensity (photos) was measured by free software ImageJ 1.40g (National Institutes of Health, Maryland, U.S.A.) or WinMDI software (cytometry). The statistical significance of the differences between the means was tested by a one-way ANOVA followed by Tukey's test. A bicaudal  $p < 0.05$  was considered significant.

## **Results**

### ***Temporizin induces Trypanosoma cruzi membrane disruption.***

In order to study the possible litic effect of temporizing on T. Cruzi, we compare the toxicity of the 1 $\mu$ g/ml Temporizin with 1 $\mu$ g/ml Gramicidin, using the PI uptakes assay evaluated fluorescence microscopy (figure 2A and B) or Flow Cytometry (figure 2C and D). As a negative control, T. cruzi were incubated with PI and Calcein alone for 60 minutes and as expected no dye uptake occurred (figure 2A-D). When the parasites were incubated with Temporizin or Gramicidin 47.53 % and 20 % were labeled respectively (figure 2). In our negative control, we added the peptide in a solution heated to a temperature of 100°C to denature the peptides, no effect occurred as would be expected (figure 2A and B).

### ***Temporizin effect on T. cruzi is time-dependent.***

Our next step, we studied the temporal kinetics of Temporizin cytotoxicity on T. Cruzi as illustrated in the figure 3. In the treatments for 90 and 120, there was a destruction of membrane integrity. In this sense, although 100% cells were marked, the background precluded the visualization and image analysis. In the figure 3A and B, 1 $\mu$ g/ml Temporizin treated for 30 minutes marked 15% and for 60 minutes 80% of the parasites. In our experiments of Flow Cytometry (figure 3C and D) in the same dose the Temporizin increases of 0,56% to 10.40% in 30 minutes and 41.90% in 60 minutes. Gramicidin (1 $\mu$ g/ml) with 30 minutes marked 5% and with 60 minutes 44% of the T. cruzi (figure 3A and B).

### ***Temporizin effect on T. cruzi is concentration-dependent.***

We tested Temporizin concentrations ranging from 1ng to 100 $\mu$ g using the Cell Permeabilisation Assay (figure A and B) and Flow Cytometry (figure 4C and D). In the figure 4A, there was an increase in the fluorescence of lower concentration to higher. In the figure 4B, we showed a dose dependent relationship between the Temporizin concentration and the labeled parasite number. In addition, Gramicidin was less potent than Temporizin to induce PI uptake in T. cruzi (figure 4B and D). In the figure 4C and D, we observed, in Flow Cytometry, dose-dependent fluorescein uptake, when we increased the Temporizin concentration.

### ***Cytotoxicity mediated by Temporizin in mammalian cells.***

As several antimicrobial peptides can permeate the membranes of mammalian cells, having unwished effect for therapeutic drug, we tested the action of temporizing in several mammalian cells. Temporizin caused low toxicity in the cell lineage J774 (figure 5A and C), when it was compared to positive control, 0.1% Triton-X (figure 5A). Gramicidin, in contrast, was toxic to J774 cells (figure 5B and D). We tested different Triton-X concentrations to function as our standard curve (data not shown). In the figure 5E, we confirmed the results above, when we used growing Temporizin or Gramicidin concentrations in the toxicity assay of LDH release. Temporizin in the dose of 10ug and 100ug induced 11% and 35% of LDH release, respectively. Gramicidin in the same doses induced 66 and 84% of LDH release.

### ***Temporizin modified peptide kills the T.cruzi.***

Temporizin showed some cytotoxic activity on J774 mammal cells, in this sense we modified its linear sequence to obtain, Temporizin-1, a new peptide with toxicity minor than Temporizin. Beside, we compared the Temporizin effect with Temporin A peptide, which is described to have low toxicity in non- cancerous mammalian cells (Wade et al, 2000; Mantylä et al, 2005). The sequences of this peptide are showed in the figure 1. In experiments using the Flow Cytometry, the Temporizin-1 died 39.71% of the parasites (figure 6A<sub>4</sub>), Gramicidin (figure 6A<sub>2</sub>), Temporin A (figure 6A<sub>3</sub>) and Temporizin (figure 6A<sub>5</sub>) marked 12.54%, 17.08% and 45.52%, respectively (figure 6B). Similar to the Flow Cytometry experiments, in the Cell Permeabilisation Assays we observed that Temporizin-1 died up to 50% of T. Cruzi (figure 6C). Temporizin and

