

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

KARINA TAMIE SHIRAKAWA

ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DE *Urochloa decumbens* (Stapf) cv. Basilisk PARA A  
IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

DOURADOS, MS

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

Karina Tamie Shirakawa

**ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DE *Urochloa decumbens* (Stapf) cv. Basilisk PARA A IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia, no Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira

DOURADOS, MS

2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

S558a Shirakawa, Karina Tamie.

Análise do transcriptoma de *Urochloa decumbens* (Stapf) cv. Basilisk para a identificação de peptídeos antimicrobianos. / Karina Tamie Shirakawa. – Dourados, MS : UFGD, 2014.

58f.

Orientadora: Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira.

Monografia (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Braquiária. 2. Bioinformática. 3. Mecanismo de defesa vegetal. I. Título.

CDD – 632.951

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.**

**©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.**

KARINA TAMIE SHIRAKAWA

**ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DE *Urochloa decumbens* (Stapf) cv. Basilisk PARA A IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS**

Aprovado em 12 de dezembro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira  
Universidade Federal da Grande Dourados

---

Prof. Dra. Simone Simionatto  
Universidade Federal da Grande Dourados

---

Prof. Dra. Danielle Marques Vilela  
Universidade Federal da Grande Dourados

---

Dedico este trabalho a minha mãe, Elza Yasue Nagamatsu Shirakawa, e aos meus tios, Neuza Hasako Nagamatsu Shimada e Nelson Hideo Shimada, que sempre me apoiaram durante todos os anos da minha graduação. Dedico também ao meu orientador, professor Dr. Rodrigo Matheus Pereira, pela oportunidade e pelo auxílio, atenção e disposição.

---

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira, pela sua disposição, cooperação e pela oportunidade de desenvolver este trabalho, sendo de grande ajuda na sua elaboração.

Agradeço também a Dra. Lucimara Chiari e a sua equipe da EMBRAPA Gado de Corte de Campo Grande, MS, que realizaram a parte laboratorial deste trabalho, disponibilizando os dados com os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Agradeço a minha família pelo apoio incondicional durante esses anos de graduação e pela motivação durante os momentos de necessidade, em especial, aos meus pais que, apesar da criação rígida, me ensinaram o valor do ensino e do trabalho duro.

Agradeço também aos meus amigos que participaram da minha vida acadêmica, pela companhia, apoio e amizade, e pelas lições que me ensinaram e me mostraram que é possível mudar, conquistar e superar desafios.

Por fim, agradeço aos órgãos de incentivo a pesquisa e as instituições de pesquisa: CNPq, UNIPASTO, FUNDAPAM, CAPES e a EMBRAPA.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE ABREVIACÕES .....</b>	<b>x</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>12</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
Objetivos .....	15
1.1 Justificativa .....	15
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>16</b>
2.1 <i>Urochloa decumbens</i> (Stapf) cv. Basilisk .....	16
2.2 Mecanismo de defesa das plantas .....	17
2.3 Compostos antimicrobianos .....	20
2.4 Peptídeos antimicrobianos vegetais .....	22
2.5 Bioinformática e Transcriptômica .....	27
2.6 BLAST .....	29
2.7 Bancos de dados biológicos .....	32
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
3.1 Desenvolvido pela EMBRAPA Gado de Corte (Campo Grande, MS) .....	34
3.1.1 Material biológico e extração de RNA para o sequenciamento .....	34
3.1.2 Construção das bibliotecas de mRNA .....	34
3.2 Desenvolvido na Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) .....	35
3.2.1 Obtenção das sequências de peptídeos antimicrobianos .....	35
3.2.2 Alinhamento das sequências .....	35
3.2.3 Análise dos resultados .....	36
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
4.1 Análise geral dos peptídeos antimicrobianos encontrados .....	37
4.2 Análise dos peptídeos antimicrobianos vegetais .....	43

4.3 Atividade antimicrobiana e classificação em famílias dos peptídeos antimicrobianos vegetais .....	46
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>54</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura tridimensional de peptídeos antimicrobianos selecionados de diferentes famílias .....	24
<b>Figura 2.</b> Modelos de atividade dos peptídeos antimicrobianos .....	25
<b>Figura 3.</b> Ilustração do procedimento do BLAST .....	31
<b>Figura 4.</b> Taxonomia dos organismos de origem dos peptídeos antimicrobianos obtidos .....	41
<b>Figura 5.</b> Taxonomia dos organismos de origem dos peptídeos antimicrobianos de acordo com o CAMP .....	41
<b>Figura 6.</b> Atividade antimicrobiana dos peptídeos antimicrobianos obtidos .....	42
<b>Figura 7.</b> Família dos peptídeos antimicrobianos obtidos baseados no CAMP .....	43
<b>Figura 8.</b> Atividade antimicrobiana dos peptídeos antimicrobianos vegetais obtidos .....	46
<b>Figura 9.</b> Família dos peptídeos antimicrobianos vegetais obtidos de acordo com o CAMP .....	50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Lista de todos os peptídeos antimicrobianos obtidos no alinhamento .....	37
<b>Tabela 2.</b> Lista dos peptídeos antimicrobianos de origem vegetal obtidos no alinhamento .....	43

## LISTA DE ABREVIÇÕES

ABIEC: Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes

AMP(s): *Antimicrobial Peptide(s)*

BGI: *Beijing Genomics Institute*

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

CAMP: *Collection of AntiMicrobial Peptides*

cDNA: *complementary DNA*

DAMPs: *Damage-Associated Molecular Patterns*

DDBJ: *DNA DataBank of Japan*

EMBL: *European Molecular Biology Laboratory*

ESTs: *Expressed Sequence Tags*

E-value: *Expectation value*

GenBank: *National Center for Biotechnology Information*

Genes R: genes de Resistência

Genes *avr*: genes de avirulência

IPEAN: Instituto de Pesquisas Experimentais Agropecuárias do Norte

LTP(s): *Lipid-Transfer Protein(s)*

MAMPs: *Microbe-Associated Molecular Patterns*

mRNA: *messenger RNA*

ncRNA: *nonprotein-coding RNA*

rRNA: *ribosomal RNA*

tRNA: *transfer RNA*

NB-LRR: *Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repeat*

nsLTP: *non-specific Lipid-Transfer Protein*

ORESTES: *Open Reading Frames EST Sequence*

ORF: *Open Reading Frame*

PAMPs: *Pathogen-associated Molecular Patterns*

PR: *pathogenesis-related*

ROS: *Reactive Oxygen Species*

TLP: *Thaumatin-like Protein*

## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi realizar a identificação de peptídeos antimicrobianos no transcriptoma de *Urochloa decumbens* cv. Basilisk utilizando ferramentas da Bioinformática, classificando os peptídeos antimicrobianos vegetais encontrados em famílias. Este trabalho visa fornecer informações sobre a espécie vegetal em análise e identificar os peptídeos antimicrobianos que possam ser utilizados como princípios ativos de fármacos ou como inseticidas, e em programas de melhoramento genético. O RNA foi extraído pela EMBRAPA Gado de Corte (Campo Grande, MS) e sequenciado pelo Beijing Genomics Institute, na China. O alinhamento dos transcritos únicos da planta foi realizado localmente utilizando o BLASTx pelo *script* BLASTall contra o banco de dados de peptídeos antimicrobianos CAMP. Os resultados foram organizados e analisados utilizando o MySQL, separando e contabilizando por taxonomia de origem, atividade antimicrobiana e família de peptídeos antimicrobianos. Do alinhamento obteve-se, inicialmente, 3.161 similaridades com 250 peptídeos antimicrobianos diferentes que, após a seleção manual, obteve-se 1.033 similaridades com 94 peptídeos antimicrobianos diferentes entre si. Os peptídeos antimicrobianos resultantes tinham principalmente atividade antibacteriana e antifúngica, pertencendo, principalmente, as famílias: taumatinas, snakins e defensinas, porém a maioria permaneceu como não definida pela classificação do CAMP. Os resultados obtidos demonstraram a diversidade do arsenal de defesa de *U. decumbens* cv. Basilisk.

**Palavras-chave:** braquiária, bioinformática, mecanismo de defesa vegetal.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o quinto maior país em dimensões territoriais no mundo, com 8,5 milhões de km<sup>2</sup> de extensão, e o maior produtor de carne bovina, sendo que grande parte do rebanho (cerca de 97%) é criada em pastos e somente 3% sistema fechado, deste modo, uma grande parcela do território nacional é ocupada por pastagens (IBGE, 2011 *apud* ABIEC, 2014). Por esse fato, o Brasil tornou-se autossuficiente na produção de sementes de forrageiras, passando de importador para maior produtor e exportador mundial (SOUZA *et al*, 2007). Entre 1960 e 2010, a área de pastagem teve uma alta de 39%, passando de 122,3 milhões de hectares para cerca de 170 milhões. Enquanto isso, a capacidade de suporte evoluiu cerca de 155%, aumentando de 0,47 cabeça para 1,2 cabeça por hectare (PEREIRA *et al*, 2012).

As plantas do gênero *Urochloa* P. Beauv. spp. (sinônimo de *Brachiaria* (Trin.) Griseb. spp.), família Poaceae são forrageiras originárias da África Tropical que tiveram boa adaptação nos trópicos úmidos sendo disseminadas pela África, Ásia, Austrália e América do Sul (SATURNINO, 2009; BITENCOURT *et al*, 2011). São espécies amplamente utilizadas na formação de pastagens no Brasil, por se adaptarem a diferentes condições de solo, destacando-se os solos acidificados e fracos, ocupando 40 milhões de hectares apenas no Cerrado brasileiro (LENIS-MANZANO *et al*, 2010). As espécies mais utilizadas são: *Urochloa brizantha*, *U. decumbens*, *U. humidicola* e *U. ruziziensis* (SATURNINO, 2009; LENIS-MANZANO *et al*, 2010). O aumento no rendimento das pastagens, pode ser atribuído dentre outros fatores à substituição dos pastos de gramíneas nativas por espécies de *Urochloa*, principalmente *Urochloa decumbens* (PEREIRA *et al*, 2012).

*Urochloa decumbens* é uma gramínea perene e herbácea popularmente conhecida como capim-braquiária, que emite uma grande quantidade de estolões, os quais se enraízam com facilidade proporcionando proteção ao solo contra a erosão e cobrindo todo o terreno, podendo atingir cerca de 60 a 70 cm de altura. Originária do leste africano, essa planta não é exigente quanto à fertilidade e possui boa adaptação na maioria dos solos, mesmo em solos fracos e arenosos ou acidificados e inférteis, além de ser resistente à seca e ter alta produção de biomassa, porém o solo deve ser bem drenado, visto que essa forrageira não tolera o encharcamento e possui baixa tolerância à geada (BOTREL, NOVAES & ALVIM 1998; ANDREAZZA *et al*, 2013).

As plantas, em geral, são constantemente expostas a numerosos patógenos, tais como fungos, oomicetos, bactérias, insetos, nematoides e vírus, no entanto, raramente ocorrem doenças. Para competir contra os patógenos, as plantas desenvolveram um sofisticado sistema multinível que permite que elas identifiquem e contra-ataquem o patógeno. Os mecanismos de defesa desenvolvidos pelas plantas podem ser constitutivos ou induzidos (HAMMOND-KOSACK & JONES, 2000; ODINTSOVA & EGOROV, 2012). Os mecanismos induzíveis podem ser classificados em três categorias principais: (1) a produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e a iniciação da resposta hipersensitiva; (2) o reforço das paredes celulares vegetais; e (3) a produção de compostos antimicrobianos que inibem o crescimento dos patógenos. Dentre os compostos antimicrobianos produzidos pelas plantas como mecanismo de defesa, encontram-se os peptídeos antimicrobianos (ODINTSOVA & EGOROV, 2012).

Os peptídeos antimicrobianos são antibióticos naturais que constituem uma estratégia de defesa antiga e evolucionária conservada, utilizada por todos os organismos vivos para combater infecções. Estão amplamente distribuídos pelo reino animal e vegetal, e estão presentes até mesmo nos micro-organismos mais simples, o que sugere seu papel fundamental na evolução bem sucedida de organismos multicelulares complexos (ZASLOFF, 2002; ODINTSOVA & EGOROV, 2012).

Os peptídeos antimicrobianos vegetais são moléculas efectoras consideradas importantes componentes da barreira de defesa contra patógenos e pragas. Esse fato é aceito graças às pesquisas biológicas *in vitro* e é fortemente suportado por três linhas de evidência, como observações do aumento da resistência de plantas transgênicas expressando peptídeos antimicrobianos constitutivamente, regulação positiva de genes de peptídeos antimicrobianos em resposta ao estresse, e, por fim, a localização predominante desses compostos em camadas de células periféricas e em tecidos especialmente sensitivos a infecções. É evidente que as espécies vegetais produzem matrizes únicas de peptídeos antimicrobianos para prevenir a invasão patogênica de seus tecidos (ODINTSOVA & EGOROV, 2012).

Durante as duas últimas décadas, vários peptídeos antimicrobianos foram identificados, sendo divididos em diversos grupos baseados em seu comprimento, estrutura secundária e terciária e a presença ou ausência de pontes dissulfeto. Esses peptídeos exibem uma ampla gama de atividades antimicrobianas *in vitro* e, apesar de sua linhagem antiga, essas moléculas permanecem como armas de defesa efetivas possuindo o potencial de superar a resistência dos micro-

organismos, confundindo a crença geral que bactérias, fungos e vírus podem e irão desenvolver resistência a qualquer substância imaginável (ZASLOFF, 2002; REDDY, YEDERLY & ARANHA, 2004). Devido às suas características, os peptídeos antimicrobianos têm sido alvo de estudos como potenciais candidatos para a produção de fármacos terapêuticos e para a engenharia da resistência patogênica em culturas. Além disso, peptídeos antimicrobianos que exibem uma resistência de amplo espectro são bons candidatos para a transformação genética de plantas (REDDY, YEDERLY & ARANHA, 2004; ODINTSOVA & EGOROV, 2012).

Recentemente foi realizado o transcriptoma das raízes de *U. decumbens* cv. Basilisk por meio da técnica de RNA-Seq, disponibilizando um banco de dados das sequências expressas para estudos desta forrageira (OLIVEIRA *et al*, 2013).

## **Objetivos**

Geral: Identificar e analisar os peptídeos antimicrobianos no transcriptoma de *Urochloa decumbens* (Stapf) cv. Basilisk, a fim de obter informações sobre a planta em nível molecular, que poderão ser utilizadas para pesquisas posteriores.

Específico 1: Identificação por similaridade local.

Específico 2: Classificar e quantificar os peptídeos antimicrobianos vegetais em famílias.

Específico 3: Fornecer dados para estudos de fármacos e para o melhoramento genético de plantas.

### **1.1 Justificativa**

O presente trabalho fornecerá informações adicionais sobre *Urochloa decumbens* cv. Basilisk e sobre os peptídeos antimicrobianos produzidos pela planta, alvo de grande interesse em pesquisas nesses últimos anos. Além disso, os dados obtidos nessa análise poderão ser utilizados em trabalhos futuros visando o melhoramento da espécie, ou de outras plantas e também como potenciais candidatos para a produção de novos fármacos terapêuticos.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Urochloa decumbens* (Stapf) cv. Basilisk

*Urochloa decumbens*, família Poaceae e gênero *Urochloa* P. Beauv. spp. (sinônimo de *Brachiaria* (Trin.) Griseb. spp.), originária do oeste africano, é popularmente conhecida como capim-braquiária e ocupa a maior área de pastagens na região Centro-Oeste devido a simplicidade no manejo e as suas qualidades como forrageira (ROSA *et al*, 1998; JAKELAITIS *et al*, 2004). Existem pelo menos duas cultivares desta espécie no país: a cultivar IPEAN e a Basilisk.

A cultivar IPEAN foi introduzida no Brasil em 1952, em Belém, Pará, pelo Instituto de Pesquisas Experimentais Agropecuárias do Norte (IPEAN), e caracteriza-se por ser menos vigorosa, ter baixa produção de sementes, reproduzir-se por grande número de estolões proporcionando boa cobertura vegetal, mas expandindo-se lentamente (BOTREL, NOVAES & ALVIM, 1998; RIET-CORREA *et al*, 2011). A cultivar Basilisk ou Australiana foi introduzida em 1972 e caracteriza-se por ser mais vigorosa, com florescência durante quase toda sua estação de crescimento, com elevada produção de sementes e alta agressividade na competição com plantas invasoras (BOTREL, NOVAES & ALVIM, 1998). Tais características possibilitaram sua rápida difusão pelo Centro-Oeste, Norte e Sul do Brasil, destacando-se dentre as demais forrageiras, principalmente na região do Cerrado (RIET-CORREA *et al*, 2011).

