

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

doutorado

BC/51601

IB/ 81851

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

**CARACTERIZAÇÃO DE UM PEPTÍDEO
ANTICOCCIDIANO OBTIDO A PARTIR DE
BIBLIOTECAS DE *PHAGE DISPLAY***

Arnaldo da Silva Junior

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
ARNALDO DA SILVA JUNIOR.
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP, para a
Obtenção do título de Doutor em
Genética e Biologia Molecular na
Área de Genética Vegetal e
Melhoramento.

Orientador: Prof. Dr. Adilson Leite


Co-Orientadora: Profa. Dra. Urara Kawazoe

2002

UNIDADE I.B/21351
Nº CHAMADA T/UNICAMP
Si38c
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 51601
PROC 16.837102
C _____ DX _____
PREÇO R\$ 12,00
DATA 15/11/02
Nº CPD _____

CM00176455-1

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Si38c **Silva Junior, Arnaldo**
Caracterização de um peptídeo anticoccidiano obtido a partir de
Bibliotecas de phage display/Arnaldo Silva Junior. --
Campinas, SP: [s.n.], 2002.

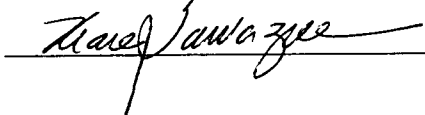
Orientador: Adilson Leite
Co-Orientadora: Urara Kawazoe
Tese(Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas .
Instituto de Biologia.

1. Coccidiose. 2. Peptídeo. 3. Phage display. I. Leite, Adilson. II.
Kawazoe, Urara. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto
de Biologia. IV. Título.

Campinas, 5 de Setembro de 2002.

Banca Examinadora

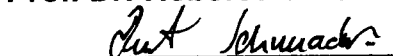
1/ Prof. Dr. Adilson Leite



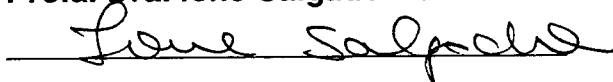
Prof. Dra. Sirlei Daffre



Prof. Dr. Robert Ivan Schumacher



Prof. Dra. Ione Salgado Martins



Prof. Dra. Selma Giorgio



Prof. Dra. Anete Pereira de Souza

Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Adilson Leite, por acreditar em idéias malucas provenientes da mente de um infante acadêmico. Agradeço muito pela oportunidade de trabalhar com uma cabeça tão brilhante. Muito obrigado pela amizade. Não acredito muito em relacionamentos estritamente profissionais pois todo profissional não deixa de ser antes uma pessoa. Muito obrigado por isso! Agradeço também a Profa. Dra. Urara Kawazoe, do departamento de Parasitologia-IB-UNICAMP. Obrigado pelo carinho.

Agradeço muito à FAPESP pelo suporte financeiro dado a mim e ao projeto através da bolsa e da reserva técnica durante a minha pós-graduação. Sem esse estímulo a realização do trabalho seria muito difícil.

Agradeço a FAEP por me agraciar com uma bolsa de monitoria e uma bolsa de iniciação científica durante a graduação, foi uma ajuda fundamental que me permitiu completar o curso de Biologia com custo baixo para meus pais que puderam investir mais na formação de meus irmãos mais novos.

Gostaria de agradecer ao Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética e ao Departamento de Genética da UNICAMP pelas excelentes condições de formação e trabalho.

Também gostaria de agradecer a todas as instituições onde foram realizadas colaborações científicas. Agradeço aos Departamentos de Parasitologia, Microbiologia e Biologia Celular do Instituto de Biologia da

UNICAMP, ao Instituto de Química e Instituto de Ciências Biomédicas da USP, São Paulo-SP, ao Centro Nacional de Ressonância Magnética da UFRJ e ao Instituto Biológico de São Paulo, Campinas-SP. Muito obrigado.

Gostaria de agradecer às Instituições que tornaram possível a minha formação. Primeiramente gostaria de agradecer (assim como defender) à Universidade Pública, no caso mais específico à UNICAMP, pela minha formação como Biólogo Molecular. Como sou proveniente de família de classe média baixa (quase baixa), e dividi meu parco quinhão com mais dois irmãos, teria extrema dificuldade para concluir meu curso em faculdade particular. A UNICAMP, além de pública, possui um dos mais conceituados cursos de Biologia do país, mantendo sempre um compromisso e excelência pela atividade de Pesquisa. Agradeço a todos os meus professores de Graduação que me conduziram durante estes quatro anos.

Agradeço e defendo a iniciativa da Moradia Estudantil da UNICAMP, onde morei durante quatro anos. Como o aluguel em Barão Geraldo é um dos mais elevados do país, também ficaria difícil com minha renda familiar morar em algum lugar que não fosse uma pensão. A Moradia é apertada, mas o calor da convivência com os colegas universitários é inesquecível!

Agora chegou a vez de agradecer às pessoas que foram importantes para a minha chegada neste momento. Agradeço aos meus pais, Arnaldo da Silva e Maria do Socorro Flora da Silva pela minha criação e amor. Parece engraçado, mas a minha existência começou com uma falha da biotecnologia de modo que

agradeço a mudança de planos do destino quando o contraceptivo de minha mãe falhou em 1976. Agradeço aos meus irmãos, Vitor e Anderson, pelo carinho e competição saudável (às vezes nem tanto!). Agradeço à minha esposa, Simone, pelo amor, dedicação e companheirismo. Eu te amo! Agradeço ao meu professor de biologia do segundo grau. O professor Lima foi o primeiro a mexer com o biólogo dentro de mim. Também agradeço ao ex-presidente Fernando Collor por cancelar os exames da escola de cadetes do ar em 1990. Decidir o que querer da vida na adolescência é mesmo muito complicado.

Agradeço a todos os meus amigos e colegas que, por serem tantos, não me arriscaria a citá-los e esquecer o nome de alguém. Valeu a força galera! Obrigado também a todos os companheiros do laboratório. Umbigo na bancada, vivendo de bolsa com um futuro incerto. Mesmo assim essa galera coloca a faca entre os dentes e empurra a bola para a frente. Obrigado e parabéns. Qualquer coisa estamos aí! Um agradecimento especial para meus companheiros da casa F6 da Moradia Estudantil, José Milton Longo e Everton Nogueira Lima por ajudarem no desenvolvimento de um garoto de 17 anos. Agradeço a Profa. Dra. Ione Salgado Martins pela minha iniciação científica na área de Bioquímica Vegetal e Bioenergética. Foi realmente muito importante na minha vida. Agradeço em especial a Profa. Dra. Silvia Gatti pelo apoio irrestrito dado aos alunos durante sua gestão como coordenadora de Graduação da Biologia em 1997. Obrigado pela força.

Agradeço do fundo do coração ao Dr. José Andrés Yunes por me introduzir ao CBMEG em 1994 e por me recolocar no centro em 1997. Ainda vamos fazer

algo juntos, eu creio. Gostaria de agradecer também a todos os colaboradores cujos nomes acompanham o meu nos artigos científicos. Um agradecimento também para aqueles colaboradores com trabalhos em andamento, que são a Profa. Dra. Sirlei Daffre do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, São Paulo-SP, a Dra. Wanda Malavolta do Instituto Biológico de São Paulo, Campinas-SP e o Prof. Dr. Omar Teschke do Instituto de Física da UNICAMP.

Também gostaria de agradecer a Deus. Por mais avançada que esteja a ciência, ainda não me convenci de que esta vai fornecer todas as respostas. A existência é uma maravilha sem tamanho que, por si só, evidencia a existência de Deus. Tenho inclinação a acreditar em um Deus gnóstico, composto pelo conjunto e harmonia de todos os componentes do Universo, desta forma achei conforto para minhas contradições e dúvidas na espiritualidade oriental. Gostaria de citar palavras de Lao Tse sobre este assunto, provenientes do livro do caminho e da virtude, “Tao Te Ching” (texto 25).

Há algo completamente entorpecido anterior à criação do céu e da terra. Quietos e êrmos. Independente e inalterável. Move-se em círculo e não se exaure. Pode-se considerá-lo a Mãe sob o Céu.

Eu não conheço seu nome. Chamo-o de Caminho. Esforçando-me por denominá-lo, chamo-o de Grande. Grande significa Ir. Ir significa Distante. Distante significa Retornar.

O Caminho é grande. O céu é grande. A terra é grande. O Rei-Celeste é grande. Dentro do universo há quatro grandes, e o rei é um deles.

O homem se orienta pela terra. A terra se orienta pelo céu. O céu se orienta pelo Caminho. O Caminho se orienta por sua própria natureza.

Lao Tse (Tradução de Wu Jyh Cherng)

Felicidade é enxergar os dias ensolarados que virão
mesmo durante as piores tempestades.

Arnaldo da Silva Jr

Dedico esta Tese ao meu
orientador e amigo Dr. Adilson Leite.
Votos de vitória sobre qualquer dificuldade.

Índice

Resumo	1
Summary	4
Capítulo 1- Introdução	6
Capítulo 2- Revisão Bibliográfica	9
2.1- O agente causador da coccidiose aviária	9
2.2- Formas de controle da doença (anticoccidianos e vacinas)	12
2.2.1- Medicamentos anticoccidianos	12
2.2.2- Imunidade e Vacinas	13
2.3- “Phage display”: um método alternativo para identificação de peptídeos com atividade anticoccidiana	20
2.4- Peptídeos antimicrobianos: função e distribuição	22
2.5- Composição e classificação dos peptídeos antimicrobianos	24
2.5.1- Peptídeos antimicrobianos com estrutura do tipo α -hélice	25
2.5.2- Peptídeos antimicrobianos com estrutura do tipo folha ou grampo β	26
2.5.3- Peptídeos antimicrobianos de estrutura extendida	27
2.6- Mecanismo e espectro de ação dos peptídeos antimicrobianos	28
Capítulo 3- Objetivo e Justificativa	31
Capítulo 4- Apresentação dos artigos científicos (Anexos 1 e 2)	32

Capítulo 5- Resultados adicionais não publicados	33
5.1- Testes de atividade de PW2 contra fungos fitopatogênicos	33
5.2- Estudo da fluorescência do aminoácido triptofano de PW2	35
na presença de lipossomos	
Capítulo 6- Discussão	38
6.1- Obtenção e caracterização do peptídeo anticoccidiano PW2	38
6.1.1- <i>Seleção de peptídeos com afinidade pela superfície de</i>	38
<i>esporozoítos vivos de <u>Eimeria acervulina</u></i>	
6.1.2- <i>Semelhança de PW2 com peptídeos antimicrobianos ricos</i>	39
<i>em triptofano</i>	
6.1.3- <i>Semelhança de PW2 com domínios ricos em triptofano</i>	41
<i>presentes em proteínas de plantas com atividade antimicrobiana</i>	
6.2- Atividade do peptídeo PW2	42
6.2.1- <i>PW2 permeabiliza a membrana externa de esporozoítos de</i>	42
<i><u>Eimeria acervulina</u> e <u>Eimeria tenella</u></i>	
6.2.2- <i>PW2 provoca danos visíveis em microscopia eletrônica</i>	44
<i>de varredura à superfície de esporozoítos de <u>Eimeria acervulina</u></i>	
6.2.3- <i>PW2 induz vazamento de calceína confinada no interior de</i>	44
<i>esporozoítos de <u>Eimeria acervulina</u> e <u>Eimeria tenella</u></i>	
6.2.4- <i>PW2 inibe a invasão celular de esporozoítos de</i>	45
<i><u>Eimeria acervulina</u> e <u>Eimeria tenella</u></i>	
6.2.5- <i>PW2 não possui atividade antibacteriana, mas apresenta</i>	47
<i>atividade antifúngica</i>	
6.2.6- <i>PW2 não apresenta atividade hemolítica</i>	48
6.3- Análise sobre o possível mecanismo de ação de PW2	49

6.3.1- PW2 apresenta afinidade por lipossomos e micelas membranomiméticas de carga negativa	49
6.3.2- Análise da estrutura tridimensional de PW2 ligado a micelas membranomiméticas de SDS	51
6.3.3- PW2 forma agregados em solução	54
6.3.4- Análise geral sobre a atividade anticoccidiana de PW2	55
6.3.5- A maquinaria motora dos esporozoítos de <i>Eimeria</i> , responsável pelo processo de invasão, pode estar sendo direta ou indiretamente afetada pelo peptídeo PW2?	58
Capítulo 7- Conclusões	65
Capítulo 8- Perspectivas para o futuro	68
Referências Bibliográficas	71 a 89

Anexo 1- Arnaldo da Silva Jr, Urara Kawazoe, Fabio F.T. Freitas, Maria Silvia V. Gatti, Heidi Dolder, Robert Ivan Schumacher, Maria Aparecida Juliano, Márcio José da Silva and Adilson Leite. (2002) *Avian anticoccidial activity of a novel membrane-interactive peptide selected from phage display libraries*. Molecular and Biochemical Parasitology, 120, pp. 53-60.

Anexo 2- Luzineide W. Tinoco, Arnaldo da Silva Jr, Adilson Leite, Ana Paula Valente, Fabio C. L. Almeida. (2002) *NMR Structure of PW2 Bound to SDS Micelles: A Tryptophan-rich Anticoccidial Peptide Selected from Phage Display Libraries*. Journal of Biological Chemistry, em impressão.

Abreviações

SDS- sódio dodecil sulfato

RMN- ressonância magnética nuclear

IGM- imunoglobulina tipo M

IGA- imunoglobulina tipo A

MIC- "minimal inhibitory concentration"

PDB- "potato dextrose broth"

DMPC- 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina

DMPG- 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol

HSBS- "HEPES sucrose buffer solution"

Ph.D.- "phage display"

nsLTPs- "nonspecific lipid transport proteins"

MDBK- "Mardin Darby Bovine Kidney cells"

GFP- "green fluorescent protein"

Resumo

No presente estudo, através do uso de *phage display*, foram selecionados peptídeos com afinidade pela superfície de esporozoítos vivos de *Eimeria acervulina*, protozoário do filo Apicomplexa e agente causador da coccidiose aviária. Após três ciclos de seleção utilizando três diferentes bibliotecas de “phage display” em ensaios independentes, o sequenciamento dos fagos revelou uma forte convergência para motivos contendo dois resíduos de triptofano acompanhados de uma arginina ou lisina (WWR ou WWK). A sequência HPLKQYWWRPSI, proveniente da biblioteca de *phage display* de 12 resíduos, foi a mais freqüente, sendo escolhida, portanto, para estudos mais aprofundados. Este peptídeo foi sintetizado quimicamente e nomeado PW2.

PW2 demonstrou possuir elevada atividade inibitória na invasão celular de esporozoítos de *Eimeria acervulina* e *Eimeria tenella in vitro*. Estudos de citometria de fluxo, vazamento de calceína e microscopia eletrônica de varredura indicaram que o peptídeo age permeabilizando a membrana externa do parasito. Este modo de ação é comum entre diversos peptídeos antimicrobianos naturais já descritos na literatura. PW2 apresentou atividade antifúngica de amplo espectro e baixa atividade contra taquizoítos de *Toxoplasma gondii*. Entretanto, PW2 não demonstrou atividade contra bactérias e epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e *Crithidia fasciculata*. Adicionalmente, PW2 não apresentou atividade hemolítica em ensaios com eritrócitos de mamíferos e aves. PW2 também não demonstrou toxicidade a células cultivadas de rim de galinha.

PW2 possui semelhança em composição com dois peptídeos antimicrobianos catiônicos ricos em triptofano encontrados em grânulos de neutrófilos de mamíferos pertencentes à família das Cateligidinas. Estes peptídeos (indolicidina e tritripticina) são componentes do sistema de defesa imune inespecífico de mamíferos, responsável pelas primeiras etapas na defesa contra patógenos. PW2 também apresenta similaridade com peptídeos antimicrobianos catiônicos ricos em triptofano obtidos a partir de bibliotecas combinatórias artificiais. O duplo triptofano presente em PW2 ainda pode ser encontrado nos domínios indólicos de três proteínas de plantas pertencentes à classe das tioninas (puroindolina-a, puroindolina-b e Ace-AMP1) que apresentam atividade antimicrobiana *in vitro*, estando possivelmente envolvidas na defesa das sementes contra o ataque de patógenos.

Estudos espectroscópicos revelaram que PW2 apresenta afinidade por micelas membranomiméticas de SDS e lipossomos de carga negativa. De acordo com a estrutura de PW2 em solução determinada por RMN, os aminoácidos com maior envolvimento no processo de interação com micelas de SDS são K4, Y6, W7, W8 e R9. A região central da estrutura é composta por W7, P2 e P10, enquanto que as cadeias laterais dos resíduos K4, Y6, W8 e R9 encontram-se voltados para o mesmo lado da superfície da estrutura, compondo o provável domínio de contato entre o peptídeo e as micelas de SDS.

A atividade contra esporozoítos de *Eimeria* associada à ausência de efeitos adversos sobre as células do hospedeiro indicam que PW2 pode ser utilizado como modelo na geração de novas drogas anticoccidianas, sejam peptídeos ou

análogos químicos sintéticos. Devido à sua atividade antifúngica, PW2 também apresenta potencial de aplicação na produção de plantas transgênicas resistentes ao ataque por fungos. A produção de sementes de milho transgênico expressando PW2 pode resultar em eventuais melhorias na qualidade da ração de frango, propiciando um método de controle da coccidiose aviária e incluindo o enriquecimento no aminoácido essencial triptofano.

Summary

In the present work we describe the selection of a novel anticoccidial peptide through the use of the phage display technique by using an alternative method of biopanning by using living *Eimeria acervulina* sporozoites as selection target. After three rounds of selection using three distinct phage display libraries the recovered phage DNA sequencing revealed a strong convergence to peptides bearing a double triptophan followed by a positively charged residue (WWR or WWK). The peptide HPLKQYWWRPSI, obtained from the 12-residue library showed the highest occurrence. This peptide was chemically synthesized and named PW2 for further studies.

PW2 showed a strong *in vitro* inhibitory effect in the invasion of *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* sporozoites. According to flow cytometry, electron scanning microscopy and cell-constrained calcein leakage experiments the peptide acts through permeabilization of the outer membrane of the sporozoites pellicle. Membrane permeabilization has been reported as the mechanism of action of several natural antimicrobial peptides. PW2 also showed broad-spectrum antifungal activity and low activity against the related protozoa *Toxoplasma gondii* but had no effect over bacteria or unrelated protozoa like *Trypanosoma cruzi* or *Crithidia fasciculata*. The peptide showed no toxicity to avian and mammalian erythrocytes or chicken kidney cultured cells.

PW2 presents composition similarities with two cathelin-derived indolic peptides with antimicrobial activity found in neutrophil granules. These peptides (indolicidin and tritrpticin) are components of the innate immune system of mammals being part of the initial steps of defense against infection. PW2 also shows similarities with tryptophan rich cationic peptides with antimicrobial activity obtained from chemical combinatorial libraries. The double tryptophan motif present in PW2 can be also found in the tryptophan-rich domain of three plant thionins (puroindoline-a, puroindoline-b and Ace-AMP1) with antimicrobial activity possibly involved in the defence of seeds against pathogens.

According to spectroscopic studies, PW2 has affinity to SDS membranomimetic micelles and negatively charged liposomes. The solution structure of PW2 bound to SDS micelles was obtained through NMR. Structural calculation showed that W7 is important for the peptide folding, forming the hydrophobic core together with P2 and P10 while K4, Y6, W8 and R9 side chains are in the same surface, possibly facing the micelle interface.

The anticoccidial activity and low toxicity against host cells *in vitro* suggest that PW2 is a candidate model in the generation of new anticoccidial drugs, which may be modified peptides or chemical analogs. Furthermore, the antifungal activity of PW2 may be used in the generation of transgenic plants with resistance against fungal pathogens. The production of transgenic corn seeds expressing PW2 may also represent possible advantages in the production of chicken food like enrichment in tryptophan and anticoccidial activity.

1- Introdução

O frango é uma das principais fontes de proteína do mundo moderno representando aproximadamente 30% de toda a carne consumida atualmente (revisto por Ruff, 1999). O melhoramento genético, bem como melhorias no manejo das aves, têm conseguido resultados fantásticos em termos de tempo de crescimento e eficiência na conversão de alimento em peso vivo. Entretanto, a prática intensiva de produção em larga escala resultou em um aumento do estresse das aves com o concomitante aumento da incidência de doenças intestinais como a Criptosporidiose, a Salmonelose e a Coccidiose. Estas infecções prejudicam a taxa de conversão alimentar das aves causando prejuízos severos ao setor produtivo da indústria avícola (revisto por Yun *et al.* 2000).

A coccidiose aviária representa, atualmente, uma das maiores causas de perdas econômicas na indústria avícola, tanto em frangos de corte como em reprodutoras pesadas. Seus efeitos adversos são: perda de pigmento nas penas, redução de ganho de peso e, em casos mais severos, mortalidade. As galinhas consomem mais ração, engordam mais lentamente e sofrem uma redução no seu peso final (Long, 1987). A taxa de conversão alimentar é tão importante que um aumento de seu valor em 1% (ou seja, as galinhas precisariam comer 10 gramas a menos de ração para engordarem 1 Kg), representaria aos E.U.A. um ganho de 70 milhões de dólares de acordo com a produção anual de 1996 (Ruff & Danforth, 1996).

Estimativas recentes revelam que os Estados Unidos perdem aproximadamente 1,5 bilhões de dólares anualmente devido à coccidiose aviária (revisto por Ruff, 1999 e Yun *et al.*, 2000). De acordo com estimativas de 1994, o tratamento com anticoccidianos representava para os E.U.A., um gasto adicional de mais de 100 milhões de dólares/ano (Danforth *et al.* 1994). Também estima-se que, atualmente, o mercado mundial de vacinas para a coccidiose supera a marca de 300 milhões de dólares (revisto por Dalton & Mulcahy, 2001).

Castro (1994) realizou uma análise baseando-se na estimativa de que o Brasil aloja 185 milhões de frangos de corte por mês com uma mortalidade média de 4% e peso final para abate de 2 Kg. Supondo que 10% deste plantel fosse afetado por coccidiose subclínica, com uma redução de 100 g no peso vivo e um aumento no consumo de ração em 100 g por Kg de frango produzido, teríamos como resultado uma perda anual de 21.312 toneladas de carne mais um consumo adicional de 42.624 toneladas de ração.

As previsões para o futuro da coccidiose aviária no Brasil não são animadoras. Levantamentos revelaram que a incidência da doença no país antes de 1970 era de 35%, diminuiu para menos de 10% na década de 80 (devido ao advento dos medicamentos anticoccidianos) e posteriormente voltou a subir, atingindo uma incidência de 40% em 1994. Estudos sobre o impacto da doença na economia revelaram que 65% das empresas avícolas brasileiras já tiveram problemas com coccidiose clínica e subclínica. Segundo estes estudos, as espécies com maior incidência foram *Eimeria maxima* e *Eimeria acervulina* (Castro, 1994).

Estes dados combinados indicam a importância da busca de métodos alternativos de controle da coccidiose aviária. Os métodos atuais além de dispendiosos não têm sido capazes de erradicar a doença que se encontra em expansão devido, principalmente, à emergência de linhagens de parasitos resistentes aos medicamentos disponíveis no mercado (revisto por Sangster, 2001).

2- Revisão bibliográfica

2.1- O agente causador da coccidiose aviária

O agente causador da coccidiose aviária é um protozoário do Filo Apicomplexa, que é caracterizado por um complexo de organelas na região apical, sendo este o responsável pela capacidade destes parasitos invadirem as células de seus hospedeiros (Dubremetz, 1993). A coccidiose em galinhas é causada por sete espécies descritas dentro do gênero *Eimeria*, que pertence ao grupo dos Coccidia, junto com outros parasitos importantes de animais e seres humanos (*Toxoplasma gondii*, *Isospora* spp., *Cryptosporidium* spp., *Sarcocystis* spp., *Plasmodium* spp., entre outros). Estas espécies apresentam uma grande especificidade ao hospedeiro, o que indica provável coevolução do parasito. O local de infecção no intestino também é preferencial e varia de acordo com as espécies. *Eimeria acervulina* e *Eimeria praecox* ocupam a porção anterior do intestino, *Eimeria maxima* ocupa as porções anterior e média, *Eimeria brunetti* e *Eimeria mitis* a porção posterior, *Eimeria necatrix* a porção posterior e o ceco e *Eimeria tenella* o ceco (Long, 1987; Kawazoe, 1994).

O ciclo de vida completo de parasitos do gênero *Eimeira* causadores da coccidiose aviária encontra-se esquematizado na **Figura 1**. A infecção ocorre via oral, através de oocistos esporulados ingeridos pelas aves, que durante seu processo de digestão, estimulam a excitação. Cada oocisto esporulado possui em seu interior quatro esporocistos que por sua vez possuem dois esporozoítos

em seu interior. A parede dos oocistos é rompida pela ação mecânica da moela liberando os esporocistos. Os esporocistos contêm uma abertura denominada corpo de Stieda, que é degradado pela tripsina. A motilidade do parasito é estimulada por sais biliares e pela temperatura interna da galinha. Sob estes estímulos os esporozoítos completam a excitação e penetram ativamente nas células do epitélio intestinal (Dubremetz, 1993). Dentro da célula alvo do hospedeiro, em uma estrutura denominada vacúolo parasitóforo, o esporozoíto torna-se arredondado transformando-se num trofozoíto ou meronte uninucleado. Após sucessivas divisões mitóticas, em um processo denominado merogonia (ou esquizogonia), os diversos núcleos individualizam-se em células alongadas, similares aos esporozoítos, denominados merozoítos. Os merozoítos são liberados e reinfectam o hospedeiro penetrando em outras células epiteliais intestinais, assim como os esporozoítos, amplificando muitas vezes a infecção. Os merozoítos podem reiniciar um novo processo de merogonia, por um número variável de vezes, gerando uma ou mais gerações de merontes.

Após a última geração de merogonia os merozoítos liberados penetram em novas células e iniciam a fase denominada gamogonia (ou gametogonia) que é a fase sexuada do ciclo de vida dos parasitos. Os merozoítos diferenciam-se em microgamontes (gamontes masculinos) e macrogamontes (gamontes femininos). Os microgamontes sofrem sucessivas divisões nucleares dando origem a muitos microgametas flagelados enquanto os macrogamontes apenas aumentam em tamanho, sem passar por divisões nucleares, dando origem aos macrogametas.

Os microgametas são liberados e procuram ativamente os macrogametas através de quimiotaxia. Os macrogametas fertilizados dão origem aos zigotos que elaboram uma parede cística tornando-se finalmente oocistos que serão liberados nas fezes aonde irão esporular para recomençar o ciclo de vida do parasito.

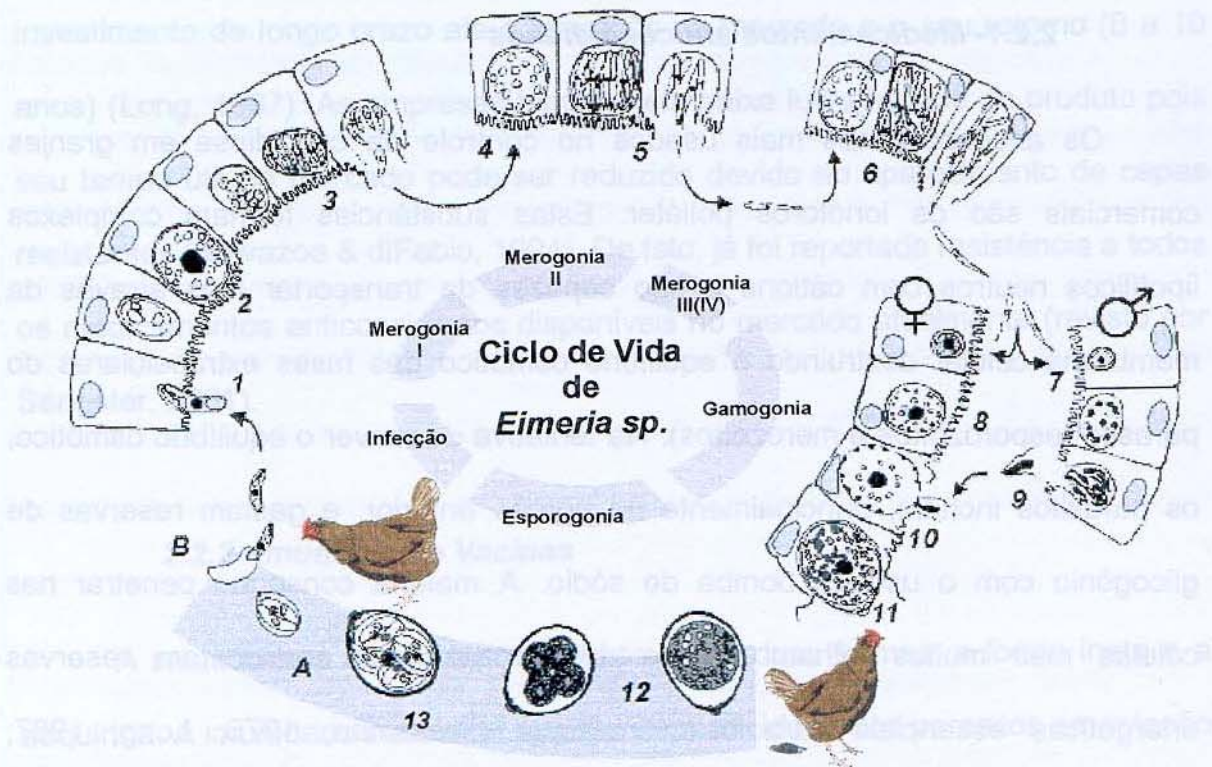


Figura 1: Ciclo de vida de *Eimeria* spp. A- Ciclo exógeno, B- Ciclo endógeno. 1- penetração do esporozoítio; 2- meronte imaturo de 1ª geração; 3- meronte maduro de 1ª geração; 4- liberação e penetração de merozoítos de 1ª geração; 5- meronte maduro de 2ª geração; 6- meronte maduro de 3ª geração; 7- microgamonte; 8- macrogamonte; 9- microgameta flagelado; 10- fertilização do macrogameta; 11- zigoto; 12- oocisto imaturo; 13- oocisto esporulado.