Benzoniazide were more effective than Temporizin-1 to injure the trypanosome (figure 6C). We confirmed the citotoxic effect of the different antimicrobial peptides concentrations in the T. Cruzi using the MTT Assay. When, we compared the dose of 1ug of the peptides and of the Benzoniazide, we observed that Benzoniazide was most potent to injure T. Cruzi followed by Temporizin, Temporizin-1, Temporin A and Gramicidin.

***Temporizin modified peptide possess low toxicity in mammal cells.***

We investigated whether the Temporizin-1 is cytotoxic to mammalian cells or not (figure 7). The cell line J774 (obtained from reticulum cell sarcoma), mice peritoneal macrophage (primary cell type), human T cell lymphoblast-like Jurkat cells and rat pituitary adenoma *GH3 cells* were used as study model. In the J774 cell, using the Cell Permeabilisation Assay, Temporizin-1 killed 10% of the cells. This result was similar to that observed for the Temporin A (8%), but it was minor than values obtained for the Temporizin (21%) and Gramicidin (71%) treatments (figure 7A and B). In the LDH release experiments, only the doses of 100ug were toxic for Temporin A, Temporizin and Temporizin-1, in contrast to benzoniiazide and gramicidin (figure 7G). In peritoneal macrophages, using the Cell Permeabilisation Assay, we observed results similar to that in J774 cells, although the toxicity decreased compared to that of cell line: Temporizin (10%), Temporizin-1 (4.5%), Gramicidin (22%) and Temporin A (2%) (figure 7C). The LDH Release Assay (figure 7E) contained results similar to the Cell Permeabilisation Assay (compare with the figure 7C). In contrast, when we did the experiments in an adenoma cell line, *GH3 cells*, Temporizin died 72% of the cells (figure 7D), Temporizin-1 (26%), Gramicidin (88%) and Temporin A (45%). LDH Release Assay in *GH3 cells* showed high toxicity to doses up to 10ug for all peptides and benzoniiazide (figure 7F). In the dose of 1ug, only Temporizin-1 and Temporin A induced low toxicity (figure 7F). Jurkat cells exposed to these peptides exhibited a LDH release up to 50% in the dose of 10ug for all peptides and Benzoniiazide except to Temporizin-1 (figure 7H). Our results indicated the Temporizin-1 is not cytotoxic to wild mammal cells and it contains low cytotoxic in neoplastic cells.

**Temporizin and Temporizin-1 induce macroscopic ionic currents on mammalian cell membrane.**

We investigated the action mechanism of the peptides, Temporizin and Temporizin-1, using the electrophysiology in the configuration whole-cell. In the figure 8 using the whole-cell configuration, we applied, in the bath, 1ug/ml

*Temporizin at J774 cells in holding potential of +80 mV until -80 mV. Temporizin induced macroscopic ionic currents did not exhibited voltage-dependence (figure 8 A and B). In addition, this macroscopic ionic current was dependent on the peptide concentration (figure 8 C and D).*

*When we repeated the whole-cell configuration experiments applying 1ug/ml Temporizin-1 in the bath (figure 9), there was not voltage-dependence and there was a peptide concentration-dependence similar to the Temporizin treatment (compare figure 8 with figure 9).*

## Discussion

Anti-trypanosomal treatment of chagasic patients relies on benznidazole and nifurtimox. These drugs are the only with proven efficacy against the Chagas`disease. In contrast, they have several limitations due to their high toxicity and have limited benefits during the chronic phase of the disease (Urbina and Docampo, 2003). In addition, there are absence of effective vaccines, prophylatic measures and there is increasing drug resistance in the trypanosomatides population (Delespaux and Koning 2007; Croft et al, 2006). These restrictions encourage the search for new anti-parasites effectors that have a broad spectrum of activity, low toxicity for the recipient and a low propensity to induce microbial resistance. Antimicrobial proteins or peptides (AMPs) possess many of these properties, thus they were used in our model.