*Urochloa decumbens* (Stapf) cv. Basilisk é uma gramínea perene, herbácea que ocupa todo o terreno devido a sua ampla capacidade de se alastrar pelos rizomas e raízes adventícias dos nós inferiores dos colmos, podendo formar uma vegetação de 60 a 70 cm de altura (SOUZA *et al*, 2007). Não exige solos de elevada fertilidade e possui excelente adaptação na maioria dos solos, mesmo em solos arenosos, acidificados ou inférteis, além de possuir resistência a seca (BOTREL, NOVAES & ALVIM, 1998; SOUZA *et al*, 2007). No entanto, os solos devem ser bem drenados, pois esta gramínea não tolera o encharcamento e possui baixa tolerância as geadas (BOTREL, NOVAES & ALVIM, 1998).

Historicamente, os cerrados brasileiros naturalmente apresentam solos de baixa fertilidade caracterizados por alta acidez associada a metais tóxicos, especialmente o alumínio (Al). Elevados níveis de alumínio debilitam o crescimento das raízes das plantas e, quando aliados aos períodos

de deficiência hídrica, mesmo em períodos chuvosos, a produtividade é significativamente reduzida, incapacitando o cultivo em áreas com solos ácidos. Muitos autores têm reportado que o alumínio fixa o fósforo em formas menos disponíveis para as plantas, o que reduz a respiração das raízes, interfere na divisão celular e em enzimas responsáveis pela deposição de polissacarídeos nas paredes celulares, aumentando a rigidez da parede celular, interferindo na absorção, transporte e uso de alguns elementos químicos (como cálcio, magnésio, fósforo e potássio) e água, além de possuir a capacidade de precipitar ácidos nucleicos (BITENCOURT *et al*, 2011).

Em experimentos realizados por BITENCOURT e colaboradores (2011), foi demonstrado que dentre as espécies *U. ruziziensis*, *U. brizantha* cv. Marandu e *U. decumbens* cv. Basilisk, apenas o genótipo demonstrou ser tolerante ao alumínio. Estudos recentes com fitorremediação de solos poluídos com metais pesados utilizando *U. decumbens* tem demonstrado alta capacidade de crescimento com níveis de Pb, Cd e Zn, além de bioacumulação de metais pesados em sua biomassa (ANDREAZZA *et al*, 2013). Deste modo, esta cultivar possui características favoráveis e úteis para fitorremediação e fitoestabilização, pois esta espécie é extremamente resistente às condições extremas de campo.

No entanto, uma das grandes desvantagens de *U. decumbens* cv. Basilisk é sua alta susceptibilidade ao ataque das cigarrinhas-das-pastagens (*Deois flavopicta*) (BOTREL, NOVAES & ALVIM, 1998; SOUZA *et al*, 2007) e, em determinadas circunstâncias pode causar fotossensibilização quando ingerida pelos animais (BRUM *et al*, 2009; SATURNINO *et al*, 2010). Entretanto, sua fácil difusão e alta produção de biomassa em solos pobres, torna essa gramínea de grande importância econômica para a pecuária do país, transpondo suas desvantagens.

## **2.2 Mecanismo de defesa das plantas**

As plantas são constantemente expostas a uma grande variedade de organismos potencialmente patogênicos, como vírus, fungos, bactérias, micoplasma, nematoides, insetos e até mesmo outras plantas, além de serem afetadas por condições ambientais adversas (HAMMOND-KOSACK & JONES, 2000; CASTRO & FONTES, 2005; ODINTSOVA & EGOROV, 2012). No entanto, apesar dessa constante exposição aos patógenos, dificilmente ocorrem processos de infecção nas plantas, principalmente em plantas nativas, devido ao desenvolvimento de

mecanismos de defesa durante a co-evolução de planta-patógeno (BELARMINO & BENKO-ISEPPON, 2010).

Cada célula vegetal possui uma capacidade de defesa pré-formada e induzida, a qual entra em contraste com o sistema imune dos vertebrados, onde células especializadas na defesa são mobilizadas rapidamente para o local da infecção, eliminando o organismo invasor ou limitando sua propagação (HAMMOND-KOSACK & JONES, 2000; JONES & DANGL, 2006). Nas plantas, se doenças ocorrem, são normalmente restritas a alguns indivíduos e afetam apenas uma pequena porção do tecido. Essas doenças raramente matam o organismo, resultado da seleção natural que, provavelmente, tende a reduzir a toxicidade fatal do patógeno nas plantas, pois quanto maior for o tempo de vida do hospedeiro, maior será a reprodução do patógeno (HAMMOND-KOSACK & JONES, 2000).

Esta infecção limitada nos vegetais se deve a quatro fatores principais: à incapacidade em atender os requisitos básicos para a sobrevivência do patógeno; à presença de barreiras estruturais pré-formadas ou compostos tóxicos que limitam sua suscetibilidade às espécies patogênicas especializadas; ao reconhecimento do ataque patogênico que ativa mecanismos de defesa, limitando a invasão; e às mudanças nas condições ambientais (HAMMOND-KOSACK & JONES, 2000). A infecção patogênica ocorre apenas se as condições forem favoráveis ao seu desenvolvimento e o sistema de defesa da planta falhar ou for superado.

Durante o processo de infecção, o patógeno utiliza uma série de substâncias que contribuem para facilitar sua passagem pelas barreiras físicas da planta, certificando-se que ele consiga obter nutrientes do hospedeiro e promovendo a neutralização de suas respostas de defesa (DANGL & JONES, 2001; CASTRO & FONTES, 2005). As substâncias secretadas pelo patógeno enquanto se dissemina pelos tecidos do hospedeiro, são, principalmente: as enzimas hidrolíticas que degradam os componentes estruturais da parede celular; toxinas que interferem com as funções metabólicas do hospedeiro; e reguladores de crescimento que causam o desbalanceamento no sistema hormonal do hospedeiro (CASTRO & FONTES, 2005).

Em contrapartida, as plantas possuem um sofisticado sistema de defesa multinível, que permite que elas detectem e interceptem o ataque patogênico. Esse sistema pode ser dividido em dois tipos: constitutivo, representado pelas estruturas e compostos sintetizados durante o

desenvolvimento normal da planta; e induzido, ativado apenas após o contato com o patógeno (CASTRO & FONTES, 2005; ODINTSOVA & EGOROV, 2012).

O mecanismo de defesa induzido pode ser sistemático ou localizado, o qual só pode ser detectado na região imediatamente adjacente ao local de penetração patogênica, seguida de rápido colapso e morte celular. Esse mecanismo de defesa é mediado pela interação conhecida como relação gene-gene, a qual envolve o reconhecimento molecular entre os produtos de genes complementares, presentes na planta (genes de resistência ou genes *R*) e no patógeno (genes de avirulência ou genes *avr*) (CASTRO & FONTES, 2005).

O primeiro mecanismo de reconhecimento específico envolve o reconhecimento de elicitores e sinais de transdução a partir de suas próprias células danificadas, *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs) assim como das células dos patógenos, *Pathogen-* ou *Microbe-Associated Molecular Patterns* (PAMPs ou MAMPs) (BENKO-ISEPPON *et al*, 2010; ODINTSOVA & EGOROV, 2012). Esse reconhecimento é o passo inicial na ativação da resposta imune inata. Uma vez reconhecido, a reação de defesa é desencadeada, culminando na regulação positiva de genes relacionados à defesa (ODINTSOVA & EGOROV, 2012).

No entanto, alguns patógenos conseguem evitar essa primeira linha de defesa das plantas liberando efetores específicos (fatores de virulência) a partir de seus genes *avr* nas células vegetais. Para prevenir a colonização dos tecidos por esses patógenos, uma segunda classe de receptores vegetais, as proteínas *Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repeat* (NB-LRR), entram em ação. Se um efector é reconhecido pela sua proteína NB-LRR, uma cascata imune é ativada (BENKO-ISEPPON *et al*, 2010; ODINTSOVA & EGOROV, 2012).

Diversas técnicas de expressão mostraram, nas últimas décadas, que uma única interação entre planta-patógeno (compatível ou incompatível) é capaz de recrutar ou silenciar centenas de genes, muitos deles já conhecidos, enquanto outros permanecem a ser descritos (BENKO-ISEPPON *et al*, 2010).

Uma vez que o contato é estabelecido, elicitores produzidos e liberados pelos patógenos induzem defesas adicionais, compreendendo a produção de espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*, ROS) e nitrogênio e a iniciação da resposta hipersensitiva; o reforço das paredes celulares vegetais; a produção e liberação de compostos antimicrobianos e a síntese de proteínas

relacionadas com a defesa que inibem o crescimento patogênico (VAN LOON, REP & PIETERSE, 2006; ODINTSOVA & EGOROV, 2012).

A resposta hipersensitiva corresponde ao mecanismo de resistência localizado, que ocorre imediatamente no local de penetração do patógeno, causando a morte celular das células próximas ao local sob ataque. Este mecanismo é muito semelhante ao fenômeno de apoptose, sendo igualmente complexo, envolvendo a participação de várias moléculas sinalizadoras, como ROS, fluxo de íons, proteínas-G, ácido jasmônico, ácido salicílico, cascata de fosforilação e reciclagem de proteínas por meio do sistema da poliubiquitina (CASTRO & FONTES, 2005).

As ROS ( $H_2O_2$  e  $O_2^-$ ), são compostos tóxicos para os micro-organismos que, além de participar da morte celular programada, limitando o avanço da infecção pelo tecido vegetal; participam do reforço das paredes celulares induzindo a ligação cruzada de glicoproteínas e outros constituintes da parede celular nos locais iniciais da penetração patogênica. Além da ligação cruzada de componentes celulares, ocorre o acúmulo de lignina, compostos fenólicos, proteínas de hidroxiprolina e tioninas, deposição de novas substâncias (ex. callose) e até mesmo a síntese de novas células. Por fim, a invasão patogênica induz a produção de compostos antimicrobianos (ODINTSOVA & EGOROV, 2012).

### **2.3 Compostos antimicrobianos**

Os compostos antimicrobianos podem ser sintetizados nas células vegetais constitutivamente, em tecidos ou órgãos especializados, ou podem ser induzidos por ataques patogênicos. De acordo com sua natureza química, eles incluem metabólitos secundários, como as fitoantocianinas e as fitoalexinas, e as moléculas baseadas em polipeptídios (ODINTSOVA & EGOROV, 2012).

As fitoantocianinas e as fitoalexinas podem ser definidas como compostos antifúngicos constitutivos presentes nas plantas na forma biologicamente ativa ou podem estar armazenados como precursores inativos que são convertidos a sua forma ativa por enzimas hospedeiras em resposta ao dano tecidual ou ao ataque patogênico, respectivamente (HAMMOND-KOSACK & JONES, 2000). Elas estão localizadas predominantemente nas camadas celulares exteriores dos órgãos vegetais ou nos vacúolos, sendo que ambos os compostos são quimicamente diversificados:

fenóis, glicosídeos fenólicos, saponinas, lactonas insaturadas, glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos (ODINTSOVA & EGOROV, 2012).

A atividade antimicrobiana das fitoantocianinas e das fitoalexinas é mais ou menos inespecífica e, de acordo com a variação de sua estrutura química, seus modos de ação diferem-se consideravelmente (ODINTSOVA & EGOROV, 2012). Por exemplo, as saponinas, compostos glicosinolados biologicamente ativos, formam complexos com esteroides nas membranas dos micro-organismos induzindo a formação de poros (HAMMOND-KOSACK & JONES, 2000; ODINTSOVA & EGOROV, 2012).

Os polipeptídios antimicrobianos podem ser arbitrariamente subdivididos em dois grupos: as proteínas e os peptídeos. O primeiro grupo compreende nas proteínas *pathogenesis-related* (PR), incluindo enzimas inibidoras e proteínas inativadoras de ribossomos (ODINTSOVA & EGOROV, 2012). O termo proteínas PR é utilizado para indicar “proteínas que não são detectadas ou que são detectadas apenas em concentrações basais nos tecidos saudáveis, mas que a acumulação no nível proteico foi demonstrada sob condições patológicas e situações relacionadas com pelo menos duas ou mais combinações entre planta-patógeno” (SELS *et al*, 2008).

O papel das proteínas PR nas plantas foi demonstrado por três abordagens experimentais independentes: ensaios antimicrobianos *in vitro*, estudo da regulação induzida por patógenos da expressão genética e análise de plantas transgênicas superexpressando proteínas particulares constitutivamente (ODINTSOVA & EGOROV, 2012).

Baseada na homologia da sequência, diversas classes de proteínas PR foram identificadas nas plantas (ODINTSOVA & EGOROV, 2012), sendo, até o momento, classificadas em 17 famílias; com algumas que aparentemente ocorrem mais especificamente em espécies de plantas particulares (BENKO-ISEPPON *et al*, 2010).

Algumas famílias são representadas por enzimas (chitinases, glucanases, proteases, oxidases) e supostamente estão envolvidas em várias funções: rompimento das paredes celulares de bactérias e fungos pela hidrolização dos constituintes da parede celular (chitina, glucano e proteínas), estabelecimento de barreiras estruturais em células vegetais (peroxidases), e produção de ROS (oxalato oxidases). As chitinases podem estar envolvidas na defesa contra nematoides e insetos. Outras famílias de proteínas PR compreendem em enzimas inibidoras, que parecem defender as

plantas de insetos herbívoros. Algumas proteínas PR não possuem nenhuma atividade enzimática, mas mostram inibição do crescimento de fungos e oomicetos pelo distúrbio da integridade da membrana plasmática (ODINTSOVA & EGOROV, 2012).

Dentre os diferentes grupos de proteínas PR, três (nomeados PR-12, 13 e 14) consistem em proteínas com um tamanho molecular abaixo de 10 kDa, que são codificadas por um único gene, possuem geralmente carga positiva, tolerância a solventes ácidos e orgânicos, com ênfase em atividades antimicrobianas específicas; características que são comuns em peptídeos antimicrobianos (AMPs, antimicrobial peptides) (BENKO-ISEPPON *et al*, 2010). Essas famílias de proteínas PR, conhecidas como defensinas vegetais (PR-12), tioninas (PR-13) e proteínas transferidoras de lipídeos (PR-14) estão incluídas junto com os AMPs (SELS *et al*, 2008; BENKO-ISEPPON *et al*, 2010; ODINTSOVA & EGOROV, 2012; SINHA *et al*, 2014).

## **2.4 Peptídeos antimicrobianos vegetais**

Os peptídeos são cadeias curtas de aminoácidos que distinguem-se das proteínas apenas na base de número de resíduos que apresentam, sendo convencionalmente menos que 50, enquanto que aqueles com menos de 20 resíduos tendem a ser designados de oligopeptídeos. Em uma tentativa recente de padronizar a nomenclatura desses compostos foi sugerido que moléculas menores do que 10 kDa devem ser referidas como peptídeos sintetizados ribossomalmente e modificados pós-transducionalmente (MARMIROLI & MAESTRI, 2014).

Os peptídeos antimicrobianos (*Antimicrobial Peptides*, AMPs) são porções de aminoácidos relacionadas aos patógenos e são considerados antibióticos naturais utilizados pelos organismos vivos para combater infecções patogênicas (ODINTSOVA & EGOROV, 2012; MARMIROLI & MAESTRI, 2014). Os AMPs foram descritos em uma ampla variedade de espécies incluindo insetos, anfíbios, mamíferos (NAWROT *et al*, 2014) e plantas (CASTRO & FONTES, 2008; ODINTSOVA & EGOROV, 2012). Sua ampla distribuição pelos reinos animal e vegetal sugere que os AMPs tiveram um papel fundamental na evolução dos organismos multicelulares complexos (ZASLOFF, 2002).