2.2- Formas de controle da doença (anticoccidianos e vacinas)

Duas formas de controle da coccidiose aviária são utilizadas em larga escala: o tratamento com anticoccidianos sintéticos e ionóforos (revisto por Jeffers, 1989), e o uso de vacinas vivas virulentas e atenuadas (revisto por Shirley & Long, 1990).

2.2.1- Medicamentos anticoccidianos

Os anticoccidianos mais usados no controle da coccidiose em granjas comerciais são os ionóforos poliéter. Estas substâncias formam complexos lipofílicos neutros com cátions e são capazes de transportar íons através da membrana celular destruindo o equilíbrio osmótico das fases extracelulares do parasito (esporozoítos e merozoítos). Na tentativa de reaver o equilíbrio osmótico, os parasitos incham, principalmente na porção anterior, e gastam reservas de glicogênio com o uso da bomba de sódio. A maioria consegue penetrar nas células mas muitos falham em se desenvolver pois consumiram reservas energéticas essenciais para esta finalidade (Pressman, 1976; Long, 1987; Stallbaumer & Daisy, 1988). Além dos ionóforos são utilizados Sulfonamidas, Quinolonas (ex: Decoquinato), Piridonas (ex: Clopidol), mímicos de Tiamina (ex: Amprolium, Halofuginona) e Guanidina (Diclazuril, Toltazuril, Nicarbazina) (revisto por Sangster, 2001).

Os anticoccidianos, entretanto, não são totalmente eficazes, de modo que os parasitos mais resistentes sobreviventes completam o ciclo de vida. Desta maneira aparecem novos isolados resistentes conforme a seleção imposta pela

administração extensiva destes compostos. Os anticoccidianos possuem uma vida útil limitada no mercado, devido, principalmente, ao sucessivo aparecimento de cepas resistentes aos seus mecanismos de ação. O combate ao parasito requer lançamento constante de novos compostos anticoccidianos. Além disso, o número de empresas interessadas têm diminuído devido aos altos custos para o desenvolvimento de novos produtos (15 a 20 milhões de dólares nos EUA) e ao investimento de longo prazo até a liberação no mercado e o seu retorno (8 a 10 anos) (Long, 1987). As empresas temem pela baixa lucratividade do produto pois seu tempo útil no mercado pode ser reduzido devido ao aparecimento de cepas resistentes (Kawazoe & diFabio, 1994). De fato, já foi reportada resistência a todos os medicamentos anticoccidianos disponíveis no mercado atualmente (revisto por Sangster, 2001).

2.2.2- Imunidade e Vacinas

A imunidade à coccidiose manifesta-se de duas formas: a forma inata e a adquirida. A imunidade inata está ligada à especificidade dos parasitos em relação ao hospedeiro. Os parasitos que infectam determinada espécie coevoluíram com a mesma, criando mecanismos de evasão para as barreiras iniciais de defesa do hospedeiro. Em outras palavras, espécies de *Eimeria* que infectam coelhos, por exemplo, não podem infectar galinhas. Por outro lado, a imunidade adquirida é obtida após uma infecção prévia do hospedeiro e persiste por algumas semanas, sendo espécie específica (Long, 1987) ou adquirida da mãe, persistindo nos animais por uma ou duas semanas após o nascimento (Smith *et al.*, 1994).

As diferentes espécies de *Eimeria* são imunogênicas, porém a proteção adquirida não é absoluta. Em geral, a imunização minimiza a mortalidade ou os efeitos clínicos severos, mas não é capaz de evitar totalmente a reinfecção (revisto por Augustine, 2001). Deste modo, a imunização apenas reduz o impacto da doença no hospedeiro, o que diminui, mas não anula as perdas econômicas (Long, 1987).

A infecção de galinhas com um número reduzido de oocistos por duas ou três vezes consecutivas (em geral com um intervalo de sete dias entre os inóculos) é capaz de produzir proteção imune após a terceira ou quarta semana. Todas as vacinas disponíveis no mercado atualmente baseiam-se neste princípio. As vacinas podem ser divididas em três grupos: vacinas vivas compostas por linhagens virulentas, vacinas vivas compostas por linhagens atenuadas, e vacinas vivas compostas por linhagens resistentes à ação de ionóforos (revisto por Vermeulen *et al.*, 2001).

Para que seja garantida sua eficácia, a vacina viva deve conter oocistos de todas as espécies e/ou cepas que ocorrem com frequência em galinhas de uma determinada região, pois galinhas imunes à uma espécie de *Eimeria* são suscetíveis a outras, e galinhas imunes à determinada cepa de *Eimeira* podem ser suscetíveis a outras cepas da mesma espécie (Long, 1987). Um problema encontrado neste tipo de vacina, composta por oocistos esporulados, é o fato de existir um contínuo contágio nos galpões das granjas propagado pelos próprios criadores, através da disseminação dos oocistos no ambiente. O desenvolvimento de vacinas a partir de linhagens atenuadas ou precoces (Shirley & Bedrník, 1997)

reduziu os problemas de ocorrência de coccidiose após administração de vacinas. As linhagens atenuadas são obtidas através de seleção repetitiva de oocistos precoces que passaram por um número menor de ciclos de merogonia. Uma redução no número de ciclos de merogonia de determinada linhagem significa uma infecção intestinal menos abrangente e, portanto, de menor impacto. Entretanto, na ausência de seleção imposta pelo homem, estas linhagens podem sofrer mutações reversas ou recombinação genética com linhagens selvagens restaurando assim a sua virulência (revisto por Vermeulen *et al.*, 2001).

A vacina composta por linhagens com resistência a ionóforos foi recentemente introduzida no mercado. A vantagem deste tipo de vacina é a possibilidade de administração de ionóforos durante as 3 ou 4 primeiras semanas de tratamento. Neste período as galinhas ainda não possuem imunidade completa, estando suscetíveis à infecção por linhagens selvagens de *Eimeria* (revisto por Vermeulen *et al.*, 2001).

As vacinas são recomendadas no controle preventivo, especialmente em galinhas poedeiras, pois os anticoccidianos acumulam-se nos fluidos corporais dos animais contaminando, conseqüentemente, os ovos produzidos, inviabilizando seu consumo e comercialização. Na ausência de reinfecção, a duração da imunidade é baixa, em torno de 4 a 6 semanas variando de acordo com a espécie (Long, 1987). A imunização é mais eficiente quando as pequenas doses de oocistos são administradas por um longo período de tempo, em geral superior a 1 mês (Long, 1987; Joyner & Norton, 1976).

Os estágios mais imunogênicos do parasito são os intracelulares, e a imunidade adquirida é do tipo celular, existindo pouca ou nenhuma participação de imunidade humoral (Danforth *et al.*, 1994). Este fato foi confirmado através do tratamento de galinhas imunizadas com ciclosporina A (inibidor da imunidade celular), as quais tornaram-se altamente suscetíveis à doença (Lillehoj, 1987; Danforth *et al.*, 1994).

A imunização tem pouca ou nenhuma influência sobre as etapas extracelulares devido a vários fatores. Em experimentos com *Eimeria tenella*, a imunização inibiu 50% da penetração dos esporozoítos enquanto com *Eimeria acervulina* a taxa de penetração aumentou 11% após a imunização (revisto por Lillehoj & Trout, 1993). A baixa eficiência deve-se, principalmente, à rapidez com que o parasito excista e invade a célula, protegendo-se assim do sistema imune do hospedeiro, não permitindo uma exposição adequada de antígenos específicos das formas invasivas (Dubremetz, 1993).

No entanto, a incubação de esporozoítos e merozoítos com imunoglobulinas presentes no epitélio intestinal das galinhas (IgM e IgA) resulta em uma redução da taxa de penetração dos mesmos (Lillehoj, 1993). Da mesma forma, o anti-soro específico e os anticorpos monoclonais produzidos contra espécies de *Eimeria* são capazes de inibir a penetração e o desenvolvimento dos esporozoítos. Os anticorpos monoclonais direcionados contra as proteínas de superfície dos parasitos são os mais efetivos na prevenção da invasão. A maioria destes anticorpos monoclonais reconhece proteínas com peso molecular aparente

em torno de 23-24 kDa em análise de *Western Blot* (Danforth *et al.*, 1994; Sasai *et al.*, 1996).

Estes dados estimularam diversas tentativas de se criar uma vacina composta por antígenos do parasito. Foram descritas recentemente as características antigênicas de diferentes organelas de *Eimeria tenella* separadas por fracionamento em gradiente de sacarose. Os micronemas, as roptrias e as frações da membrana foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida. Realizou-se em seguida uma análise através de *Western Blot* com anti-soro de coelhos imunizados com esporozoítos e merozoítos. O anti-soro contra esporozoítos reconheceu 8 antígenos de membrana dos quais 7 também foram reconhecidos pelo anti-soro contra merozoítos (Kawazoe *et al.*, 1992). Antígenos obtidos a partir de extratos de corpos refráteis de esporozoítos de *Eimeria tenella* também foram capazes de induzir proteção parcial contra infecção oral (Karkhanis *et al.*, 1991). A análise cromatográfica destes extratos revelou que os antígenos responsáveis pela proteção estavam numa única fração, denominada fração V, compreendida por proteínas de 20 a 30 kDa. A análise posterior identificou um polipeptídeo de 26 kDa como responsável pela indução de proteção.

Muitos esforços foram realizados na tentativa do uso eficaz de produzir antígenos recombinantes originados de bibliotecas de cDNA de *Eimeria*. A partir de um clone proveniente de bibliotecas de cDNA de merozoítos de *Eimeria tenella*, foi obtido um antígeno recombinante capaz de induzir proteção cruzada contra quatro diferentes espécies de *Eimeria* (Crane *et al.* 1991). Este antígeno também estava presente na mesma fração V descrita por Karkhanis *et al.* (1991). Frangos

de corte com 2 a 4 dias de idade foram imunizados, via intramuscular, com uma injeção deste antígeno purificado (0,1 a 10 µg por ave) e, após 3 semanas, foram desafiados oralmente com *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix* ou *E. tenella*. Entretanto, a proteção não foi completa e os escores de lesão ainda foram altos, impossibilitando a competição com a quimioterapia usada atualmente. Bhogal *et al.* (1992) também utilizaram um antígeno recombinante da fração V descrita por Crane *et al.* (1991) denominado antígeno 3262, o qual foi capaz de induzir proteção parcial em desafios contra *E. tenella* e *E. acervulina*. Este antígeno foi identificado em bibliotecas de cDNA de oocistos esporulados utilizando-se um anticorpo monoclonal capaz de reconhecer antígenos da mesma fração V dos corpos refráteis de *E. tenella*. Este antígeno apresenta reação cruzada com todas as espécies de *Eimeria* de peru e galinha. Este mesmo anticorpo monoclonal foi capaz de inibir o desenvolvimento de esquizontes de *E. tenella in vitro*, em até 100% (Danforth & Augustine, 1989).

Danforth *et al.* (1989) expressaram os antígenos recombinantes 3262 ou 3264 em *Escherichia coli*. Estas bactérias (vivas ou mortas por calor) foram injetadas subcutaneamente em aves de 2 dias (10, 25 ou 100 µg por ave) e foram capazes de induzir proteção parcial em desafio contra *E. tenella* ou *E. acervulina*, 21-22 dias após a imunização.

Foram realizados também estudos similares com antígenos de merozoítos (Jenkins & Dame, 1987; Jenkins *et al.*, 1988; Jenkins *et al.*, 1990; Ko *et al.*, 1990; Castle *et al.*, 1991) mas apenas a imunização parcial foi obtida.

Altos níveis de proteção contra *Eimeria acervulina* foram obtidos em um estudo de imunização oral com *E. coli* recombinante expressando um antígeno presente na fração V descrita por Crane *et al.* (1991) fusionado à β -galactosidase (Jenkins *et al.*, 1991). Foram inoculadas 10^9 bactérias em frangos de 7 dias de idade. Uma redução deste número em 10 vezes resultou em perda da proteção, indicando que a dose de bactérias era crítica para uma imunização eficiente. Portanto, o uso desta técnica em larga escala torna-se inviável pela necessidade de se produzir uma quantidade muito grande de bactérias recombinantes.

Estudos com antígenos de gametócitos foram realizados com *Eimeria maxima* visando uma redução no número de oocistos liberados nas fezes (Mencher *et al.*, 1989 & Wallach *et al.*, 1989). Três antígenos imunodominantes descritos nestes estudos foram utilizados por Wallach *et al.*, (1992) para imunizar galinhas contra infecção com *E. maxima*, atingindo uma redução de 83% na produção de oocistos em relação aos controles.

Muitos antígenos de *Eimeria spp.* foram caracterizados e muitas investigações têm sido realizadas nesta área. Entretanto, poucos antígenos foram produzidos em quantidade suficiente para ensaios de imunização. Resultados obtidos em desafios indicaram que os métodos utilizados nesta linha de pesquisa foram capazes apenas de gerar proteção parcial contra os parasitos (Danforth *et al.*, 1994), o que indica que ainda há espaço para o estudo de novas estratégias no combate à coccidiose aviária.

2.3- “Phage display”: um método alternativo para identificação de peptídeos com atividade anticoccidiana

A descoberta de novas drogas envolve, na maioria dos casos, a busca de substâncias ativas dentre milhares de componentes provenientes de misturas complexas utilizando-se métodos de seleção *in vitro*. Os candidatos selecionados nos testes *in vitro* são então submetidos a testes *in vivo* onde espera-se que produzam a atividade desejada para a nova droga, com o mínimo de efeitos colaterais (revisto por Benhar, 2001).

Atualmente existem métodos artificiais capazes de gerar um grande número de moléculas distintas para depois selecionar dentre elas os melhores candidatos com relação à atividade desejada para novos compostos. Estas tecnologias, em sua maioria, envolvem a produção e apresentação de grandes coleções de peptídeos ou proteínas que são selecionados por afinidade e atividade em relação a um ligante específico. O princípio baseia-se na geração de uma biblioteca envolvendo um conjunto de variantes que envolvam todas as possíveis combinações dos peptídeos ou proteínas de interesse. Dentre estas metodologias, encontramos as bibliotecas combinatórias de peptídeos sintéticos (revisto por Al-Obeidi *et al.*, 1998 e Lohner & Blondelle, 2000), e a expressão na superfície de bactérias (*bacterial surface display*) ou bacteriófagos (*phage display*) (revisto por Benhar, 2001).

O processo de seleção de peptídeos com determinadas propriedades de ligação (*biopanning*) através da expressão no capsídio do bacteriófago filamentosos

M13 foi desenvolvido pelos pesquisadores Stephen F. Parmley e George P. Smith (1988). Neste estudo, que deu origem à técnica de *phage display*, foram utilizados anticorpos imobilizados em coluna para selecionar e recuperar fagos que expressavam um determinante antigênico dentro de uma população excedente 10^9 vezes maior de partículas selvagens que não continham o inserto. Posteriormente, a técnica foi aprimorada e foram criadas as bibliotecas de *phage display* com insertos aleatórios (Scott & Smith, 1990; Cwirla *et al.*, 1990). Nestas bibliotecas a inserção de pequenas sequências aleatórias de aminoácidos na extremidade de proteínas do capsídio é capaz de gerar uma “biblioteca de epítomos”. Esta biblioteca engloba um número suficiente de variantes para que seja possível a rápida seleção de peptídeos com certas propriedades de ligação. O processo de seleção não afeta a infectividade das partículas virais, capazes de suportar grandes variações de pH e soluções tamponantes. A identidade dos peptídeos selecionados é revelada através de propagação e sequenciamento do DNA do bacteriófago (Scott & Smith, 1990; Cwirla *et al.*, 1990).

As bibliotecas de *phage display* com uso mais difundido são as baseadas no fago filamentoso M13. No entanto, também foram desenvolvidos sistemas de expressão em cabeças e caudas do fago λ , assim como nos capsídeos dos vírus T7, T4, P4 e MS2. Dentre as sequências já expressas em bibliotecas de *phage display* encontramos pequenos peptídeos, anticorpos ou fragmentos de anticorpos, citocinas, receptores ou domínios isolados de receptores, enzimas, substratos/inibidores de enzimas e proteínas de ligação ao DNA (revisto por Benhar, 2001).

Na maioria das bibliotecas de *phage display* em bacteriófagos M13, a fusão do inserto ocorre na extremidade N-terminal do gene III (que codifica uma pequena proteína do capsídio, pIII). Entretanto, também foram desenvolvidos sistemas onde o inserto encontra-se incorporado às extremidades de pIV, pVI e pVIII (revisto por Benhar, 2001). Durante a formação das partículas virais a proteína quimérica é exposta na superfície dos capsídios, ocasionando a exposição (*display*) do inserto. Estes bacteriófagos podem ser selecionados dentro de uma grande população de vírus por afinidade protéica entre a sequência de aminoácidos exposta no capsídio do virion e uma determinada proteína alvo.

A seleção repetida em ciclos consecutivos promove uma competição entre as partículas virais pela maior especificidade/afinidade pelo alvo. Este método torna possível, inclusive, a seleção de peptídeos com afinidades e/ou atividades maiores que os ligantes naturais de receptores, enzimas ou anticorpos (Doorbar & Winter, 1994; Koivunem *et al.*, 1993).

2.4- Peptídeos antimicrobianos: função e distribuição

A emergência de micróbios resistentes aos antibióticos convencionais gerou um crescente interesse no estudo de peptídeos naturais com atividade antibiótica. Tais peptídeos, denominados peptídeos antimicrobianos, participam do sistema inato de defesa de animais e plantas. Atualmente, existem mais de 500 peptídeos antimicrobianos isolados e estudados. A produção de peptídeos antimicrobianos faz parte dos mecanismos de defesa do hospedeiro durante as etapas iniciais de infecção e sua importância na proteção contra patógenos foi reconhecida apenas

na última década (revisto por Hancock & Lehrer, 1998, Hancock & Scott, 2000 e Zasloff, 2002).

Nos animais superiores, os sistemas de defesa imunológica do tipo celular e do tipo humoral não são acionados de forma rápida o suficiente para evitar a exposição inicial do organismo aos agentes patogênicos. Os locais onde o primeiro encontro com micróbios ocorre com mais frequência são as superfícies epiteliais (pele, olhos, vias aéreas, trato digestivo, vias urinárias e reprodutivas). Em mamíferos, por exemplo, estas superfícies secretam uma diversidade de peptídeos antimicrobianos, chamados defensinas, que formam uma barreira protetora contra infecção. As células fagocitárias também contêm em seu citoplasma diversos grânulos de armazenamento repletos de peptídeos antimicrobianos e enzimas digestivas. Estes grânulos esvaziam seu conteúdo em vacúolos fagocitários gerando altas concentrações de enzimas e peptídeos microbicidas, enquanto alguns tipos de grânulos secretam seu conteúdo de peptídeos para o fluido extracelular onde matam ou impedem o crescimento de micróbios (Ganz & Lehrer, 2001).

O epitélio dos invertebrados, especialmente o trato digestivo dos insetos, secreta peptídeos antimicrobianos que são importantes na defesa contra infecção por patógenos. Os artrópodes também possuem peptídeos antimicrobianos que podem ser secretados e dissolvidos na hemolinfa após uma infecção, assim como outros peptídeos produzidos constitutivamente e armazenados em grânulos presentes no interior dos hemócitos. Os hemócitos podem secretar na linfa os peptídeos armazenados em seu interior em resposta a uma infecção ou utilizá-los

internamente para matar micróbios fagocitados. Nas plantas, os peptídeos antimicrobianos estão presentes em diversas estruturas, especialmente nas sementes que são vulneráveis durante o período de germinação (Schröder, 1999; Ganz & Lehrer, 2001).

Diversos peptídeos antimicrobianos (isolados a partir de fontes naturais ou mesmo provenientes de bibliotecas combinatórias sintéticas) possuem atividade contra protozoários parasitas como *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* e *Leishmania amazonensis* (Jaynes *et al.*, 1988; Arrowood *et al.*, 1991; Aley *et al.*, 1994; Barry *et al.*, 1995, Silva Jr. *et al.*, 2000). Também foi demonstrado que análogos químicos sintéticos de peptídeos antimicrobianos naturais (Peptidyl-MIMs, Demeter Biotechnologies, Ltd.) são capazes de induzir efeito protetor parcial contra infecções por *Eimeria* ssp., reduzindo os escores de lesão das galinhas tratadas (Martin *et al.*, 1999).

2.5- Composição e classificação dos peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos naturais, em geral, possuem menos de 100 resíduos de aminoácidos, são codificados por um único gene e, consequentemente, sintetizados por ribossomos. Podem ser expressos tanto na forma ativa quanto ligados a precursores. Tal definição os distingue da maioria dos peptídeos com atividade antibiótica produzidos por bactérias e fungos, que são sintetizados por rotas metabólicas distintas e possuem, em sua maioria, resíduos exóticos (revisto por Hancock & Scott, 2000).

A grande maioria dos peptídeos antimicrobianos possui de 12 a 45 aminoácidos, dentre os quais aproximadamente 50% são hidrofóbicos e, em geral, apresentam estrutura tridimensional anfipática. São catiônicos devido ao excesso de arginina, lisina e histidina em relação aos aminoácidos de carga negativa, com uma carga total variando entre +2 e +7 (revisto por Hancock & Diamond, 2000). Apesar da grande diversidade, a maioria dos peptídeos antimicrobianos está distribuída em basicamente três classes principais de acordo com suas estruturas tridimensionais: 1- α -hélices; 2- folhas e grampos β ; 3- estruturas extendidas (com frequência são ricos em um determinado aminoácido) (revisto por Hancock & Lehrer, 1998 e Hancock & Diamond, 2000).

2.5.1- Peptídeos antimicrobianos com estrutura do tipo α -hélice

Estes peptídeos apresentam exclusivamente estrutura em α -hélice, sendo que esta conformação ocorre especialmente na presença de biomembranas aniônicas e solventes indutores de estruturação secundária como o trifluoroetanol. Os exemplos mais conhecidos destes peptídeos com pronunciada (mas não exclusiva) atividade antibacteriana são: as magaininas (peptídeos de 23 resíduos encontrados na pele de anfíbios), as cecropinas (possuem em torno de 33 resíduos sendo encontradas principalmente na hemolinfa de insetos) e as catelicidinas do tipo α -hélice (família de peptídeos de 23 a 38 resíduos encontrados em células brancas de mamíferos). Encontram-se armazenados em grânulos, ligados a um precursor N-terminal conservado (Catelina), que possui

aproximadamente 100 resíduos (revisto por Hancock & Lehrer, 1998 e Ganz & Lehrer, 2001).

2.5.2- Peptídeos antimicrobianos com estrutura do tipo folha ou grampo β

Peptídeos antimicrobianos com estrutura do tipo folha ou grampo β são os mais comuns na natureza sendo produzidos em animais e plantas. Esta classe é composta por peptídeos com estrutura exclusiva do tipo folha ou grampo β (por exemplo: α -defensinas, β -defensinas, protegrinas, taquilepsinas, polifemusinas) e por peptídeos de estrutura híbrida, que possuem domínios do tipo α -hélice fundidos a domínios do tipo folha ou grampo β (por exemplo: γ tioninas, defensinas de insetos, drosomicina). Os peptídeos desta classe apresentam sua estrutura estabilizada por 2 a 4 pontes dissulfeto intramoleculares (revisto por Hancock & Lehrer, 1998 e Ganz & Lehrer, 2001).

As α -defensinas e β -defensinas são produzidas em neutrófilos e no epitélio de vertebrados. Possuem de 29 a 40 resíduos com estrutura estabilizada por três pontes dissulfeto conservadas. São efetivas contra bactérias, fungos e vírus envelopados (revisto por Hancock & Lehrer, 1998 e Ganz & Lehrer, 2001).

As protegrinas (encontradas em neutrófilos de porco) e taquilepsinas (encontradas em hemócitos de *Limulus*) possuem de 16 a 18 resíduos (2 KDa). Estas moléculas adotam estrutura do tipo folha β antiparalela estabilizada por

duas pontes dissulfeto. São ativos contra bactérias, fungos e vírus envelopados (revisto por Hancock & Lehrer, 1998 e Ganz & Lehrer, 2001).

As α -, β - e γ -tioninas são peptídeos de 45 a 54 resíduos (aproximadamente 5 KDa) produzidos em plantas. Possuem estrutura compacta em forma de "L" onde o braço longo é composto de duas α -hélices unidas por duas pontes dissulfeto e o braço curto composto por três folhas β antiparalelas unidas por duas pontes dissulfeto. O peptídeo antifúngico drosomicina, encontrado na hemolinfa da mosca da fruta *D. melanogaster*, possui 44 resíduos e 4 pontes dissulfeto, apresentando estrutura tridimensional similar às γ -tioninas (revisto por Hancock & Lehrer, 1998 e Ganz & Lehrer, 2001).

2.5.3- Peptídeos antimicrobianos de estrutura estendida

Os principais representantes desta classe de peptídeos são os peptídeos ricos em prolina encontrados em leucócitos de mamíferos, hemócitos de invertebrados marinhos e na linfa de insetos, com tamanho variando de 15 a 39 resíduos. A prolina corresponde a aproximadamente 25% da composição de resíduos nestes peptídeos, ocorrendo com frequência associada em dubletes ou tripletes acompanhados de lisina ou arginina (revisto por Hancock & Lehrer, 1998, Bulet *et al.*, 1999 e Ganz & Lehrer, 2001).

A família de peptídeos ricos em glicina também pertence a esta categoria. Estes peptídeos variam em tamanho de 8 a 30 kDa tendo sido isolados a partir da hemolinfa de diversos insetos (revisto por Bulet *et al.*, 1999).

Nesta categoria também são encontrados peptídeos ricos em resíduos de triptofano. Os peptídeos indolicidina e tritripticina, isolados a partir de grânulos de neutrófilos bovinos, pertencem à família das Catelicidinas (Selsted *et al.*, 1992; Lawyer *et al.*, 1996).

2.6- Mecanismo e espectro de ação dos peptídeos antimicrobianos

Apesar das diferenças, os modos de ação dos diversos peptídeos antimicrobianos envolvem, em geral, associação com os lipídios da membrana plasmática microbiana provocando aumento de sua permeabilidade. Em um primeiro momento ocorre uma atração eletrostática entre as moléculas de peptídeo (que possuem carga positiva) e lipídios aniônicos presentes na membrana. Em seguida, a estrutura anfipática dos peptídeos antimicrobianos desempenha seu papel, promovendo a interação dos peptídeos antimicrobianos com a interface hidrofílica/hidrofóbica presente na superfície das biomembranas (revisto por Maget-Dana, 1999). Os diversos mecanismos propostos para o aumento na permeabilidade de biomembranas devido à interação com peptídeos antimicrobianos foram revistos pelos autores Schreier *et al.*, (2000); Ladokhin & White, (2001); Lohner, (2001); Zasloff, (2002). Estes mecanismos podem ser resumidos em três modelos:

1- Formação de poros organizados compostos por múltiplas unidades de peptídeo organizadas em forma de um barril (*barrel stave model*) ou toróide (*wormhole model*) que atravessa a bicamada lipídica.

2- Os peptídeos comportam-se como detergentes, provocando alterações estruturais na membrana, deslocando lipídios e causando a formação de poros temporários ou mesmo lisando completamente a membrana (*carpet like model*).