AMPs exhibited an activity against a broad spectrum of microorganisms, including bacterias, fungi and, rarely, virus and protozoans. Despite variations in their structure and chain length, these peptides share two major features for their mode of action: a net positive charge and a potential to adopt amphipathic  $\alpha$  helix and/or  $\beta$  sheet structures upon their interaction with phospholipid membrane of the target cell, which is highly negatively charged in bacteria, followed by the peptide insertion and membrane permeabilisation (Brogden, 2005). This mode of action could explain why AMPs fail to induce resistance and are effective against the pathogenic microorganisms resistant to conventional antibiotics (Vizioli and Salzet, 2002a and b).

The majority of the literature focuses the mode of action of AMPs on bacteria and fungi, few studies have focused on protozoan parasites. According to these studies, it appears that the activity of AMPs is also based on electrostatics interactions, since protozoans have a higher quantity of anionic phospholipids in their cell membrane compared to that of mammalian cells (McGwire et al, 2003). In the *T. cruzi* the surface charge is species specific and varies according to the developmental stages. Trypsin and neuraminidase treatments indicated that sialic acids contributed to the negative surface charge and that they are associated with glycoproteins and glycolipids (Souto-Padrón, 2002). In keeping with this idea, *T. cruzi* becomes a good target for the action of antimicrobial peptides.

Frogs are naturally refractory to trypanosoma cruzi (Diaz, 1940) and the amphibian skin is the richest source for natural peptide (Simmaco et al, 1998; Rinaldi, 2002). Among them the genus *Rana* possesses a worldwide distribution with approximately 250 different species (Conlon et al, 2004). European red frog *Rana temporaria* produce the temporin peptides, which possesses unique properties in the Ranidae family, they lack the “Rana box” motif and are amidated at their C terminus (Bradbury and Smyth, 1991). In addition, temporins are the smallest amphipathic  $\alpha$ -helical AMP found in the nature (10-14 amino acids); their net positive charge at a neutral pH is low, ranging from 0 to +3; they act against a wide range of pathogens and low toxicity in mammalian cells; their mode of action includes perturbation of the pathogen membrane, allowing the passage of small and large molecules, in a rapid and dose-dependent manner (Rinaldi et al, 2002; Mangoni et al, 2000).

Tempone and colleagues in 2007 study the skin secretion of 8 anurans and 1 gymnophionan against the protozoan parasites, which are etiological agents of Visceral Leishmaniasis, Chagas disease and Toxoplasmosis. However, there is no description to date of the action of the temporin in *T. cruzi*.

Based on data presents in the literature, we made a hybrid peptide based on a sequence responsible for Temporin A insertion in the cell membrane, an anchoring sequence of the Polileu peptide and the sequence responsible for ionic channel formation of the Gramicidin. Our objective was to obtain a peptide with the ability to form pores of the Gramicidin and low toxicity in mammalian cells. This peptide was named of Temporizin-1.

In according to data above, we investigated whether temporizin could act on *T. Cruzi*. We observed that Temporizin injured the *T. cruzi* after 1h of treatment and it was dose-dependent (figure 2 -4). We used Gramicidin, as a positive control, to compare its effect with Temporizin. Gramicidin injured about 90% *T. cruzi* after 2h (data not shown) and it presented dose-response relationship (figure 4). Gramicidin was less potent than Temporizin to injure the *T. cruzi* (figures 3 and 4). This can be due to difference in the time to reach maximal response. We did not use the time of 2 hours for treatment, because in this time around 100% of the *T. cruzi* are death after Temporizin treatment (data not shown).