Essas moléculas exibem atividade antimicrobiana em condições fisiológicas ambiente, além de serem catiônicos em pH fisiológico devido ao excesso de resíduos de cargas positivas como

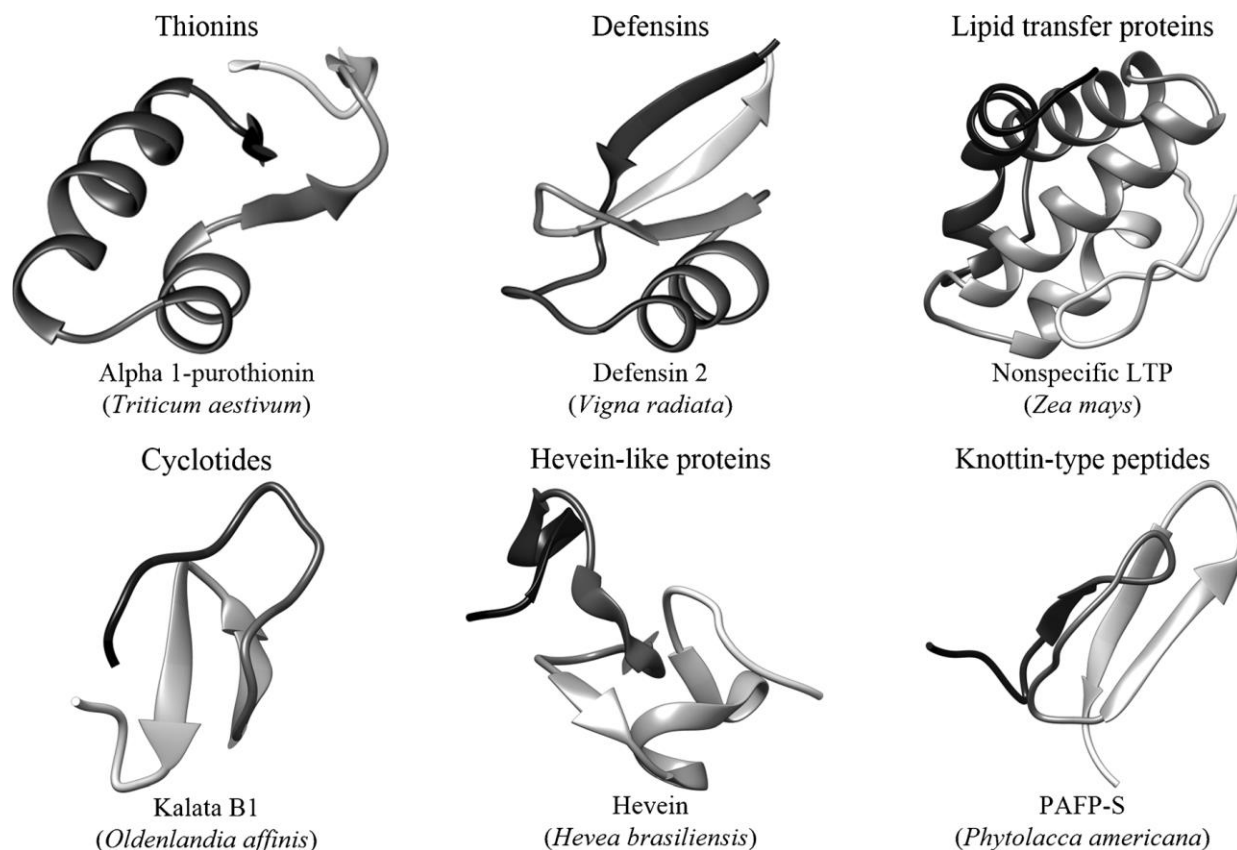
arginina e lisina, comparado com as cargas negativas (BENKO-ISEPPON *et al*, 2010). A natureza catiônica dos AMPs, associada com sua tendência a adotar estruturas anfipáticas, auxiliam em sua interação e inserção nas paredes celulares aniônicas e nas membranas fosfolipídicas dos microorganismos (BENKO-ISEPPON *et al*, 2010; ODINTSOVA & EGOROV, 2012).

Em plantas os AMPs são secretados na maioria, se não em todas as espécies de plantas, e são encontradas constitutivamente em órgãos de reserva (ex. sementes) e camadas celulares periféricas de tecidos generativos (órgãos reprodutivos, frutas e flores), além de serem induzidas em tecidos vegetativos, após infecções ou lesões (BENKO-ISEPPON *et al*, 2010; ODINTSOVA & EGOROV, 2012). Eles exibem uma ampla gama de funções variando de propriedades antimicrobianas diretas a efeitos imunomodulatórios. Em alguns experimentos, os AMPs demonstraram inativar determinadas células procarióticas almejando um número de processos metabólicos ou essenciais em locais extracelulares, na membrana plasmática, e/ou intracelular (NAWROT *et al*, 2014).

Os AMPs podem ser expressos constitutivamente ou transcritos rapidamente por indução em eucariotos pela invasão microbiana e seus produtos (ODINTSOVA & EGOROV, 2012), ou compostos celulares do hospedeiro, como citocinas, butirato ou vitaminas (NAWROT *et al*, 2014).

O repertório dos AMPs sintetizados em algumas espécies vegetais é extremamente amplo com centenas de AMPs diferentes. Esses peptídeos são categorizados em famílias distintas principalmente baseados nas sequências de aminoácidos, identidade, número de resíduos de cisteína e em seu espaçamento (NAWROT *et al*, 2014). As principais famílias de AMPs compreendem as defensinas, tioninas, proteínas transferidoras de lipídeos, ciclotídeos, *snakins* e proteínas *hevein-like*, de acordo com a homologia da sequência de aminoácidos (CASTRO & FONTES, 2005; ODINTSOVA & EGOROV, 2012; NAWROT *et al*, 2014). Apesar das diferenças significantes nas sequências de aminoácidos, análises *in silico* revelaram algumas similaridades na estrutura terciária das famílias de AMPs (**Figura 1**). Uma revisão recente classifica os peptídeos relevantes na resposta de defesa da planta de acordo com sua origem: de proteínas citosólicas, de precursores secretados ou da degradação de outras proteínas (MARMIROLI & MAESTRI, 2014).

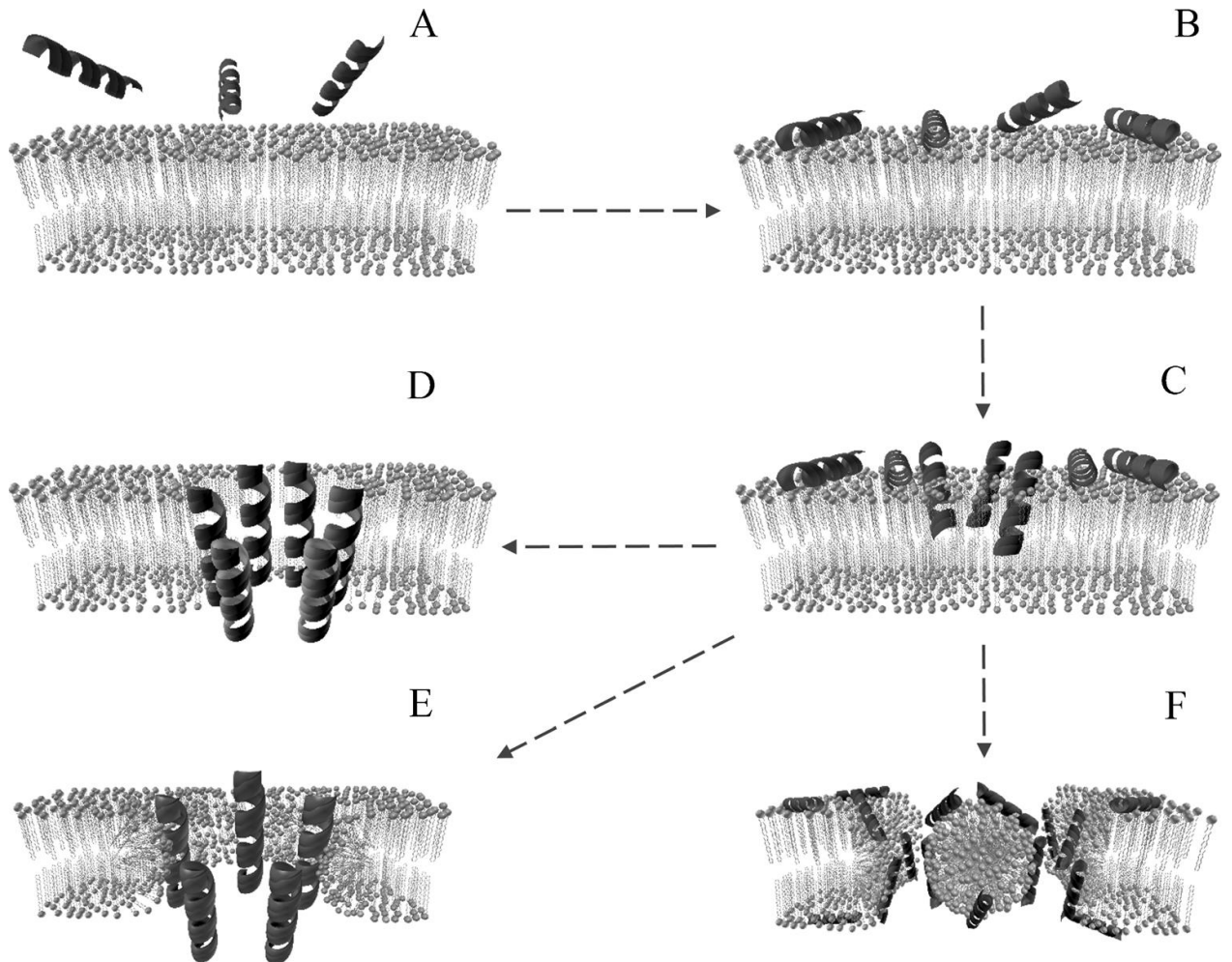




**Figura 1.** Estrutura tridimensional de peptídeos antimicrobianos selecionados de diferentes famílias. A estrutura foi obtida do RCSB Protein Databank e visualizada com o pacote UCSF Chimera (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics; University of California) (NAWROT *et al*, 2014).

Os peptídeos antimicrobianos de plantas têm demonstrado um amplo espectro de atividades antimicrobianas contra fitopatógenos, assim como contra organismos patogênicos para humanos, vírus, bactérias, fungos, parasitas e células neoplásticas (ODINTSOVA & EGOROV, 2012; NAWROT *et al*, 2014). A maioria dos AMPs conhecidos atua pela formação de poros nas membranas, resultando no escape de íons e metabólitos, despolarização, interrupção dos processos respiratórios e morte celular (PELEGRINI *et al*, 2011). A estrutura anfipática e carga positiva em pH fisiológico podem ser características significativas permitindo que os AMPs interajam com os lipídeos de membrana. Os resíduos catiônicos eletrostaticamente atraem moléculas carregadas negativamente (ex. fosfolipídeos aniônicos, lipopolissacarídeos ou ácidos teicóicos) permitindo que o peptídeo acumule-os na superfície da sua membrana (PELEGRINI & FRANCO, 2005).

Quando as concentrações alcançam um valor limite, o colapso começa. Foi proposto três modelos principais explicando esse fenômeno: modelo barrel-stave, modelo buraco de minhoca (ou poro toroidal) e modelo do tapete (**Figura 2**) (NAWROT *et al*, 2014).



**Figura 2.** Representação dos modelos frequentemente citados para atividade dos peptídeos antimicrobianos. (a) AMPs difundindo-se na solução, (b) adsorção dos AMPs na membrana. Após alcançar a concentração limiar, as moléculas peptídicas começam a se reorientar na dupla camada lipídica (c). A destinação posterior deve ser descrita utilizando um dos três modelos. (d) modelo barrel-stave, (e) modelo buraco de minhoca ou fenda espacial e (f) o modelo de carpete (NAWROT *et al*, 2014).

No modelo de *barrel-stave* (**Figura 4d**), os AMPs se oligomerizam com resíduos hidrofóbicos dos peptídeos voltados para o interior da camada lipídica e os hidrofílicos orientados

para o lúmen de poros recém-formado. No modelo buraco de minhoca, ou fenda espacial (**Figura 4e**), as moléculas peptídicas reorientam-se na membrana durante a agregação, arrastando os lipídeos com eles (por meio de interações eletrostáticas entre os grupos de fosfolipídeos e resíduos hidrofílicos dos AMPs). Consequentemente, a membrana “dobra-se” e camadas unidas formam o poro toroidal. No modelo de tapete (**Figura 4f**), os peptídeos atuam como detergentes, cobrindo a membrana de forma eletrostática (em uma forma oligomérica ou monomérica). Esse “tapete” de moléculas anfipáticas causa um deslocamento fosfolipídico, alterando as propriedades da membrana, rompendo-a (PELEGRINI *et al*, 2011; NAWROT *et al*, 2014).

Existem diferenças entre a atividade antifúngica e antibacteriana, majoritariamente conectada com a diferença de composição das membranas-alvo. Por exemplo,  $\gamma$ -tioninas podem se ligar as glucosilceramidas e aos esfingolipídeos na membrana dos fungos. Já nas bactérias os receptores são os fosfolipídeos da membrana (PELEGRINI & FRANCO, 2005; NAWROT *et al*, 2014). Apesar disso, muitos AMPs mostram atividade contra bactérias e fungos, simultaneamente (HUGHES *et al*, 2000; PELEGRINI & FRANCO, 2005).

O interesse nos AMPs tem crescido devido ao seu potencial em aplicações terapêuticas, principalmente devido ao fato de que, apesar de sua linhagem antiga, os AMPs permanecem como armas de defesa efetivas, confundindo a crença geral de que bactérias, fungos e vírus podem e irão desenvolver resistência a qualquer substância imaginável (ZASLOFF, 2002). Seu modo específico de ação contra bactérias permite que eles evitem os mecanismos de resistência mais comuns. AMPs contendo  $\alpha$ -hélices ou folhas- $\beta$  podem interagir com as membranas bacterianas criando poros e, consequentemente, destroem a funcionalidade da membrana. Considerando os problemas atuais com as bactérias resistentes a multi-drogas, há esperança que os AMPs possam fornecer benefícios terapêuticos como alternativa aos antibióticos convencionais (BENKO-ISEPPON *et al*, 2010; ODINTSOVA & EGOROV, 2012; MARMIROLI & MAESTRI, 2014).

Embora existam muitas pesquisas sobre os peptídeos antimicrobianos de diversas espécies, tanto em relação a suas estruturas e atividade antimicrobiana, poucas sequências de peptídeos vegetais estão registradas nos bancos de dados de proteínas e, aqueles que estão, são pouco anotadas, principalmente em relação as interações AMPs-patógenos (NAWROT *et al*, 2014), ou seja, possuem poucas informações, principalmente devido a seu *Open Reading Frame* (ORF) ser curto (MARMIROLI & MAESTRI, 2014).

A abordagem de bioinformática convencional tem contribuído para o entendimento da estrutura madura dos peptídeos e suas formas modificadas pós-transducional, complementadas pelas análises dos peptídeos via espectrofotometria de massa (MARMIROLI & MAESTRI, 2014). Recentes análises de bioinformática em plantas revelaram uma inesperada abundância de genes codantes para os AMPs, representando um arsenal de defesa dinâmico e diversificado contra invasores patogênicos (BENKO-ISEPPON *et al.*, 2010).

## **2.5 Bioinformática e Transcriptômica**

A Bioinformática é uma área de pesquisa interdisciplinar (fica entre a ciência computacional e a ciência biológica) que consiste na análise quantitativa de informações relacionadas com as macromoléculas biológicas com o auxílio de computadores. Existem várias definições na literatura para a bioinformática, algumas mais inclusivas que outras. O principal objetivo da bioinformática é compreender melhor as células vivas e seu funcionamento em um nível molecular. Por meio da análise da sequência molecular bruta e dados de sua estrutura, a bioinformática pode gerar novas visões e fornecer uma perspectiva “global” da célula (XIONG, 2006).

O surgimento da bioinformática, datado no final dos anos 60, pode ser atribuído a três fatores principais: (i) a explosão do número de sequências proteicas disponíveis que precisavam ser “traduzidas”, (ii) a descoberta de que as macromoléculas carregam informações (PROSDOCIMI *et al.*, 2002; DEGRAVE & MACHADO, 2007) e (iii) a disponibilidade de computadores mais potentes e rápidos nas principais universidades e centros de pesquisa. Porém foi apenas na década de 1980 que a Bioinformática se tornou uma disciplina independente (DEGRAVE & MACHADO, 2007).