3- A interação dos peptídeos com a superfície das biomembranas provoca distúrbios físico-químicos. O acúmulo de moléculas de peptídeo (muitas vezes envolvendo a formação de agregados) ocasiona flutuações e instabilidades estruturais locais na bicamada lipídica que resultam na formação de poros transientes.

Existem duas hipóteses para explicar como a permeabilização da membrana afeta a viabilidade dos micróbios. Uma baseia-se na perda de energia provocada pelo desequilíbrio e consequente destruição do potencial eletroquímico devido à formação de poros. A outra hipótese seria de que o peptídeo, após danificar a membrana, pode atravessá-la e interferir com funções intracelulares, através de interação com macromoléculas como proteínas e ácidos nucleicos. Em alguns casos ainda, foi demonstrada a ligação do peptídeo antimicrobiano com receptores de membrana (revisto por Andreu & Rivas, 1999, Wu *et al.*, 1999 e Ganz & Lehrer, 2001). Entretanto, ainda existe muita discussão sobre o mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos.

Apesar das discordâncias sobre o modo de ação dos peptídeos antimicrobianos, existe um consenso de que, na grande maioria dos casos, a membrana está diretamente envolvida. Os peptídeos antimicrobianos são ativos contra alvos que possuem membrana plasmática, como bactérias, fungos,

protozoários, células tumorais e vírus envelopados (gripe e HIV, por exemplo) (revisto por Hancock & Diamond, 2000).

O efeito generalizado destes peptídeos sobre a membrana dificulta o desenvolvimento de resistência por parte dos patógenos, tendo em vista a improbabilidade da ocorrência de mutações capazes de produzir grandes alterações no componente lipídico da membrana dos micróbios. Como a composição lipídica das biomembranas é muito similar entre os seres vivos, os peptídeos antimicrobianos possuem, em geral, amplo espectro de ação. Entretanto, esta ação inespecífica torna grande parte destes peptídeos tóxicos às próprias células do hospedeiro, o que dificulta seu uso clínico (revisto por Andreu & Rivas, 1999 e Zasloff, 2002).

3- Objetivo e justificativa

O uso de peptídeos ativos no combate de infecções por agentes patogênicos é comum na natureza. A seleção de peptídeos com atividade anticoccidiana a partir de bibliotecas de peptídeos aleatórios pode ser uma alternativa interessante na busca de novos métodos de controle da coccidiose aviária. A grande variabilidade dos peptídeos apresentados nestas bibliotecas, aliada à plasticidade dos métodos de seleção, permite a busca de novos compostos que apresentam outras características além da atividade anticoccidiana, como especificidade de ação e baixa toxicidade.

Levando-se em conta o fato da invasão celular de *Eimeria* ser um processo ativo que envolve reconhecimento e adesão na célula hospedeira (Dubremetz, 1993; revisto por Augustine, 2001), a técnica de *phage display* foi utilizada no presente trabalho com o intuito de selecionar peptídeos com alta afinidade por alvos na superfície das formas invasivas do parasito *Eimeria acervulina* (esporozoítos). O principal objetivo foi a identificação de peptídeos com eventual atividade inibitória no processo de invasão celular de esporozoítos e merozoítos. Tais peptídeos poderiam agir inibindo a função de proteínas envolvidas no processo de invasão, ou reduzindo a viabilidade das formas invasivas dos parasitos. Posteriormente, os peptídeos poderiam ser testados como candidatos a novos compostos anticoccidianos ou mesmo utilizados como modelos estruturais para o desenho de análogos químicos sintéticos.

4- Apresentação dos artigos científicos

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento do projeto de Tese resultaram na publicação de dois artigos científicos. O método utilizado, assim como os resultados obtidos encontram-se descritos nos artigos científicos em anexo. O primeiro artigo, intitulado "Avian anticoccidial activity of a novel tryptophan-rich membrane-interactive peptide selected from phage display libraries", descreve a identificação e caracterização do peptídeo anticoccidiano PW2. O artigo foi publicado em Março de 2002 na revista Molecular and Biochemical Parasitology, volume 120, páginas 53-60 (**Anexo 1**).

A publicação deste artigo foi precedida do pedido de depósito de uma patente pela FAPESP, no "U.S. Patent and Trademark Office", EUA, em primeiro de julho de 2001, intitulada "Antimicrobial peptides and methods for identifying and using such peptides", tendo como inventores Adilson Leite, Urara Kawazoe, Paulo Arruda e Arnaldo da Silva Jr. O depósito recebeu o número de série 09/870,498.

O segundo artigo intitulado "NMR structure of PW2 bound to SDS micelles: A tryptophan-rich anticoccidial peptide selected from phage display libraries", descreve os resultados visando a elucidação da estrutura tridimensional de PW2 realizados em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Fábio Almeida do Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear localizado no Departamento de Bioquímica Médica da UFRJ. Este artigo foi aceito para publicação no periódico Journal of Biological Chemistry e encontra-se em fase de impressão (**Anexo 2**).

5- Resultados adicionais não publicados

5.1- Testes de atividade de PW2 contra fungos fitopatogênicos

As espécies de fungos fitopatogênicos de importância econômica no Brasil utilizadas (Galli *et al.*, 1980) foram gentilmente cedidas pela Dra. Wanda Malavolta do Laboratório de Fitopatologia do Instituto Biológico de São Paulo, Campinas-SP.

A concentração mínima inibitória (MIC) do peptídeo PW2 contra fungos fitopatogênicos foi determinada em ensaios de inibição de crescimento em meio líquido utilizando-se diluições seriadas 1:2 de peptídeo conforme descrito em Ehret-Sabatier *et al.*, (1996). Os esporos foram incubados em placas de cultura de células de 96 poços de fundo plano (Corning), utilizando meio Potato Dextrose Broth (Sigma) 1,2%. Os esporos de fungos foram coletados através de lavagem dos micélios esporulados com água Milli-Q estéril e filtrados em lã de vidro. Como inóculo foram utilizadas 10^7 células por ml. O crescimento foi avaliado através da leitura da absorbância a 600 nm das placas (Microplate Reader Model 450, Bio-Rad). Para realização de testes com o fungo *Rhizoctonia solani*, que não produz esporos, foram cortadas pequenas fatias do meio de cultura sólido na região da extremidade de crescimento do micélio com a finalidade de selecionar as hifas mais jovens. Em seguida as fatias foram mergulhadas em 1 ml de meio PDB 1,2 % contendo as diferentes concentrações de peptídeo. Todos os fungos foram incubados a temperatura ambiente por 72 horas no escuro.

Os testes de atividade antifúngica revelaram que PW2 possui atividade inibitória de crescimento *in vitro* contra diversos fungos causadores de doenças em plantas cultivadas no Brasil (Galli *et al.*, 1980). Na **Tabela I** são apresentadas as concentrações inibitórias mínimas de PW2 ("MIC") obtidas para cada um dos fungos testados.

Tabela I: Atividade de PW2 (MIC) contra fungos fitopatogênicos *in vitro*

fungos	MIC*	planta hospedeira
<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	50-100 µg/ml (31-62µM)	algodão
<i>Alternaria macrospora</i>	12,5-25 µg/ml (7,75-15,5 µM)	algodão
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	50-100 µg/ml (31-62µM)	trigo
<i>Drechslera tritici</i>	50-100 µg/ml (31-62µM)	trigo
<i>Phoma sorghina</i>	50-100 µg/ml (31-62µM)	arroz
<i>Microdochium oryzae</i>	50-100 µg/ml (31-62µM)	arroz
<i>Bipolaris oryzae</i>	25-50 µg/ml (15,5-31 µM)	arroz
<i>Pyricularia grisea</i>	50-100 µg/ml (31-62µM)	arroz
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	50-100 µg/ml (31-62µM)	manga, abacate, alho, cebola, cítricos, figo, goiaba, mamão, mandioca, seringueira, jiló, pimentão e berinjela
<i>Rhizoctonia solani</i>	100-200µg/ml(62-124 µM)	alface
<i>Fusarium solani</i>	25-50 µg/ml (15,5-31 µM)	feijão

* As concentrações inibitórias mínimas de PW2 (MIC) foram expressas como um intervalo [a]-[b] de concentrações, onde [a] representa a maior concentração onde foi observado crescimento e [b] representa a menor concentração com 100% de inibição (Ehret-Sabatier *et al.*, 1996).

5.2- Estudo da fluorescência do aminoácido triptofano de PW2 na presença de lipossomos

A fluorescência do aminoácido triptofano foi monitorada em espectrofluorímetro Hitachi F-2000 com excitação a 295 nm e emissão analisada no intervalo de 310 a 450 nm. As leituras foram realizadas com uma largura de banda de emissão/excitação de 10 nm a uma velocidade de 40 nm/s. Foi utilizada a concentração de 10 µg/ml de peptídeo na presença e ausência de 2,9 mM de lipossomos de DMPC (DMPC: 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina, SIGMA) ou DMPC:DMPG a uma razão molar 7:3 (DMPG: 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol, SIGMA).

Lipossomos multilamelares foram preparados através de hidratação de filmes de DMPC ou DMPC:DMPG com tampão HSBS a 60^o C por 1 minuto seguida de agitação vigorosa e ciclos sucessivos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido (total de 10) como descrito previamente por Mayer *et al.* (1985). Para obtenção de lipossomos unilamelares a suspensão foi submetida a 10 passagens sucessivas por filtros de 0,22 µm (Millipore) (Ahmad *et al.*, 1995).

A análise comparativa do espectro de fluorescência dos triptofanos presentes no peptídeo PW2 quando livre em solução ou na presença de lipossomos de DMPC ou DMPC:DMPG 7:3 revelou um desvio para o azul do pico de emissão de fluorescência de PW2 quando na presença de lipossomos de

DMPC:DMPG. O pico de emissão de fluorescência de triptofano de PW2 foi de 351 nm quando livre em solução; e 347 nm na presença de 2,9 mM de lipossomos de DMPC:DMPG (**Figura 2**), o que corresponde a um desvio 4 nm. Lipossomos compostos por apenas DMPC não produziram alteração no pico de fluorescência de PW2 sendo observada apenas uma pequena redução na intensidade de fluorescência devida, possivelmente, ao espalhamento de luz provocado pelos lipossomos. Este desvio para o azul indica o deslocamento de parte dos triptofanos para uma região mais hidrofóbica que pode ser encontrada entre as cadeias de carbono da micela

Com o intuito de confirmar este deslocamento dos triptofanos para uma região de maior hidrofobicidade foram realizados experimentos de "quenching" com acrilamida. Como a acrilamida fica restrita ao meio aquoso, as regiões hidrofóbicas dos lipossomos de DMPC:DMPG oferecem proteção às cadeias laterais dos triptofanos. Nos experimentos de "quenching" a acrilamida foi adicionada a partir de uma solução estoque a 8 M sendo considerados os fatores de diluição no cálculo a cada adição. Foi utilizada a concentração de 10 µg/ml de PW2 em 1 ml de tampão HSBS. As emissões de PW2 foram analisadas a 347 nm na presença de 2,9 mM de lipossomos de DMPC:DMPG e a 351 nm quando livre em solução. Estes valores de comprimento de onda correspondem aos picos máximos de emissão de fluorescência de triptofano para cada condição (**Figura 2**). As constantes de "quenching" para acrilamida (K_{SV}) foram determinadas através da equação de Stern-Volmer (Eftink & Ghiron, 1976).

6- Discussão

6.1- Obtenção e caracterização do peptídeo anticoccidiano PW2

6.1.1- Seleção de peptídeos com afinidade pela superfície de esporozoítos vivos de *Eimeria acervulina*

Após três ciclos de “biopanning” contra esporozoítos vivos de *E. acervulina* com três bibliotecas distintas de “phage display”, o sequenciamento dos clones selecionados revelou uma forte convergência para motivos que possuem em comum a presença de um duplo triptofano acompanhado de um aminoácido de carga positiva (WWR ou WWK). Este motivo (WW+) está presente em 82,14% do total de clones sequenciados a partir das três bibliotecas. A convergência para este motivo foi especialmente marcante na biblioteca Ph.D.-12 onde, dos 26 clones sequenciados, 23 apresentaram o motivo WWR e 1 apresentou o motivo WWK. A sequência HPLKQYWWRPSI foi a mais fortemente selecionada apresentando 22 repetições (84,6% do número total de clones sequenciados a partir da biblioteca Ph-D12) (**vide Figura 1 em Anexo 1**).

O fato de esta convergência ter ocorrido em três ensaios independentes utilizando três bibliotecas de phage display distintas indica a provável ausência de ocorrência de artefato durante a seleção. Adicionalmente, de acordo com ensaios de ELISA, o bacteriófago proveniente da biblioteca de 12 resíduos expressando a

sequência de resíduos de PW2 não apresentou afinidade pelo plástico dos tubos utilizados durante as etapas de seleção (dados não apresentados).

O peptídeo de maior ocorrência (HPLKQYWWRPSI), nomeado PW2, que, aparentemente, apresentou maior afinidade pelo alvo, foi sintetizado visando estudos de atividade e caracterização físico-química.

6.1.2- Semelhança de PW2 com peptídeos antimicrobianos ricos em triptofano

Existem descritos na literatura hexapeptídeos obtidos a partir de bibliotecas combinatórias sintéticas que apresentam semelhanças com PW2. Estes hexapeptídeos são catiônicos e ricos em triptofano (RRRWWCR, RRRWWRF e RRRWWRR), apresentando atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* (revisto por Blondelle & Houghten, 1996 e Al-Obeidi *et al.*, 1998).

PW2 também apresenta similaridade em composição com peptídeos antimicrobianos indólicos derivados de grânulos de neutrófilos, membros da família das catelicidinas: a indolicidina (ILPWLWPWWPWRR) e a tritripticina (VRRFPWWPFLRR) (Selsted *et al.*, 1992; Lawyer *et al.*, 1996). Estes peptídeos antimicrobianos, componentes do sistema de defesa do hospedeiro contra infecções, possuem um amplo espectro de ação, sendo efetivos contra diversas espécies de bactérias, fungos e protozoários. Os mecanismos de ação propostos para estes peptídeos envolvem a interação com a membrana plasmática

microbiana, onde provocam a formação de poros e lise celular. No entanto, esta afinidade por biomembranas e alta hidrofobicidade torna tais peptídeos hemolíticos e, portanto, tóxicos para as células do hospedeiro. Tal toxicidade dificulta o uso clínico destes peptídeos. A indolicidina e a tritripticina não são secretadas para o meio extracelular do hospedeiro por esta mesma razão, agindo sempre confinadas nos fagossomos das células fagocitárias (Aley *et al.*, 1994; Ahmad *et al.*, 1995; Falla *et al.*, 1996; Subbalakshmi *et al.*, 1996; Schibli *et al.*, 1999).

Estudos recentes indicam que diversos peptídeos antimicrobianos exercem sua atividade através de mecanismos que envolvem outras etapas além da permeabilização da membrana microbiana. Existem evidências de que tais peptídeos, após passarem pela membrana plasmática, agem interagindo com alvos intracelulares, como proteínas, ribossomos e DNA (Matsuzaki, 2001; Yang *et al.*, 2000; Westerhoff *et al.*, 1989; Bierbaum & Sahl, 1985; Kragol, 2001). De acordo com um estudo realizado por Subbalakshimi *et al.* (1996), existem evidências de que a indolicidina não exerce sua atividade antibacteriana através da permeabilização da membrana. Neste mesmo estudo foi demonstrado que a substituição dos triptofanos por fenilalaninas reduziu a atividade hemolítica da indolicidina, retendo, porém a atividade antimicrobiana do peptídeo. Foi sugerido que a indolicidina, devido à presença de resíduos aromáticos e carga positiva, pode interagir com ácidos nucleicos, exercendo sua atividade através da interferência com as etapas de replicação e transcrição.

6.1.3- Semelhança de PW2 com domínios ricos em triptofano presentes em proteínas de plantas com atividade antimicrobiana

A sequência consenso WW+ (WWR ou WWK), presente entre os peptídeos selecionados contra esporozoítos de *E. acervulina* por “phage display”, pode ser observada no domínio rico em triptofano da região C-terminal da puroindolina-a (WRWWKWWK), da puroindolina-b (WPTKWWK), ambas isoladas a partir de sementes de trigo, e da proteína Ace-AMP1(TFVRPFWWRPRI) isolada a partir de sementes de alho. Estas proteínas (puroindolinas e Ace-AMP1) apresentam similaridade em sequência e estrutura tridimensional com a família das proteínas conhecidas por nsLTPs (“nonspecific lipid transport proteins”), porém não apresentam a capacidade de transferir fosfolipídios entre vesículas ou organelas *in vitro* como as nsLTPs (Blochet *et al.*, 1993; Cammue *et al.*, 1995). No entanto foi demonstrado que, assim como os peptídeos antimicrobianos indolicidina e tritripticina (Ahmad *et al.*, 1995; Robinson *et al.*, 1998; Schibli *et al.*, 1999), estas proteínas possuem a capacidade de se ligar a fosfolipídios, aumentando, inclusive, a permeabilidade de membranas modelo. Uma característica em comum entre estas proteínas e os peptídeos antimicrobianos ricos em triptofano é a presença de resíduos de triptofano expostos ao solvente, que podem estar envolvidos na capacidade destas moléculas de se ligarem à lipídios (Gautier *et al.*, 1993; Le Bihan *et al.*, 1996, Cammue *et al.*, 1995, Tassin *et al.*, 1998, Blochet *et al.*, 1993).

A função das puroindolinas e de Ace-AMP1 *in vivo* ainda é desconhecida, entretanto suas atividades antifúngica e antibacteriana *in vitro* sugerem o seu

envolvimento na proteção das sementes contra o ataque de patógenos (Blochet *et al.*, 1993; Cammue *et al.*, 1995). Estudos com anticorpos policlonais indicam que as puroindolinas localizam-se na aleurona das sementes de trigo, uma posição favorável para defesa do endosperma (Le Bihan *et al.*, 1996).

6.2- Atividade do peptídeo PW2

6.2.1- PW2 permeabiliza a membrana externa de esporozoítos de *Eimeria acervulina* e *Eimeria tenella*

Os ensaios de citometria de fluxo demonstraram que 15 minutos de exposição a uma concentração de 100 µg/ml de PW2 provocaram danos na membrana dos esporozoítos de *Eimeria acervulina* e *Eimeria tenella* de acordo com a captação da sonda fluoescence Sytox Green. Esta sonda somente penetra em células com membrana danificada, se acumulando no núcleo, principalmente. A população de epimastigotas de *Crithidia fasciculata* não sofreu nenhum efeito dada a ausência de marcação fluoescence ou alterações de volume nas incubações com PW2 em relação à população controle (**vide Figura 2 em Anexo 1**).

Nos ensaios com esporozoítos de *Eimeria* foi observado o aparecimento de detritos de pequeno tamanho após adição de PW2. Este efeito está provavelmente associado a perda de material celular e lise. A população de células fluoescence também demonstrou uma redução em seu volume, corroborando com esta

hipótese. Uma população de células com redução de volume, porém com ausência de fluorescência, também foi observada. Estas células provavelmente não tiveram tempo suficiente para acumular a sonda fluorescente, visto que esta necessita de pelo menos 10 minutos após ocorrido o dano à membrana para ser detectada pelo aparelho (Dr. Robert Ivan Schumacher, informação pessoal) (**vide Figura 2 em Anexo 1**).

A porcentagem de esporozoítos danificados, antes e depois do tratamento, foi de 20 e 62% para *E. acervulina* e 10 e 82% para *E. tenella*, respectivamente. Estes resultados indicam que os esporozoítos de *E. tenella* são mais sensíveis a PW2. Este comportamento também foi observado em estudos com análogos sintéticos de peptídeos antimicrobianos naturais (Peptidyl-MIMs, Demeter Biotechnologies, Ltd.) (Martin *et al.*, 1999). Uma possível explicação para este comportamento reside na diferença entre o local de infecção das duas espécies no intestino das aves. Os esporozoítos de *E. acervulina* infectam a porção inicial do intestino das aves e possuem o menor tempo de excitação entre as espécies de *Eimeria* que parasitam o frango (aproximadamente 10 minutos). Entretanto, *E. tenella* infecta o ceco das aves, possuindo tempo de excitação de aproximadamente 1 hora. Desta maneira, os esporozoítos de *E. acervulina* sofrem maior exposição ao pH ácido e enzimas digestivas (Long, 1987; Kawazoe, 1994). Os esporozoítos de *E. acervulina* durante a evolução podem ter desenvolvido alguma resistência aos danos em sua superfície, enquanto os esporozoítos das espécies que infectam regiões posteriores à porção inicial do intestino das aves permanecem protegidas dentro da parede esporocística.

6.2.2- PW2 provoca danos visíveis em microscopia eletrônica de varredura na superfície de esporozoítos de Eimeria acervulina

As imagens de microscopia eletrônica de varredura demonstraram que os esporozoítos de *E. acervulina* sofrem danos em suas superfícies após incubação com PW2. Foram observados o aparecimento de micelas destacadas da membrana e a formação de poros que resultaram em extravazamento de material citoplasmático quando foram utilizadas concentrações entre 50 e 100 µg/ml. As células danificadas também demonstraram tendência a formar agregados (**vide Figura 4 em Anexo 1**). Um efeito semelhante foi observado em imagens obtidas a partir de microscopia eletrônica de varredura de bactérias (*E. coli* e *S. aureus*) tratadas com 10 µM de PGYa, um peptídeo antimicrobiano sintético desenhado a partir de sequência consenso de diversos peptídeos antimicrobianos naturais pertencentes à classe das catelicidinas com estrutura em α -hélice (Tiozzo *et al.*, 1998).

6.2.3- PW2 induz vazamento de calceína confinada no interior de esporozoítos de Eimeria acervulina e Eimeria tenella

Os testes de vazamento de calceína confinada indicaram que o efeito anticoccidiano de PW2 envolve a permeabilização da membrana do parasito conforme observado em esporozoítos de *E. acervulina* e *E. tenella*. A incubação com 100µg/ml de PW2 por uma hora produziu, em esporozoítos de *Eimeria*, o mesmo efeito de vazamento de Calceína que a lise com Triton X-100. Em

epimastigotas de *C. fasciculata* e *T. cruzi* o efeito de PW2 foi reduzido. Em taquizoítos de *T. gondii* observou-se efeito moderado (38%). As cinéticas de vazamento de calceína de esporozoítos de *E. acervulina* e *E. tenella* indicaram que os danos ocorreram mais rapidamente em esporozoítos de *E. acervulina* (**vide Figura 3 em Anexo 1**).

Os dados obtidos nos testes de vazamento de calceína confinada indicam uma provável baixa toxicidade de PW2 às células do hospedeiro. A incubação com o peptídeo não produziu efeito em células primárias de rim de galinha. Em células THP1 (derivadas de linfoma humano) o efeito de PW2 foi relativamente baixo, mas significativo (18%) (**vide Figura 3 em Anexo 1**). Isto talvez esteja relacionado com o fato de alguns peptídeos antimicrobianos catiônicos como as magaininas (presente na pele de anfíbios), as melitinas e as cecropinas (isolados de insetos) possuírem atividade contra células derivadas de tumores de mamíferos. Acredita-se que esta atividade antitumoral deve-se à maior presença de ácido fosfatídico nestas células, um intermediário na via de síntese de fosfolipídios que possui carga negativa. O ácido fosfatídico se acumula devido a alterações no metabolismo das células tumorais que podem ter suas vias de síntese afetadas (Jaynes *et al.*, 1989; Moore *et al.*, 1994; Winder *et al.*, 1998).

6.2.4- PW2 inibe a invasão celular de esporozoítos de Eimeria acervulina e Eimeria tenella

Os testes de invasão *in vitro* indicaram que o peptídeo PW2 foi capaz de inibir significativamente a penetração de esporozoítos de *Eimeria acervulina* e

Eimeria tenella em células primárias de rim de galinha. A incubação com concentrações baixas de PW2 (1 µg/ml ou 0,63 µM) provocou uma inibição na taxa de invasão celular de 72,4% para *E. acervulina* e 77,5% para *E. tenella* (**vide Tabela 1 em Anexo 1**). Entretanto, os esporozoítos de *Eimeria acervulina* incubados com 1 µg/ml de PW2 não apresentavam danos visíveis na sua superfície de acordo com as imagens de microscopia eletrônica de varredura (**vide Figura 4 em Anexo 1**). O aparecimento de grandes poros e vesículas na superfície dos esporozoítos foi observado apenas nas incubações com 50 e 100 µg/ml de PW2.

A incubação com 100 µg/ml (ou 63 µM) não produziu efeitos inibitórios superiores a um valor máximo de 80,8% para *E. acervulina* e 90,8% para *E. tenella*. Aparentemente, existe um limite máximo de dosagem efetiva para PW2, mas não podemos precisar se este comportamento deve-se à presença de parasitos resistentes ou à agregação das unidades de peptídeo em altas concentrações. Martin *et al.* (1999) ao realizarem estudos com peptídeos sintéticos análogos a peptídeos antimicrobianos que interagem com membranas observaram um efeito semelhante. O aumento da concentração a partir de um certo limite era incapaz de produzir aumento na proteção. No entanto, o motivo deste comportamento não foi elucidado.

6.2.5- PW2 não possui atividade antibacteriana, mas apresenta atividade antifúngica

A toxicidade de PW2 contra bactérias foi testada utilizando *Micrococcus luteus* (Gram +) e *E. coli* (Gram -) como modelos através da análise de seu efeito antibacteriano em ensaios de crescimento bacteriano em meio líquido. Altas concentrações de peptídeo (200 µg/ml ou 68 µM) não produziram efeito inibitório sobre estas bactérias (**vide Anexo 1**).

De acordo com os resultados negativos com relação à atividade de PW2 contra bactérias ou parasitos não relacionados, era esperado que PW2 apresentasse especificidade para espécies de *Eimeria*. No entanto PW2 demonstrou atividade antifúngica em ensaios similares aos realizados com bactérias. PW2 demonstrou possuir concentração inibitória de 25-50 µg/ml contra as leveduras *Candida albicans* e *Candida parapsilopsis*. PW2 também demonstrou atividade contra o fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* (**vide Anexo 1**).

Devido ao crescente interesse na expressão de peptídeos antimicrobianos em plantas transgênicas resistentes a patógenos (Takaichi & Oeda, 2000; Sharma *et al.*, 2000; Osusky *et al.*, 2000; Cary *et al.*, 2000) o efeito do peptídeo PW2 em fungos fitopatogênicos foi estudado. Os resultados obtidos nos ensaios confirmam a ação antifúngica de PW2 (**Capítulo 6; Tabela I**). Tais resultados indicam a possibilidade de sua utilização na obtenção de plantas transgênicas resistentes ao ataque por fungos.

Dado que PW2 foi selecionado por “phage display” contra esporozoítos de *E. acervulina*, a atividade antifúngica cruzada de PW2 pode sugerir a existência de alguma similaridade na composição de superfície entre esporozoítos de *Eimeria* e fungos. Esta similaridade pode estar relacionada com indícios de proximidade filogenética entre protozoários do filo Apicomplexa e fungos, como revelado em estudos de homologia de rRNA (Edman *et al.*, 1988). Vale ressaltar que as tioninas Ace-AMP1 e puroindolinas, encontradas em sementes de alho e trigo, respectivamente, possuem domínios ricos em triptofano com características semelhantes à PW2 (principalmente a presença do consenso de seleção WW+) e apresentam atividade antifúngica *in vitro* (Blochet *et al.*, 1993; Cammue *et al.*, 1995; Le Bihan *et al.*, 1996; Tassin *et al.*, 1998). A atividade contra fungos fitopatogênicos pode ser um indício de que o modo de ação do peptídeo PW2 e das proteínas de plantas mencionadas envolvem vias comuns. No entanto, o exato mecanismo de ação das puroindolinas e de Ace-AMP1 ainda não foi elucidado. Infelizmente, a literatura também não apresenta testes envolvendo a atividade das puroindolinas e de Ace-AMP1 contra protozoários.

6.2.6- PW2 não apresenta atividade hemolítica

A toxicidade de PW2 foi avaliada em ensaios de hemólise realizados com hemácias humanas, de galinha e de coelho. PW2 não demonstrou atividade hemolítica após 6 horas de incubação mesmo em altas concentrações (100 µg/ml) (vide Tabela 2 em Anexo 1). Provavelmente, PW2 não possui afinidade por membranas de eucariotos superiores. Esta propriedade indica uma provável baixa

toxicidade de PW2 para aves e mamíferos. As chances de efeitos colaterais danosos provocados pelo peptídeo em galinhas são ainda mais reduzidas se considerarmos que a administração de compostos anticoccidianos ocorre via oral.