We investigated a possible toxicity of the Temporizin on mammalian cells, initially, in cell lineages derived from neoplastic tissues. Temporizin and Gramicidin were toxic to the J774 lineage (figure 5). Similar to Temporizin other peptides were toxic to the mammalian cells (Haines et al, 2003). To solve this question, we synthesize a peptide, analog to Temporin, with the functional portion shortened (see figure 1). In addition, we compared the effects of Temporizin-1, Temporizin, Temporin A and Gramicidin and the drug used in the treatment of Chagas disease, Benzoniazide. All compounds killed the trypanosomes, as we can see by Cell Permeabilisation Assay (figure 6C), Flow Cytometry (figure 6A and B) and MTT Assay (figure 6D). When compared to Temporizin, Temporizin-1 showed slight reduction in its ability to kill *T. cruzi*. Temporin A had effect similar to Temporizin-1 in Cell Permeabilisation Assay and MTT Assay (figure 6C and D), and it was equipotent in Flow Cytometry (figure 6A and B). Gramicidin was the less effective to kill the pathogen (figure 6B, C and D). Benzoniazide was more efficient than all peptides to kill *T. cruzi* (figure 6C and D).

The same way as Temporizin, we tested the toxicity of the Temporizin-1 in the J774 cells (figure 7A) using the Cell Permeabilisation Assay. Temporizin-1 was less toxic than Temporizin to injure the J774 cell lineage (figure 7A and B). Temporin A was the less potent to injure J774 cells and Gramicidin the most (figure 7B). In addition, we tested the properties of the peptides in other cell types (neoplasics or not). As we can see in the figure 7D, in the rat adenoma GH3 cells using the Cell Permeabilisation Assay, the Gramicidin was the most toxic compound with almost 90% of the GH3 cells injured. Temporizin had an effect slight minor than Gramicidin and Temporizin-1 had the less toxic effect. Regarding J774 cells, GH3 cells were more affected by peptide treatments. Mice Peritoneal macrophages, a primary culture cell, presented a reduced response compared to that of J774 and Gh3 cells (compare figure 7B with 7C and 7D).

In the experiments using the Cell Permeabilisation Assay, Benzoniiazide showed the highest citotoxicity and Temporin-1 was the less toxic. Gramicidin in the dose of 1ug practically was not toxic and in the dose of 10ug it exhibited toxicity about of 40% (figure 7C).

We confirmed the results of mammalian cells toxicity using the LDH release cells. Gramicidin and Benzoniiazide contained dose-response citotoxicity in J744 cells (figure 7G). The Temporin A, Temporizin and Temporizin-1 were cytotoxic only in the highest dose of 100ug (figure 7G). In GH3 cells, similar to the Cell Permeabilisation Assay, there was more citotoxicity than J774 cells and peritoneal macrophages (figure 7F). In the dose of 10ng, all compounds had toxicity up to 50%. In the dose of 1ng, Gramicidin and Temporizin showed LDH release about 50%, in contrast the Temporizin almost did not induce LDH release, in this dose. Human lymphoma Jurkat cells, in the dose of 1ng exhibited a citotoxicity minor than GH3 cells, but higher than J774 cells (figure 7H). In this dose, all treatments had response inferior to 50% LDH release. Gramicidin was the most toxic followed by Benzoniiazide, Temporin A, Temporizin and Teporizin-1 (figure 7H). In the dose of 10ug only Temporizin-1 obtained citotoxicity low to 15%. All other treatments released between 40-60% of LDH (figure 7H). In Peritoneal macrophages, only Benzoniiazide and Gramicidin were toxic in the both doses (1ug and 10ug). The other doses were not toxic to peritoneal macrophages. In according to data above, the Temporizin-1 was slight less potent than Temporizin to kill the *T. cruzi*. In addition, Temporizin-1 was less toxic than Temporizin, Temporin A, Gramicidin and Benzoniiazide in mammalian cells. This lack of cytotoxic effect displayed from Temporins and its derivatives do not injure macrophages (Mangoni et al, 2005).