Em princípio, a Bioinformática trabalhava apenas com a genômica, entretanto, com o aumento exponencial do número de genomas sequenciados surge também a necessidade de processar e correlacionar as informações brutas dos bancos de dados existentes transformando-as em informação e, partindo desta informação, gerando conhecimento, que é a informação testada experimentalmente. Essa alteração de foco dos ácidos nucleicos para as proteínas, suas estruturas e funções, vias metabólicas e interações celulares, é a chamada “Era Pós-Genômica” (PROSDOCIMI *et al.*, 2002). O termo “ômico” refere-se à análise global dos sistemas biológicos.

Assim, além da genômica, outras ciências ômicas surgiram, como a transcriptômica, a proteômica e a metabolômica, cada uma com seu próprio conjunto de instrumentos, técnicas, softwares e base de dados (ESPÍNDOLA *et al.*, 2010).

A transcriptômica tem se tornado um campo inspirador das pesquisas científicas na era pós-genômica, devido as seguintes razões: (i) análises do transcriptoma refletem a dinâmica da expressão do genoma. Apesar da maioria das células compartilharem o mesmo conjunto de genes, seus modelos de transcrição são temporal e espacialmente específicos, o que leva a diferentes tipos celulares e/ou funções. (ii) Estudos transcriptômicos suportam as pesquisas da proteômica. As análises do transcriptoma não apenas ajudam a explicar a inconsistência do número de genes codificantes com o número de proteínas traduzidas, mas também é o ponto de partida para o estudo da regulação transducional. (iii) Estudos estruturais e funcionais de ncRNA (do inglês, nonprotein-coding RNA) expandem o campo da transcriptômica. Recentemente, um grande número de espécies de RNA, transcritos de regiões genômicas de proteínas não codantes, foram descobertas com papéis importantes na regulação genética. Além disso, para genes codificadores de proteínas, ambos os genomas procaríoto e eucarioto contêm sequências de proteínas não codantes (DONG & CHEN, 2013).

Um dos campos mais desenvolvidos da era pós-genômica a transcriptômica consiste no estudo do conjunto completo dos RNAs transcritos em uma célula ou tecido específico, em um certo estágio de desenvolvimento e/ou sobre uma condição fisiológica específica. Esse conjunto de RNAs consiste no RNA mensageiro (*messenger RNA*, mRNA), RNA transportador (*transfer RNA*, tRNA), RNA ribossômico (*ribosomal RNA*, rRNA) e outros RNAs não-codantes. A transcriptômica foca na expressão genética no nível do RNA e oferece uma ampla gama de informações da estrutura e função dos genes, com o intuito de revelar os mecanismos moleculares envolvidos nos processos biológicos específicos (WANG, GERSTEIN & SNYDER, 2009; DONG & CHEN, 2013).

Atualmente, os avanços computacionais em paralelo com a internet, permitem a rápida análise e troca de informações presentes em bancos de dados biológicos online, possibilitando a construção de sistemas *in silico* para simulação de formas naturais e modificadas de produtos específicos (ESPÍNDOLA *et al.*, 2010) ou para seleção de genes diferencialmente expressos (ANDRADE, 2006).

Com o desenvolvimento de tecnologias de sequenciamento de alto rendimento de última geração, as análises transcriptômicas têm contribuído progressivamente no nosso entendimento sobre a rede reguladora dos genes baseado no RNA. Estudos com o transcriptoma têm demonstrado que a maioria dos genomas eucarióticos é transcrita em RNAs. Por exemplo, mais de 93% do genoma humano é transcrito em RNAs, dentre estes apenas 2% são de regiões codantes (DONG & CHEN, 2013).

Uma das técnicas desenvolvidas para a análise do transcriptoma dos organismos é a técnica de RNA-Seq, a qual utiliza tecnologias de sequenciamento de alta cobertura desenvolvidos recentemente. No geral, esta técnica consiste em uma população de RNA (total ou fracionado) que é convertida em uma biblioteca de fragmentos de *complementary DNA* (cDNA) com adaptadores acoplados a uma ou a ambas as regiões terminais. Cada molécula, com ou sem amplificação, é sequenciada para obter pequenas sequências de uma região ou de ambas as regiões terminais. Os *reads* gerados são de 30-400 pb, dependendo da tecnologia de sequenciamento de DNA utilizada. Após o sequenciamento, as sequências (reads) resultantes são alinhadas a um genoma de referência ou a transcritos de referência; ou é realizado a montagem (*assembly*) *de novo* sem a sequência genômica para produzir um mapa de transcrição em escala genômica que consiste da estrutura transcricional e/ou nível de expressão de cada gene (WANG, GERSTEIN & SNYDER, 2009). Essa técnica de RNA-Seq oferece a promessa de descobertas rápidas e compreensivas de novos genes e transcritos em menos tempo e a um preço menor do que as ESTs do sequenciamento de Sanger convencional (ROBERTS *et al*, 2011).

## **2.6 BLAST**

O *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), como o próprio nome indica, é uma ferramenta de busca de similaridade entre sequências biológicas, de nucleotídeos ou aminoácidos. Ele foi desenvolvido por Stephen Altschul em 1990 (XIONG, 2006) e deriva do algoritmo Smith e Waterman (1981), caracterizado por apresentar a pontuação máxima do alinhamento local de duas sequências por meio do método exaustivo (conhecido como programação dinâmica), porém, ao invés do método exaustivo, emprega a heurística baseada em “palavras”, um método muito mais rápido (XIONG, 2006; EMBRAPA, 2007).

O objetivo do BLAST é encontrar segmentos sem brechas de alta pontuação dentre as sequências relacionadas. A existência de segmentos acima de um dado limiar indica a similaridade entre os pares além do acaso, o que auxilia na discriminação de sequências relacionadas de sequências não relacionadas em um banco de dados (XIONG, 2006).

Comparando as sequências de proteínas ou nucleotídeos, o BLAST produz uma representação dos alinhamentos em gráfico de pontos (*dot plot*) na qual apresenta combinações em diagonal ao longo de uma matriz com as possíveis regiões similares entre aminoácidos ou nucleotídeos com valores atribuídos a cada uma das unidades correspondentes. Cada alinhamento retornado é marcado e a ele é atribuída uma medida de significância estatística, chamada de Medida Esperada (*Expectation Value*, E-value), que apresenta a probabilidade do alinhamento ter ocorrido ao acaso. Além disso, o BLAST considera a composição de aminoácidos da sequência de entrada (*Query sequence*) na sua estimativa de significância estatística, reduzindo assim, o número de resultados falso-positivos (WHEELER *et al*, 2007). Os alinhamentos retornados podem ser limitados por um E-value limite ou um intervalo.

O alinhamento do BLAST ocorre por meio dos seguintes passos (**Figura 3**). (i) O primeiro passo (*seeding*) é a criação de uma lista de palavras da sequência de entrada. Cada palavra é, geralmente, de três resíduos para sequências de proteínas e de onze resíduos para sequências de DNA. Essa lista inclui cada palavra possível extraída da sequência de entrada. (ii) Depois, ocorre a busca nos bancos de dados por sequências com palavras similares aquelas da lista gerada anteriormente. (iii) A essa similaridade é atribuída uma pontuação dada por uma matriz de substituição. Uma palavra é dada como correspondente se essa pontuação for superior a um limiar. (iv) Depois ocorre o alinhamento dos pares, estendendo a partir das palavras em ambas as direções e ao mesmo tempo, contando a pontuação do alinhamento usando a mesma matriz de substituição do passo anterior. A extensão continua até que a pontuação do alinhamento seja menor do que do limiar estipulado devido a não-correspondência. As sequências alinhadas resultantes sem lacunas são chamadas de HSP (do inglês *high-scoring segment pair*) sendo apresentadas no relatório final do alinhamento (XIONG, 2006).

1. Query: MRD**PYN**KLIS
2. Scan every three residues to be used in searching BLAST word database.
3. Assuming one of the words finds matches in the database.

Query	<b>PYN</b>	<b>PYN</b>	<b>PYN</b>	<b>PYN</b>	...
Database	<b>PYN</b>	<b>PFN</b>	<b>PFQ</b>	<b>PFE</b>	...

4. Calculate sums of match scores based on BLOSUM62 matrix.

Query	<b>PYN</b>	<b>PYN</b>	<b>PYN</b>	<b>PYN</b>	...
Database	<b>PYN</b>	<b>PFN</b>	<b>PFQ</b>	<b>PFE</b>	...
Sum of score	<b>20</b>	<b>16</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	...

5. Find the database sequence corresponding to the best word match and extend alignment in both directions.

Query	<b>M R D</b>	<b>PYN</b>	<b>K L I S</b>
Database	<b>M H E</b>	<b>PYN</b>	<b>D V P W</b>

←
→

extension to left
extension to right

6. Determine high scored segment above threshold (22).

Query	<b>M R D</b>	<b>PYN</b>	<b>K L I S</b>
Database	<b>M H E</b>	<b>PYN</b>	<b>D V P W</b>
	<b>5 0 2</b>	<b>20</b>	<b>-1 1 -3 -3</b>

**HSP, total score 24**

**Figura 3:** Ilustração do procedimento do BLAST utilizando uma sequência de entrada hipotética correspondendo com um banco de dados de sequências hipotéticas. A pontuação do alinhamento é baseada na matriz BLOSUM62. Um exemplo de correspondência de palavras é destacado nas caixas (XIONG, 2006).

O BLAST ainda possui uma variedade de outros programas, os quais incluem o BLASTn, BLASTp, BLASTx, tBLASTn e tBLASTx. O BLASTn faz a comparação de queries de sequências de nucleotídeos com um banco de dados de sequências de nucleotídeos. O BLASTp usa sequências



de proteínas como queries contra um banco de dados de proteínas. O BLASTx traduz os queries em seis frames (“quadros de leitura”) de sequências de nucleotídeos para sequências de aminoácidos e compara com um banco de dados de sequências de aminoácidos. O tBLASTn, ao invés de traduzir os queries, traduz um banco de dados de nucleotídeos para seis frames para comparar com as sequências de proteínas (queries). O tBLASTx traduz tanto as sequências de entrada quando do banco de dados, ambos de sequências de nucleotídeos (XIONG, 2006).

## 2.7 Bancos de dados biológicos

Um banco de dados biológicos é o local onde são armazenadas as sequências, seja de nucleotídeos ou aminoácidos, que são utilizadas como referência ou ponto de partida para a comparação. Ele pode ser de acesso restrito, o qual não compartilha publicamente seu conteúdo, ou livre, que permite o acesso dos dados por qualquer usuário sem autorização prévia. Existem três grandes bancos públicos mundiais que trocam diariamente dados entre si: *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL, <http://www.embl.de/>), *National Center for Biotechnology Information* (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e *DNA Databank of Japan* (DDBJ, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) (EMBRAPA, 2007).

A crescente quantidade de sequências de nucleotídeos e aminoácidos de diversas espécies de organismos nos bancos de dados possibilitou o uso da abordagem computacional para descobrir genes ainda não identificados e compreender suas funções, estruturas e papel em alguns processos biológicos. Entre os diversos bancos de dados disponíveis, aqueles relacionados aos peptídeos antimicrobianos despertam grande interesse por sua funcionalidade e importante papel na defesa contra infecções microbianas em eucariontes multicelulares (BELARMINO & BENKO-ISEPPON, 2010).

Com o aumento do número de peptídeos antimicrobianos codificados, bancos de dados dedicados a essas moléculas foram criados e têm aumentado, com informações disponíveis e abrangendo dados taxonômicos, microbiológicos, físico-químicos e estruturais (ODINTSOVA & EGOROV, 2012). Dentre eles, encontra-se o *Collection of AntiMicrobial Peptides* (CAMP, disponível em [www.camp.bicnirrh.res.in/index.php](http://www.camp.bicnirrh.res.in/index.php)), um banco de dados online e de livre acesso o qual é administrado e organizado manualmente. Os dados no CAMP são organizados em 17

campos: CAMP ID, sequência, tamanho da sequência, organismo de origem, taxonomia, atividade, natureza da Gram, organismos-alvo, atividade hemolítica, PubMed ID, nome e definição da proteína, GenInfo ID, Swiss-Prot, números de acesso do PDB, comentários e o tipo de conjunto de dados (experimentalmente validado/patente/predição). Baseado em sua atividade, os peptídeos eram classificados em antibacteriano, antifúngico, antiviral ou antiparasitário (THOMAS *et al*, 2010), agora, após uma nova atualização em 2013, no lugar de antiparasitário há a não-classificadas, além das patentes, possuindo atualmente um total de 6756 sequências: 2822 antibacterianas, 1107 antifúngicas, 98 antivirais, 1879 não-classificadas e 1716 patentes (CAMP, 2014).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental 3.1 foi realizada pela EMBRAPA Gado de Corte (Campo Grande, MS).

#### 3.1 Desenvolvido pela EMBRAPA Gado de Corte (Campo Grande, MS)

##### 3.1.1 Material biológico e extração de RNA para o sequenciamento

Aproximadamente 640 sementes de *U. decumbens* cv. Basilisk (genótipo tolerante ao Al<sup>3+</sup>) foram germinadas em bandejas com areia e vermiculita 1:1. Após doze dias da germinação, 200 plântulas foram transferidas para dois sistemas hidropônicos, contendo os seguintes tratamentos: (1) 200 µM CaCl<sub>2</sub>, pH 4.2; e (2) 200 µM CaCl<sub>2</sub> + 200 µM AlCl<sub>3</sub>, pH 4.2; preparadas conforme WENZL *et al* (2006). Foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado com três repetições, com cerca de 30 plântulas cada. As plântulas permaneceram nos tratamentos por 8 horas. Depois deste período, as plântulas foram retiradas dos tratamentos e suas raízes foram cortadas em aproximadamente 1 centímetro a partir da ponta para a extração do RNA total.

A extração de RNA dos seis bulks de raízes (três submetidos ao Al<sup>3+</sup> e três controles) foi feita utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen) conforme o protocolo do fabricante. O RNA total foi então ressuspensionado em 20 µL de água MilliQ estéril e tratado com DNase (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fabricante. A quantificação do RNA total foi realizada no NanoDrop® 1000 (Thermo), obtendo-se concentrações superiores a 1000 ng µL<sup>-1</sup>. A qualidade do RNA foi avaliada pela razão das absorvâncias A260 nm e A280 nm, sendo próximas a 1,8; e pela análise em gel de agarose 1%. Após esta avaliação, as amostras foram ressuspensionadas novamente em etanol 70% e enviadas para o Beijing Genomics Institute (BGI), Shenzhen, China.

##### 3.1.2 Construção das bibliotecas de mRNA

No *Beijing Genomics Institute* (BGI) em Shenzhen, China, o RNA total foi tratado com DNase e o mRNA foi isolado e purificado utilizando esferas magnéticas com oligo(dT). O mRNA purificado foi fragmentado por enzimas de restrição e, em seguida, a primeira fita de cDNA foi sintetizada. O mRNA molde foi removido e a segunda fita de cDNA foi sintetizada.

Posteriormente, as extremidades dos cDNAs foram reparadas e foi adicionado ao meio um nucleotídeo A (adenina) em cada extremidade 3' para ligação com os adaptadores (linkers). Foi realizada uma PCR com oligonucleotídeos específicos para as sequências dos adaptadores, aumentando o número de fragmentos das bibliotecas. Para validação dos dados, as bibliotecas foram quantificadas e qualificadas usando o Agilent DNA 1000 no *Bionalyzer* e ABI *StepOnePlus Real-Time PCR System*. As bibliotecas de cDNA foram sequenciadas utilizando a plataforma Illumina HiSeq™ 2000.