6.3- Análise sobre o possível mecanismo de ação de PW2

6.3.1- *PW2 apresenta afinidade por lipossomos e micelas membranomiméticas de carga negativa*

A análise do espectro de fluorescência de triptofano de PW2 indica um desvio do pico de emissão para o azul quando são adicionadas à solução micelas de SDS (8 nm de desvio) (**vide Figura 5 em Anexo 1**) ou lipossomos de DMPC:DMPG 7:3 (4 nm de desvio) (**Capítulo 6; Figura 2**). Este desvio para o azul indica que parte dos triptofanos é deslocada para um ambiente mais hidrofóbico. Isto pode ser explicado pela inserção das cadeias laterais dos triptofanos em regiões de maior hidrofobicidade presentes nas micelas de SDS e nos lipossomos de DMPC:DMPG. Não foi observado desvio na presença de lipossomos de DMPC, cuja carga total é neutra.

No intuito de confirmar esta interação foram realizados experimentos de "quenching" com acrilamida. Como a acrilamida fica restrita à fase aquosa da solução, os triptofanos imersos por partição na região hidrofóbica das micelas ou dos lipossomos serão protegidos. Desta forma ao adicionarmos determinada quantidade de acrilamida a uma solução de peptídeo associado a micelas ou

lipossomos teremos uma menor redução na intensidade de emissão de fluorescência de triptofano em relação aos valores obtidos com o peptídeo livre.

Esta diferença foi evidenciada através das constantes K_{sv} obtidas através da equação de Stern-Volmer que realaciona a fluorescência de PW2 nas diferentes condições em relação ao “quencher” acrilamida. PW2 apresentou constantes K_{sv} diferentes quando se encontrava livre em solução ($10,8 \text{ M}^{-1}$), na presença de micelas de SDS ($6,8 \text{ M}^{-1}$) (vide **Figura 5 em Anexo 1**), ou lipossomos de DMPC:DMPG 7:3 ($2,74 \text{ M}^{-1}$) (**Capítulo 6; Figura 3**). Não é possível determinar se o maior grau de proteção dos resíduos de triptofano, observado nos ensaios com lipossomos de DMPC:DMPG, se deve a uma maior interação com os lipossomos em relação ao SDS, ou a diferenças conformacionais induzidas pelos dois sistemas. Estes resultados demonstraram que PW2 possui a capacidade de interagir com micelas membranomiméticas de SDS e com lipossomos de DMPC:DMPG, corroborando com a hipótese de que PW2 age diretamente na membrana dos esporozoítos de *Eimeria*. Como o SDS e o DMPG apresentam carga negativa, podemos concluir que, possivelmente, a carga seria um fator relevante na interação de PW2 com biomembranas. Não existem informações na literatura sobre a composição exata da membrana externa de esporozoítos de *Eimeria*. Nossos resultados indicam a possibilidade da existência de componentes de carga negativa na superfície de esporozoítos de *Eimeria*. A afinidade da membrana de esporozoítos de *Eimeria meleagridis* por ferritina catiônica descrita por Augustine & Danforth (1984) corrobora com a presença de cargas negativas na superfície de esporozoítos de *Eimeria*. Entretanto, formas epimastigotas de

Trypanosoma cruzi, que, de acordo com os testes de vazamento de calceína, não são afetadas por PW2, também apresentam afinidade por ferritina cationizada (revisto por De Souza, 1995). Assim sendo conclui-se que a afinidade e atividade de PW2 não dependem exclusivamente da carga da membrana alvo.

6.3.2- Análise da estrutura tridimensional de PW2 ligado a micelas membranomiméticas de SDS

A estrutura tridimensional de PW2 ligado à micelas de SDS possui semelhanças com as estruturas tridimensionais dos peptídeos antimicrobianos indolicidina (Rozek *et al.*, 2000) e tritripticina (Schibli *et al.*, 1999) (**vide Figura 3 em Anexo 2**).

A comparação entre as estruturas de PW2, da indolicidina e da tritripticina revela, no entanto, diferenças na distribuição das cargas positivas ao longo da cadeia polipeptídica. Na tritripticina as cargas positivas estão nas extremidades do peptídeo (Tassin *et al.*, 1998), na indolicidina existem duas cargas positivas na extremidade C-terminal e uma no centro da cadeia polipeptídica (Rozek *et al.*, 2000), enquanto em PW2 as cargas positivas (K4 e R9) estão juntas à região aromática no centro do peptídeo (YQWW). Esta distribuição de cargas pode estar relacionada com as diferenças observadas no espectro de atividade destes peptídeos.

Entretanto, apesar das diferenças, as estruturas tridimensionais destes peptídeos possuem uma característica em comum. A indolicidina, a tritripticina e

PW2 tendem a adotar estruturas tridimensionais onde um dos triptofanos faz parte do centro hidrofóbico da estrutura enquanto os triptofanos restantes encontram-se expostos ao solvente na superfície. Estes resíduos aromáticos expostos são o provável sítio de interação com biomembranas. De fato, o triptofano possui tendência natural a particionar em biomembranas (Wimley & White, 1996), sendo um resíduo essencial para a atividade de toxinas presentes em venenos de animais que agem sobre a membrana plasmática das células da vítima (Gatineau *et al.*, 1987).

Existem proteínas de plantas com atividade antimicrobiana que possuem domínios ricos em triptofano que apresentam esta mesma característica estrutural. As estruturas tridimensionais das puroindolinas (sementes de trigo) e da proteína antimicrobiana de sementes de alho Ace-AMP1 também apresentam triptofanos expostos em suas superfícies, sendo prováveis agentes efetores na atividade destas proteínas (Le Bihan *et al.*, 1996; Tassin *et al.*, 1998). A existência de triptofanos expostos tanto em PW2 como em peptídeos ou proteínas ricas em triptofano com atividade antimicrobiana pode estar relacionada com o envolvimento de mecanismos de ação semelhantes para estes compostos. Aparentemente, os resíduos de triptofano são responsáveis pela afinidade por biomembranas em geral, enquanto os outros resíduos modulam a atividade antimicrobiana.

Em PW2 (HPLKQYWWRPSI) os resíduos que apresentam maiores deslocamentos químicos em espectros de RMN quando da adição de micelas de SDS são K4, Y6, W7, W8, R9 e I12 (**vide Figura 4 em Anexo 2**). De acordo com

os cálculos da estrutura através de RMN, o resíduo W7 é importante para estabilização da estrutura compondo o centro hidrofóbico junto às prolinas enquanto os resíduos K4, Y6, W8 e R9 estão orientados para a mesma superfície, compondo o provável domínio de contato entre o peptídeo e a micela de SDS (**vide Figura 3 em Anexo 2**). O desvio para o azul na fluorescência dos triptofanos também indica que estes aminoácidos se encontram em ambiente mais hidrofóbico na presença de SDS. Isto poderia ser explicado pela acomodação de W7 como núcleo hidrofóbico da estrutura de PW2 associada à inserção de W8 na região hidrofóbica entre as cadeias de carbono das moléculas de detergente da micela. Entretanto ainda são necessários experimentos que demonstrem precisamente a inserção de W8, bem como sua profundidade na região hidrofóbica da micela.

Os resíduos W7, W8 e R9 além de serem importantes na interação com micelas de SDS também compõem o consenso WW+ de PW2. Este consenso foi observado entre os peptídeos selecionados contra *Eimeria acervulina* (**vide Figura 1 em Anexo 1**), o que indica que esta região também é de grande importância para interação do peptídeo com a membrana do parasito. Possivelmente, PW2 adota estruturas similares quando ligado a micelas de SDS ou à superfície de esporozoítos de *Eimeria*. No entanto, ainda são necessários estudos mais aprofundados acerca do mecanismo de interação de PW2 com esporozoítos de *Eimeria* para confirmar esta hipótese.

6.3.3- PW2 forma agregados em solução

Os experimentos de espalhamento de luz indicaram que as moléculas de PW2 associam-se formando agregados em concentrações acima de 50 µg/ml (vide Figura 5 em Anexo 1). A partir desta concentração PW2 produziu danos à superfície de esporozoítos de *E. acervulina* de acordo com as imagens de microscopia eletrônica de varredura, o que indica que o efeito lítico de PW2 pode estar envolvido com a formação de agregados de peptídeo na membrana dos esporozoítos. Entretanto, nos experimentos de invasão de esporozoítos *in vitro* PW2 mostrou-se efetivo mesmo à concentrações baixas (1 µg/ml) onde não foram observados danos à superfície dos esporozoítos nas imagens de microscopia eletrônica de varredura. Provavelmente, os esporozoítos perdem a viabilidade mesmo em concentrações onde não se observam danos visíveis na membrana dos esporozoítos.

PW2 não provoca hemólise mesmo em concentrações onde foi observada a formação de agregados. A indolicidina, no entanto, possui comportamento oposto, apresentando uma correlação direta entre a capacidade de formar agregados e a atividade hemolítica (Subbalakshmi *et al.*, 1996). Interessantemente, neste estudo foi demonstrado que um peptídeo análogo à indolicidina onde os triptofanos foram substituídos por fenilalaninas perdeu drasticamente a atividade hemolítica, mantendo, porém, a atividade antimicrobiana. Neste trabalho também foi demonstrado que a indolicidina não permeabiliza a membrana interna de bactérias Gram(-), apenas a membrana externa. O autor sugere que o modo de ação da indolicidina envolveria a penetração no interior da célula e ligação do peptídeo ao

DNA (devido à hidrofobicidade e carga positiva do peptídeo) inibindo a replicação e a transcrição (Subbalakshmi *et al.*, 1996). Entretanto, no caso de PW2 este modo de ação é improvável pois o peptídeo foi selecionado por “phage display” contra esporozoítos vivos em metodologia direcionada a recuperar apenas as partículas virais ligadas à superfície dos parasitos. Os fagos que eventualmente penetraram nos esporozoítos e se ligaram ao DNA (por exemplo) foram descartados junto ao sedimento de células, de modo que os peptídeos selecionados devem interagir, provavelmente, com a superfície do parasito.

6.3.4- Análise geral sobre a atividade anticoccidiana de PW2

O peptídeo PW2 apresenta semelhanças em composição de aminoácidos e estruturais com os peptídeos antimicrobianos de neutrófilos indolicidina e tritripticina. Entretanto, estes peptídeos apresentam grandes diferenças nas suas atividades antimicrobianas. A indolicidina possui um amplo espectro de atividade, sendo ativa contra bactérias (Selsted *et al.*, 1992), protozoários (Aley *et al.*, 1994), fungos (Ahmad *et al.*, 1995) e vírus envelopados como o HPV-1 (Robinson *et al.*, 1998). A tritripticina apresenta atividade contra bactérias e fungos (Nagpal *et al.*, 1999) enquanto PW2 apresenta uma atividade mais específica, sendo efetivo contra esporozoítos de *Eimeria* em concentrações baixas (0,63 μM) e efetivo contra fungos em concentrações mais altas (em torno de 15 μM), não possuindo atividade antibacteriana ou hemolítica. Esta especificidade pode ser uma consequência do processo de seleção de PW2 por “phage display”, que tende a otimizar a interação do peptídeo selecionado com o alvo escolhido, no caso

esporozoítos de *E. acervulina*. Entretanto, a razão para a especificidade de PW2 bem como para a atividade antifúngica inesperada não está clara.

De acordo com os estudo de RMN, os resíduos W7, W8 e R9, que compõem o consenso de seleção WW+ de PW2, estão entre os resíduos que apresentam maior deslocamento químico devido a alterações estruturais provocadas pela presença de SDS em relação ao peptídeo livre em solução. Este deslocamento indica que estes resíduos são importantes para a interação de PW2 com a superfície das micelas. Provavelmente, estes mesmos resíduos estão diretamente envolvidos na interação de PW2 com os esporozoítos de *Eimeria*. Isto também nos leva a crer que PW2, quando ligado à superfície do parasito, deve apresentar estrutura tridimensional semelhante àquela adotada quando o peptídeo está ligado a micelas membranomiméticas de SDS. Este resultado também reforça a hipótese de que o sítio de ligação de PW2 encontra-se na camada lipídica da membrana externa da película dos esporozoítos de *Eimeria*. Isto condiz com o método de seleção empregado, onde as partículas virais das bibliotecas de "phage display" foram postas em contato direto com a superfície de esporozoítos vivos, tendo acesso, portanto, à camada lipídica da membrana externa dos parasitos.

Os estudos espectroscópicos demonstraram que PW2 possui afinidade por micelas membranomiméticas e lipossomos de carga negativa. Os ensaios com ferritina cationizada realizados por Augustine & Danforth (1984) demonstram que os esporozoítos de *Eimeria* possuem cargas negativas em sua superfície. Estas cargas podem estar envolvidas no mecanismo de interação de PW2 com o

parasito. Entretanto, a carga somente não é determinante, visto PW2 não demonstrar atividade contra *T. cruzi* que também possui afinidade por ferritina cationizada, contendo, portanto, cargas negativas em sua superfície (De Souza, 1995). Os resultados indicam a possível participação de um componente comum, presente na superfície de esporozoítos de *Eimeria* e fungos, que seria o alvo hipotético de PW2 responsável pela ação seletiva do peptídeo.

Os testes de citometria de fluxo e vazamento de calceína confinada demonstraram que PW2 é capaz de aumentar a permeabilidade da membrana de esporozoítos de *Eimeria*. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura revelam que PW2 em altas concentrações (50 e 100 µg/ml) provoca danos na superfície de esporozoítos de *Eimeria acervulina*. Ensaio de espalhamento de luz indicaram que PW2 forma agregados em solução a partir de 50 µg/ml. O efeito lítico observado em esporozoítos de *Eimeria* nestas concentrações pode estar relacionado com a formação de agregados de peptídeo na membrana dos parasitos.

Os testes de invasão *in vitro* indicaram que a incubação com apenas 1 µg/ml de PW2 reduziu a taxa de penetração de esporozoítos de *E. acervulina* e *E. tenella* em aproximadamente 75%. Nesta concentração não foram observados danos visíveis à superfície de esporozoítos de *E. acervulina* em imagens de microscopia eletrônica de varredura. Aparentemente, os esporozoítos perdem a viabilidade em concentrações de peptídeo onde não são observados poros. O efeito lítico observado na membrana dos esporozoítos de acordo com as imagens

de microscopia eletrônica de varredura ocorreu apenas nas incubações com 50 e 100 µg/ml de peptídeo. Como PW2 apresentou atividade inibitória na invasão celular dos parasitos em concentrações muito menores (1 µg/ml), seu modo de ação envolve, provavelmente, outros mecanismos além da permeabilização da membrana. Não podemos descartar a hipótese de PW2 penetrar no interior dos esporozoítos e interferir com macromoléculas como proposto para diversos peptídeos antimicrobianos, incluindo a indolicidina. No entanto, o método de seleção utilizado visou selecionar e recuperar partículas virais aderidas na superfície de esporozoítos intactos de *Eimeria*, onde não teriam a oportunidade de entrar em contato com macromoléculas intracelulares durante os ciclos de “biopanning”. Os fagos que eventualmente foram internalizados pelos esporozoítos foram provavelmente descartados junto ao sedimento de células após a eluição das partículas aderidas à superfície e centrifugação dos parasitos.

6.3.5- A maquinaria motora dos esporozoítos de Eimeria, responsável pelo processo de invasão, poderia estar sendo direta ou indiretamente afetada pelo peptídeo PW2?

Os peptídeos antimicrobianos em geral provocam desorganização estrutural e espacial em biomembranas (Shai, 1999). Esta desorganização foi evidenciada através de indução de efeito “flip-flop” e aumento na permeabilidade e translocação de moléculas de peptídeo e lipídio pelos folhetos da bicamada lipídica (Mol *et al.*, 1998; El Jastimi *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2001). Em biomembranas existem diferentes componentes lipídicos que se organizam em

grupos gerando domínios com características específicas em determinadas regiões dos folhetos. Estas características são importantes, por exemplo, nos processos de fusão de membranas durante internalização ou secreção de substâncias. Os peptídeos antimicrobianos também provocam desorganização lateral dos fosfolipídios, interferindo com estes agrupamentos (Polozov *et al.*, 1997).

De acordo com White *et al.* (2001) a composição lipídica da membrana assim como suas características físico-químicas são extremamente importantes para o enovelamento correto de proteínas ligadas à membrana. Desta forma, as alterações provocadas pela interação com peptídeos antimicrobianos podem interferir com o estado estrutural de proteínas imersas ou ligadas à superfície da membrana plasmática. Como a estrutura de uma proteína é fundamental para que esta execute suas funções, podemos concluir que os peptídeos antimicrobianos podem prejudicar a atividade de proteínas de membrana de uma maneira indireta.

A região de interface hidrofílica/hidrofóbica da membrana apresenta elevada importância na estruturação das proteínas que estejam ligadas à mesma, sendo responsável, por exemplo, pelo correto endereçamento de moléculas e/ou processos de sinalização celular envolvendo proteínas que contêm domínios com afinidade pela membrana. Existem evidências de que resíduos aromáticos e resíduos carregados presentes nestas proteínas desempenham papel importante no processo de interação com as interfaces das biomembranas (White *et al.*, 2001). PW2 é rico em resíduos aromáticos e carregados que podem interagir com a região de interface hidrofílica/hidrofóbica da membrana externa de esporozoítos

de *Eimeria*. Estes resíduos podem teoricamente provocar alterações físico-químicas capazes de interferir com a interação entre a membrana e as proteínas do parasito. Esta interferência pode ser prejudicial à função das proteínas de superfície dos esporozoítos de *Eimeria*, o que prejudicaria diversos processos como, por exemplo, motilidade e invasão. Em concentrações altas de peptídeo as alterações acumulam-se provocando permeabilização e eventual rompimento da membrana externa, mas mesmo em concentrações baixas estas alterações seriam suficientes para prejudicar o processo de invasão do parasito devido à interferência com as proteínas de membrana. Isto possivelmente explicaria a atividade inibitória de 1 µg/ml de PW2 (0,63 µM) nos ensaios de invasão celular *in vitro* com esporozoítos de *E. acervulina* e *E. tenella* (**vide Tabela 1 em Anexo 1**). Esta concentração não produziu danos visíveis à superfície de esporozoítos de *E. acervulina* em imagens de microscopia eletrônica de varredura (**vide Figura 4 em Anexo 1**).

A forma característica, bem como a rigidez das formas invasivas dos parasitos do filo Apicomplexa, resulta da existência de uma película composta por três bicamadas lipídicas que está associada a componentes de citoesqueleto que se encontram ao redor do parasito em contato com as membranas média e interna. A rigidez e morfologia do parasito estariam intimamente associados com o processo de invasão celular, característico do filo, onde os parasitos necessitam do emprego de força motriz, passando por severas deformações durante a penetração na célula hospedeira (Hettmann *et al.*, 2000). Existe um modelo proposto para a invasão celular dos parasitos do filo Apicomplexa ("capping

model") onde determinadas proteínas que são secretadas pelos micronemas e roptrias na porção anterior do parasito são movidas para a porção posterior da superfície do parasito através do sistema motor subpelicular. Algumas destas proteínas secretadas por micronemas, possuem sítios de adesão responsáveis pela interação entre a membrana do parasito e a superfície da célula hospedeira (Hettmann *et al.*, 2000). Assim sendo, logo que a região apical das formas invasivas dos coccídios reconhece a célula a ser invadida, ocorre a secreção de proteínas adesivas. Estas proteínas formam uma junção que se move da região anterior até a porção posterior do parasito graças à interação com os complexos de actina e miosina. O parasito penetra na célula hospedeira invaginando-se através desta junção, formando, em seguida, o vacúolo parasitóforo (Mordue *et al.*, 1999).

Foi demonstrado recentemente que, em *Eimeria tenella*, as proteínas provenientes dos micronemas são secretadas e se movem da região anterior para a porção posterior da superfície do parasito (Bumstead & Tomley, 2000). Este comportamento está de acordo com o modelo proposto ("capping model") para explicitar o mecanismo motor ("gliding motility") responsável pela capacidade de locomoção e penetração dos parasitos do filo Apicomplexa (Hettmann *et al.*, 2000). Este processo foi induzido durante a penetração de esporozoítos de *E. tenella* quando adicionados a uma cultura de células MDBK ("Mardin Darby Bovine Kidney cells"). O processo de "capping" também foi induzido pela adição de soro fetal bovino e albumina, sendo inibido pela adição de citocalasina-D, um inibidor de polimerização de actina. Nestas condições as proteínas dos micronemas foram

secretadas, mas não foram movidas para a porção posterior dos parasitos. Esta inibição é um indicativo do envolvimento de um sistema motor baseado em actina e miosina no processo de invasão e motilidade (Bumstead & Tomley, 2000).

Em *Toxoplasma gondii*, existem moléculas de miosina associadas à membrana externa da película do parasito. Junto às moléculas de miosina encontram-se filamentos de actina ligados às membranas média e interna. Este sistema seria responsável pela motilidade ("gliding motility") e conseqüentemente pela capacidade de invasão celular do parasito. Também foi demonstrado que a motilidade, bem como a taxa de invasão celular dos parasitos, foram reduzidas após incubação com inibidores de atividade de miosina (Dobrowolski *et al.*, 1997; Hettmann *et al.*, 2000).

As miosinas de *T. gondii* TgM-A e TgM-D, pertencentes ao grupo de miosinas classe XIV, encontram-se ligadas fortemente à membrana plasmática dos parasitos. Os domínios N-terminais destas miosinas efetuam a atividade motora enquanto suas caudas C-terminais são responsáveis pela ligação com a membrana plasmática (Hettmann *et al.*, 2000). Foi demonstrado, através de mutações e deleções, que um par de argininas (RR) presente na extremidade C-terminal é essencial para a localização periférica destas miosinas. A fusão de GFP ("Green Fluorescent Protein") com a cauda C-terminal destas proteínas foi suficiente para conferir localização junto à membrana de taquizoítos de *T. gondii*. Entretanto, a quimera de GFP não se localizou na periferia de células HeLa, o que indica o possível envolvimento de um receptor protéico específico presente em *T. gondii*, mas ausente nas células HeLa. Aparentemente, a interação destas

miosinas com a membrana é saturável, o que também pode ser interpretado como indício do envolvimento de um receptor (Hettmann *et al.*, 2000).

Como o peptídeo PW2 apresenta duas cargas positivas, sendo uma delas (R9) extremamente conservada durante a seleção por “phage display”, existe a possibilidade do peptídeo estar interagindo com estes receptores hipotéticos possivelmente presentes na membrana externa dos esporozoítos de *Eimeria*. Possivelmente, PW2 age saturando este receptor hipotético, impedindo sua interação com as moléculas de miosina do sistema motor do parasito. A existência deste receptor poderia explicar a seletividade da ação antimicrobiana de PW2 bem como a sua atividade inibitória no processo de invasão celular de esporozoítos mesmo em concentrações baixas onde não foram observados danos visíveis à superfície da membrana dos esporozoítos. Outra hipótese seria a de que o peptídeo PW2 quando ligado à membrana do parasito prejudicaria indiretamente a interação das miosinas por repulsão de cargas. Em ambos os casos, a conexão entre a maquinaria motora associada ao sistema de membranas do parasito e as proteínas adesivas secretadas em sua superfície seria prejudicada, impedindo a transferência da força motriz gerada pelas moléculas de miosina, reduzindo portanto a eficiência do processo de invasão celular dos parasitos.

Em estudo recente também foi demonstrado que o parasito *Toxoplasma gondii* possui um citoesqueleto extra associado à membrana interna da película, aparentemente sendo responsável pela manutenção da forma e resistência mecânica da célula. Esta estrutura (“subpellicular network”) composta por duas proteínas; TgIMC1 e TgIMC2 cerca o citoesqueleto de microtúbulos do parasito. A

existência de uma proteína homóloga à TgIMC1 em *Plasmodium falciparum* é um indicativo de que este componente extra de citoesqueleto esteja presente em todos os parasitos do filo Apicomplexa. A rigidez e morfologia dos parasitos seriam muito importantes para garantir a transferência e orientação adequadas da força motriz gerada pela maquinaria de actina e miosina que se encontra associada ao sistema de membranas da película das formas invasivas dos parasitos (Mann & Beckers, 2001). A interação de PW2 com a membrana externa de esporozoítos de *Eimeria* pode estar prejudicando a integração entre este citoesqueleto membranoso e a membrana externa, seja por ação indireta devido à alterações físico-químicas na membrana devido à interação do peptídeo com os lipídios, ou por ligação a um eventual receptor protéico responsável pela conexão entre a camada lipídica e os filamentos do citoesqueleto do parasito.

A elucidação dos mecanismos envolvidos tanto no processo de invasão de parasitos do filo Apicomplexa, quanto no sítio e modo de ação dos peptídeos antimicrobianos ainda está em andamento.

7- Conclusões

- Os fagos selecionados a partir de três bibliotecas de “phage display” contra esporozoítos vivos de *E. acervulina* apresentaram em seus insertos uma elevada convergência para peptídeos catiônicos, tendo em comum a ocorrência de um duplo triptofano acompanhado de um aminoácido de carga positiva (WWR ou WWK). O peptídeo de maior ocorrência (HPLKQYWWRPSI), apresentando 26 repetições entre 56 clones seqüenciados, foi obtido a partir da biblioteca de 12 aminoácidos. Este dodecapeptídeo foi sintetizado quimicamente e nomeado PW2.

- PW2 apresenta semelhança em composição com os peptídeos antimicrobianos indólicos derivados de neutrófilos, indolicidina e tritripticina. PW2 também apresenta semelhança com peptídeos antimicrobianos ricos em triptofano obtidos através de bibliotecas combinatórias de peptídeos sintéticos.

- O motivo WW+ (WWK ou WWR) pode ser encontrado em domínios C-terminais de proteínas de plantas pertencentes à classe das tioninas. Estas proteínas (puroindolinas e Ace-AMP1) apresentam atividade antifúngica e antibacteriana *in vitro*.

- PW2 demonstrou atividade anticoccidiana contra esporozoítos de *E. acervulina* e *E. tenella* de acordo com os ensaios de invasão celular *in vitro*. PW2 reduziu em torno de 75% a taxa de penetração dos esporozoítos de ambas as espécies estudadas em baixas concentrações (1 µg/ml ou 0,63 µM).

- PW2 aumenta a permeabilidade da membrana dos esporozoítos de *Eimeria*. O modo de ação proposto para diversos peptídeos antimicrobianos naturais envolve a permeabilização da membrana microbiana. Assim sendo, PW2 pode ser considerado o primeiro peptídeo antimicrobiano obtido por “phage display”.

- PW2 provoca danos visíveis à superfície de esporozoítos de *Eimeria acervulina* em concentrações altas (50 e 100 µg/ml). Nestas concentrações, foram observados a formação de micelas e grandes poros com vazamento de material citoplasmático. Os esporozoítos também demonstraram tendência a formar agregados de células.

- PW2 apresenta pouca ou nenhuma atividade *in vitro* contra células primárias de rim de galinha ou contra os parasitos heterólogos *Crithidia fasciculata* e *Trypanosoma cruzi*.

- PW2 não demonstrou atividade antibacteriana em concentrações de até 200 µg/ml (126 µM).

- PW2 demonstrou atividade hemolítica muito reduzida após 6 horas de incubação com alta concentração de peptídeo (100 µg/ml). A taxa de hemólise foi muito próxima aos valores obtidos nos controles negativos com solução tampão isotônica o que indica provável baixa toxicidade do peptídeo a aves e mamíferos.

- PW2 apresentou atividade antifúngica *in vitro* de largo espectro em concentrações em torno de 25-50 µg/ml (15-31 µM).

- PW2 possui afinidade por micelas membranomiméticas de SDS e lipossomos de carga negativa de acordo com estudos de fluorescência do triptofano, dicroísmo circular e ressonância magnética nuclear.

- Os estudos acerca da estrutura tridimensional de PW2 ligado a micelas membranomiméticas de SDS indicaram que os aminoácidos mais importantes para interação do peptídeo são K4, Y6, W7, W8 e R9. Na estrutura, as cadeias laterais dos resíduos K4, Y6, W8 e R9 estão voltadas para a mesma face sendo esta o provável ponto de contato entre o peptídeo e a micela. W7, P2 e P10 compõem o centro hidrofóbico da estrutura.

- Os dados adquiridos através dos diversos experimentos realizados apontam para a membrana externa como o provável sítio de ação de PW2.

8- Perspectivas para o Futuro

O peptídeo PW2 demonstrou possuir elevada atividade anticoccidiana em baixas concentrações (menores que 1 μ M) onde não foram observados efeitos adversos sobre células de mamíferos e aves. Os testes de toxicidade de PW2 foram realizados em concentração 100 vezes superior à concentração capaz de produzir 75% de efeito inibitório na invasão celular *in vitro* de esporozoítos de *Eimeria acervulina* e *Eimeria tenella*. Esta especificidade é uma vantagem em relação aos peptídeos antimicrobianos naturais ricos em triptofano indolicidina e tritripticina que são tóxicos às células do hospedeiro (Selsted *et al.*, 1992; Lawyer *et al.*, 1996; Ahmad *et al.*, 1995).