Temporin A, Temporizin and Temporizin-1 possess net positive charge at a neutral pH range from 0 to +2 (figure 1). This positive charge can be related to action mechanism of the peptide. Trypanosome *cruzi* membrane possesses negative charges in its surface (Souto-Pádrón, 2002), thus this interaction between the peptide with *T. cruzi* might facilitate the insertion of the peptide in the *T. cruzi* membrane. This property can help to explain the fact of the Gramicidin to be ineffective in *T. cruzi*, because it has 0 of the charge at a neutral pH (figure 1). Moreover, Temporin A, Temporizin and Temporin-1 were toxic in the neoplastic cell lineages (J774, GH3 and Jurkat cells) compared to primary cell type (peritoneal macrophages). Neoplastic cell types overexpress in its plasma membrane negatively charged phosphatidyl-serine and O-

glycosylated mucins, thereby carrying a slightly higher net negative charge compared to that of normal eukaryotic cells (Iwasaki et al, 2009; Dobrzynska et al, 2005). These data may partly explain why these peptides had a higher specificity for neoplastic cells used in our work.

Due to Temporizin-1 and temporizin to exhibit low toxicity in primary cells and it to be toxic in neoplastic lineages suggests that these peptides can be used in the treatment of neoplasms *in vivo*. In this context, there are publications relating the use of antimicrobial peptides to treat tumors (Ellerby et al, 1999; Leuschner et al, 2003).

In our model, we observed that Temporizin and Temporizin-1 are able to injure the *T. cruzi* and mammalian cells. This is consistent to a characteristic of this peptide family (Temporins), which binds and permeates both zwitterionic and anionic phospholipid bilayers (mimicking the membrane composition of higher eukaryotes and bacteria or in the case *T. cruzi*) (Zhao et al, 2002). Mode-of-action of the some Temporins on intact cells has not entirely been clarified, it has been shown that the sequence, the charge distribution and the secondary structure influence the capacity of the peptides to interact with bacterial membranes. A possible mechanism is based on interdependent acidic phospholipid-induced conformational changes, aggregation, and formation of toxic oligomers in the membrane. These oligomers are subsequently converted to amyloid-type fibers (Mahalka and Kinnunen, 2009). These structures possibly form holes in the lipid bilayer related to Temporizin mode-of-action mechanism. However, there are not descriptions of the Temporin or the peptides used in our work at electrophysiological configuration on mammalian cells. Thus, we did experiments of cell attached and the whole-cell configuration using the Temporizin and Temporizin-1, because both contained toxicity to trypanosome and were toxic in J774 and GH3 neoplastic cells. In addition, to study functionally the mode-of-action of the peptides may be a way to maximize the efficiency of these peptides against the neoplastic cells. In the figure 8A and B, we used whole cell configuration and ranged the holding potential from +80mV to -80mV with Temporizin in the bath. Temporizin formed an ionic channel able to open in positive and negative holding potentials. In the extremes potential holding, there was a large increase in the amplitude values number of opened channels compared to that of potentials near to 0mV. In addition to Temporizin formed ionic channels of manner dependent on its concentration in the patch (figure 8C and D). Whole cell experiments using the Temporizin-1 in the bath exhibited an ionic channel similar to the Temporizin channel, regarding opening in positive and negative

holding potential (figure 9A and B) and concentration dependency (figure 9C and D). In contrast, the ionic current amplitude value of the ionic channels formed by Temporizin-1, in the potential of +80mV and -80mV, was minor than Temporizin in the same potentials and the amplitude of current value (compare figure 8A and B with figure 9A and B). In addition, the number of ionic channels formed in highest Temporizin-1 concentrations decrease compared to that of Temporizin in the same concentrations (compare figure 8C and D with figure 9C and D).

The reduction by shortening the four residues related to Gramicidin ionic channel pore, in Temporizin-1 structure, decreases the cytotoxicity to mammalian, but not trypanosomal cells compared with Temporizin peptide (compare figure 6 with 7). This may be related to reduction in the number of ionic channel formed (cell attached) and ionic current amplitude (cell attached and the whole-cell) of the Temporin-1 compared to that of Temporizin. The conductance of the Temporin-1 channel is lower than Temporizin channel conductance, and this may explain the slight reduction in the *T. Cruzi* toxicity observed between them. The number of ionic channels formed by Temporizin-1 present in the patch, using the cell attached configuration, was decrease in comparison to Temporizin. This property seems to interfere in the mammalian cell toxicity, because Temporizin-1 has lower toxicity than Temporizin.