## **3.2 Desenvolvido na Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)**

### **3.2.1 Obtenção das sequências de peptídeos antimicrobianos**

As sequências de peptídeos antimicrobianos foram obtidas do banco de dados *Collection of AntiMicrobial Peptides* (CAMP disponível em [www.camp.bicnirrh.res.in/index.php](http://www.camp.bicnirrh.res.in/index.php)). O download das sequências dos AMPs foi realizado manualmente, selecionando e copiando cada sequência e passando-as para o programa Excel. As sequências foram convertidas para o formato FASTA e instaladas em um banco de dados local no computador que seria utilizado para as posteriores análises. Obteve-se um total de 5.906 sequências de AMPs do banco CAMP, com exceção das sequências de patentes.

### **3.2.2 Alinhamento das sequências**

Foi realizada a comparação por similaridade dos transcritos de *U. decumbens* contra as sequências obtidas do banco CAMP utilizando o BLASTx pelo script *BLAST all*. O BLASTx traduz as sequências de nucleotídeos (queries) em seis frames de sequências de aminoácidos, que são utilizados para comparação por similaridade com um banco de dados de proteínas (XIONG, 2006). Já o BLASTall permite realizar, em um computador local, a comparação de todas as sequências, em formato fasta, presentes em um arquivo contra um banco de dados instalado localmente. Foram considerados resultados positivos apenas aqueles com E-value menor que 1e-5. O E-value é um parâmetro utilizado no BLAST e mostra qual a probabilidade de um alinhamento

ter ocorrido ao acaso. Quanto menor o E-value, menor é a probabilidade do alinhamento ter ocorrido ao acaso, ou seja, melhor é o resultado do alinhamento.

### **3.2.3 Análise dos resultados**

Os resultados foram armazenados em um banco de dados construído localmente utilizando o MySQL, através do programa phpmyadmin, disponibilizado pelo pacote de código aberto XAMP. O MySQL é um sistema de gerenciamento de banco de dados, que utiliza a linguagem de consulta estruturada (*Structured Query Language, SQL*) como interface. O banco de dados local serviu para facilitar a análise das características de cada peptídeo. Ao analisar os resultados iniciais, percebeu-se que havia transcritos que retornavam similaridade com diferentes AMPs, na mesma região ou com poucos aminoácidos de diferença. Deste modo, realizou-se uma seleção manual dos dados, utilizando como parâmetro o melhor E-value e o local que retornava similaridade de cada transcrito. Essa seleção foi realizada no programa Excel e com o auxílio do MySQL. Ao final, obteve-se uma segunda tabela de dados que foi então, colocada no MySQL criando um segundo banco de dados local. Os AMPs encontrados foram separados em famílias de acordo com a classificação do banco de dados CAMP. Subsequentemente, foi realizada uma detalhada busca bibliográfica sobre os resultados encontrados para a discussão dos mesmos. Baseada na revisão de literatura, foi realizada uma nova classificação dos AMPs que não foram classificados de acordo com o CAMP.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análise geral dos peptídeos antimicrobianos encontrados

A partir do alinhamento entre os 164.920 transcritos únicos de *U. decumbens* cv. Basilisk contra as 5.906 sequências de peptídeos antimicrobianos do banco de dados CAMP obteve-se 3.161 similaridades com 250 peptídeos diferentes. Como foi identificado similaridades entre um transcrito com mais de uma sequência de AMP no mesmo local, foi realizado a seleção dos dados inicialmente obtidos, utilizando como parâmetro o melhor E-value e a região que retornava similaridade para cada transcrito. Obteve-se, então, uma segunda tabela de dados, com 1.033 similaridades entre os transcritos e os peptídeos, e com 94 AMPs diferentes entre si (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Tabela dos resultados obtidos após a seleção dos dados obtidos a partir do BLASTx entre os 164.920 transcritos únicos e as 5.906 sequências de peptídeos antimicrobianos com o número de vezes que retornaram similaridade, taxonomia do AMP e melhor E-value.

Nome do peptídeo antimicrobiano	Nº de repetições	Taxonomia de origem	Melhor E-value
<i>L-amino-acid oxidase (Bothrops moojeni)</i>	1	Animalia	1,00E-07
<i>Lysozyme C I</i>	1	Animalia	4,00E-07
<i>Tu-AMP 1</i>	1	Viridiplantae	7,00E-08
<i>Defensin Ec-AMP-D1</i>	1	Viridiplantae	5,00E-22
<i>Cationic antimicrobial protein CAP37</i>	1	Animalia	6,00E-11
<i>Germin-like protein</i>	1	Viridiplantae	2,00E-33
<i>L-amino-acid oxidase (LAO)</i>	1	Animalia	2,00E-06
<i>L-cystatin</i>	1	Animalia	3,00E-06
<i>Protein NP24</i>	1	Viridiplantae	2,00E-11
<i>Lysozyme C</i>	1	Animalia	1,00E-07
<i>Snakin-1</i>	1	Viridiplantae	1,00E-12
<i>LTP110</i>	1	Viridiplantae	9,00E-15
<i>Dendrocin</i>	1	Viridiplantae	9,00E-06
<i>L-amino-acid oxidase (Crotalus atrox)</i>	1	Animalia	4,00E-07
<i>Enhancer of rudimentary homolog</i>	1	Animalia	7,00E-06
<i>Lysozyme c-1</i>	1	Animalia	2,00E-08
<i>Fa-AMP1</i>	1	Viridiplantae	4,00E-06
<i>Hevein-like antimicrobial peptide</i>	1	Viridiplantae	6,00E-60
<i>Non-specific lipid-transfer protein 3</i>	1	Viridiplantae	9,00E-15
<i>Non-specific lipid-transfer protein 4.1</i>	1	Viridiplantae	9,00E-06
<i>L-amino-acid oxidase (Crotalus adamanteus)</i>	1	Animalia	4,00E-07
<i>Antimicrobial peptide NK-lysin, partial</i>	1	Animalia	7,00E-06
<i>Antifungal protein</i>	1	Viridiplantae	3,00E-18

**Tabela 1.** Tabela dos resultados obtidos após a seleção dos dados obtidos a partir do BLASTx entre os 164.920 transcritos únicos e as 5.906 sequências de peptídeos antimicrobianos com o número de vezes que retornaram similaridade, taxonomia do AMP e melhor E-value.

<i>Fa-AMP2</i>	1	Viridiplantae	4,00E-06
<i>Non-specific lipid-transfer protein 4</i>	1	Viridiplantae	6,00E-18
<i>Parabutoparin</i>	1	Animalia	9,00E-06
<i>Viphi-E</i>	1	Viridiplantae	2,00E-06
<i>Antimicrobial phospholipase A2</i>	1	Animalia	5,00E-06
<i>Griffithsin</i>	1	Algae	3,00E-07
<i>Bactericidal permeability-increasing protein (Ictalurus punctatus)</i>	1	Animalia	2,00E-06
<i>Bactericidal permeability-increasing protein (Rattus norvegicus)</i>	1	Animalia	6,00E-06
<i>Sd3</i>	2	Viridiplantae	3,00E-23
<i>Lysozyme</i>	2	Animalia	7,00E-10
<i>L-amino-acid oxidase (Pseudechis australis)</i>	2	Animalia	2,00E-06
<i>Snakin-2 precursor</i>	2	Viridiplantae	5,00E-22
<i>Achacin</i>	2	Animalia	5,00E-11
<i>Antimicrobial protein PN-AMP1</i>	2	Viridiplantae	4,00E-06
<i>Sd1</i>	2	Viridiplantae	9,00E-22
<i>Snakin-2</i>	2	Viridiplantae	7,00E-22
<i>Putative defense protein</i>	2	Animalia	3,00E-10
<i>EcLTP</i>	2	Viridiplantae	2,00E-12
<i>Trypsin inhibitor</i>	2	Viridiplantae	5,00E-07
<i>HGAPDH</i>	2	Animalia	1,00E-07
<i>L-amino-acid oxidase (Bothrops jararacussu)</i>	3	Animalia	9,00E-11
<i>L-amino-acid oxidase (Demansia vestigiata)</i>	3	Animalia	9,00E-08
<i>Flower-specific gamma-thionin</i>	3	Viridiplantae	4,00E-12
<i>Protein synthesis inhibitor II</i>	4	Viridiplantae	2,00E-18
<i>Hordoindoline-A</i>	4	Viridiplantae	4,00E-06
<i>Kallikrein-related peptidase 5</i>	4	Animalia	4,00E-24
<i>L-amino-acid oxidase (Oxyuranus scutellatus)</i>	4	Animalia	1,00E-12
<i>CD-HEL</i>	4	Viridiplantae	2,00E-42
<i>Histone H2B 1/2/3/4/6</i>	4	Animalia	7,00E-26
<i>Endochitinase</i>	5	Viridiplantae	9,00E-19
<i>Snakin-1</i>	5	Viridiplantae	8,00E-22
<i>Wheatwin-2</i>	5	Viridiplantae	3,00E-59
<i>Zeamatin</i>	6	Viridiplantae	8,00E-127
<i>Histone H2B type 1-J</i>	6	Animalia	3,00E-51
<i>Wheatwin-1</i>	6	Viridiplantae	2,00E-60
<i>Hipposin</i>	7	Animalia	1,00E-13
<i>Cyanovirin-N</i>	7	Bacteria	9,00E-15
<i>Antimicrobial peptide eNAP-1</i>	7	Animalia	8,00E-10
<i>L-amino-acid oxidase (Bothropoides pauloensis)</i>	8	Animalia	5,00E-13
<i>Naegleriapore B</i>	8	Bacteria	2,00E-42

**Tabela 1.** Tabela dos resultados obtidos após a seleção dos dados obtidos a partir do BLASTx entre os 164.920 transcritos únicos e as 5.906 sequências de peptídeos antimicrobianos com o número de vezes que retornaram similaridade, taxonomia do AMP e melhor E-value.

<i>NK-lysin type 1 precursor</i>	8	Animalia	2,00E-07
<i>Histone H2B type 2-E</i>	8	Animalia	4,00E-54
<i>L-amino-acid oxidase (Siganus canaliculatus)</i>	8	Animalia	1,00E-18
<i>Thaumatin-like pathogenesis-related protein 2</i>	10	Viridiplantae	7,00E-68
<i>Protein synthesis inhibitor I</i>	10	Viridiplantae	5,00E-28
<i>Lysozyme (Entamoeba histolytica)</i>	11	Amoebozoa	1,00E-34
<i>Mannose-specific lectin</i>	11	Viridiplantae	6,00E-16
<i>Basic endochitinase A</i>	12	Viridiplantae	5,00E-154
<i>Thaumatin-like pathogenesis-related protein 3</i>	12	Viridiplantae	8,00E-77
<i>Thaumatin-like pathogenesis-related protein 1</i>	13	Viridiplantae	2,00E-69
<i>Bactericidal permeability-increasing protein precursor</i>	13	Animalia	6,00E-33
<i>Basic endochitinase B</i>	14	Viridiplantae	2,00E-106
<i>Naegleriapore A</i>	15	Bacteria	1,00E-40
<i>Basic endochitinase C</i>	16	Viridiplantae	1,00E-130
<i>Seed lectin alpha chain</i>	19	Viridiplantae	2,00E-35
<i>Putative fungistatic metabolite</i>	19	Fungi	3,00E-26
<i>Histone H2B type 1-K</i>	20	Animalia	2,00E-54
<i>Antifungal protein ginkbilobin-2</i>	20	Viridiplantae	2,00E-14
<i>Histone H2B type 1-C/E/F/G/I</i>	21	Animalia	6,00E-56
<i>Soybean toxin 17kDa chain</i>	22	Viridiplantae	2,00E-08
<i>Acyl-CoA-binding protein</i>	28	Animalia	3,00E-19
<i>Germin-like protein</i>	31	Viridiplantae	9,00E-66
<i>P14a</i>	32	Viridiplantae	5,00E-42
<i>YFGAP</i>	32	Animalia	5,00E-11
<i>Ubiquicidin</i>	33	Animalia	8,00E-18
<i>Histone H2B</i>	34	Animalia	3,00E-55
<i>Thaumatin-like protein1</i>	35	Viridiplantae	2,00E-80
<i>Casbene synthase</i>	41	Viridiplantae	6,00E-43
<i>Seed lectin beta chain</i>	41	Viridiplantae	7,00E-27
<i>Histone H2A</i>	78	Animalia	3,00E-49
<i>cgUbiquitin</i>	207	Animalia	2,00E-47

Nos resultados encontrados (**Tabela 1**), cgUbiquitina foi o AMP que apresentou o maior número de repetições (207 vezes). Essa molécula é um polipeptídeo antimicrobiano purificado de extratos de *Crassostrea gigas* que, por comparação com outras sequências N-terminais, é idêntica as ubiquitinas presentes em outros organismos (SEO *et al*, 2013). Dados da literatura indicam que as ubiquitinas possuem um importante papel na resposta hipersensitiva, constituindo o conjunto de



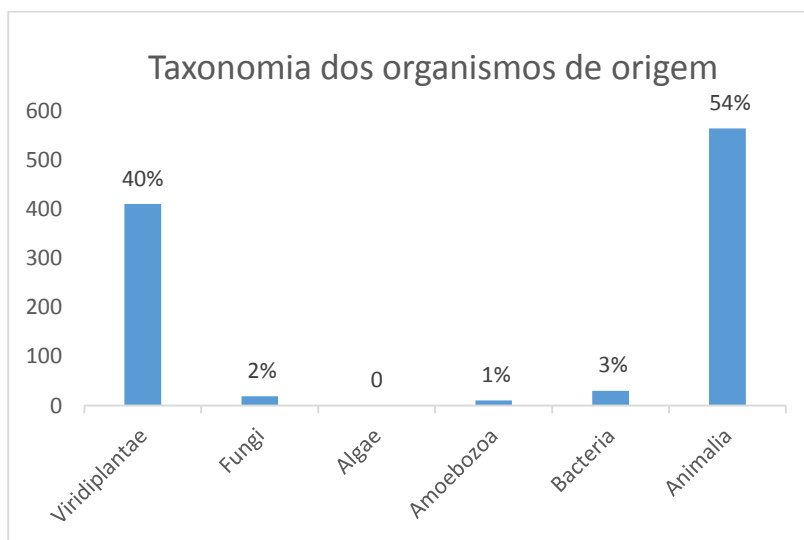
moléculas sinalizadoras que participam do mecanismo de morte celular programada nas plantas (CASTRO & FONTES, 2005).

Além disso, o AMP cgUbiquitina apresentou ampla atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo contra *Streptococcus iniae* e *Vibrio parahaemolyticus*, respectivamente, sem atividade hemolítica. Testes posteriores demonstraram que esse AMP não é permeável à membrana e atua por meio de um processo bacteriostático (SEO *et al*, 2013). *Streptococcus iniae* é um patógeno que ataca peixes em muitas regiões do mundo e que também pode causar infecções em seres humanos por meio da manipulação e preparação de peixes infectados (BAIANO & BARNES, 2009). O *Vibrio parahaemolyticus* é uma das principais espécies do gênero *Vibrio* e encontra-se distribuído em regiões costeiras de clima temperado e tropical de todo o mundo. Esse micro-organismo possui a capacidade de causar manifestações gastrointestinais por meio de surtos esporádicos associados com a ingestão de peixes e moluscos bivalves contaminados que não foram ou foram insuficientemente cozidos (PEREIRA *et al*, 2007).