Entretanto, os resultados, até então, foram obtidos *in vitro*, fazendo-se necessários diversos testes *in vivo* que comprovem a eficácia do peptídeo no combate à coccidiose e a baixa toxicidade de PW2. Para que estes testes sejam possíveis é necessária a obtenção de grande quantidade do peptídeo. A produção em larga escala de PW2 através de síntese química é dispendiosa, necessitando a aplicação de muitos recursos financeiros. Assim sendo, a evolução do projeto deve envolver, no futuro, métodos de produção menos dispendiosos e acessíveis como a expressão em organismos geneticamente modificados.

Diversos peptídeos antimicrobianos são produzidos e armazenados fundidos a um precursor que anula o efeito tóxico destes compostos, e isto é verdade para a indolicidina por exemplo (Selsted *et al.*, 1992; Ahmad *et al.*, 1995;

Schibli). Desta forma a expressão de PW2 pode envolver a fusão com um precursor, bem como estratégias de endereçamento celular e clivagem específicas para a obtenção da forma ativa do peptídeo.

A eficácia dos peptídeos antimicrobianos pode ser reduzida pela ação de proteases do hospedeiro de modo que também são interessantes estudos com peptídeos análogos a PW2, desenhados de forma a conter aminoácidos exóticos ou modificações que inibam a atividade de proteases. A produção de variantes de PW2, como peptídeos com mais carga positiva ou com maior número de aminoácidos aromáticos também seria importante na possível obtenção de peptídeos mais potentes, assim como na elucidação do mecanismo de ação de PW2.

A atividade antifúngica de PW2 também torna interessante a eventual produção de plantas transgênicas resistentes ao ataque por fungos fitopatogênicos. A produção de sementes de milho transgênico expressando PW2 pode possuir potencial na prevenção de ataque por fungos durante a silagem das sementes assim como permitir a eventual produção a baixos custos de ração de frango com atividade anticoccidiana e enriquecida em triptofano.

Outro possível caminho para o uso do peptídeo PW2 no combate à coccidiose envolve a continuidade dos estudos acerca da estrutura tridimensional do peptídeo. Estes estudos podem permitir no futuro o desenho de peptídeos modificados ou análogos químicos sintéticos de PW2. Os análogos químicos sintéticos são imunes à degradação por proteases e, por serem moléculas

menores que os peptídeos, difundem-se com maior facilidade podendo apresentar maior atividade anticoccidiana.

Além das possibilidades do uso de PW2, o presente trabalho apresenta um método de seleção que pode ser empregado na obtenção de novos peptídeos antimicrobianos com atividade mais específica utilizando-se outros agentes patogênicos como alvo. Caso a técnica possua reprodutibilidade, o presente trabalho pode representar um avanço na obtenção de novas drogas de atividade específica e que, possivelmente, possam combater o problema da emergência de resistência aos antibióticos convencionais.

Referências Bibliográficas

- Ahmad**, I.; Perkins, W.R.; Lupan, D.M.; Selsted, M.E.; Janoff, A.S. (1995). Liposomal entrapment of the neutrophil-derived peptide indolicidin endows it with in vivo antifungal activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1237**, pp. 109-114.
- Aley**, S.B.; Zimmerman, M.; Hetsko, M.; Selsted, M.E. & Gillin, F.D. (1994). Killing of *Giardia lamblia* by cryptdins and cationic neutrophil peptides. *Infect. Immun.*, **62(12)**, pp. 5397-5403.
- Al-Obeidi**, F.; Hruby, V. J. & Sawyer, T. K. (1998). Review: Peptide and Peptidomimetic Libraries. *Molecular Diversity and Drug Design. Molecular Biotechnology*, **9**, pp. 205-223.
- Andreu**, D. & Rivas, L. (1998) Animal antimicrobial peptides: An overview. *Biopolymers*, **47**, pp. 415-433.
- Augustine**, P. (2001). Cell: sporozoite interactions and invasion by apicomplexan parasites of the genus *Eimeria*. *International Journal for Parasitology*, **31**, pp. 1-8.
- Augustine**, P. & Danforth, H.D. (1984). Effects of cationized ferritin and neuraminidase on invasion of cultured cells by *Eimeria meleagridis* sporozoites. *Journal of Protozoology*, **31(1)**, pp. 140-144.
- Arrowood**, M.J.; Jaynes, J.M.; Healey, M.C. (1991). *In vitro* activities of lytic peptides against the sporozoites of *Cryptosporidium parvum*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **35**, pp. 224-227.

- Barr, S.C.; Rose, D.; Jaynes, J.M.** (1995). Activity of lytic peptides against intracellular *Trypanosoma cruzi* amastigotes *in vitro* and parasitemias in mice. *J. Parasitol.*, **81**, pp. 974-978.
- Barry, M. A.; Dower, W. J. & Johnston, S. A.** (1996). Toward cell-targeting gene therapy vectors: Selection of cell-binding peptides from random peptide-presenting phage libraries. *Nature Medicine*, **2(3)**, pp. 299-305.
- Bax, A. & Davis, D.G.** (1985). MLEV-17-Based Two-dimensional homonuclear magnetisation transfer spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **65**, 355–360.
- Benhar, I.** (2001). Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnology Advances*, **19**, pp. 1-33.
- Bierbaum, G. & Sahl, H. G.** (1985) Induction of autolysis of staphylococci by the basic peptide antibiotics Pep 5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes. *Arch. Microbiol.*, **141**, pp. 249-254.
- Blochet, Jean-Erik, Chevalier, C., Forest, E., Pebay-Peyroula, E., Gautier, Marie-Francoise, Joudrier, P., Pézolet, M., Marion, D.** (1993) Complete amino acid sequence of puroindoline, a new basic and cysteine-rich protein with an unique tryptophan-rich domain, isolated from wheat endosperm by Triton X-114 phase partitioning. *FEBS Letters*, **329**, 336-340.
- Blondelle, S.E. & Houghten, R.A.** (1996). Novel antimicrobial compounds identified using synthetic combinatorial library technology. *TIBTECH*, **14**, pp. 60-65.
- Blondelle, S.E. & Lohner, K.** (2000). Combinatorial libraries: A tool to design antimicrobial and antifungal peptide analogues having lytic specificities for structure-activity relationship studies. *Biopolymers*, **55**, pp. 74-87.

- Brunger, A. T.; Adams, P. D.; Clore, G. M.; Delano, W. L.; Gros, P.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Jiang, J. S.; Kuszewski, J.; Nilges, N.; Pannu, N. S.; Read, R. J.; Rice, L. M.; Simonson, T. and Warren, G. L. (1998).** Crystallography and NMR system (CNS): A new software system for macromolecular structure determination. *Acta Cryst.* **D54**, 905-921. <http://cns.csb.yale.edu/v1.1/>
- Bulet, P.; Hetru, C.; Dimarcq, Jean-Luc & Hoffman, D. (1999)** Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental and Comparative Immunology*, **23**, pp. 329-344.
- Bumstead, J.M. & Tomley, F.M. (1997).** *Use of in vitro culture to examine the role of microneme proteins in host cell invasion by Eimeria tenella.* In: VIIIth International Coccidiosis Conference and European Union COST820 Workshop, September 1997, Keble College, Oxford, UK. Caderno de trabalhos, página 77.
- Bumstead, J.M. & Tomley, F.M. (2000).** Induction of secretion and surface capping of microneme proteins in *Eimeria tenella*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **110**, pp. 311-321.
- Bhogal, B.S.; Miller, G.A.; Anderson, A.C.; Jessee, E.J.; Strausberg, S.; McCandliss, R.; Nagle, J. & Strausberg, R.L. (1992).** Potential of a recombinant antigen as a prophylactic vaccine for day old broiler chickens against *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections. *Vet. Imm. And Immunopath.*, **31**. pp. 323-335.
- Camargo E.P. (1964).** Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop S Paulo*, **6**, pp. 93-100.
- Cammue, B. P. A.; Thevissen, K.; Hendriks, M.; Eggermont, K.; Goderis, I. J.; Proost, P.; Van Damme, J.; Osborn, R. W.; Guerbette, F.; Kader, J. C.; Broekaert, W. F.**

- (1995). A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiol.*, **109**, pp. 445-455.
- Castle**, M.D.; Jenkins, M.C.; Danforth, H.D. & Lillehoj, H.S. (1991). Characterization of a recombinant *Eimeria acervulina* antigen expressed in sporozoite and merozoite developmental stages. *Journal of Parasitology*, **77**(3), pp. 384-390.
- Castro**, A.G.M. (1994). *Situação atual da coccidiose no Brasil. Importância Econômica*. Simpósio Internacional sobre Coccidiose, Santos-SP-Brasil, Maio 1994. Caderno de trabalhos, pp. 45-54.
- Chapman**, H.D. (1978). Studies on the excystation of different species of *Eimeria* in vitro. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, **56**, pp. 115-121.
- Chapman**, H.D. (1993). Resistance to anticoccidial drugs in fowl. *Parasitol Today*, **9**, pp.159-162.
- Coombs**, G. H.; Denton, H.; Brown, S. M. A. & Thong, Kam-Wah (1997) Biochemistry of the Coccidia. *Advances in Parasitology*, **39**, pp. 141-226.
- Crane**, M.S.J.; Goggin, B.; Pelegriño, R.M.; Ravino, O.J.; Lange, C.; Karkhanis, Y.D.; Kirk, K.E. & Chakraborty, P.R. (1991). Cross protection against four species of chicken coccidia with a single recombinant antigen. *Infect. and Immunity*, **59**(4), pp. 1271-1277.
- Cwirla**, S.E.; Peters, E.A.; Barret, R.W. & Dower, W.J. (1990). Peptides of Phage; a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc. Acad. Sci., U.S.A.*, **87**, pp. 6378-6382.
- Dalton**, J.P. & Mulcahy, G. (2001). Parasite vaccines - a reality? *Veterinary Parasitology*, **98**, pp. 149-167.

- Danforth, H.D. & Augustine, P.C. (1989).** *Coccidia vaccines. In: Veterinary Protozoan and Hemoparasite Vaccines.* I. Wright (ed.). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, pp. 165-175.
- Danforth, H.D.; Augustine, P.C. & Jenkins, M.C. (1994).** *Desenvolvimento de vacinas: situação atual e perspectivas.* Simpósio Internacional sobre Coccidiose, Santos-SP-Brasil, Maio 1994. Caderno de trabalhos, pp. 125-140.
- De Souza, W. (1995).** Structural organization of the cell surface of pathogenic protozoa. *Micron*, **26(5)**, pp. 405-430.
- Delaglio, F.; Grzesiek, S.; Zhu, G.; Vuister, G. W.; Pfeifer, J., & Bax, A.** NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. <http://hhmi.umbc.edu/toolkit/processing/nih/NMRPipe.html>
- Dobrowolski, J.M.; Carruthers, V.B. and David, S.L. (1997)** Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Molecular Microbiology*, **26(1)**, pp. 163-173.
- Doorbar, J. & Winter, G. (1994).** Isolation of a peptide antagonist to the thrombin receptor using phage display. *J. Mol. Biol.*, **244**, pp. 361-369.
- Doran, D.J. (1971).** Increasing the yield of *Eimeria tenella* oocysts in cell culture. *J. Parasitol.*, **57**, pp. 891-900.
- Dowbenko, D.; Spencer, S.; Quan, C. & Lasky, L. A. (1997).** Identification of a novel polyproline recognition site in the cytoskeletal associated protein, proline serine threonine phosphatase interacting protein. *Journal of Biological Chemistry*, **273(2)**, pp. 989-996.
- Dubremetz, J. F. (1993).** *Apical organelles (rhoptries, micronemes, dense granules) and host cell invasion by Coccidia: What do we know now?* In: Proceedings of the

- Vlth Coccidiosis Conference. J.R. Barta & M.A. Fernando Eds. Guelph, Ontario. pp. 3-9.
- Dunn, P. P. J.; Bumstead, J.M.& Tomley, F.M.** (1996). Sequence, expression and localization of calmodulin-domain protein kinases in *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima*. *Parasitology*, **113**, pp. 439-448.
- Ehret-Sabatier, L.; Loew, D.; Goyffon, M. et al.** (1996). Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. *J. Biol. Chem.*, **271**, pp. 29537-29544.
- Eftink, M.R. & Ghiron, C.A.** (1976). Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies. *Biochemistry*, **15**, pp. 672-680.
- El Jastimi, R.; Edwards, K. & Lafleur, M.** (1999). Characterization of permeability and morphological perturbations induced by Nisin on phosphatidylcholine membranes. *Biphs. J.*, **77(2)**, pp. 842-852.
- Falla, T.J.; Karunaratne, D.N.; Hancock, R.E.** (1996). Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. *J. Biol. Chem.*, **271(32)**, pp. 19298-19303.
- Friedrich, C. L.; Rozek, A.; Patrzykat, A.; Hancock, R. E. W.** (2001) Structure and mechanism of action of an indolicidin peptide derivative with improved activity against gram-positive bacteria. *J. Biol. Chem.*, **276**, pp. 24015-24022.
- Galli, F. et al.**, (1980). *Manual de Fitopatologia vol. II*, Editora Agronômica Ceres LTDA.
- Ganz, T. & Lehrer, R.I.** (2001). Antimicrobial peptides in innate immunity. In: *Development of novel antimicrobial agents: Emerging strategies.* (Ed. Karl Lohner). Horizon Scientific Press, Wymondham, UK. ISBN 1-898486-23-9.

- Gatineau, E., Toma, F., Montenay-Garestier, Th., Takeshi, M., Fromageot, P., Ménez, A. (1987)** Role of Tyrosine and Tryptophan residues in the structure-activity relationships of a cardiotoxin from *Naja nigricollis* venom. *Biochemistry* **26**, pp. 8046-8055.
- Goodson, R. J.; Doyle, M. V.; Kaufman, S. E. & Rosenberg, S. (1994).** High-affinity urokinase receptor antagonists identified with bacteriophage peptide display. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, pp. 7129-7133.
- Greif, G. & Entzeroth, R. (1996).** *Eimeria tenella*: Localization of rhoptry antigens during parasite-host cell interactions by a rhoptry-specific monoclonal antibody in PCKC culture. *Applied Parasitology*, **37**, pp. 253-259.
- Hancock, R.E.W. & Lehrer R. (1998)** Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotech.*, **16**, pp. 82-88.
- Hancock, R.E.W. & Diamond, G. (2000)** The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in Microbiology*, **8(9)**, pp. 402-410.
- Hancock, R.E.W. & Scott, M.G. (2000).** The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc. Acad. Sci., U.S.A.*, **97(16)**, pp. 8856-8861.
- Hettmann, C.; Herm, A.; Geiter, A.; Frank, B.; Schwartz, E.; Soldati, T. & Soldati, D. (2000).** A dibasic motif in the tail of a class XIV apicomplexan myosin is an essential determinant of plasma membrane localization. *Molecular Biology of the Cell*, **11**, pp. 1385-1400.
- Hudson, L. & Hay, F. C. (1991).** *In: Practical Immunology* (3^a ed.) Blackwell Scientific Publications, Oxford. 507 pp.

- Hyberts, S. G.; Goldberg, M. S.; Havel, T. F. & Wagner, G. (1992).** The solution structure of eglin c based on measurements on many NOEs and coupling constants and its comparison with X-ray structures. *Protein Sci.* **1**, 736-751.
- Jaynes, J.M.; Burton, C.A.; Barr, S.B. et al. (1998)** *In vitro* cytotoxic effect of novel lytic peptides on *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma cruzi*. *FASEB J.*, **2**, pp. 2878-2883.
- Jeffers, T.K. (1989).** *Anticoccidial drug resistance : a review with emphasis on the polyether ionophores.* Coccidia and intestinal coccidiomorphs. In: Vith Coccidiosis Conference, Tours (France), October 1989. Ed INRA Publ., 1989, pp. 295-308.
- Jenkins, M.C. & Dame, J.B. (1987).** Identification of immunodominant surface antigens of *Eimeria acervulina* sporozoites and merozoites. *Mol. Biochem. Parasitology*, **25**, pp. 155-164.
- Jenkins, M.C.; Lillehoj, H.S. & Dame, J.B. (1988).** *Eimeria acervulina*: DNA cloning and characterization of recombinant sporozoites and merozoites antigens. *Experimental Parasitology*, **66**, pp. 96-107.
- Jenkins, M.C.; Lillehoj, H.S.; Barta, J.R.; Danforth, H.D. & Strohlein, D.A. (1990).** *Eimeria acervulina*: Cloning of a cDNA encoding an immunogenic region of several related merozoite surface and rhoptry proteins. *Experimental Parasitology*, **70**, pp. 353-362.
- Jenkins, M.C.; Castle, M.D.; Danforth, H.D. (1991).** Protective immunization against the intestinal parasite *Eimeria acervulina* with recombinant coccidial antigen. *Poultry Science*, **70**, pp. 539-547.

- Johnson, B. A. & Blevins, R. A. (1994)** NMRView: Software for the Visualization and Analysis of Nuclear Magnetic Resonance Data. *Journal of Biomolecular NMR*, **4**, 603-614. <http://www.nmrview.com>
- Joyner, L.P. & Norton, C.C. (1976).** The immunity arising from continuous low-level infection with *Eimeria maxima* and *Eimeria acervulina*. *Parasitology*, **72**, pp. 115-125.
- Karkhanis, Y.D.; Nollstadt, K.A.; Boghal, B.S.; Ravino, O.; Pellegrino, R.; Crane, M.S.; Murray, P.K. & Turner, M.J. (1991).** Purification and Characterization of a protective antigen for *Eimeria tenella*. *Infection and Immunity*, **59**, pp. 983-989.
- Kawazoe, U.; Tomley, F.M. & Frasier, J.A. (1992).** Fractionation and antigenic characterization of organelles of *Eimeria tenella* sporozoites. *Parasitology*, **104**, pp. 1-9.
- Kawazoe, U. (1994).** *Biologia*. Simpósio Internacional sobre Coccidiose, Santos-SP-Brasil, Maio 1994. Caderno de trabalhos, pp. 1-6.
- Kawazoe, U. & diFabio, J. (1994).** Resistance to diclazuril in field isolates of *Eimeria* species obtained from commercial broiler flocks in Brazil. *Avian Pathology*, **23**, pp. 305-311.
- Koivunem, E.; Gay, D.A. & Ruoslahti, E. (1993).** Selection of peptides binding to the $\alpha 5 \beta 1$ integrin from phage-display library. *J. Bio. Chem.*, **269**, pp. 20205-20210.
- Ko, C.; Smith, C.K. II & McDonell, M. (1990).** Identification and characterization of a target antigen of a monoclonal antibody against *Eimeria tenella* merozoites. *Mol. and Biochem. Parasitology*, **41**, pp. 53-64.

- Koradi, R.; Billeter, M. & Wüthrich, K. (1996).** MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graphics*, **14**, 51-55.
<http://www.mol.biol.ethz.ch/wuthrich/software/molmol/>
- Kragol, G. (2001).** The antibacterial peptide Pyrrhocoricin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry*, **40**, pp. 3016-3026.
- Ladokhin, A.S. & White, S.H. (2001)** 'Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles by melitin. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1514**, pp. 253-260.
- Laurent, F.; Bordieu, C.; Kakanji, M.; Yvoré, P. & Péry, P. (1994).** The immunodominant *Eimeria acervulina* sporozoite antigen previously described as p160/p240 is a 19-kilodalton antigen present in several *Eimeria* species. *Mol. and Biochem. Parasitology*, **63**, pp. 79-86.
- Lawyer, C.; Pai, S.; Watabe, M. et al. (1996).** Antimicrobial activity of a 13 amino acid tryptophan-rich peptide derived from a putative porcine precursor protein of a novel family of antibacterial peptides. *FEBS Lett.*, **390**, pp. 95-98.
- Le Bihan, T.; Blochet, J. E.; Desormeaux, A.; Marion, D.; Pezolet, M. (1996)** Determination of the secondary structure and conformation of puroidolines by infrared and Raman spectroscopy. *Biochemistry*, **35**, pp. 12712-12722.
- Lillehoj, H.S. (1987).** Effects of immunosuppression on avian coccidiosis: cyclosporin A but not hormonal bursectomy abrogates host protective immunity. *Infection and Immunity*, **75**, pp. 1616-1621.
- Lillehoj, H.S. & Trout, J.M. (1993).** Coccidia: a review of recent advances on immunity and vaccine development. *Avian Pathology*, **22**, pp. 3-31.

- Lillehoj, H.S. & Trout, J.M. (1994).** CD8+ T Cell-Coccidia Interactions. *Parasitology Today*, **10(1)**, pp. 10-14.
- Lohner, K. (2001).** The role of membrane lipid composition in cell targeting of antimicrobial peptides. In: *Development of novel antimicrobial agents: Emerging strategies*. (Ed. Karl Lohner). Horizon Scientific Press, Wymondham, UK. ISBN 1-898486-23-9.
- Long, P.L.; Millard, B.J.; Joyner, L.P. & Norton, C.C. (1976).** A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. *Folia Vet. Lat.*, **6**, pp. 201-217.
- Long, P.L. (1987).** Coccidiosis in Poultry. *CRC Critical Reviews in Poultry Biology*, **1(1)**, pp. 25-50.
- Lopez-Bernard, F.; Del Cacho, E.; Gallego, M.; Quilez, J. & Sanches-Acedo, C. (1996).** Identification of a fibronectin-like molecule on *Eimeria tenella*. *Parasitology*, **113**, pp. 505-510.
- Maget-Dana, R. (1999).** The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1462**, pp. 109-140.
- Maniatis, T.; Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1984).** *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Mann, T. & Beckers, C. (2001)** Characterization of the subpellicular network, a filamentous membrane skeletal component in the parasite *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **115**, pp.257-268.

- Martin, A.; Danforth, H.D.; Jaynes, J.M.** (1999). Evaluation of the effect of peptidyl membrane-interactive molecules on avian coccidian. *Parasitol Res.*, **85**, pp. 331-336.
- Matsuzaki, K.** (2001). Molecular mechanisms of membrane perturbation by antimicrobial peptides. *Development of Novel Antimicrobial Agents: Emerging Strategies*. Ed. Karl Lohner. Horizon Scientific Press (2001), Norfolk-England. 167-181.
- Mayer, L. D.; Hope, M. J.; Cullis, P. R. & Janoff, A. S.** (1985). Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, **817(1)**, pp. 193-196.
- McDonald, V.; Rose, M.E. & Jeffers, T.K.** (1986). *Eimeria tenella*: Immunogenicity of the first generation of schizogony. *Parasitology*, **93**, pp. 1-7.
- Mencher, D.; Pugatsch, T. & Wallach, M.** (1989). Antigenic proteins of *Eimeria maxima* gametocytes: Cell-free translation and detection with recovered chicken serum. *Experimental Parasitology*, **68**, pp. 40-48.
- Moll, G.N.; Konings, W.N. & Driessen, A.J.M.** (1998). The lantibiotic nisin induces transmembrane movement of a fluorescent phospholipid. *Journal of Bacteriology*, **180(24)**, pp.6565-6570.
- Mordue, D.G.; Desai, N.; Dustin, M. & Sibley, D.** (1999). Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J. Exp. Med.*, **190**, pp.1783-1792.

- Nagpal, S.;** Gupta, V.; Kaur, K. J. & Salunke, D. M. (1999). Structure-function analysis of tritrypticin, an antibacterial peptide of innate immune origin. *J. Biol. Chem.*, **274(33)**, pp. 23296-23304.
- Oren, Z. & Shai, Y.** (1998). Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, **47**, pp. 451-463.
- Parmley, S.F. & Smith, G.P.** (1988). Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene*, **73**, pp. 305-318.
- Piotto, M.;** Sandek, V. & Sklenar, V. (1992). Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR*, **2**, 661-665.
- Pressman, B.C.** (1976). Biological applications of ionophores. *Annual Review of Biochemistry*, **45**, pp. 501-530.
- Polozov, I.V.,** Polozova, A.I.; Molotkovsky, J.G. & Epand, R.M. (1997). Amphipathic peptide affects the lateral domain organization of lipid bilayers. *Biochim. et Biophys. Acta*, **1328**, pp. 125-139.
- Robert, R.;** Mauras, G.; Senet, J.M. & Hocquet, P. (1982). Purification of *Toxoplasma gondii* suspensions from mice peritoneal exudate. *Biomed. Pharmacol.*, **36**, pp. 98-100.
- Robinson, W. E., Jr.,** McDougall, B., Tran, D., Selsted, M. E. (1998) Anti-HIV-1 activity of indolicidin, an antimicrobial peptide from neutrophils. *J. Leukocyte Biol.*, **63**, pp. 94-100.

- Rozek, A., Friedrich, C. L. and Hancock, R. E. W. (2000)** Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry*, **39**, pp. 15765-15774.
- Ruff, M.D. (1999).** Important parasites in poultry production systems. *Veterinary Parasitology*, **84**, pp. 337-347.
- Ruff, M. D. & Danforth, H. D. (1996).** Resistance of coccidia to medications. In: Proc. XX World's Poult. Cong. World's Poult. Sci. Assoc., New Delhi, India. pp. 427-430.
- Sangster, N.C. (2001).** Managing parasiticide resistance. *Veterinary Parasitology*, **98**, pp. 89-109.
- SAS Institute Inc. SAS/STATIM User's guide. Release 6.03. Cary NC, editor. SAS Institute Inc 1988.**
- Sasai, K.; Lillehoj H.S.; Matsuda, H. & Wergin, W.P. (1996).** Characterization of a chicken monoclonal antibody that recognizes the apical complex of *Eimeria acervulina* sporozoites and partially inhibits sporozoite invasion of CD8+ lymphocytes in vitro. *Journal of Parasitology*, **82(1)**, pp. 82-87.
- Sayle, R. A.; Milner-White, E. J. (1995).** RASMOL: biomolecular graphics for all. *Trends in Biochemical Sciences*, **20(9)**, pp. 374-376.
- Schibli, D.J.; Hwang, P.M. & Vogel, H.J. (1999).** Structure of the antimicrobial peptide tritrpticin bound to micelles: A distinct membrane-bound peptide fold. *Biochemistry*, **38**, pp. 16749-16755.
- Schmatz, D.M.; Crane, M.ST. J. & Murray, P.K. (1984).** Purification of *Eimeria* sporozoites by DE-52 anion exchange chromatography. *Journal of Protozoology*, **31**, pp. 181-183.

- Schreier, S.; Malheiros, S.V.P. & de Paula, E. (2000)** Surface active drugs: self-association and interactions with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1508**, pp. 210-234.
- Schröder, Jens-M. (1999).** Epithelial peptide antibiotics. *Biochemical Farmacology*, **57**, pp. 121-134.
- Scott, J.K. & Smith, G.P. (1990).** Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*, **249**, pp. 386-390.
- Selsted, M.E.; Novotny, M.J.; Morris, W.L. et al. (1992).** Indolicidin, a novel tridecapeptide amide from neutrophils. *J. Biol. Chem.*, **267**, pp. 4292-4295.
- Shai, Y. (1999)** Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, **1462**, pp. 55-70.
- Shiratsuchi, T.; Futamura, M.; Oda, K.; Nishimori, H.; Nakamura, Y. & Tokino, T. (1998).** Cloning and characterization of BAI-associated protein 1: A PDZ domain-containing protein that interacts with Bal1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **247**, pp. 597-604.
- Shirley, M.W. & Millard, B.J. (1986).** Studies on the immunogenicity of seven attenuated lines of *Eimeria* given as a mixture to chickens. *Avian Pathology*, **15**, pp. 629-638.
- Shirley, M.W. & Long, P.L. (1990).** *Control of coccidiosis: immunization with live vaccines*. In: *Coccidiosis of man and domestic animals* (ed. P.L. Long) CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. pp. 322-341.

- Shirley, M.W. & Bedrník, P. (1997).** Live Attenuated Vacines against avian coccidiosis: Success with Precocious and Egg-adapted Lines of *Eimeria*. *Parasitology Today*, **13(12)**, pp. 481-484.
- Silva Jr., P. I.; Daffre, S. & Bulet, P. (2000)** Isolation and characterization of gomesin, an 18-Residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscuria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. *J. Biol. Chem.*, **275**, pp. 33464-33470.
- Sklenar, V.; Piotto, M.; Leppek, R. & Sandek, V. (1993).** Gradient-Tailored Water Suppression for ^1H - ^{15}N HSQC Experiments Optimized to Retain Full Sensitivity *J. Magn. Reson. series A* **102**, 241-245.
- Smith, N. C.; Wallach, M.; Petracca, M.; Braun, R. & Eckert, J. (1994).** Maternal transference of antibodies induced by infection with *Eimeria maxima* partially protects chickens against challenge with *Eimeria tenella*. *Parasitology*, **109**, pp. 551-557.
- Stallbauner, M. & Daisy, K.J. (1988).** The effects of monensin, salinomycin and nicarbazin on field strains of chicken coccidia. *Avian Pathology*, **17**, pp. 793-802.
- Stephan, B.; Rommel, M.; Dauschies, A. & Haberkorn, A. (1997).** Studies of resistance to anticoccidials in *Eimeria* field isolates and pure *Eimeria* strains. *Vet. Parasitol.*, **69**, pp. 19-29.
- Subbalakshmi, C.; Krishnakumari, V.; Nagaraj, R. & Sitaram, N. (1996).** Requirements for antibacterial and hemolytic activities in the bovine neutrophil derived 13-residue peptide indolicidin. *FEBS Letters*, **395**, pp. 48-52.