We showed that the antitrypanosomal activity of the Temporin A and Gramicidin peptides could be increased by fusing the both peptides plus the Polileu peptide to make the Temporizin peptide. However, as the Temporizin was moderately toxic to mammalian cells, we shortened few of its amino acids residues making the Temporizin-1 peptide. Temporizin-1 presented antitrypanosomal activity better than Temporin A and Gramicidin and it had low toxicity in mammalian cells. We found Temporizin analogue possibly devoid of its low cytotoxic activity in mammalian cells is a good candidate to develop antitrypasosomal drugs.

## LEGENDS

**Table 1: The amino acid sequences of Temporin A, Gramicidin, Polileu, Temporizin and Temporizin-1 peptides.** The entire sequences of the peptides are shown. Temporizin peptide was formed from the junction of the N-terminal Temporin A with the portion of the Gramicidin pore-forming and the C-terminal of the Polileu peptide. Temporizin-1 possesses a reduction in the portion responsible for the Gramicidin pore-forming.

**Figure 1. Temporizin kills the *Trypanosoma cruzi*.** A: *T. cruzi* were incubated, using Cell Permeabilisation Assay, at 27°C for 45 minutes in the absence of treatments (A1), in the presence of 1µg/ml Gramicidin (A2), in the presence of 1µg/ml Temporizin (A3), in the presence of 0,1% Triton X 100 (A4). In the figures A5 and A6, Gramicidin and Temporizin were heated until 100°C before your incubation with *T. cruzi*. B: Quantification of the results obtained in the figure A. C: The treatments done in the figure A were repeated using the Flow Cytometry configuration. D: Quantification of the results obtained in the figure C. The values represent the mean ± SD of three to five experiments performed on different days. \*p<0.05, \*\*p<0.01 compared with the corresponding negative control.

**Figure 2. Temporizin cytotoxicity at the *Trypanosoma cruzi* is time dependent.** A: *T. cruzi* were incubated at 27°C for 30 and 60 minutes using Cell Permeabilisation Assay experiments. In the figure A1, there was absence of treatments for 30 minutes. *T. cruzi* was treated with 1µg/ml Gramicidin (A2) or 1µg/ml Temporizin (A3) for 30 minutes. In the figure A4, there was absence of treatments for 60 minutes. *T. cruzi* was treated with 1µg/ml Gramicidin (A5) or 1µg/ml Temporizin (A6) for 30 minutes. B: Quantification of the results obtained in the figure A. C: *T. cruzi* were incubated at 27°C for 60 minutes using Flow Cytometry. The figure C1 and C3 represents the negative controls (absence of treatments) after 30 or 60 minutes of incubation, respectively. The figure C2 and C4 represents the application of the 1µg/ml Temporizin after 30 or 60 minutes of incubation, respectively. D: Quantification of the results obtained in the figure C compared to the data obtained after Gramicidin treatment in the same times. Note that our positive control (0.1% Triton-X) labeled all parasites .

The values represent the mean  $\pm$  SD of three to four experiments performed on different days. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with the corresponding negative controls.

**Figure 4. Temporizin citotoxicity at the *Trypanosoma cruzi* is concentration-dependent.** A: *T. cruzi* were incubated at 27°C for 60 minutes using Cell Permeabilisation Assay. The figure A1 represents the Negative Control. We added Temporizin against the *T. cruzi* in the concentrations of 0,1 $\mu$ g/ml (A2), 1 $\mu$ g/ml (A3) and 10 $\mu$ g/ml (A4). B: Quantification of different Temporizin and Gramicidin doses obtained in Cell Permeabilisation Assay. C: The treatments done in the figure A were repeated using the Flow Cytometry configuration. D: Quantification of the results obtained in the Flow Cytometry experiments using distinct Temporizin and Gramicidin doses. The values represent the mean  $\pm$  SD of five to seven experiments performed on different days. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with the corresponding negative control.