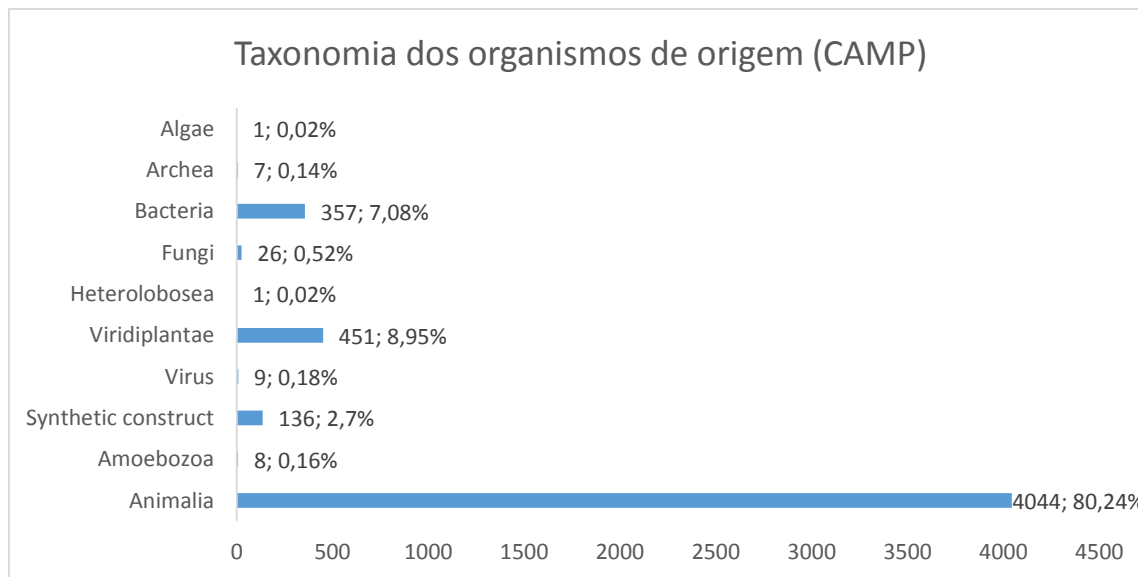
Outros AMPs que se destacaram nos resultados foram as histonas de Animalia. As histonas são componentes essenciais dos nucleossomos, os quais são responsáveis pelo enrolamento e compactação do DNA em cromatina, além de desempenharem um papel central na regulação da transcrição, reparo e replicação do DNA, e estabilidade cromossomal. O papel das proteínas histonas dos vertebrados ou de peptídeos derivados das histonas como efetores do sistema imune inato despertou o interesse dos pesquisadores apenas recentemente, apesar de ter sido relatada desde 1958. Essas moléculas possuem atividade antibacteriana contra várias bactérias Gram-positivas e negativas que afetam humanos e animais (PATAT *et al*, 2004).

Dentre os AMPs encontrados na **Tabela 1**, 54% são de origem animal, 40% de origem vegetal e 6% originários de outros organismos (**Figura 4**). Comparando com os dados do CAMP, banco de dados utilizado como base, onde observou-se 80% das sequências são de animais e apenas 9% de plantas (**Figura 5**), há a possibilidade do banco utilizado ter influenciado nos resultados obtidos. Além disso, de acordo com dados literários, as pesquisas sobre AMPs animais ocorreram anteriormente e são mais abundantes do que os AMPs vegetais, sendo que o primeiro relato desses compostos foi feito no início da década de 1980 em insetos (BOMAN, 2003). Comparando a variação de E-value entre os AMPs animais (2,00E-06 a 6,00E-36) e AMPs vegetais (2,00E-06 a 5,00E-154), percebe-se que estes últimos apresentaram E-values melhores do que os primeiros, ou

seja, a probabilidade do alinhamento ter ocorrido ao acaso é menor para aqueles de origem vegetal do que os de origem animal, o que entra em concordância com o organismo utilizado.



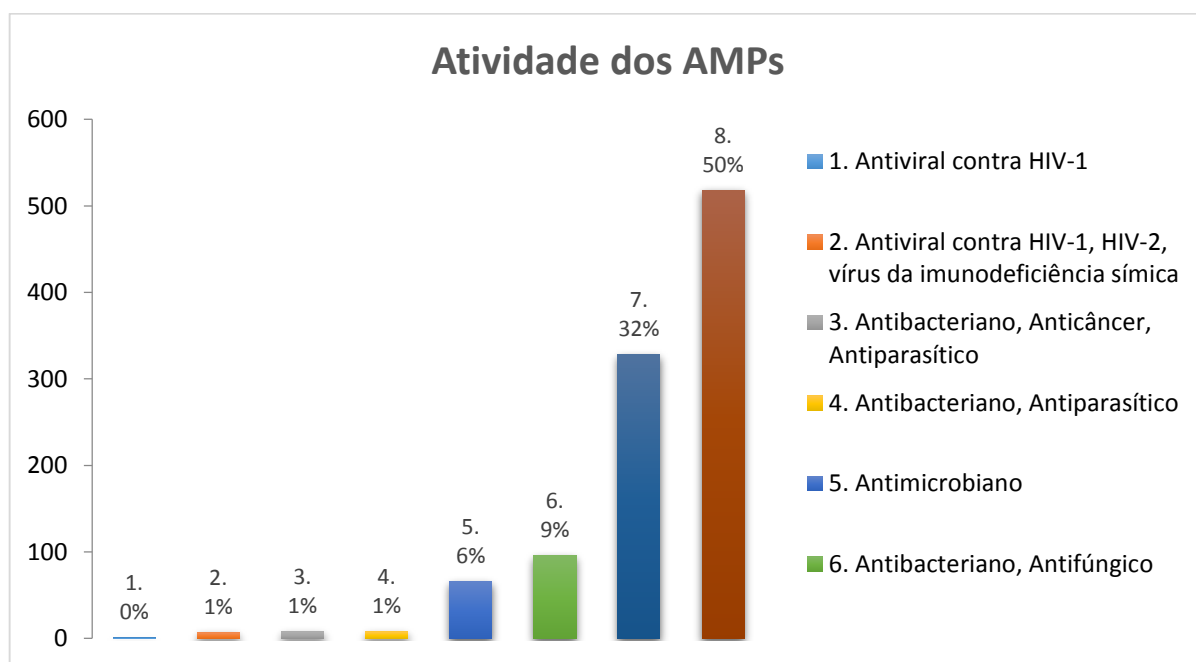
**Figura 4.** Taxonomia dos organismos de origem dos peptídeos antimicrobianos obtidos no BLASTx de *U. decumbens* cv. Basilisk contra o banco de dados CAMP.



**Figura 5.** Taxonomia dos organismos de origem das sequências de peptídeos antimicrobianos do banco de dados CAMP.

Cerca de 50% dos AMPs encontrados em *U. decumbens* cv. Basilisk possuem atividade antibacteriana, 32% antifúngica, 9% antibacteriana e antifúngica, 6% antimicrobiana e 3% outras

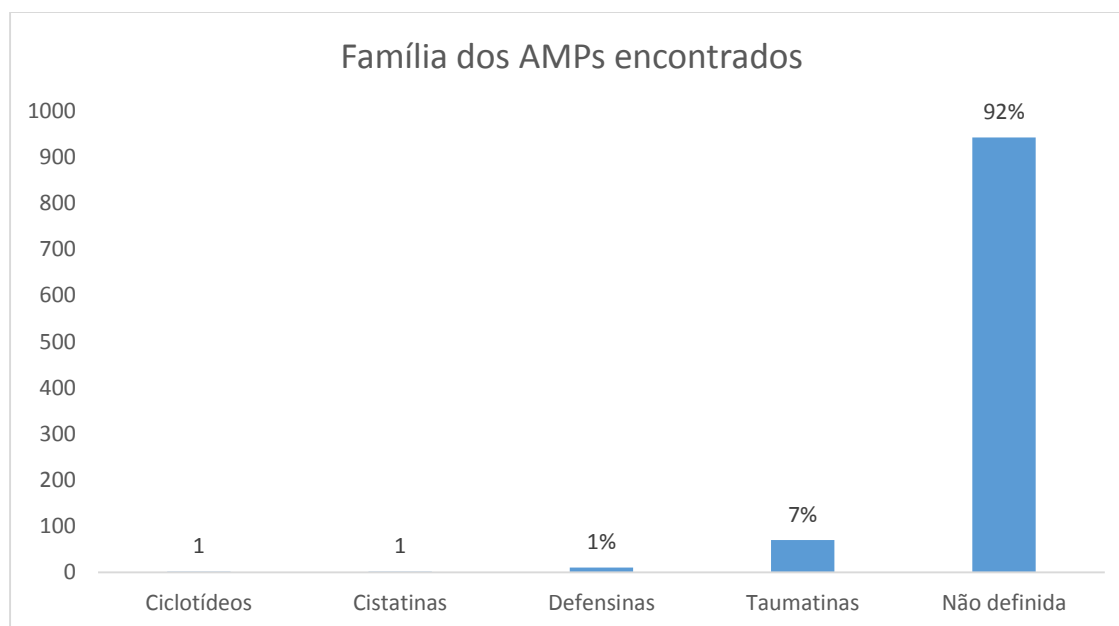
(Figura 6). Ainda, na Figura 6, é possível observar a variedade do arsenal de defesa de *U. decumbens* cv. Basilisk contra os patógenos, visto que esta forrageira mostra-se suscetível a apenas dois fungos: *Pithomyces chartarum* (BOTREL, NOVAES & ALVIM 1998; SATURNINO *et al*, 2010), o qual coloniza as folhas secas próximas ao solo; e *Clavipes sulcata* ataca principalmente os estágios de florescimento das gramíneas (SOUZA *et al*, 2007), provando ser eficiente, já que não há relatos de ataque de outros patógenos neste período de desenvolvimento. Apesar de *U. decumbens* cv. Basilisk também ser suscetível ao ataque das cigarrinhas-das-pastagens, não foram encontrados peptídeos antimicrobianos com atividade inseticida, visto que, no banco CAMP, não há AMPs com tal propriedade.



**Figura 6.** Atividade antimicrobiana dos peptídeos antimicrobianos obtidos, de acordo com a classificação do banco de dados CAMP, disponível em < <http://www.camp.bicnirrh.res.in/>>

Adotando a mesma classificação do banco de dados CAMP, foram encontradas em *Urochloa decumbens* cv. Basilisk quatro famílias de peptídeos antimicrobianos nos resultados obtidos: Taumatinas (70, 7%), defensinas (10, 1%), ciclotídeos e cistatinas (Figura 7). No entanto, a grande maioria dos AMPs encontrados, cerca de 92%, não possuem família definida pela classificação do CAMP. Dentre os AMPs de origem animal, apenas um peptídeo foi classificado

dentro de uma família, no caso, na cistatina. Os demais não são designados a nenhuma família de AMP. O mesmo ocorreu com AMPs originários de *Fungi*, *Bacteria*, *Amoebozoa* e *Algae*, os quais não foram classificados em nenhuma família. Mesmo dentre os AMPs vegetais, que apresentaram o maior número de classificados em famílias, muitos permaneceram como não definidos.



**Figura 7.** Família dos peptídeos antimicrobianos encontrados, de acordo com a classificação do banco de dados CAMP

#### 4.2 Análise dos peptídeos antimicrobianos vegetais

A partir do BLASTx entre os 164.920 transcritos únicos e as 5.906 sequências de AMPs, foi construída uma segunda tabela dos resultados obtidos para os AMPs de origem vegetal com o número de vezes que retornaram similaridade, a família, o organismo de origem do AMP e o melhor E-value. (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Total de 410 similaridades com peptídeos antimicrobianos de origem vegetal, com 47 AMPs diferentes nos resultados obtidos

Nome do peptídeo antimicrobiano/família	Nº de repetições	Organismo de origem	Melhor E-value
<i>Tu-AMP I/</i>	1	<i>Tulipa gesneriana</i> L	7,00E-08
<i>Defensin Ec-AMP-DI/</i>	1	<i>Echinochloa crusgalli</i>	5,00E-22

**Tabela 2.** Total de 410 similaridades com peptídeos antimicrobianos de origem vegetal, com 47 AMPs diferentes nos resultados obtidos

<i>Germin-like protein/</i>	1	<i>Morus alba</i>	2,00E-33
<i>Protein NP24/ thaumatin</i>	1	<i>Solanum lycopersicum</i>	2,00E-11
<i>Snakin-1/</i>	1	<i>Solanum tuberosum</i>	1,00E-12
<i>LTP110/</i>	1	<i>Oryza sativa</i>	9,00E-15
<i>Dendrocin/</i>	1	<i>Dendrocalamus latiflorus</i> Munro	9,00E-06
<i>Fa-AMP1/ defensin</i>	1	<i>Fagopyrum esculentum</i>	4,00E-06
<i>Hevein-like antimicrobial peptide/</i>	1	<i>Euonymus europaeus</i>	6,00E-60
<i>Non-specific lipid-transfer protein 3/</i>	1	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group	9,00E-15
<i>Non-specific lipid-transfer protein 4.1/</i>	1	<i>Hordeum vulgare</i>	9,00E-06
<i>Antifungal protein/ thaumatin</i>	1	<i>Zea mays</i>	3,00E-18
<i>Fa-AMP2/ defensin</i>	1	<i>Fagopyrum esculentum</i>	4,00E-06
<i>Non-specific lipid-transfer protein 4/</i>	1	<i>Lens culinaris</i>	6,00E-18
<i>Viphi-E/ ciclotyde</i>	1	<i>Viola philippica</i>	2,00E-06
<i>Sd3/ defensin</i>	2	<i>Saccharum officinarum</i>	3,00E-23
<i>Snakin-2 precursor/</i>	2	<i>Solanum lycopersicum</i>	5,00E-22
<i>Antimicrobial protein PN-AMP1/</i>	2	<i>Ipomoea nil</i>	4,00E-06
<i>Sd1/ defensin</i>	2	<i>Saccharum officinarum</i>	9,00E-22
<i>Snakin-2/</i>	2	<i>Solanum tuberosum</i>	7,00E-22
<i>EcLTP/</i>	2	<i>Echinochloa crusgalli</i> L	2,00E-12
<i>Trypsin inhibitor/</i>	2	<i>Fagopyrum tataricum</i>	5,00E-07
<i>Flower-specific gamma-thionin/</i>			
<i>defensin</i>	3	<i>Helianthus annuus</i>	4,00E-12
<i>Protein synthesis inhibitor II/</i>	4	<i>Hordeum vulgare</i>	2,00E-18
<i>Hordoindoline-A/</i>	4	<i>Hordeum vulgare</i>	4,00E-06
<i>CD-HEL/</i>	4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2,00E-42
<i>Endochitinase/</i>	5	<i>Avena sativa</i>	9,00E-19
<i>Snakin-1/</i>	5	<i>Solanum tuberosum</i>	8,00E-22
<i>Wheatwin-2/</i>	5	<i>Triticum aestivum</i>	3,00E-59
<i>Zeamatin/ thaumatin</i>	6	<i>Zea mays</i>	8,00E-127
<i>Wheatwin-1/</i>	6	<i>Triticum aestivum</i>	2,00E-60
<i>Thaumatin-like pathogenesis-related</i>			
<i>protein 2/ thaumatin</i>	10	<i>Avena sativa</i>	7,00E-68
<i>Protein synthesis inhibitor I/</i>	10	<i>Hordeum vulgare</i>	5,00E-28
<i>Mannose-specific lectin/</i>	11	<i>Dendrobium findlayanum</i>	6,00E-16
<i>Basic endochitinase A/</i>	12	<i>Secale cereal</i>	5,00E-154
<i>Thaumatin-like pathogenesis-related</i>			
<i>protein 3/ thaumatin</i>	12	<i>Avena sativa</i>	8,00E-77
<i>Thaumatin-like pathogenesis-related</i>			
<i>protein 1/ thaumatin</i>	13	<i>Avena sativa</i>	2,00E-69
<i>Basic endochitinase B</i>	14	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2,00E-106
<i>Basic endochitinase C</i>	16	<i>Secale cereal</i>	1,00E-130
<i>Seed lectin alpha chain</i>	19	<i>Spatholobus parviflorus</i>	2,00E-35
<i>Antifungal protein ginkobilobin-2</i>	20	<i>Ginkgo biloba</i>	2,00E-14

**Tabela 2.** Total de 410 similaridades com peptídeos antimicrobianos de origem vegetal, com 47 AMPs diferentes nos resultados obtidos

<i>Soybean toxin 17kDa chain /</i>	22	<i>Glycine max</i>	2,00E-08
<i>Germin-like protein/</i>	31	<i>Morus alba</i>	9,00E-66
<i>P14a/</i>	32	<i>Solanum lycopersicum</i>	5,00E-42
<i>Thaumatococcus-like protein 1/ thaumatin</i>	35	<i>Castanea sativa</i>	2,00E-80
<i>Casbene synthase</i>	41	<i>Ricinus communis</i>	6,00E-43
<i>Seed lectin beta chain</i>	41	<i>Spatholobus parviflorus</i>	7,00E-27

O AMP *Seed lectin beta chain*, o qual teve um alto número de repetições dentre os AMPs vegetais encontrados (41 vezes), é uma lecitina de semente galactose-específica que foi purificado de *Spatholobus parviflorus*, sendo a primeira lecitina purificada e cristalizada do gênero *Spatholobus* (família Fabaceae). O AMP *Seed lectin alpha chain*, com 19 repetições, também é uma lecitina de semente galactose-específica encontrada na mesma planta (GEETHANANDAN *et al*, 2011).