- Talebi, A. & Mulcahy, G. (1994).** High-resolution mapping of B-cell epitopes within an antigenic sequence from *Eimeria tenella*. *Infection and Immunity*, October-1994. pp. 4202-4207.
- Tassin, S., Borekaert, W. F., Marion, D., Acland, D., Ptak, M., Vovelle, F., Sodano, P. (1998)** Solution structure of Ace-AMP1, a potent antimicrobial protein extracted from onion seeds. Structural analogies with plant nonspecific lipid transfer proteins. *Biochemistry*, **37**, pp. 3623-3637.
- Tiozzo, E.; Rocco, G.; Tossi, A. & Romeo, D. (1998).** Wide-spectrum antibiotic activity of synthetic amphipatic peptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **249**, pp. 202-206.
- Tomley, F. M.; Clarke, L. E.; Kawazoe, U.; Dijkema, R. & Kok, J. J. (1991).** Sequence of the gene encoding na immunodominant microneme protein of *Eimeria tenella*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **49**, pp. 277-288.
- Tomley, F. M. (1994).** Characterization of rhoptry proteins of *Eimeria tenella* sporozoites: Antigenic diversity of rhoptry epitopes within species of the genus *Eimeria* and among three asexual generations of a single species, *E. tenella*. *Infection and Immunity*, October-1994, pp. 4656-4658.
- Tomley, F. M. (1994b).** Antigenic diversity of the asexual developmental stages of *Eimeria tenella*. *Parasite Immunology*, **16**, pp. 407-413.
- Tomley, F. M.; Bumstead, J. M.; Billington, K. J. & Dunn, P. P. J. (1996).** Molecular cloning and characterization of a novel acidic microneme protein (Et mic-2) from the apicomplexan protozoan parasite, *Eimeria tenella*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **79**, pp. 195-206.

- Vermeulen, A.N.; Schaap, D.C. & Scheters, Th.P.M.** (2001). Control of coccidiosis in chickens by vaccination. *Veterinary Parasitology*, **100**, pp. 13-20.
- Vervelde, L.; Vermeulen, A. N. & Jeurissen, S. H. M.** (1993). Common epitopes on *Eimeria tenella* sporozoites and cecal epithelium of chickens. *Infection and Immunity*, October-1993, pp. 4504-4506.
- Wallach, M.; Mencher, D.; Yarus, S.; Pillemer, G.; Halabi, A. & Pugatsch, T.** (1989). *Eimeria maxima*: Identification of gametocyte protein antigens. *Experimental Parasitology*, **68**, pp. 46-49.
- Westerhoff, H. V.; Juretic, D.; Hendler, R. W.; Zasloff, M.** (1989) Magainins and the disruption of membrane-linked free-energy transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, pp. 6597-6601.
- White, S.H.; Ladokhin, A.S.; Jayasinghe, S. & Hristova, K.** (2001). How membranes shape protein structure. *The Journal of Biological Chemistry*, **276(35)**, pp. 32395-32398.
- Williams, R.B.** (1997). *Economic importance of Eimeria mitis, E. praecox and E. acervulina infections in chickens*. In: VIIth International Coccidiosis Conference and European Union COST820 Workshop, September 1997, Keble College, Oxford, UK. Worksheet, pp. 39.
- Wimley W.C., White S.J.** (1996). Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nat. Struct. Biol.*, **3**, pp. 842-848.
- Woody, R. W.** (1994) Contributions of tryptophan side chains to the far-ultraviolet circular dichroism of proteins. *Eur. Biophys. J.*, **23**, pp. 253-262.

- Wu, M.; Maier, E.; Benz, R. & Hancock, R.E.W. (1999).** Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **38**, pp. 7235-7242.
- Wütrich, K. (1986).** *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley-Interscience, New York.
- Yang, L.; Weiss, T. M.; Lehrer, R. I.; Huang, H. W. (2000)** Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophys. J.* **79**, pp. 2002-2009.
- Yang, J. J.; Pitkeathly, M. and Radford, S. E. (1994)** Far-UV circular dichroism reveals a conformational switch in a peptide fragment from the β -sheet of hen lysozyme. *Biochemistry*, **33**, pp. 7345-7353.
- Yun, C.H.; Lilehoj, H.S. & Lilehoj, E.P. (2000).** Intestinal immune responses to coccidiosis. *Developmental and Comparative Immunology*, **24**, pp. 303-324.
- Zasloff, M. (2002).** Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389-395.
- Zhang, L.; Rozek, A. & Hancock, R.E.W. (2001).** Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, **276(38)**, pp. 35714-35722.
- Zhao, H.; Mattila, J. P.; Holopainen, J. M.; Kinnunen, P. K. J. (2001)** Comparison of the membrane association of two antimicrobial peptides, magainin 2 and indolicidin. *Biophys. J.*, **81**, pp. 2979-2991.

Anexo 1

Avian anticoccidial activity of a novel membrane-interactive peptide selected from phage display libraries

Arnaldo da Silva Jr, Urara Kawazoe, Fabio F.T. Freitas, Maria Silvia V. Gatti, Heidi Dolder, Robert Ivan Schumacher, Maria Aparecida Juliano, Márcio José da Silva and Adilson Leite. (2002)

Molecular and Biochemical Parasitology, vol. 120, pp. 53-60.

Avian anticoccidial activity of a novel membrane-interactive peptide selected from phage display libraries

Arnaldo da Silva Jr ^a, Urara Kawazoe ^b, Fabio F.T. Freitas ^b, Maria Silvia V. Gatti ^c, Heidi Dolder ^d, Robert Ivan Schumacher ^e, Maria Aparecida Juliano ^f, Márcio José da Silva ^a, Adilson Leite ^{a,*}

^a Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária Zeferino Vaz, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

^b Departamento de Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil

^c Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil

^d Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil

^e Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^f Departamento de Biofísica, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Received 18 July 2001; received in revised form 12 November 2001; accepted 14 November 2001

Abstract

In the present work, we describe the discovery of PW2, a novel peptide presenting in vitro activity against *Eimeria acervulina* and *E. tenella* sporozoites. PW2 was selected from phage display (Ph.D.) peptide libraries by an alternative method of panning using living purified *E. acervulina* sporozoites as targets. Our results showed that the peptide disrupts the sporozoite pellicle, resembling the effect caused by most natural antimicrobial peptides. PW2 peptide was also effective against fungi and showed low activity against *Toxoplasma gondii* tachyzoites, but no activity against *Trypanosoma cruzi*, *Crithidia fasciculata* epimastigotes, and bacteria. Additionally, the parasitocidal concentrations of PW2 produced a very low lytic effect on mammalian and avian cells. The effectiveness against *Eimeria* sporozoites and the absence of adverse effects to host cells indicates that PW2 may be used as a model to generate new drugs for the control of avian coccidiosis. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Anticoccidial peptide; *Eimeria*; Phage display

1. Introduction

Eimeria species are protozoan parasites that cause the economically important disease coccidiosis in poultry. Anticoccidial compounds have kept the disease under control in the last years. However, the extensive use of anticoccidial compounds has led to the selection of resistant strains against all drugs available in the market. As it is becoming increasingly difficult to de-

velop new anticoccidials to replace the old ones, the search for alternative strategies for the control of avian coccidiosis is urgently needed [1,2].

One potential approach to improve the control of avian coccidia is the use of antimicrobial peptides [3]. Natural antimicrobial peptides participate in innate immune systems of animals and plants. Most of these peptides are cationic amphipathic molecules that act on the microbial membrane, producing permeabilization or forming pores and eventually causing cell lysis. This mode of action endows antimicrobial peptides with a broad activity against several bacteria, fungi and protozoal species, and restricts the development of resistance, but usually it causes host cytotoxicity [4,5]. It has been demonstrated that some of these peptides, as well as synthetic ones, exhibit activity against protozoan parasites [3,6–9].

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; Calcein-AM, calcein-acetoxymethyl; HSBS, HEPES sucrose buffer solution; LIT, liver infusion-trypsin; MIC, minimal inhibitory concentration; Ph.D., phage display; SDS, sodium dodecyl sulphate; TBS, tris buffered saline.

* Corresponding author. Tel.: +55-19-3788-1138; fax: +55-19-3788-1089.

E-mail address: aleite@unicamp.br (A. Leite).

Phage display (Ph.D.) has been used frequently for the discovery of novel peptide ligands for receptors, enzymes and antibodies. The fusion of a small-randomized peptide to the coat proteins of a filamentous phage allows the screening of peptides in binding assays without affecting phage infectivity. Furthermore, the amino acid sequence of the selected peptide can be determined by propagation and sequencing of the phage DNA [10,11].

Using Ph.D. peptide libraries, we developed an alternative method of panning, using living sporozoites of *E. acervulina* as a target. Flow cytometry and calcein leakage assays showed that PW2, the peptide that was selected with the highest frequency among the selected peptides, has the ability to permeabilize the trilaminar membrane of the sporozoites.

The effect of the peptide on the invasion of primary chicken-kidney cultured cells by sporozoites of *E. acervulina* and *E. tenella* was also investigated. The visualization of its effects by scanning electron microscopy and the study of some of the peptide physico-chemical properties provided some clues about its mode of action.

2. Material and methods

2.1. Production of protozoan parasites

E. acervulina 'T' and *E. tenella* 'Pa' oocysts were obtained by passage in 4–5-week-old 'hy-line' chickens [12]. Sporozoites were purified using anion-exchange chromatography [13]. *Toxoplasma gondii* 'MC' tachyzoites were obtained from intraperitoneal exudates of infected white mouse *Mus musculus* by washing with phosphate buffer solution, pH 7.2 [14]. *Crithidia fasciculata* 'Y' and *Trypanosoma cruzi* 'CL' epimastigotes were cultivated at 30 °C in Liver infusion-triptose (LIT) medium (LIT; 0.004% NaCl, 0.0004% KCl, 0.008% Na₂PO₄, 0.002% Glucose, 0.005% Triptose, 0.005% liver infusion) [15].

2.2. Peptide selection from Ph.D. libraries

The Ph.D. Peptide Library Kits Ph.D.-7, Ph.D.-C7C, and Ph.D.-12 (New England BioLabs, Cambridge, MA) were used for peptide selection. *E. acervulina* sporozoites (1×10^8 cells) were incubated for 1 h with 2×10^{11} phage from each Ph.D. library in 1 ml of tris buffered saline (TBS) buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mg ml⁻¹ BSA, pH 7.5) containing 5 mg ml⁻¹ of bovine serum albumin (BSA). The unbound phage particles were removed by washing six times with TBS/BSA. The specific bound phage particles were then eluted by incubation with 1 ml of 0.2 M glycine buffer pH 2.2, containing 1 mg ml⁻¹ BSA, for 10 min at room

temperature. The eluted fractions were neutralized with 150 µl of 1 M Tris, pH 9.0. The recovered phage were amplified in *E. coli* ER2537 and partially purified by precipitation with polyethylene glycol. After titration, the eluted phage were submitted to two additional binding/amplification cycles. After the third cycle, DNA of individual phage clones was sequenced (ABI 377, PE Biosystems, Foster City, CA).

2.3. Flow cytometry analysis

Cells were incubated with 100 µg ml⁻¹ (63 µM) of PW2 for 15 min at 37 °C in 10 mM HEPES, pH 7.2 buffer containing 0.25 M sucrose (HEPES sucrose buffer solution [HSBS]) and Sytox Green (Molecular Probes, Eugene, OR) diluted 10 000 fold. Flow cytometric measurements were performed in a FacStar Plus model (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ). The argon laser excitation was set at 488 nm. Fluorescence emission was determined using a 530 nm (green) band-pass filter, and the experimental results analyzed with CELLQUEST software (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

2.4. Calcein leakage

Cells were incubated with 1 µM calcein-ace-toxymethyl (Calcein-AM) (Molecular Probes, Eugene, OR) in HSBS for 2 h at 37 °C. The parasites, chicken kidney cells (1×10^6 cells), and THP1 human lymphoma cells (1×10^6 cells) were incubated in 150 µl HSBS containing PW2 (100 µg ml⁻¹) for 1 h at 37 °C. After incubation, cell suspensions were centrifuged at low speed (1000 × g for 3 min) and 100 µl of supernatants were recovered and diluted to 1 ml in Milli-Q water. The THP1 human lymphoma cells used in this assay were cultivated in RPMI medium supplemented with 10% foetal calf serum (FCS), in 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. The fluorescence of free calcein was measured in a spectrofluorimeter set at 490 nm for excitation and 530 nm for emission.

2.5. Hemolysis assay

The hemolytic activity of PW2 was monitored against human, rabbit and chicken erythrocytes. The erythrocyte suspensions (4% in HSBS) were incubated for 6 h at 37 °C in the presence of 100 µg ml⁻¹ of PW2. After low speed centrifugation (320 × g for 5 min) 100 µl of the supernatants were diluted to 1 ml in Milli-Q water and the absorbance was measured at 576 nm. Incubations with HSBS and 0.2% Triton X-100 were used as negative and positive controls (0 and 100% of lysis, respectively).

2.6. Scanning electron microscopy

Freshly purified sporozoites of *E. acervulina* (10^5 cells) were incubated in 50 μ l HSBS, at 41 °C, for 1 h in the absence or presence of PW2 (1, 10, 50 and 100 μ g ml^{-1}). After incubation, 10 μ l aliquots were separated for scanning electron microscopy. Cells were attached to cover slips with 5 min decantation and fixed for 10 min in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.6, containing 2.5% glutaraldehyde. After dehydration in alcohol, cells were dried. Cover slips were attached with carbon tape on stubs and gold sputtered for 2 min. Cell surface images were obtained using a scanning electron microscope JSM 5800LV (JEOL, Tokyo, Japan).

2.7. Antimicrobial assay

The minimal inhibitory concentration (MIC) of PW2 against fungi and bacteria were determined by monitoring liquid growth inhibition using two times serial dilutions of peptide [16]. MICs are expressed as the [a]–[b] interval of concentrations, where [a] is the highest concentration in which growth was observed and [b] is the lowest concentration that causes 100% growth inhibition.

2.8. In vitro cell invasion/inhibition assay

E. acervulina and *E. tenella* sporozoites were treated for 1 h at 41 °C with 1, 10, 50 and 100 μ g ml^{-1} of PW2 in 1 ml HSBS and rinsed three times for peptide removal in HSBS. Pre-treated sporozoites of *E. acervulina* (1.5×10^6 per well) and *E. tenella* (5×10^5) were added to the primary chick kidney culture cells in six replications for *E. acervulina* and three replications for *E. tenella*, incubated at 41 °C during 4 h with 5% CO_2 for cell-invading sporozoite counting. The cover slips were treated with methanol for 10 min and cells stained with Giemsa solution (1:50 w/v) for 1 h. One hundred microscopic fields ($\times 1000$ magnification) of invading sporozoites into the cells were counted using a light microscope. One-way analysis of variance was conducted using the PROC GLM programme of SAS Institute (1988) [17] to test for significant differences. To obtain the primary chicken kidney cell cultures one day-old chick kidney cells were cultivated on round cover slips (5×10^5 cells per well) in polyethylene plates with 24 wells in 1 ml Eagle 199 medium containing 10% FCS and 1% penicillin/streptomycin to produce semi-confluent monolayers within 72 h at 37 °C, 5% CO_2 [18].

2.9. Spectroscopic analysis

Tryptophan fluorescence was monitored on a spectrofluorimeter with the excitation wavelength set at 295

nm and emission scanned from 310 to 450 nm. Scans were taken with a 10 nm emission per excitation bandwidth and a scan speed of 40 nm s^{-1} . The PW2 concentration of 10 μ g ml^{-1} in 1 ml of HSBS was used in the presence or absence of 25 mM sodium dodecyl sulphate (SDS). For fluorescence quenching experiments, acrylamide was added from an 8 M stock solution to final concentrations of 0.1–0.5 M. The emissions were analyzed at 351 nm in the absence of SDS, and at 343 nm in the presence of SDS micelles. The fluorescence quenching constants Stern–Volmer constants (K_{SV}) for acrylamide, in the presence and absence of SDS, were determined using Stern–Volmer equation [19]. Right angle light scattering of PW2 in HSBS was monitored using a spectrofluorimeter by setting both excitation and emission at 500 nm. All the fluorescence experiments were performed on a F-2000 fluorescence spectrophotometer (Hitachi, Japan).

3. Results

3.1. Sporozoite-binding peptide selection

Three different M13-derived Ph.D. peptide libraries were used for the selection of sporozoite-binding phage. Two of these libraries (Ph.D.-7 and Ph.D.-C7C) display 7-mer random peptides fused to the pIII M13 coat protein. In the C7C library the randomized sequence is flanked by a pair of cysteine residues that allow the display of cyclized version of the peptides. The third Ph.D. peptide library, Ph.D.-12 displays 12-mer random peptides. The DNA sequencing of phage recovered after three rounds of selection revealed a strong convergence to a peptide motif containing two tryptophan residues (Fig. 1). The double tryptophan motif (WW)

Library	Sequence	Occurrence
Ph.D.-12	HPLKQY WW RPSI-----	22/26
Ph.D.-12	----PI WW KHSGGPIL-	1/26
Ph.D.-12	-----Y WW RDAPVSQGR	1/26
Ph.D.-12	SYPTD WW IKPG-----	1/26
Ph.D.-7	----V WW RPT-----	7/15
Ph.D.-7	----N WW RPLP-----	1/15
Ph.D.-7	----G WW VFD-----	1/15
Ph.D.-7	-VPT WW -----	1/15
Ph.D.-C7C	----P WW ITSE-----	6/15
Ph.D.-C7C	----P WW KASS-----	1/15
Ph.D.-C7C	---TPT WW RT-----	1/15
Ph.D.-C7C	---APT WW KS-----	1/15
Ph.D.-C7C	----W WW TSASR-----	1/15
Ph.D.-C7C	---SAP WW QP-----	1/15

Fig. 1. Deduced amino acid sequence of the peptides displayed by the three peptide phage libraries after three rounds of selection. Only the sequences bearing the WW motif are presented. The peptide sequences are aligned preserving the relative position of the double tryptophan motif indicated in boldface. Grey boxes indicate positively charged amino acids. The incidence column shows the frequency of each individual amino acid sequence in the total sequenced clones from each library.

was found in 67, 73 and 92% of the sequenced phage of Ph.D-7, -C7C and -12 libraries, respectively. Furthermore, an arginine or lysine residue often succeeds the double-tryptophan motif (WW motif.) In order to study the interaction that drove the phage selection the most common sequence detected in the Ph.D-12 library, HPLKQYWWRPSI, named PW2, was chosen for further studies.

PW2 is characterized by an amino acid composition constituted by seven hydrophobic and three basic residues, which confers an estimated isoelectric point of ten. This unusual amino acid composition is also shared with two natural antimicrobial peptides, indolicidin (ILPWLWPWWPWRR) [20] and tritrypticin (VR-RFPWWWPFLRR) [21].

3.2. Sporozoite membrane permeabilization activity of PW2 peptide

The effect of PW2 upon the membrane permeability of *Eimeria* sporozoites was initially studied by flow cytometry. The membrane integrity of the same population was also measured by the sensitivity to Sytox Green dye. This dye has a strong affinity for nucleic acids, but can only penetrate cells that have a damaged membrane. Cell size, measured as forward light scatter, and membrane integrity were correlated in a contour plot (Fig. 2). Sporozoites of *E. acervulina* and *E. tenella* were compared with epimastigotes of an unrelated parasite, *C. fasciculata* (Trypanosomatidae). After a short exposure (15 min) significant damage was observed on both avian parasites, while the other protozoan was not affected. The majority of both *Eimeria* species sporozoites acquired fluorescence as a result of membrane injury. The fluorescent population of sporozoites also showed a reduction in volume concomitant with an increase in the number of very small non-fluorescent particles (Fig. 2B and D). These small particles are probably debris originated by injured sporozoites. A population of cells with loss of volume but without fluorescence is observed in the *E. acervulina* treated sporozoites (Fig. 2B). This probably is due to recently damaged sporozoites which have not yet had time to accumulate the fluorescent probe. The numeric analysis (CELLQUEST software) of the population of sporozoites with fluorescence or size shifts when compared with intact sporozoites showed that the percentage of injured cells in the presence or absence of peptide was 62 and 20% for *E. acervulina* and 82 and 10% for *E. tenella* sporozoites populations, respectively. These results indicate that the sporozoites of *E. tenella* are more sensitive to PW2 than those of *E. acervulina*.

Membrane permeability was also studied by means of a calcein leakage assay based on Calcein-AM uptake. Calcein-AM (a non-fluorescent ester) readily

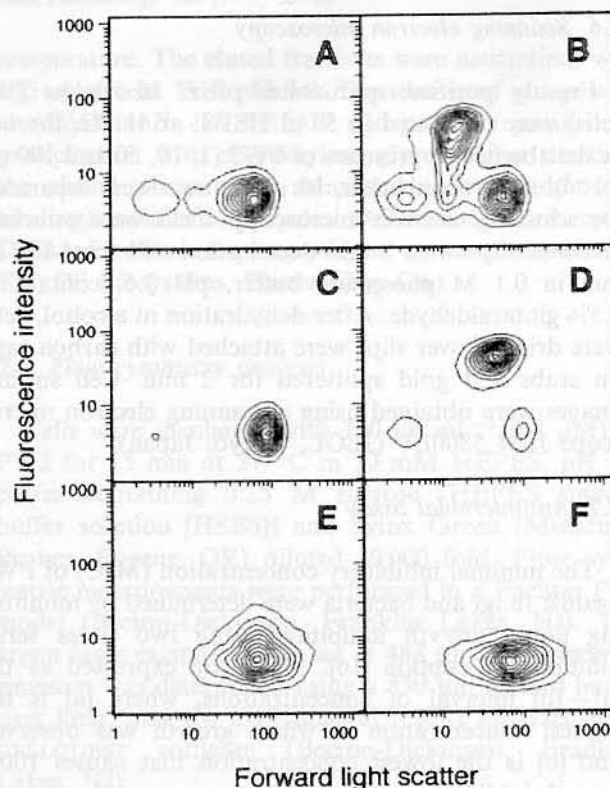


Fig. 2. Flow cytometry analysis data of PW2-treated and untreated *E. acervulina* and *E. tenella* sporozoites and *C. fasciculata* epimastigotes. Cells were incubated with the fluorescent dye Sytox Green (1:10 000) in the absence or presence of 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of PW2 peptide in HSBS for 15 min at 41 °C. The experimental data is presented as a contour plot where x-axis represents the forward light scatter, an indirect measure of cell size; whereas y-axis represents the intensity of Sytox Green fluorescence which is proportional to membrane permeability. (A, B) *E. acervulina*. (C, D) *E. tenella*. (E, F) *C. fasciculata*. (A, C, E) untreated cells. (B, D, F) PW2-treated cells.

crosses cell membranes and is processed by cytosolic esterases, with the formation of a fluorescent product (free calcein). As the cell membrane is impermeable to free calcein, any treatment that affects cell integrity releases the trapped fluorescent form of the probe. After sedimentation of cells and debris, the probe can be detected in the supernatant by fluorimetry. This approach was used to evaluate the effect of PW2 upon sporozoites of *E. acervulina*, *E. tenella*, tachyzoites of *T. gondii*, and epimastigotes of *C. fasciculata* and *T. cruzi*. Human lymphoma THP1 and primary chicken kidney cultured cells were also tested. The peptide-induced leakage of calcein was compared with control treatments in buffer solution and 0.2% Triton X-100 (0 and 100% of leakage effect, respectively) (Fig. 3A). PW2 had an insignificant effect on chicken kidney cells and upon the unrelated protozoans *C. fasciculata* and *T. cruzi* (Mastigophora) and little effect (38.4%) on the closely related protozoa *T. gondii* (Apicomplexa). The effect of PW2 on THP1 cells was also low (18%).

However, the same treatment caused 97.4 and 100% effect on *E. acervulina* and *E. tenella* sporozoites, respectively. Kinetic assays of the calcein leakage from sporozoites showed that the effect of the peptide depends on its concentration (Fig. 3B and C). The difference in the patterns observed could reflect differences in membrane composition between the two *Eimeria* species.

The effect of PW2 peptide was visualized by scanning electron microscopy. Images of *E. acervulina* sporozoites treated for 1 h showed progressive surface damage and cell debris as the concentration of peptide increased (Fig. 4). At high peptide concentrations (50 and 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) the injured cells formed aggregates (Fig. 4B and H) and showed partial loss of cytoplasm (Fig. 4F and G). These results provide evidence that PW2 peptide is able to induce pore formation in the pellicle.

3.3. Effect of PW 2 peptide upon sporozoite cell-invasion

The effect of PW2-peptide upon the viability of *Eimeria* sporozoites was investigated by measuring invasion by sporozoites of primary chick kidney cultured cells. Sporozoites treated with 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of PW2 showed a significant reduction in the ability to invade cells when compared with untreated sporozoites (Table 1). A reduction of approximately 70% of sporozoites able to invade cells of both *Eimeria* species was observed. Inhibition of cell invasion at higher peptide concentrations (10, 50 and 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) increased to about 80% for *E. acervulina* and 90% for *E. tenella* with no significant differences for PW2 concentrations above 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ in both species. These results indicate a dose threshold, but it is not certain whether this effect is due to the presence of sporozoites that are resistant

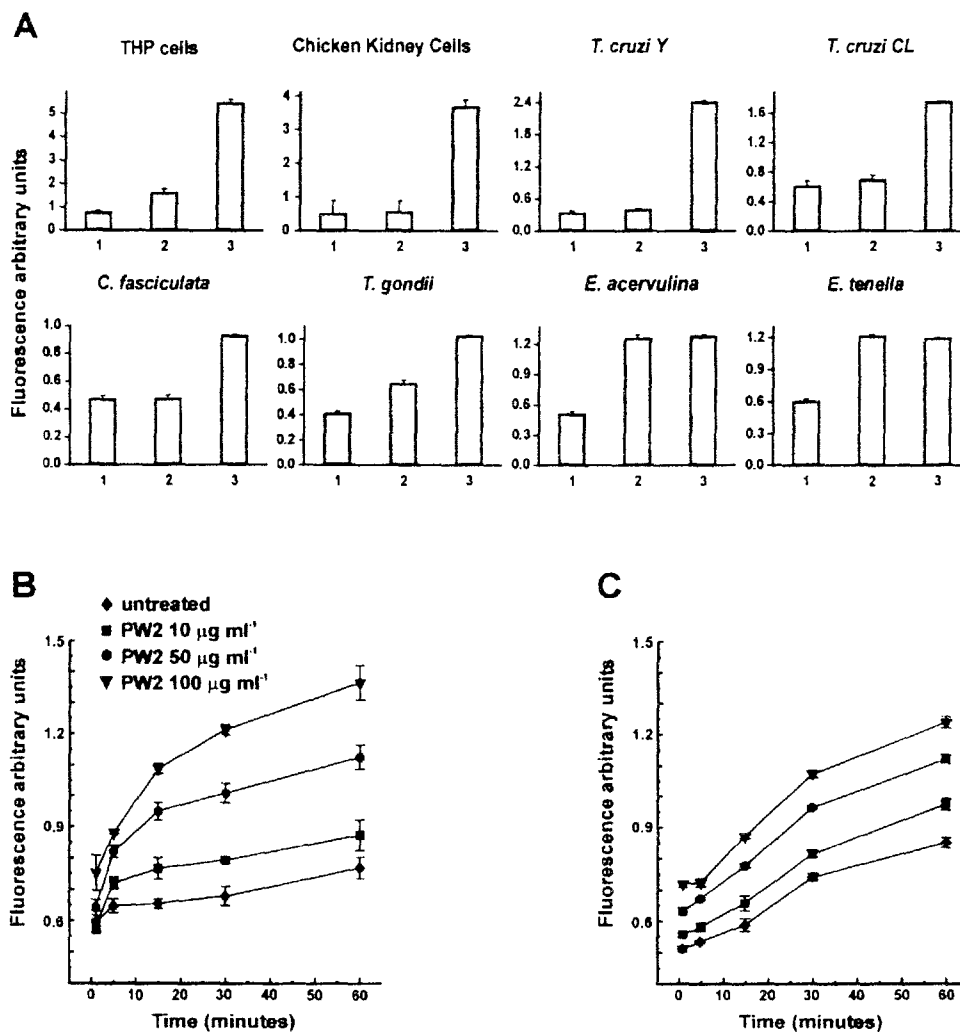


Fig. 3. Effect of PW2 in calcein leakage. (A) Calcein leakage induced by incubation during 1 h at 37 °C with 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of PW2. Column 1-buffer solution (negative control); Column 2-PW2 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$; Column 3-0.2% Triton X-100 (positive control). (B and C) Time course of calcein leakage from *E. acervulina* and *E. tenella* sporozoites, respectively, induced by different concentrations of PW2 at 37 °C. All the assays were performed as triplicates using 10^6 cells. The bars represent standard deviations.