**Figure 5. Temporizin possesses toxicity against the mammalian J774 cells.** A and B: J774 cell lines were incubated at 37°C for 60 minutes using Cell Permeabilisation Assay. Figures A1 and B1 are the Negative Control in the experiments using Temporizin and Gramicidin, respectively. In the figures A2 and B2, Temporizin and Gramicidin were applied in the dose of 0,1 $\mu$ g/ml, respectively. In the figures A3 and B3, they were applied in the dose of 10 $\mu$ g/ml, respectively. C: Quantification of the results obtained using Cell Permeabilisation Assay after the treatment with the Temporizin in different concentrations. D: Quantification of the results obtained using Cell Permeabilisation Assay after the treatment with the Gramicidin in different concentrations. E: Graphic representing the Gramicidin and Temporizin toxicity quantified from LDH Release Assay. The values represent the mean  $\pm$  SD of four to six experiments (Cell Permeabilisation Assay) and three experiments (LDH Release Assay) performed on different days. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with the corresponding negative control.

**Figure 6. Temporizin-1 possesses toxicity against the *T. cruzi*.** A: *T. cruzi* was incubated at 37°C for 60 minutes using Flow Cytometry Assay. We applied a unique dose of 1 $\mu$ g/ml to compare the efficiency of the peptides Gramicidin (A2), Temporin A (A3), Temporizin-1 (A4) and Temporizin (A5) to kill the *T. cruzi*. B: Quantification of

the results obtained in A. C: Graphic representing Cell Permeabilisation experiments done adding the same peptide doses used in A and doses of Benzoniiazide. D: MTT Assay using varied concentrations of peptides and Benzoniiazide. The values represent the mean  $\pm$  SD of three to five experiments (Flow Cytometry and Cell Permeabilisation Assay) and three experiments (MTT Assay) performed on different days. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with the corresponding negative control.

**Figure 7. Temporizin-1 possesses low toxicity against mammalian cells.** A: J774 cells were incubated at 37°C for 60 minutes using Cell Permeabilisation Assay. We applied a unique dose of 1 $\mu$ g/ml to compare the efficiency of the peptides Gramicidin (A2), Temporin A (A3), Temporizin-1 (A4) and Temporizin (A5) to injure the J774 cell line. B: Quantification of the results obtained in A. C: Graphic representing Cell Permeabilisation experiments performed in primary mice peritoneal macrophage after the addition of the peptide and Benzoniiazide in different concentrations. D: Graphic representing Cell Permeabilisation experiments performed in the rat adenoma GH3 cell line after the addition of the peptide and Benzoniiazide in different concentrations. E: Graphic representing LDH Release Assay performed after the addition of the peptide and Benzoniiazide (for 60 minutes) in different concentrations using primary mice peritoneal macrophage; rat adenoma GH3 cell line (F); J774 cells (G) and human lymphoma Jurkat cell line (H). The values represent the mean  $\pm$  SD of three to five experiments (Cell Permeabilisation Assay) and three experiments (MTT Assay) performed on different days. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with the corresponding negative control.

**Figure 8. Temporizin induces a macroscopic ionic current in the HEK-293 mammalian cell line.** A: Macroscopic ionic currents of a whole-cell patch from HEK-293 cells induced by different Temporizin concentrations. The ionic currents (far right) elicited by Temporizin are indicated by vertical arrows. The holding potential ranged from +100 mv to -100mV. B: The mean I-V relationship for whole-cell configuration. C: Whole-cell recordings obtained from HEK-293 cells in function of the varied Temporizin concentrations. The values represent the means  $\pm$  SD of six experiments performed on different days.

**Figure 9. Temporizin-1 induces a macroscopic ionic current in the HEK-293 mammalian cell line.** A: Macroscopic ionic currents of a whole-cell patch from HEK-293 cells induced by different Temporizin-1 concentrations. The ionic currents (far right) elicited by Temporizin-1 are indicated by vertical arrows. The holding potential ranged from +100 mv to -100mV. B: The mean I-V relationship for whole-cell configuration. C: Whole-cell recordings obtained from HEK-293 cells in function of the varied Temporizin-1 concentrations. The values represent the means  $\pm$  SD of six experiments performed on different days.