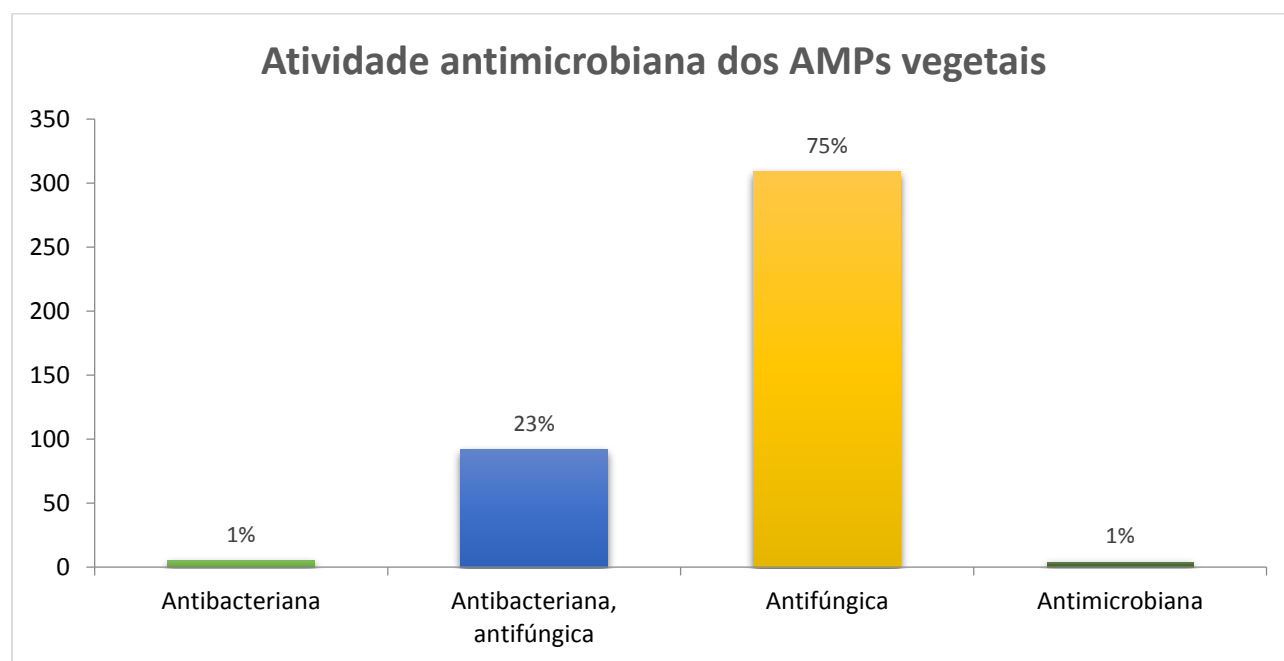
As lecitinas pertencem a uma classe de proteínas que ligam açúcares de forma específica e reversível, e que aglutinam células, sendo amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em animais, insetos, plantas e micro-organismos (SHARON & LIS, 1990). Devido as suas propriedades únicas de ligação com carboidratos, essas moléculas podem ser utilizadas na separação e caracterização de glicoproteínas e glicopeptídeos e em estudos de glicolipídeos, para diferenciação de células cancerígenas, estudos histoquímicos de células e tecidos, tipagem de células do sangue e bactérias, para rastrear vias neuronais e outros (SHARON & LIS, 1990; GEETHANANDAN *et al*, 2011).

Essas proteínas ou peptídeos também podem ser utilizadas para estimular os linfócitos a ativar o estado imune de pacientes e para a análise cromossômica na citogenética humana, assim como para a produção de citocininas. Além disso, as lecitinas são excelentes modelos para examinar a base molecular de reações específicas que ocorrem entre proteínas e outros tipos de moléculas, ambas de baixo ou alto peso molecular, como a ligação de antígenos e anticorpos, de substratos e enzimas, de drogas e proteínas, e de hormônios e fatores de crescimento (SHARON & LIS, 1990; 2004).

Outro AMP que teve um alto número de repetições foi *Casbene synthase* (41 vezes), de *Ricinus communis* L. Essa proteína catalisa a ciclização de geranyl difosfato para casbene, uma fitoalexina diterpeno com atividade antibacteriana e antifúngica que é produzida pelas mudas da mamona (*Ricinus communis* L.) em resposta ao ataque de fungos (HILL *et al.*, 1996). A casbene sintase pertence ao domínio N-terminal da família terpeno sintase, a qual possui o papel de sintetizar os terpenos que são parte do metabolismo primário, como os esteróis e caroteno, e também parte do metabolismo secundário (EMBL-EBI, 2014).

#### 4.3 Atividade antimicrobiana e classificação em famílias dos AMPs vegetais

Dentre os AMPs vegetais encontrados, a grande maioria possui atividade antifúngica (75%) e em menor proporção, atividade antibacteriana e antifúngica (23%) (**Figura 9**).



**Figura 8.** Atividade antimicrobiana dos peptídeos antimicrobianos vegetais obtidos a partir do BLASTx de *U. decumbens* cv. Basilisk contra o banco de dados CAMP, de acordo com a classificação do *Gene Ontology*.

A maioria dos AMPs encontrados em *Urochloa decumbens* cv. Basilisk pertence a família das taumatinas (**Figura 9**), sendo que todos os AMPs mencionados possuem atividade antifúngica, a qual foi aquela encontrada em maior proporção nos AMPs vegetais dos resultados (**Figura 8**). A taumatina, uma proteína de sabor doce intenso, foi primeiramente isolada dos frutos de *Thaumatococcus daniellii*, e, devido a similaridade de sequência, foi associada a família PR-5 das proteínas antimicrobianas, também designadas de proteínas semelhantes as taumatinas (*thaumatin-like proteins*, TLPs) (BREITENEDER, 2004; LIU, STURROCK & EKRAMODDOULLAH, 2010).

As TLPs nas últimas décadas, foram descobertas em uma ampla gama de organismos, incluindo nematoides, insetos, fungos e plantas gimnospermas e angiospermas. Elas são polipeptídeos de aproximadamente 200 resíduos de aminoácidos (LIU, STURROCK & EKRAMODDOULLAH, 2010) com peso molecular de 20-30 kDa, com uma estrutura tridimensional estável que é mantida por seus 16 resíduos de cisteína conservados que formam oito pontes dissulfeto (BREITENEDER, 2004; PALACIN *et al*, 2012). Além disso, devido a sua organização estrutural, geralmente, essas proteínas são resistentes a proteases e a desnaturação induzida por pH ou calor (BREITENEDER, 2004).

Essas estruturas proteicas podem ser classificadas em três grupos: (i) aquelas produzidas em resposta a infecções patogênicas, (ii) aquelas produzidas em estresse osmótico, também chamadas de osmotinas, e (iii) proteínas antifúngicas presentes nas sementes de cereais (BREITENEDER, 2004). As principais funções desempenhadas por essas estruturas são a atividade antifúngica e alérgenos de comidas, além de serem induzidos em estresse abiótico, principalmente o estresse salino (BREITENEDER, 2004; LIU, STURROCK & EKRAMODDOULLAH, 2010; PALACIN *et al*, 2012).

Outra família de AMPs que foi encontrada em grande proporção nos resultados obtidos (**Figura 7** e **Figura 9**) foi a família das defensinas. As defensinas são estruturas proteicas encontradas em uma ampla gama de organismos, como animais (GANZ, 2003; SELSTED & OUELLETTE, 2005), insetos (JANSEN & KOGEL, 2012) e plantas (SELS *et al*, 2008; ODINTSOVA & EGOROV, 2012), sendo uma das maiores e melhor estudada família de AMP. Essas estruturas proteicas são pequenos peptídeos catiônicos (45-54 aminoácidos) com um *motif* característico de oito resíduos de cisteína formando quatro pontes dissulfeto, com exceção das



defensinas de flores, que possuem cinco pontes dissulfeto (ODINTSOVA & EGOROV, 2012; MARMIROLI & MAESTRI, 2014).

As defensinas vegetais foram primeiramente isoladas em 1990 do trigo e da cevada, sendo originalmente categorizadas como um novo tipo de tioninas,  $\gamma$ -tioninas, devido ao seu tamanho molecular (5 kDa) e número similar de resíduos de cisteína (8) (SELS *et al*, 2008; BENKO-ISEPPON *et al*, 2010). No entanto, pesquisas posteriores demonstraram que estas se assemelhavam mais as defensinas de animais e insetos do que as tioninas vegetais. Deste modo, essas moléculas foram renomeadas de defensinas vegetais (ODINTSOVA & EGOROV, 2012). As defensinas vegetais foram incluídas no grupo das proteínas PR e classificadas como a família PR-12 quando TERRAS *et al* (1995) descobriu duas defensinas antifúngicas em rabanete (*Raphanus sativus*), Rs-AFP3, Rs-AFP4, que eram praticamente indetectáveis em folhas saudáveis, mas eram acumuladas em altos níveis após infecção fúngica.

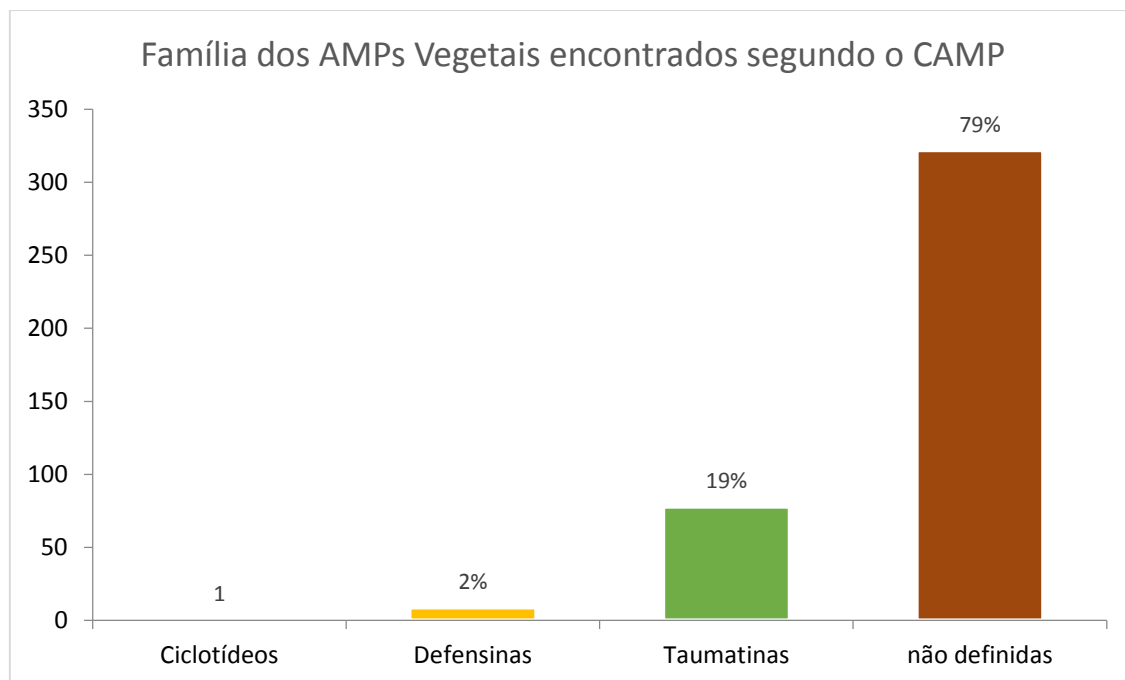
Exceto pelos seus resíduos de cisteína conservados, as sequências de aminoácidos das defensinas são altamente variáveis entre as plantas. No geral, uma maior conservação é observada dentro das famílias das plantas, como é o caso da família Brassicacea e Poaceae, mas também há relatos de similaridades entre defensinas de famílias não relacionadas. Apesar dessa considerável variabilidade nas sequências, o dobramento da molécula é similar e envolve uma única  $\alpha$ -hélice e uma cadeia tripla  $\beta$ -sheet (ODINTSOVA & EGOROV, 2012).

As defensinas vegetais possuem similaridades tanto estrutural quanto funcional com as defensinas animais e de insetos, o que indica a origem comum de todas as defensinas (CARVALHO & GOMES, 2009; NAWROT *et al*, 2014). A descoberta de defensinas em fungos sugerem que elas apareceram na evolução antes da divergência de fungos e insetos (CARVALHO & GOMES, 2009). Defensinas foram identificadas em uma ampla diversidade de plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas incluindo as famílias Poaceae, Brassicaceae, Fabaceae, Chenopodiaceae, Asteraceae, Solanaceae, Liliaceae, Hippocastanaceae, Ginkgoaceae, Rosaceae, Amaranthaceae, Cucurbitaceae, Ranunculaceae e Cariophyllaceae, e até mesmo em gimnospermas (ODINTSOVA & EGOROV, 2012).

A maioria das defensinas vegetais foram isoladas de sementes, no entanto, elas também foram encontradas em outros órgãos da planta, como folhas, flores, tubos, vagens e frutas (BENKO-ISEPPON *et al*, 2010; ODINTSOVA & EGOROV, 2012). Esses AMPs podem ser

expressos constitutivamente em órgãos de reserva e reprodutivos ou produzidos sob ataque patogênico ou injúrias como parte da resposta de defesa sistêmica. Além disso, a produção de defensinas vegetais também é induzida em resposta ao estresse ambiental, como seca, e a moléculas sinalizadoras, incluindo metil jasmonato, etileno e ácido salicílico (VRIENS, CAMMUE & THEVISSSEN, 2014).

As defensinas vegetais possuem uma variedade de atividades biológicas: inibição da síntese proteica, atividade enzimática e função de canal iônico. Algumas defensinas ainda exibem atividade antiproliferativa contra células cancerígenas ou efeito comprovado contra a transcriptase reversa do HIV. Até o momento, apenas algumas defensinas vegetais mostram atividade inibitória no crescimento de bactérias, visto que sua atividade antibacteriana tem sido amplamente estudada. Embora uma atividade similar possa ser observada para várias defensinas, o modo de ação pode ser extremamente diversificado com relação às suas moléculas-alvo e a sua localização (sub)celular (VRIENS, CAMMUE & THEVISSSEN, 2014). Pesquisas *in vitro* demonstraram que as defensinas possuem uma poderosa ação antifúngica, indicando que elas podem atuar como proteínas de defesa (CASTRO & FONTES, 2005; ODINTSOVA & EGOROV, 2012). Também merece especial atenção o fato de que alguns membros da família das defensinas vegetais não serem ativos apenas contra fungos fitopatogênicos, mas também contra patógenos humanos, como *Candida albicans* (STOTZ, SPENCE & WANG, 2009).



**Figura 9.** Família dos peptídeos antimicrobianos vegetais obtidos a partir do BLASTx de *U. decumbens* cv. Basilisk contra o banco de dados CAMP, de acordo com a classificação do CAMP.

Com base na literatura pesquisada, foi feita uma nova classificação em famílias de AMPs para aqueles peptídeos antimicrobianos que não possuíam classificação quanto ao CAMP. A partir dessa classificação, foi possível categorizar mais 15 sequências transcritas em três famílias. A primeira família são as *snakins* onde 10 sequências similares aos AMPs foram observadas. A segunda família foi das proteínas transferidoras de lipídeos (*Lipid-Transfer Protein*, LTPs) onde mais 4 sequências similares aos AMPs foram encontradas e a terceira família foram as proteínas *hevein-like* onde apenas 1 sequência similar aos AMP foi observada.

A família de AMPs *snakins* são peptídeos ricos em cisteínas presentes em diferentes espécies vegetais com um amplo espectro de atividades antimicrobianas *in vitro* (BENKO-ISEPPON *et al*, 2010). Há dois peptídeos descritos que representam esta família: a primeira *snakin*, *snakin-1*, e *snakin-2*, ambas isoladas dos tubérculos batata (*Solanum tuberosum* cv. Jaerla) (SEGURA *et al*, 1999 *apud* PORTO & FRANCO, 2013). Essa classe de peptídeo mostra clara similaridade com membros das famílias de proteínas *giberellic acid stimulated transcript* (GAST) e *giberellic acid stimulated in Arabidopsis* (GASA) de *Arabidopsis thaliana*. Assim, ambos foram classificados como membros da família *snakin/GASA* (PORTO & FRANCO, 2013).