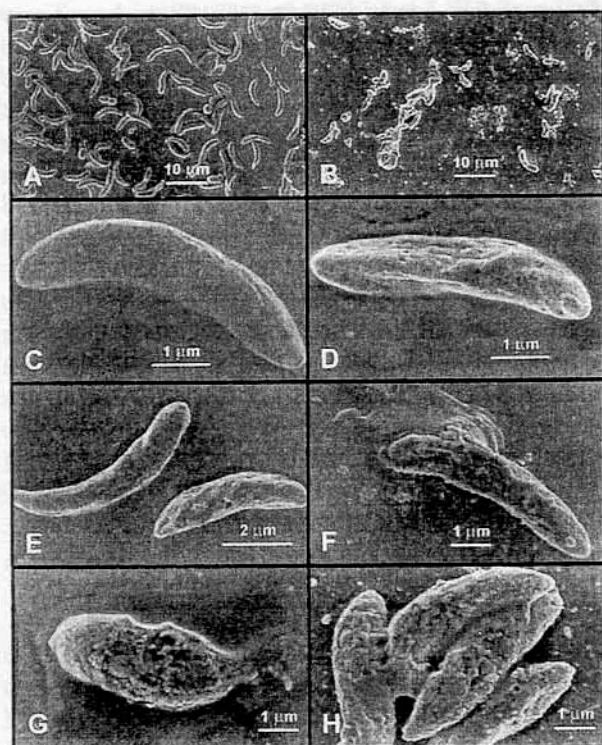


Fig. 4. Scanning electron microscopy of PW2-treated and untreated *E. acervulina* sporozoites. Sporozoites were incubated with PW2 peptide for 1 h at 41 °C in HSBS. Progressive damage of the sporozoite surface membrane and increase in cell debris as well as cell fusion can be observed with higher concentrations of PW2 peptide. (A, C) untreated, (D) PW2 1 µg ml⁻¹, (E) PW2 10 µg ml⁻¹, (F) PW2 50 µg ml⁻¹, (B, G, H) PW2 1 µg ml⁻¹.

to PW2 or a consequence of inherent properties of the peptide at higher concentrations.

3.4. The specificity of PW 2 activity

Antimicrobial activity of PW2 was tested against bacteria and fungi. Concentrations up to 200 µg ml⁻¹ had no antibacterial effect against the Gram-positive *M. luteus* and *S. aureus* and the Gram-negative *E. coli*. Surprisingly, PW2 had an inhibitory effect upon the growth of the fungi *C. albicans* and *A. nidulans* with a MIC of 12.5–25 and 25–50 µg ml⁻¹, respectively. Additionally, PW2 showed very low hemolytic activity against human, rabbit and chicken erythrocytes in concentrations up to 100 µg ml⁻¹ (Table 2).

3.5. Mode of action of PW 2 peptide

Comparative analysis of fluorescence spectra of PW2 in the presence and absence of membrane-mimicking SDS micelles revealed a blue shift of 8 nm in the maximum emission peak from 351 to 343 nm (Fig. 5A). This blue shift denotes the displacement of tryptophan residues to the hydrophobic core of the SDS micelle.

Table 1

Inhibitory effect of PW2 peptide on the invasion of *E. acervulina* and *E. tenella* sporozoites in chicken cultured cells

PW2 peptide (µg ml ⁻¹)	Number of intracellular sporozoites			
	<i>E. acervulina</i>		<i>E. tenella</i>	
	Mean number ^a	Percentage	Mean number ^a	Percentage
1	35.3 ^b	27.6	88.8 ^b	22.5
10	25.8 ^c	20.2	84.2 ^b	21.3
50	24.8 ^c	19.4	63.9 ^{b, c}	16.2
100	24.5 ^c	19.2	36.3 ^c	9.2
Untreated	127.8 ^a	100	394.8 ^a	100

One-way ANOVA analysis, variables followed by at least one similar letter did not differ significantly when Duncan's multiple range test was used (overall error rate $\alpha = 0.05$).

^a Mean number of intracellular sporozoites counted in 100 microscopic fields with magnification $\times 1000$.

The partial burial of the PW2 tryptophan residues in the presence of SDS micelles was confirmed by acrylamide fluorescence quenching experiments. The K_{SV} for PW2 were 10.8 and 6.8 M⁻¹ in the absence and presence of SDS, respectively (Fig. 5B). The K_{SV} values indicate that tryptophan residues are more accessible to acrylamide when PW2 is free in the solution, in agreement with the partitioning of tryptophan residues into the hydrophobic core of micelles.

Since the activity of the antimicrobial peptide indolicidin depends on self-association [22] the aggregation of PW2 was monitored by straight angle light scattering at increasing concentrations of PW2 peptide. Fig. 5C shows that the ability of PW2 to scatter 500 nm light increases considerably when its concentration reaches 100 µg ml⁻¹.

4. Discussion

The purpose of using the Ph.D. selection method was initially to search ligand peptides able to interfere with cell-invasion by the *Eimeria* sporozoites. Nevertheless,

Table 2

Hemolytic activity of PW2 against human, rabbit and chicken erythrocytes

Erythrocytes	HSBS (control)	PW2	Triton X-100
Human	0.0046 (0.39%)	0.0187 (1.60%)	1.1677 (100%)
Rabbit	0.0038 (0.34%)	0.0173 (1.57%)	1.0992 (100%)
Chicken	0.0067 (0.52%)	0.0184 (1.42%)	1.2984 (100%)

The erythrocyte suspension supernatants absorbance was read at 576 nm after incubation for 6 h in HSBS, 100 µg ml⁻¹ PW2 or 0.2% Triton X-100.

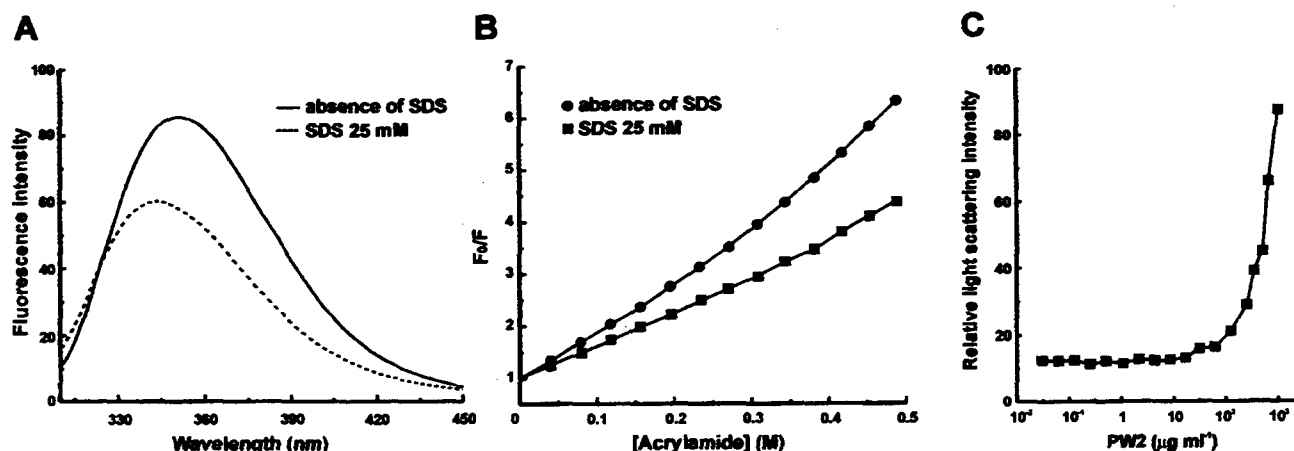


Fig. 5. (A) Fluorescence spectra of PW2 peptide in the absence (full line) and presence (dashed line) of 25 mM SDS. Fluorescence emission peaks are at 351 and 343 nm in the absence and presence of SDS, respectively; (B) Acrylamide quenching analysis of PW2 in the absence (circle) or presence (square) of 25 mM SDS. Stern–Volmer calculated constants for PW2 are 10.8 and 6.8 M⁻¹ in the absence and presence of 25 mM SDS, respectively; (C) Straight angle light scattering analysis of PW2 in HSBS. The amount of light scattered was measured using a fluorescence spectrophotometer with excitation and emission wavelengths set at 500 nm.

the composition similarity of the selected peptides to the natural antimicrobial peptides indolicidin and tritrpticin combined with results of flow cytometry indicated that the PW2, like the natural peptides, acts through membrane permeabilization. These indolic peptides are accumulated in cytoplasmic granules of neutrophils where they act killing ingested microbes [20,21]. Despite the broad spectrum of activity against bacteria, fungi and protozoa, their therapeutic use is restricted by the hemolytic and cytotoxic activity [8,22–24]. In contrast to the natural peptides, 100 μg ml⁻¹ of PW2 showed very low hemolytic effect in human, rabbit and chicken erythrocytes. Such specificity of the PW2 peptide may be resulted from the high selectivity of the Ph.D. technique, since the phage particles compete for targets of high affinity and specificity during the consecutive rounds of selection.

The mechanism of action of the indolic peptides is based on insertion into the membrane by aromatic residues of the peptide that are stabilized by interactions among basic residues of the peptide and negatively charged residues of the microbial membrane [23]. The high frequency of the WW motif among the selected peptides and the previous description that tryptophan residues can promote partitioning into lipid bilayer [25] indicates that this motif plays an important role in the mechanism of antimicrobial activity. Light scattering experiments indicate that self-association of PW2 takes place at concentrations that induce intense damage in the membrane of *E. acervulina* sporozoites (50 and 100 μg ml⁻¹). This suggests that the anticoccidial effect of PW2 is related to the formation of peptide aggregates. But, unlike indolicidin, the microbicide concentration of PW2 does not produce hemolysis. In vitro invasion experiments showed that sporozoite invasion is

inhibited at lower concentrations and this may indicate that sporozoites gradually lose their viability before the lytic concentration is reached.

Our results demonstrated that PW2 exhibits high specificity and low toxicity to host cells when compared with natural antimicrobial peptides. These characteristics altogether may represent a great advantage for the developing of a peptide-based therapy for the control of coccidiosis in poultry. However, studies on the in vivo effects of PW2 and on the establishment of system delivery of the peptide are needed to assess its use as an anticoccidial. Moreover our results clearly demonstrated the potential use of Ph.D. libraries to select disease pathogen-specific peptides and that this may be exploited in the development of new antimicrobial drugs.

Acknowledgements

We are indebted to Dr Paulo Arruda, Dr José A. Yunes, Dr David H. Chapman, Dr Sirlei Daffre, and Dr Angela Mehta for their helpful discussions and critical reading of the manuscript. We also thank Ernesto S. Nakayasu, Daniela Stancato and Eduardo Kiyota for excellent technical assistance. A.S. Jr is a recipient of a fellowship from FAPESP, A.L. received a research fellowship from CNPq. This work was supported by a grant from FAPESP (PTE: 99/02198-3).

References

- [1] Chapman HD. Resistance to anticoccidial drugs in fowl. *Parasitol Today* 1993;9:159–62.

- [2] Stephan B, Rommel M, Dausgschies A, Haberkorn A. Studies of resistance to anticoccidials in *Eimeria* field isolates and pure *Eimeria* strains. *Vet Parasitol* 1997;69:19–29.
- [3] Martin A, Danforth HD, Jaynes JM. Evaluation of the effect of peptidyl membrane-interactive molecules on avian coccidian. *Parasitol Res* 1999;85:331–6.
- [4] Hancock REW, Lehrer R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol* 1998;16:82–8.
- [5] Andreu D, Rivas L. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 1998;47:415–33.
- [6] Jaynes JM, Burton CA, Barr SB, et al. In vitro cytotoxic effect of novel lytic peptides on *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma cruzi*. *FASEB J* 1988;2:2878–83.
- [7] Arrowood MJ, Jaynes JM, Healey MC. In vitro activities of lytic peptides against the sporozoites of *Cryptosporidium parvum*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:224–7.
- [8] Aley SB, Zimmerman M, Hetsko M, Selsted ME, Gillin FD. Killing of *Giardia lamblia* by cryptidins and cationic neutrophil peptides. *Infect Immun* 1994;62(12):5397–403.
- [9] Barr SC, Rose D, Jaynes JM. Activity of lytic peptides against intracellular *Trypanosoma cruzi* amastigotes in vitro and parasitemias in mice. *J Parasitol* 1995;81:974–8.
- [10] Scott JK, Smith GP. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 1990;249:386–90.
- [11] Cwirla SE, Peters EA, Barret RW, Dower WJ. Peptides of phage; a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:6378–82.
- [12] Long PL, Millard BJ, Joyner LP, Norton CC. A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. *Fol Vet Lat* 1976;6:201–17.
- [13] Schmatz DM, Crane MS, Murray PK. Purification of *Eimeria* sporozoites by DE-52 anion exchange chromatography. *J Protozool* 1984;31:181–3.
- [14] Robert R, Mauras G, Senet JM, Hocquet P. Purification of *Toxoplasma gondii* suspensions from mice peritoneal exudate. *Biomed Pharmacol* 1982;36:98–100.
- [15] Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1964;6:93–100.
- [16] Ehret-Sabatier L, Loew D, Goyffon M, et al. Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. *J Biol Chem* 1996;271:29537–44.
- [17] SAS Institute Inc. SAS/STATIM User's guide. Release 6.03. Cary NC, editor. SAS Institute Inc 1988.
- [18] Doran DJ. Increasing the yield of *Eimeria tenella* oocysts in cell culture. *J Parasitol* 1971;57:891–900.
- [19] Eftink MR, Ghiron CA. Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies. *Biochemistry* 1976;15:672–80.
- [20] Selsted ME, Novotny MJ, Morris WL, et al. Indolicidin, a novel tridecapeptide amide from neutrophils. *J Biol Chem* 1992;267:4292–5.
- [21] Lawyer C, Pai S, Watabe M, et al. Antimicrobial activity of a 13 amino acid tryptophan-rich peptide derived from a putative porcine precursor protein of a novel family of antibacterial peptides. *FEBS Lett* 1996;390:95–8.
- [22] Ahmad I, Perkins WR, Lupan DM, Selsted ME, Janoff AS. Liposomal entrapment of the neutrophil-derived peptide indolicidin endows it with in vivo antifungal activity. *Biochim Biophys Acta* 1995;1237:109–14.
- [23] Falla TJ, Karunaratne DN, Hancock RE. Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. *J Biol Chem* 1996;271(32):19298–303.
- [24] Schibli DJ, Hwang PM, Vogel HJ. Structure of the antimicrobial peptide tritpticin bound to micelles: A distinct membrane-bound peptide fold. *Biochemistry* 1999;38:16749–55.
- [25] Wimley WC, White SJ. Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nat Struct Biol* 1996;3:842–8.

Anexo 2

NMR Structure of PW2 Bound to SDS Micelles: A Tryptophan-rich Anticoccidial Peptide Selected from Phage Display Libraries

Luzineide W. Tinoco, Arnaldo da Silva Jr, Adilson Leite, Ana Paula Valente, Fabio C. L. Almeida. (2002)

Journal of Biological Chemistry, artigo em impressão.

NMR Structure of PW2 Bound to SDS Micelles: A Tryptophan-rich Anticoccidial Peptide Selected from Phage Display Libraries

**Luzineide W. Tinoco[#], Arnaldo da Silva Jr[®], Adilson Leite[®], Ana Paula Valente[#],
Fabio C. L. Almeida^{#*}**

[#] Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear. Departamento de Bioquímica Médica - ICB/CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-590 - Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

[®] Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, 23083-970 - Campinas, SP, Brazil.

*To whom correspondence should be addressed. Phone: (5521) 25626756 Fax: (5521)22708647; e-mail: falmeida@cnrmn.bioqmed.ufrj.br

Running title: NMR Structure of PW2 an Avian Anticoccidial Peptide

SUMMARY

PW2 (HPLKQYWWRPSI) was selected from phage display libraries through an alternative panning method using living sporozoites of *E. acervulina* as target. Synthetic PW2 shows anticoccidial activity against *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* with very low hemolytic activity. It also presents antifungal activity, but no activity against bacteria. We present the solution structure of the PW2 bound to SDS micelles. In the absence of interface PW2 has no structure. Structural calculation shows that W7 is important for the peptide folding, forming the hydrophobic core. K4, Y6, W8 and R9 are in the same surface, possibly facing the micelle interface.

The chemical shifts differences for PW2 in water when compared with PW2 in SDS are more pronounced for residues K4, Y6, W7, W8 and R9. PW2 gains structure being W7 the scaffold. K4, Y6, W8 and R9 bind to the micelle. W7, W8 and R9 compose a WW+ consensus found in the sequence of the peptides selected with the phage display technique against *Eimeria acervulina* sporozoites. This suggests that W7, W8 and R9 are probably key residues not only for the peptide interaction with SDS micelles, but also for interaction with *Eimeria acervulina* sporozoites surface.

Keywords: *Anticoccidial peptide, Eimeria, NMR structure, SDS micelles.*

Acknowledgements: This work was supported by the Brazilian financial agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, PRONEX – CNPq, Fundação Universitária José Bonifácio and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP

INTRODUCTION

The presence of antimicrobial peptides in the animal and plant kingdoms suggests that those peptides played a fundamental role in the successful evolution of complex multicellular organisms. There are a large number of antimicrobial peptides with great sequence diversity. The same peptide sequence is rarely recovered from two different species of animals, even those closely related, like insects, frogs or mammals (exceptions include peptides cleaved from highly conserved proteins, such as buforin II) (1).

The novel anticoccidial peptide PW2 (HPLKQYWWRPSI) was selected from phage display peptide libraries by an alternative method of panning using living *Eimeria acervulina* sporozoites as targets. PW2 is also effective against *Eimeria tenella* and several fungi. It showed low activity against *Toxoplasma gondii* tachyzoites, and no activity against *Trypanosoma cruzi*, *Crithidia fasciculata* epimastigotes or bacteria. Additionally, the parasitical concentrations of PW2 produced very low lytic effect on mammalian and avian cells (2).

PW2 is a tryptophan-rich peptide (TRP-rich) with antimicrobial activity. Several other TRP-rich peptides presenting antimicrobial activity are described in the literature. Indolicidin (ILPWKWPWWPWRR, 3-6) and tritrypticin (VRRFPWWWPFLRR, 7) are TRP-rich peptides obtained from neutrophils with antibacteria and antifungal activity. Their structures were solved in solution in the presence of micellar interfaces (8,9). There are other antimicrobials rich in tryptophan described: ACE-AMP1 (10) is a lipid transfer protein; puroindolin A and B are plant defensins stabilized by disulfide bridges (11) obtained from wheat.

PW2 disrupts the sporozoite pellicle, and membrane permeabilization has been proposed as the mechanism of action (2), similarly to other tryptophan-rich peptides with antimicrobial activity, like indolicidin (12) and tritrpticin (9). However, the detailed mechanism of action of antimicrobial peptides remains to be elucidated. A model that explains the activity of most antimicrobial peptides is the Shai-Matsuzaki-Huang (SMH) model (13-15), which proposes the initial interaction of the peptide with the membrane, followed by displacement of lipids, alteration of membrane structure, and in certain cases entry of the peptide into the interior of the target cell.

Several studies suggested that membrane perturbation is an important, but not a lethal event. These studies have proposed that the initial step is an electrostatic association of the positively charged peptide with the negatively charged groups of the membrane. This association would be followed by the peptide folding into amphipathic structures. Consequently, this interaction would distort the outer membrane bilayer, allowing the access to the cytoplasmatic membrane, where the peptide channel formation has been proposed to occur (16-19). There is a growing body of evidence that indicates that antimicrobial peptides may not solely kill by membrane disruption but may follow various mechanisms of action, including their interaction with cellular targets (13, 14, 20-22).

In a study with indolicidin, the 13-residue TRP-rich peptide from bovine neutrophils, it was found that antibacterial activity is not due to membrane permeabilization (16). Proline and tryptophan residues present in neutrophils peptides do not appear to be essential for their antimicrobial activity. The preponderance of aromatic residues and the overall cationic nature might favor interaction with nucleic

acids. It is conceivable that indolicidin might exert its activity by interacting with nucleic acids, thus preventing either replication or transcription (8).

In the present manuscript we present the solution structure of PW2 bound to membrane-mimetic sodium dodecyl sulfate (SDS) micelles by two-dimensional NMR methods. PW2 was also fully assigned in water, 40 mM SDS and 160 mM SDS. Chemical shift comparison enabled us to assign the possible site of interaction with the micelles interface. This study contributes to the elucidation of the mechanism of peptide-membrane interactions and demonstrates several structural features that are important for this interaction.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

CD Spectroscopy. CD measurements were taken on a Jasco J-715 CD spectrophotometer with a 2 mm path length cell cuvette. The wavelengths, from 190 to 260 nm, were measured with a 1 nm step resolution, 50 nm/min sweep speed, 8 s response time and a 1 nm bandwidth. All the spectra were collected and averaged over four scans at room temperature. The samples of PW2 (63 μ M) were prepared in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 5.0 and 7.2). SDS (2 to 40 mM) and TFE (10% to 75%) were added to the PW2 sample.

NMR Spectroscopy. The NMR samples were prepared by adding solutions of SDS- d_{25} (Cambridge Isotope Laboratories - Andover, MA) in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 5.0), containing 100 mM sodium chloride, 10% D₂O (99,9 % - Isotec, Inc.), to lyophilized PW2. The final samples were 4 mM in PW2, and 30 to 160 mM in SDS- d_{25} .

NMR spectra were recorded on a Bruker Avance DRX600 or DRX400, operating at 600.04 or 400.13 MHz, respectively. The sample temperature was maintained at 25 °C. TOCSY spectra (spin-lock time of 70 ms) were acquired using the MLEV-17 pulse sequence (23). NOESY spectra (24) were acquired using a 75 ms mixing time. Water suppression was achieved using the WATERGATE technique (25) and the spectra were collected with 512 points in F1, 4K data points in F2 and 16 transients. The NMR data were processed with NMRPIPE (26). Resolution enhancement was achieved by apodization of the free induction decay with exponential multiplication and zero filling.

NMR Data Analysis and Structure Calculation. All NMR spectra were analyzed using NMRVIEW, version 4.1.2 (27). NOE cross peaks were integrated in the NOESY spectra and their volumes were converted to distances, which were calibrated using the equations suggested by Hyberts *et al.* (28). No stereospecific assignments were made. No hydrogen bonds were applied. The structure calculations were performed using CNS_Solve version 1.1 (29). Starting with the extended structure, 100 structures were generated using simulated annealing protocol. This was followed by 10 000 steps of simulated annealing at 1000 K and a subsequent decrease in the temperature in 20 000 steps in the first slow-cool annealing stage. All the structures were analyzed with the program MOLMOL (30).

RESULTS

We selected three sample conditions to perform the resonance assignments of PW2. The first was in water (20 mM sodium phosphate buffer pH 5.0) and was used for comparison with the other experimental conditions, being representative of the free state in solution. The other two conditions were with 40 and 160 mM SDS. The behavior of PW2 in the presence of detergents is intriguing. In the absence of SDS the peptide is highly soluble. At SDS/PW2 molar ratios lower than 7.5 PW2 precipitates. If the relative amount of SDS is raised further, PW2 becomes soluble again. A similar behavior has been reported for indolicidin (8). We chose to work using two SDS/PW2 molar ratios where PW2 is soluble. At high molar ratio little conformational exchange was observed (Figure 1), mainly because PW2 is preferably bound to the interface. Under those conditions we have obtained good quality spectra and the assignment was straightforward. On the other hand, at $[\text{SDS}]/[\text{PW2}]=10$, there was considerable conformational exchange, as evidenced by the broader spectral lines (Figure 1), and the TOCSY spectrum was uninformative, due to fast relaxation during the spin lock time (small $T_{1\rho}$).

The conformational exchange when $[\text{SDS}]/[\text{PW2}]=10$ could be explained by a millisecond to microseconds timescale equilibrium between the free and micelle-bound states of PW2. Figure 1 shows the one-dimensional hydrogen spectrum of PW2 as a function of SDS concentration. Note that the spectrum in water shows sharp lines (Figure 1A). Upon addition of SDS, there is an increase in line width (Figures 1B and 1C), indicating the presence conformational exchange. Ignoring the linewidth

differences, the two conditions in SDS show very similar profiles, indicating similar structures for PW2. $[\text{SDS}]/[\text{PW2}]=10$ is representative of an intermediate step in the binding process, while the $[\text{SDS}]/[\text{PW2}]=40$ was considered as the bound state.

CD Spectroscopy – The CD spectra of PW2 recorded with and without SDS and TFE are shown in Figure 2. In aqueous solution, the spectrum presents a negative band at 200 nm ($-5000 \text{ deg cm}^2 \text{ d mol}^{-1}$). This is typical of unordered peptides (31) and corroborates the data in Figure 1. The addition of 25 % TFE and SDS led to a gain of structure. Two effects evidence this: the negative band at 200 nm becomes less negative and a negative band between 200 and 230 nm becomes more intense. An intense negative band at 220 nm is observed in the presence of 25% TFE (220 nm) and 4 mM SDS (228 nm). These negative bands at ~225 nm are characteristic of aromatic bundles (31) or turns in the structure (32). The bands arising from the exciton of aromatic rings can be either positive or negative. At 200 nm, the SDS and TFE peaks are less negative (-900 and $-1500 \text{ deg cm}^2 \text{ d mol}^{-1}$, respectively). The negative band at 200 nm observed in TFE is not necessarily characteristic of helical structure because there is no negative band at 208 nm at this condition. The CD analysis of the secondary structures in these spectra is complex since the presence of the aromatic side chains prevents the observation of the secondary structure characteristic bands. CD spectroscopy is in complete agreement with Figure 1 and adds the information of the putative formation of aromatic bundle. The two conditions in SDS present a similar CD spectrum.

Chemical shift assignments: The chemical shift assignments of PW2 in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 5.0) and in SDS (40 and 160 mM) were performed by the sequential strategy as proposed by Wütrich (33). Sequential connectivities could be observed through $d\alpha_{N(i+1)}$, $d\beta_{N(i+1)}$ and $d_{NN(i+1)}$ NOEs.

Structure Calculation. The structure was calculated in the condition where the molar ratio [SDS]/[PW2] is equal to 40. Structural statistics are shown in Table 1. A total of 154 NOEs were unambiguously identified, being 50 inter-residual NOEs. There are two spin systems for Proline 2 δ -hydrogens what is indicative of the existence of *cis* and *trans* conformations for this aminoacid. We could not unambiguously identify the *cis* and *trans* conformers for this residue. The $d\alpha\delta_{(i+1)}$ NOE, typical for the *trans* conformer of proline, and the $d\alpha\alpha_{(i+1)}$ NOE, typical of the *cis* conformer of proline were not observed for Pro 2 (33). Probably the absence of these NOEs was due to the high flexibility the N-terminus of PW2. In the case of Pro 10 only $d\alpha\delta_{(i+1)}$ NOEs were observed, indicating that this proline is in *trans* conformation. Clearly, Pro 10 is in a more structured portion of the polypeptide chain.

Long-range NOEs between the side chain H ϵ 3 tryptophan 7 and the δ - and γ -hydrogens of Pro 2 were observed. These non-ambiguous NOE are important in defining the folding of the peptide. It is important to mention that both proline 2 spin system present this long range NOE connecting to W7. Other long-range NOEs were responsible for a well-defined three-dimensional structure of the peptide: Y6 H ϵ with L3 H δ , Y6 H δ with L3 H α , W7 H ϵ with S11 H α , among others.

The NOESY spectrum in water presents only intra-residual and sequential NOEs,

indicating lack of structure under those conditions. The assignment was straightforward due the sharp lines and the good quality of the spectra (not shown).

The NOESY spectrum of PW2 at a molar ratio SDS/PW2 of 10 presents three spin systems for Leu 3 as a consequence of its vicinity to Pro 2, which undergoes slow exchange between the *cis* and *trans* conformations. With the increase of the [SDS]/[PW2] molar ratio to 40, the number of Leu 3 spin systems decreased to 2, indicating a conformational stabilization of the peptide. These two spin systems are identical if we look at the NOEs in each of the spin systems. The structures calculated using both Leu 3 spin systems are identical. The calculated structure is shown in Figure 3. Figure 3A shows the superposition of the 20 lowest energy structures and Figure 3B shows the lowest energy structure. The peptide is folded in a way that tryptophan 7 forms a hydrophobic core along with proline 2 and proline 10. The aromatic residues tyrosine 6 and tryptophan 8 are exposed at the surface of the peptide and could be the responsible for the negative band at ~225 nm observed in the CD spectra, attributed to an aromatic bundle. The presence of two turns that characterize the structure could also give rise to the negative band observed in the CD spectra. Both aromatic residues are in the vicinity of the positively charged aminoacids, arginine 9 and lysine 4. The close proximity of the side chain of W9 and R9 is suggestive of a π -stacking interaction that could contribute to the stabilization of the whole three dimensional conformation.

Figure 3C shows the electrostatic surface plot of the lowest energy structure. The structure has a triangular shape, where the base could be postulated as the surface of contact with the micelle interface. The solution structure suggests that the peptide folds in a way that the aromatic residues and the positively charged aminoacids form a flat

surface. This surface goes from Lys4 to Arg9.

Figures 4A and 4B show the comparison of alpha and amide hydrogen chemical shifts of PW2 in buffer, $[\text{SDS}]/[\text{PW2}] = 10$ and $[\text{SDS}]/[\text{PW2}] = 40$ with the random coil values. In the absence of SDS the $\text{H}\alpha$ chemical shifts are similar to the random coil values. Whereas for HN chemical shifts the higher differences are shown for the residues Y6, W7, W8 and R9. In the presence of SDS the chemical shifts values are similar to each other, except for HN residues W8 and R9. The chemical shift tendency in the three studied conditions follows a similar profile. This is important since it indicates that, in the absence of SDS (free state), PW2 might show the same structural tendency observed in SDS.

PW2 chemical shift also differs between the free state and the presence of different SDS concentrations (Figures 4C and 4D). The larger positive differences for the α -hydrogens (Figure 4D) are observed for the residues K4, Q5, Y6, W7, W8 and R9. C-terminal chemical shift shows negative differences. For the amidic hydrogens (Figure 4C), the most pronounced chemical shift differences are shown for the residues K4, Q5, Y6, W8 and R9 and the C-terminus. The two SDS/PW2 molar ratios studied behave similarly for most of the residues with the exception of W8 and W9 (Figure 4C).

These chemical shift differences (Figure 4C and 4D) reflect the process of binding to the micelle interface. The residues that showed more pronounced changes in chemical shift were K4, Q5, Y6, W7, W8, R9 and C-terminus. Residue W7 forms the hydrophobic core of the structure, while K4, Y6, W8 and R9 are at the surface. The differences for the amide hydrogens lead to the same conclusion, with the remark that, for residues W8 and R9, these differences occur only at SDS/PW2 molar ratio equal to

40. Chemical shift difference in W8 and R9 between the two conditions in SDS is noteworthy because it is the only difference between the bound and intermediate state.

Figures 4E and 4F show the number of NOEs and the RMSD per residue, respectively. It can be observed that there is a higher number of NOEs for residues 6, 7, 8 and 9, in accordance to the residues with higher resolution in the structure. The residues W7, W8 and R9 have the best resolution of all (lowest RMSD). These residues also coincide with the sequence consensus WW+ observed among the peptides selected from phage display libraries using *Eimeria acervulina* sporozoites as target, as reported by Silva Jr *et al.* (2).

DISCUSSION

In the present manuscript we described the solution structure of the peptide PW2 bound to a micelle interface. PW2, selected by phage display, shows anticoccidial activity, being specific for *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella*. It also presents antifungal activity. Its mode of action is still unknown, but membrane permeabilization has been proposed as its probable mechanism of action (2), similarly to other tryptophan-rich peptides with antimicrobial activity, like indolicidin (12) and tritrpticin (9).

PW2 presents some characteristics that are different from the other tryptophan-rich peptides, like the absence of the antibacterial activity and its low hemolytic activity. One possible explanation resides in the fact that PW2 presents the lowest percentage (50%) of hydrophobic amino acids when compared to indolicidin (77%) and tritrpticin (69%). In a study with indolicidin there is a correlation between the presence of

tryptophan residues and hemolytic activity (8). It was also noted for indolicidin that upon substitution of tryptophans by phenylalanines the antibacterial activity does not vanish. The lowest number of tryptophans for PW2 can explain its low hemolytic activity.

Indolicidin, tritrypticin and PW2 present different antimicrobial activity. Indolicidin has a broad spectrum of antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria (3), protozoa (4), fungi (5), and the enveloped virus HPV-1 (6). Tritrypticin presents activity against bacteria and fungus (7) and PW2 against *Eimeria* and fungus (2). PW2 does not show antibacterial activity (2). The origin of the specificity is not yet understood. Structural comparison shows an important difference in the positive charge distribution along the peptide chain that might be related to the specificity. For tritrypticin the positive charges are in the extremities of the peptide chain (9). While in PW2, the two positive charges (K4 and R9) are within the aromatic binding region in the center of the peptide primary structure. Indolicidin shows two positive charges in the C-terminal and another in the middle of the chain (8).

The observed folding of PW2 is similar to indolicidin (8) and tritrypticin (9). It is noticeable that the multiple tryptophan residues present in these structures tend to form a common structural motif. One tryptophan always is part of a hydrophobic core in the structure while other tryptophans are always in the surface of the peptide, being the putative binding site. Prolines and other hydrophobic residues tend to be part of this hydrophobic core.

For PW2, the residues presenting higher chemical shift deviation upon binding to the micelle are K4, Y6, W7, W8 and R9 (Figure 4). Structural calculation shows that W7 is important for the peptide folding, whereas K4, Y6, W8 and R9 are in the same

surface, possibly facing the micelle interface. The residues involved in the binding together with the structural amino acid W7 shows the lowest RMSD both the backbone and side chain.

There is a remarkable chemical shift difference in the amidic hydrogen of residue W8 and R9 (Figure 4C). When the SDS/PW2 molar ratio goes from 10 to 40 the chemical shift of W8 and R9 changes in a different way from the other amide peaks. This suggests that W8 and R9 play an important role in the binding process. Electrostatic attraction might be the long-range force that drives PW2 to the negative SDS micelle interface. Once the peptide is close to the micelle surface there will be an accommodation of the peptide. Chemical shifts changes take place at this time, affecting the residues K4, Y6, W7, W8 and R9. In the intermediate condition, where molar ratio SDS/PW2 is 10, W8 and R9 could be jumping between the free and bound states, which would explain the observed conformational exchange. Increasing the SDS concentration (molar ratio SDS/PW2 = 40) conformational exchange decreases considerably. Possibly π -stacking interaction between W8 and R9 is formed stabilizing the peptide fold.

It is noteworthy that the positive charge at the R9 position, together with W7 and W8, compose the consensus WW+ observed among peptides selected from phage display libraries against living sporozoites of *E. acervulina* (2). This suggests that W7, W8 and R9 are key residues not only for the interaction with SDS micelles, but also to the interaction with *Eimeria acervulina* sporozoites surface.

The sequence consensus WW+, observed in PW2 selection, can be found in three isolated cysteine-rich plant defensins (Thionins) with antifungal and antibacterial

activity in vitro. The TRP-rich domain of puroindoline-a (WRWWKWWK) and puroindoline-b (WPTKWWK) both present the consensus WW+ and, in the case of the antimicrobial protein ACE-AMP1 from onion seeds, the tryptophan-rich region (TFVRPFWWRPRI) (10,34) presents high similarity with the sequence of PW2 (HPLKQYWWRPSI). These proteins (puroindolines and Ace-AMP1) found in wheat and onion seeds show sequence and structural similarities with the family of the nonspecific lipid transport proteins (nsLTPs), but are unable to transfer phospholipids between vesicles or organelles in vitro. Nevertheless, these proteins are able to bind to polar phospholipids and provoke an increase in the permeability of model membranes (10, 11, 34, 35) resembling the TRP-rich antimicrobial peptides indolicidin and tritrypticin (5,9).

The function of puroindolines in vivo is still unknown, but their in vitro antifungal and antibacterial activities altogether with the localization of the proteins in the aleurone of the seeds suggests that they play an important role in the protection of the seed (11, 35). Structural studies reveal that puroindolines and Ace-AMP1 present tryptophan residues that are exposed to the solvent, which are probable effectors in the binding and permeabilization of membranes (34,35). In fact, exposed tryptophan residues are important for the activity of diverse membrane-disturbing toxins present in animal venous (36). The three dimensional structures of tryptophan-rich antimicrobial peptides (indolicidin and tritrypticin) also present solvent exposed tryptophan residues (8,9) which is also truth for PW2 as revealed in the present study.

REFERENCES

- 1-Zasloff, M. (2002) *Nature* **415**, 24, 389-395.
- 2-Silva Jr, A, Kawazoe, U., Freitas, F. F. T., Gatti, M. S. V., Dolder, H., Shumacher, R. I., Juliano, M. A., Silva, M. J., Leite, A. (2002) *Mol. & Biochem. Parasitol.* **120**, 1,53-60.
- 3- Selsted, M E., Novotny, M. J., Morris, W. L., Tang, Y. Q., Smith, W., Cullor, J. S. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 4292-4295.
- 4- Aley, S. B., Zimmerman, M., Hetsko, M. Selsted, M. E., Gillin, F. D. (1994) *Infect. Immun.* **62**, 5397-5403.
- 5- Ahmad, I., Perkins, W. R., Lupan, D. M. Selsted, M. E., Janoff, A. S. (1995) *Biochem. Biophys. Acta* **1237**, 109-114.
- 6- Robinson, W. E., Jr., McDougall, B., Tran, D., Selsted, M. E. (1998) *J. Leukocyte Biol.* **63**, 94-100.
- 7- Lawyer, C. Pai, S., Watabe, M., Borgia, P., Mashimo, T., Eagleton, L., Watabe, K. (1996) *FEBS Lett.* **390**, 95-95.
- 8- Rozek, A., Friedrich, C. L. and Hancock, R. E. W. (2000) *Biochemistry* **39**, 15765-15774.
- 9- Schibli, D. J., Hwang, P. M., Vogel, H. J. (1999) *Biochemistry* **38**, 16749-16755.
- 10- Cammue, B. P. A., Thevissen, K., hendriks, M., Eggermont, K., Goderis, I. J., Proost, P., Van Damme, J., Osborn, R. W., Guerbette, F., Kader, J. C., Broekaert, W. F. (1995) *Plant Physiol.* **109**, 445-455.
- 11- Le Bihan, T., Blochet, J. E., Desormeaux, A., Marion, D., Pezolet, M. (1996) *Biochemistry* **35**, 12712-12722.

- 12- Wu, M., Maier, E., Benz, R., Hancock, R. E. (1999) *Biochemistry* **38**, 7235-7242.
- 13- Matsuzaki, K. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1462**, 1-10.
- 14- Yang, L. Weiss, T. M. Lehrer, R. I., Huang, H. W. (2000) *Biophys. J.* **79**, 2002-2009.
- 15- Shai, Y. (1999) *Biochem. Biophys. Acta* **1462**, 55-70.
- 16- Subbalakshmi, C. Krishnakumari, V., Nagaraj, R., Sitaram, N. (1996) *FEBS Lett.* **395**, 48-52.
- 17- Friedrich, C. L., Rozek A., Patrzykat, A., Hancock, R. E. W. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 24015-24022.
- 18- Zhao, H., Mattila, J. P., Holopainen, J. M., Kinnunen, P. K. J. (2001) *Biophys. J.* **81**, 2979-2991.
- 19- Zhang, L., Rozek, A., Hancock, R. E. W. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 35714-35722.
- 20- Westerhoff, H. V., Juretic, D., Hendler, R. W., Zasloff, M. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6597-6601.
- 21- Bierbaum, G., Sahl, H. G. (1985) *Arch. Microbiol.* **141**, 249-254.
- 22- Kragol, G. (2001) *Biochemistry* **40**, 3016-3026.
- 23- A. Bax, D. G. Davis (1985) *J. Magn. Reson.* **65**, 355-360.
- 24- Sklenar, V., Piotto, M., Leppek, R., Sandek, V. (1993) *J. Magn. Reson. series A* **102**, 241-245.
- 25- M. Piotto, V. Sandek, V. Sklenar (1992) *J. Biomol. NMR* **2**, 661-666.
- 26- Delaglio, F., Grzesiek, S., Zhu, G., Vuister, G. W., Pfeifer, J. and Bax, A.
<http://hhmi.umbc.edu/toolkit/processing/nih/NMRPipe.html>
- 27- Johnson, B. A., and Blevins, R.A. (1994) *Journal of Biomolecular NMR* **4**, 603-614.
<http://www.nmrview.com/>

- 28- Hyberts, S. G., Goldberg, M. S. Havel, T. F., Wagner, G. (1992) *Protein Sci.* **1**, 736-751.
- 29- Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., Delano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, N., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., Warren, G. L. (1998) *Acta Cryst.* **D54**, 905-921 .
<http://cns.csb.yale.edu/v1.1/>
- 30- Koradi, R., Billeter, M., and Wüthrich, K. (1996) *J Mol Graphics* **14**, 51-55.
<http://www.mol.biol.ethz.ch/wuthrich/software/molmol/>
- 31- Woody, R. W. (1994) *Eur. Biophys. J.* **23**, 253-262.
- 32- Yang, J. J. Pitkeathly, M. and Radford, S. E. (1994) *Biochemistry* **33**, 7345-7353.
- 33- Wüthrich, K. (1986). *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley-Interscience, New York.
- 34- Tassin, S., Borekaert, W. F., Marion, D., Acland, D., Ptak, M., Vovelle, F., Sodano, P. (1998) *Biochemistry* **37**, 3623-3637.
- 35- Gautier, M. F., Joudrier, P., Pezolet, M., Marion, D. (1993) *FEBS Letters.* **329**, 336-340.
- 36- Gatinéau, E., Thoma, F., Montenay-Garestier, Th., Takeshi, M., Fromageot, P., Ménez, A. (1987) *Biochemistry* **26**, 8046-8055.
- 37- Laskowski, R. A., Rullman, J. A. C., MacArthur, M. W., Kaptein, R., Thornton, J. M. (1996) *J. Biomol. NMR* **8**, 477-486.

Figure Legends

Figure 1: Amidic and aromatic region of the ^1H one-dimensional NMR spectra of PW2 (4mM) at 25°C: (A) 20 mM sodium phosphate buffer at pH 5.0, (B) 30 mM SDS ([SDS]/PW2] = 7.5), (C) 40mM SDS ([SDS]/PW2] = 10), (D) 50 mM SDS ([SDS]/PW2] = 12.5), (E) 80 mM SDS ([SDS]/PW2] = 20), (F) 120 mM SDS ([SDS]/PW2] = 30) and (G) 160 mM SDS ([SDS]/PW2] = 40).

Figure 2: Circular dichroism spectra of PW2 63 μM in 20 mM sodium phosphate buffer at pH 5.0 and 25°C. (—) only buffer, (-----) buffer and 4 mM SDS, (— — —) buffer and 25% TFE.

Figure 3: (A) 20 lowest energy structures calculated for PW2 4mM in 20 mM sodium phosphate buffer at pH 5.0 and 25°C with 160mM SDS- d_{25} showing the well defined region between residues K4 and P10. (B) lowest energy structure and (C) electrostatic surface plot of the lowest energy structure of PW2. Positive charge is colored in blue, neutral in white and negative in red. The figure was generated using the MOLMOL program (30).

Figure 4: Summary of chemical shifts and structure data for PW2 (A) chemical shift differences between PW2 alpha hydrogens and the respective random coil values ²⁷

black – PW2 in 20 mM sodium phosphate buffer at pH 5.0, *gray* – SDS/PW2 molar ratio 10 and *white* – SDS/PW2 molar ratio 40. **(B)** chemical shift differences between PW2 amidic hydrogens and the respective tabled values for random coil: *black* – PW2 in 20 mM sodium phosphate buffer at pH 5.0, *gray* – SDS/PW2 molar ratio 10 and *white* – SDS/PW2 molar ratio 40. **(C)** chemical shift differences between PW2 alpha hydrogens in 20 mM sodium phosphate buffer at pH 5.0 and in SDS. *black* – SDS/PW2 molar ratio 10 and *gray* - SDS/PW2 molar ratio 40. **(D)** chemical shift differences between PW2 amidic hydrogens in 20 mM sodium phosphate buffer at pH 5.0 and in SDS. *black* – SDS/PW2 molar ratio 10 and *gray* - SDS/PW2 molar ratio 40. **(E)** number of non-ambiguous NOEs for residue used as distance constraints for the structure calculation of PW2 in SDS micelles *black* - total and *gray* –inter residue. **(F)** RMSD for aminoacid residues calculated for the 20 lowest energy structures using the PROCHECK program (37). *Black* – backbone and *gray* – heavy.

Table 1: Summary of Structural Statistics for PW2 in SDS Micelles

total no. of distance constraints	154
no. of intraresidue constraints	104
no. of sequential constraints	39
no. of medium range constraints	11
rms deviations from ideal geometry	
covalent bonds ($\text{\AA}^0$)	0.0024 +/- 0.00030
covalent angles ($\text{\AA}^0$)	0.5930 +/- 0.0692
improper (deg)	0.3932 +/- 0.1169
dihedral (deg)	0.830 +/- 0.01478
NOE	0.0134 +/- 0.0023
Energies (Kcal/mol)	
overall	44.97 +/- 10.96
bond	1.36 +/- 0.34
angle	23.23 +/- 5.19
improper	3.71 +/- 1.93
VDW	11.59 +/- 2.38

Table 1 cont.

NOE		2.75 +/- 1.43
pairwise rmsd (A ⁰)		
residue 1-12		
backbone		1.58
heavy		2.32
residue 4-10		
backbone		0.66
heavy		1.18

Figure 1

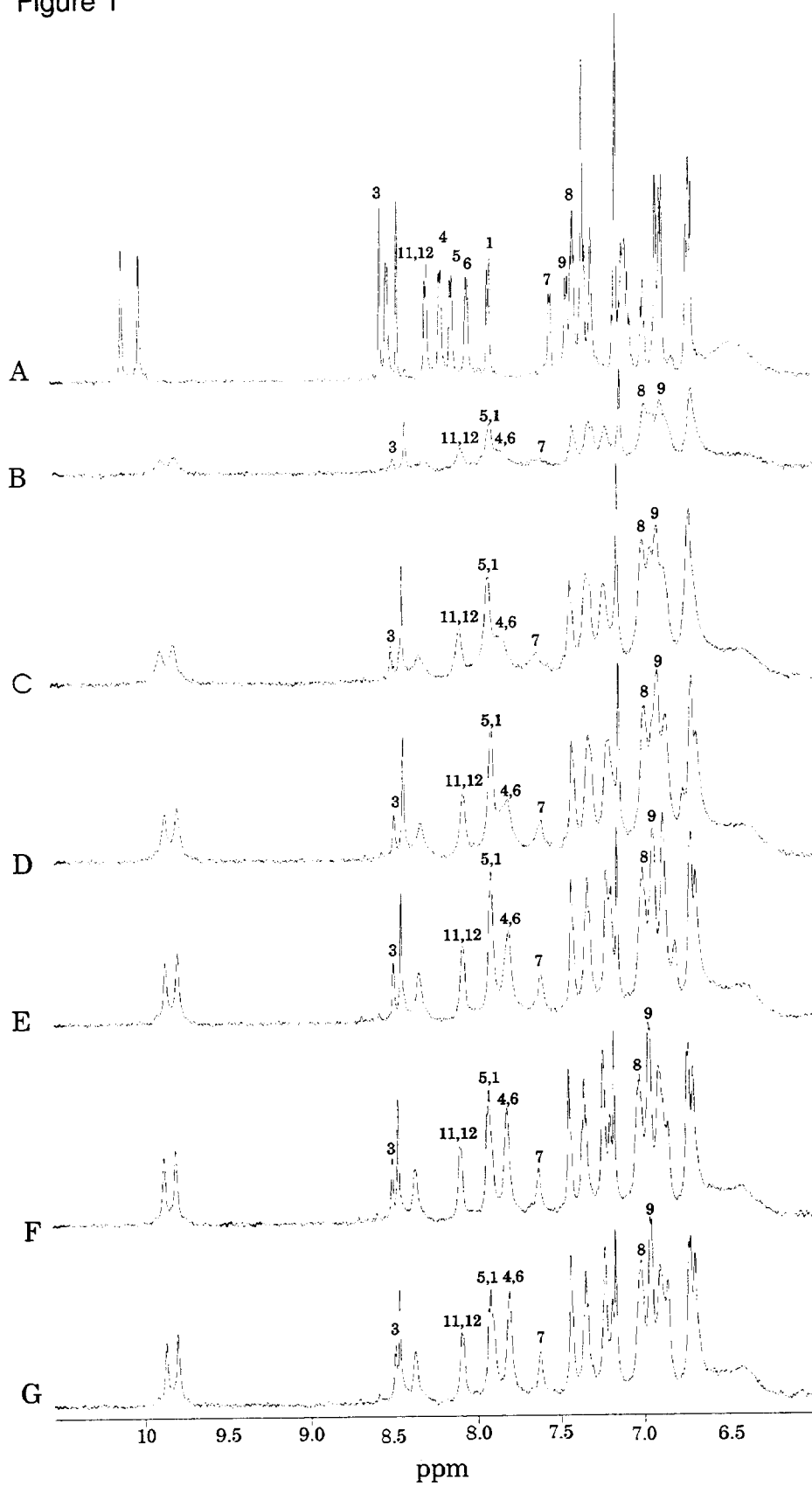


Figure 2

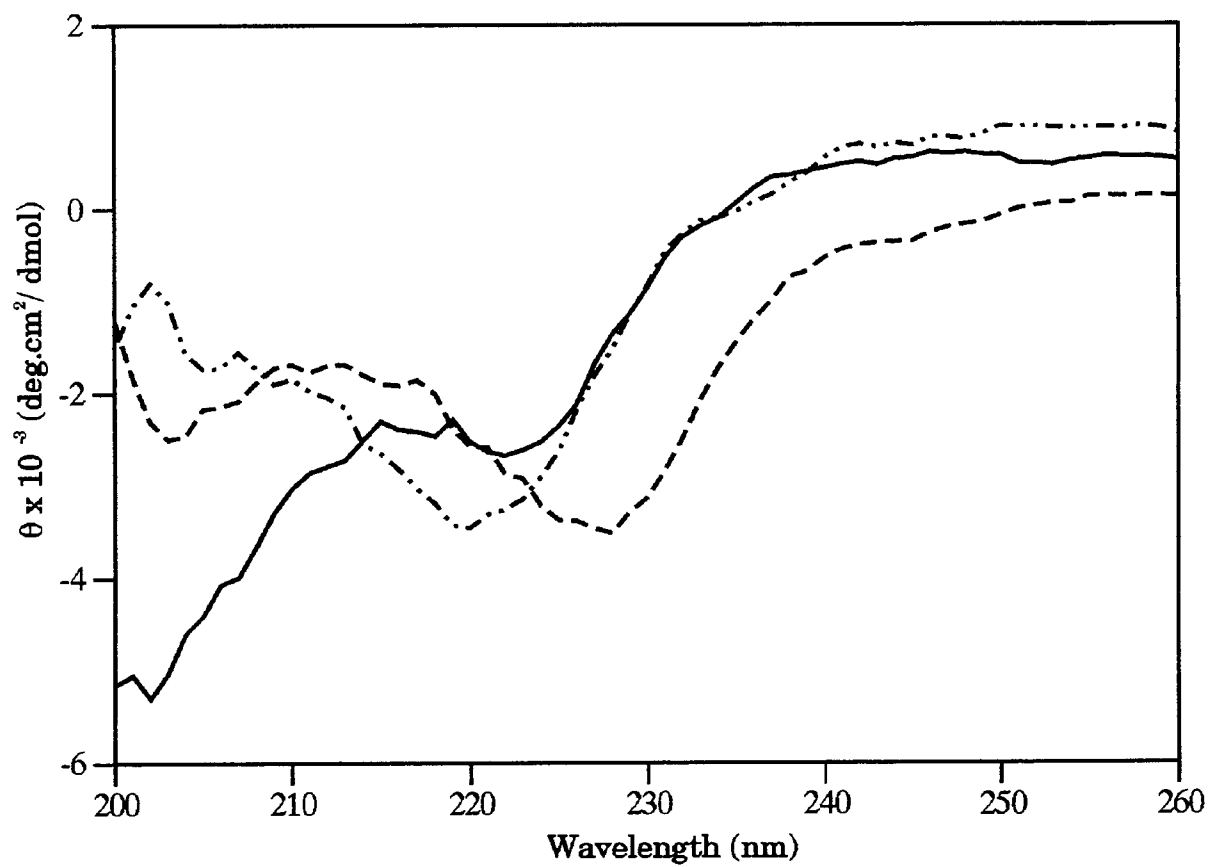


Figure 3

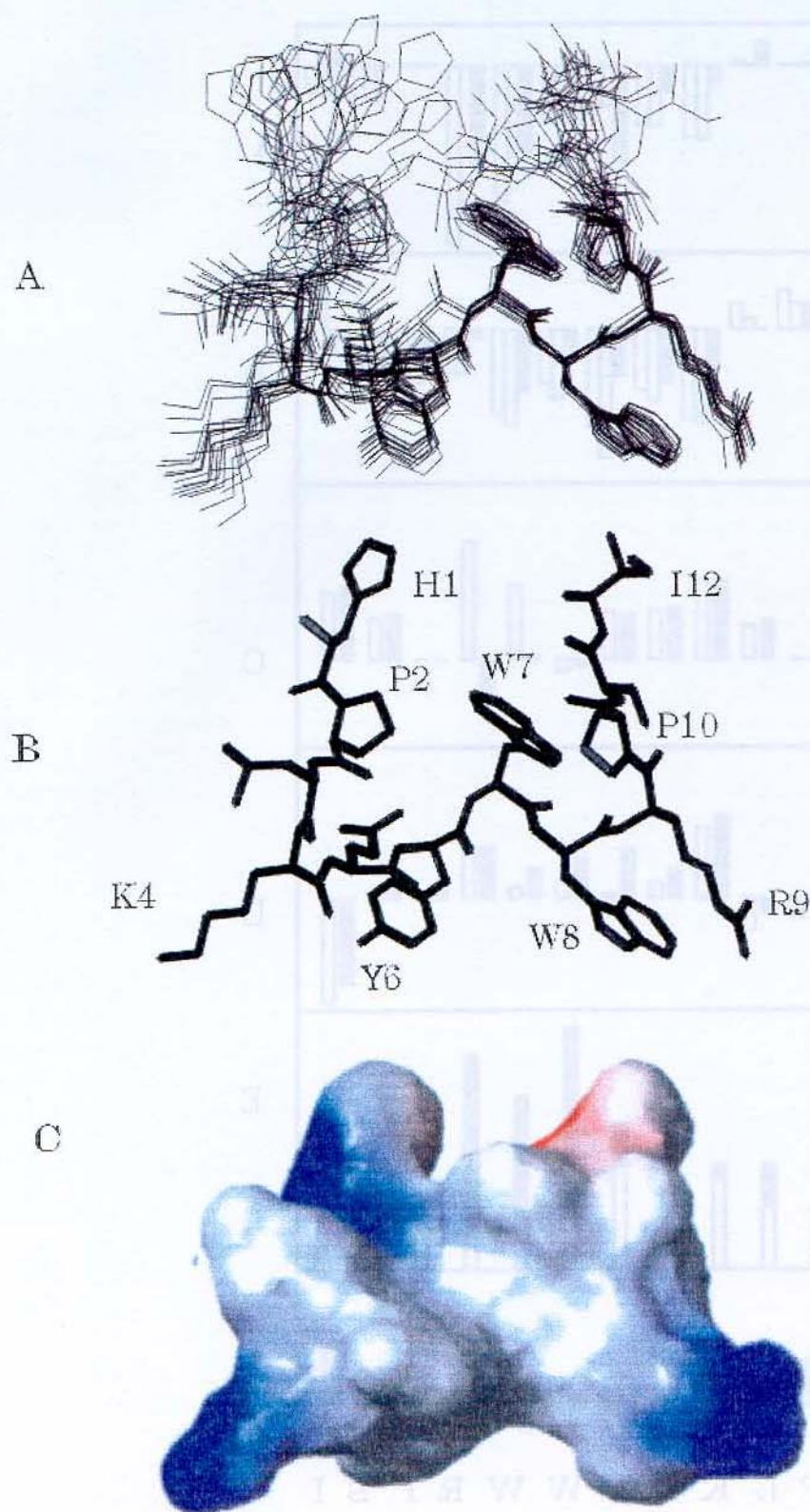


Figure 4

Figure 2