A snakin-1 madura, é composta de 63 resíduos de aminoácidos incluindo 12 cisteínas que formam seis pontes dissulfeto (PORTO & FRANCO, 2013); enquanto a snakin-2 é paróloga da snakin-1 (contendo também 12 resíduos de cisteína) com baixa similaridade de sequência (38%). As snakins têm regulação positiva em fermentos e infecções fúngicas, e regulação negativa por infecções bacterianas (BENKO-ISEPPON *et al*, 2010). No entanto, não existem informações sobre sua estrutura tridimensional ou seu modelo de ligação de cisteína. Essa falta de informações a respeito da estrutura das famílias de AMPs vegetais impossibilita uma classificação mais detalhada dessas moléculas proteicas (PORTO & FRANCO, 2013).

A biogênese de membrana envolve o movimento dos lipídeos de seus locais de síntese, especialmente do retículo endoplasmático, para outras organelas como cloroplastos e a mitocôndria (BENKO-ISEPPON *et al*, 2010). Os LTPs (Lipid transfer proteins) são pequenos peptídeos, catiônicos, ricos em cisteínas encontrados em várias espécies de plantas, incluindo cevada, uva, trigo, *Arapidopsis thaliana*, e espinafre e cebola (SELS *et al*, 2008). Essas moléculas aumentam a troca intermembrana e/ou a transferência de lipídeos polares, ácidos graxos ou acil-CoA *in vitro* (SELS *et al*, 2008; ODINTSOVA & EGOROV, 2012).

Os LTPs vegetais são subdivididos em duas famílias, LTP1s e LTP2s, as quais apresentam massas moleculares em torno de 9 e 7 kDa, respectivamente. Além dessas diferenças no tamanho molecular, outras características dos membros dessas duas famílias, como o modelo conservado de quatro pontes dissulfeto, são similares. Devido a sua baixa especificidade para os substratos de lipídeos, os LTPs vegetais também são nomeados de proteínas transferidoras de lipídeos não-específicas (*non-specific lipid transfer proteins*, nsLTPs) (SELS *et al*, 2008). Experimentos *in vitro* mostraram que alguns nsLTP possuem atividade antimicrobiana, enquanto outros inibem  $\alpha$ -amilases de animais, além de diversas outras funções como síntese de cutina, beta-oxidação, embriogênese somática e sinalização das plantas (ODINTSOVA & EGOROV, 2012).

Mais de 50% dos AMPs encontrados nos resultados foram de origem animal e cerca de 40% de origem vegetal (**Figura 4**). O banco de dados utilizado pode ter influenciado nos dados obtidos, visto que o banco CAMP possui cerca de 80% de sequências de AMPs de origem animal e apenas 8% de origem vegetal (**Figura 5**), não sendo um banco específico de sequências de AMPs vegetais. Também vale ressaltar que os AMPs estão presentes em uma ampla gama de organismos, desde micro-organismos a animais e vegetais de fisiologia mais complexa, e que existem similaridades

entre esses AMPs, mesmo sendo de organismos diferentes, considerando sua linha evolutiva e que todos possuem um ancestral em comum.

Dentre os resultados obtidos, foram encontrados sequencias similares a AMPs com diferentes atividades antimicrobianas, sendo, na maioria, de atividade antibacteriana e/ou antifúngica e, em menor número, de outras atividades antimicrobianas (**Figura 6**). Essa diversidade demonstra que o arsenal de defesa da planta é rico e complexo, já que apresenta suscetibilidade apenas a dois tipos de fungos, *Pithomyces chartarum* e *Clavipes sulcata*. Apesar da gramínea ser suscetível as cigarrinhas-das-pastagens, não foram encontrados AMPs com atividade inseticida, devido ao fato de que não há tal classificação no banco de dados CAMP.

Pode-se também considerar que as saponinas presentes na planta, também possuem um importante papel na defesa da planta contra patógenos, principalmente contra micro-organismos, já que essas moléculas formam complexos com os esteroides presentes nas membranas dos micro-organismos, induzindo a formação de poros (HAMMOND-KOSACK & JONES, 2000; ODINTSOVA & EGOROV, 2012). Também vale ressaltar que a presença de um amplo número de genes R (genes de resistência) identificados por análise *in silico* por SEGATTO (2014), também contribuem para a defesa da planta.

Apesar do grande número de pesquisas sobre os peptídeos antimicrobianos, são poucas as sequências de AMPs depositadas nos bancos de dados diante da gama de diversidade existente. Além disso, existem poucas informações sobre essas moléculas, mesmo aquelas de origem animal e principalmente as de origem vegetal. A semelhança entre essas moléculas proteicas, mesmo entre organismos diferentes, também causa problemas na identificação e diferenciação dessas estruturas.

## 5. CONCLUSÃO

Em síntese, o alinhamento local entre os 164.920 transcritos únicos de *Urochloa decumbens* (Stapf) cv. Basilisk e as 5.906 sequências de peptídeos antimicrobianos do CAMP, utilizando o BLASTx, resultou, inicialmente em 3.161 similaridades com 250 peptídeos diferentes. Após a seleção dos dados, obteve-se 1.033 similaridades com 94 peptídeos diferentes entre si. Os E-values das sequências obtidas tiveram uma grande variação, em ambos os AMPs de origem animal e vegetal. Embora nenhuma sequência tenha retornado similaridade perfeita (0.0) as sequências que retornaram similaridade com os AMPs conhecidos do banco de dados podem representar potenciais novos AMPs que ainda não foram depositados nos bancos de dados.

A família de peptídeos antimicrobianos mais abundante foram: as taumatinas, seguida das snakins e defensinas. As LTPs e hevein-like foram encontradas em menor número. A maioria das sequências de AMPs que retornaram similaridade com os transcritos únicos de *U. decumbens* (Stapf) cv. Basilisk não tinham classificação quanto a família, sendo que as famílias encontradas foram obtidas tanto por classificação do próprio banco de dados utilizado quanto com base na literatura. A dificuldade na identificação das famílias dos AMPs deve-se a falta de informações quanto a estrutura e as semelhanças entre seus componentes, mesmo entre organismos diferentes

O presente trabalho forneceu informações inéditas sobre os peptídeos antimicrobianos presentes em *Urochloa decumbens* cv. Basilisk, com novas sequências de AMPs potenciais. Com este trabalho, espera-se auxiliar na busca de novos compostos antimicrobianos que possam ser utilizados em novos fármacos, inseticidas e em programas de melhoramento genético dessa cultivar e de outras espécies semelhantes à ela.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. [http://www.abiec.com.br/3\\_pecuaria.asp](http://www.abiec.com.br/3_pecuaria.asp). Acesso em 16 de setembro de 2014.
- ANDRADE, R. V. Análise do Transcriptoma e da Expressão Diferencial de Genes de Micélio e Levedura de *Paracoccidioides brasiliensis*. 2006. 136 p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Departamento de Biologia Celular, **Universidade de Brasília – UnB**, Brasília. 2006.
- ANDREAZZA, R.; BORTOLON, L.; PIENIZ, S.; CAMARGO, F. A. O.; BORTOLON, E. S. O. Copper Phytoextraction and Phytostabilization by *Brachiaria decumbens* Stapf. Vineyard Soils and a Copper Mining Waste. **Open Journal of Soil Science**, v.3, p. 273-282, 2013.
- BAIANO, J.C.F.; BARNES, A.C. Towards Control of *Streptococcus iniae*. **Emerging Infectious Diseases**. v.15, n.12, p.1891-1896, 2000.
- BELARMINO, L.C.; BENKO-ISEPPON, A.M. Data Bank Based Mining on the Track of Antimicrobial Weapons in Plant Genomes. **Current Protein and Peptide Science**, v.11, p.195-198, 2010.
- BENKO-ISEPPON, A.M.; GALDINO, S.L.; CALSA Jr., T.; KIDO, E.A.; TOSSI, A.; BELARMINO, L.C.; CROVELLA, S. Overview on Plant Antimicrobial Peptides. **Current Protein and Peptide Science**, v.11, p.181-188, 2010.
- BITENCOURT, G.A.; CHIARI, L.; LAURA, V.A.; VALLE, C.B.; JANK, L.; MORO, J.R. Aluminum tolerance on genotypes of signal grass. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.2, p.245-250, 2011.
- BOMAN, H.G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts (Review). **Journal of Internal Medicine**, v.254, p.197-215, 2003.
- BOTREL, M.A.; NOVAES, L.P.; ALVIM, M.J. Características Forrageiras de algumas Gramíneas Tropicais. Juiz de Fora, MG: **EMBRAPA-CNPGL**, 35p. (EMBRAPA-CNPGL. Documentos, 66). 1998.
- BREITENEDER, H. Thaumatin-like proteins - a new Family of pollen and fruit allergens (Editorial). **Allergy**, v.59, p. 479-481, 2004.
- BRUM, K.B.; HARAGUCHI, M.; GARUTTI, M.B.; NÓBREGA, F.N.; ROSA, B.; FIORAVANTI, M.C.S. Steroidal saponin concentrations in *Brachiaria decumbens* and *B. brizantha* at different developmental stages. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.1, p.279-281, 2009.
- CARVALHO, A.O.; GOMES, V.M. Plant defensins – prospects for the biological functions and biotechnological properties. **Peptides**, v.30, p.1007-1020, 2009.
- CASTRO, M.S.; FONTES, W. Plant Defense and Antimicrobial Peptides. **Protein and Peptides Letters**, v.12, p.11-16, 2005.

DANGL, J.L.; JONES, J.D.G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, v.411, 2001.

DEGRAVE, W.; MACHADO, C.J.S. Bioinformática e saúde: uma visão geral. **RECIIS, Revista Eletrônica de Comunicação Informação & Inovação em Saúde**: Rio de Janeiro, v.1, n.2, sup.1, p.287, 2007.

DONG, ZC.; CHEN, Y. Transcriptomics: Advances and approaches. **Science China, Life Sciences**, v.56, n.10, p.960-967. 2013. DOI: [10.1007/s11427-013-4557-2](https://doi.org/10.1007/s11427-013-4557-2)

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). O programa BLAST: guia prático de utilização. Documento 224. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, DF, 2007.

ESPINDOLA, F. S. *et al.*, Recursos de Bioinformática Aplicados às Ciências ômicas como Genômica, Transcriptômica, Proteômica, Interatômica e Metabolômica. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.26, n.3, p.463-477, 2010.

EMBL, European Molecular Biology Laboratory. Disponível em < <http://www.embl.org/> > último acesso: 28/11/2014.

GANZ, T. Defensis: Antimicrobial Peptides of Innate Immunity. **Nature**, v.3, p.710-720, 2003.

GEETHANANDAN, K. ABHILASH, J.; BHARATH, S.R., SADASIVAN, C.; HARIDAS, M. X-ray structure of a galactose-specific lectin from *Spatholobous parviflorous*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.49, p.992-998, 2011.

HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J.D.G. Responses to Plant Pathogens (chapter). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones (eds.). **American Society of Plant Physiologists**. ch.21, p.1102-1118. 2000.

HILL, A.M.; CANE, D.E.; MAU, C.L.D.; WEST, C.A. High Level Expression of *Ricinus communis* Casbene Synthase in *Escherichia coli* and Characterization of the Recombinant Enzyme. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 336, n.2, p.282-289, 1996.

HUGHES, P.; DENNIS, E.; WHITECROSS, M.; LIEWELLY, D.; GAGE, P. The cytotoxic plant protein,  $\beta$ -purothionin, forms ion channels in lipid membranes. **J Biol Chem** 14: 823-827. 2000.

JAKELAITIS, A.; SILVA, A.A.; FERREIRA, L.R.; SILVA, A.F.; FREITAS, F.C.L. Manejo de Plantas Daninhas no Consórcio de Milho com Capim-Braquiária (*Brachiaria decumbens*). **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v.22, n.4, p.553-560, 2004.

JANSEN, C.; KOGEL, K.H. Insect Antimicrobial Peptides as New Weapons Against Plant Pathogens. A. Vilcinskis (ed.), *Insect Biotechnology, Biologically-Inspired Systems 2*, **Springer Science**, ch.7, p.123-145, 2012.

JONES, J.D.G.; DANGL, J.L. The plant immune system (Review). **Nature**, v.444, p.323-329, 2006.

LENIS-MANZANO, S.J.; ARAUJO, A.C.G.; VALLE, C.B.; SANTANA, E.F.; CARNEIRO, V.T.C. Histologia da embriogênese somática induzida em embriões de sementes maduras de



*Urochloa brizantha* apomítica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.45, n.5, p.454-441, 2010.

LIU, J.J.; STURROCK, R.; EKRAMODDOULLAH, A.K.M. The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression. Towards biological function. **Plant Cell Rep**, v.29, p.419-436, 2010. [DOI 10.1007/s00299-010-0826-8](https://doi.org/10.1007/s00299-010-0826-8)

LORENA, A.C.; CARVALHO, A.C.P.L.F. Utilização de Técnicas Inteligentes em Bioinformática. Relatórios técnicos do ICMC. **Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação**. Universidade de São Paulo, São Carlos (SP), 2003.

MARMIROLI, N.; MAESTRI, E. Plant peptides in defense and signaling. **Peptides**, v.56, p.30-44, 2014.

NAWROT, R. BARYLSKI, J. NOWICKI, G. BRONIAREZYK, J.; BUCHWALD, W. GO'ZDZCKA-JÓZEFIK, A. Plant antimicrobial peptides, **Folia Microbiol**, v.59, p.181-196, 2014. [DOI 10.1007/s12223-013-0280-4](https://doi.org/10.1007/s12223-013-0280-4)

ODINTSOVA, T.; EGOROV, T. Plant Antimicrobial Peptides (chapter). H.R. Irving and C. Gehring (eds.), **Plant Signaling Peptides, Signaling and Communication in Plants**, v.16, p.107-133, 2012.

OLIVEIRA, K.M.B.; CHIARI, L.; BARRIOS, S.C.L.; LAURA, V.A. Avaliação de Híbridos Intraespecíficos de *Brachiaria decumbens* Stapf (Poaceae) para Tolerância ao Alumínio. I Workshop sobre tolerância a estresses abióticos [recurso eletrônico] / Comitê técnico: Cacilda Borges do Valle [et al] – Campo Grande, MS: **Embrapa Gado de Corte**, 1 ed., p.16-23, 2013.

PALACÍN, A. *et al.* The Involvement of Thaumatin-like Proteins in Plant Food Cross-Reactivity: A Multicenter Study Using a Specific Protein Microarray. **PLOS ONE**, v.7, n.9, 2012.

PATAT, S.A.; CARNEGIE, R.B.; KINGSBURY, C.; GROSS, P.S.; CHAPMAN, R.; SCHEY, K.L. Antimicrobial activity of histones from hemocytes of the Pacific white shrimp. **Eur J Biochem**, v.271, p.4825-4833, 2004. [DOI:10.1111/j.1432-1033.2004.04448.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04448.x)

PELEGRINI, P.B.; DEL SARTO, R.P.; SILVA, O.N.; FRANCO, O.L.; GROSSI-DE-AS, M.F. Antibacterial peptides from plants: what they are and how they probably work. **Biochem Res Int** 2011. [DOI: 10.1155/2011/250349](https://doi.org/10.1155/2011/250349).

PELEGRINI, P.B.; FRANCO, O.L. Plant gamma-thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. **Int J Biochem Cell Biol**, v.37, p.2239-2253, 2005.

PEREIRA, C.S.; POSSAS, C.A.; VIANA, C.M.; RODRIGUES, D.P. Características de *Vibrio parahaemolyticus* isolados de mexilhões (*Perna perna*) comercializados em Niterói, Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n.1, p.56-59, 2007.

PEREIRA, M.R.R.; MARTINS, C.C.; SOUZA, G.S.F.; MARTINS, D. Influência do estresse hídrico e salino na germinação de *Urochloa decumbens* e *Urochloa ruziziensis*. **Biosci J**, Uberlândia, v.28, n.4, p.537-545, 2012.

PORTO, W.F.; FRANCO, O.L. Theoretical structural insights into the snakain/GASA Family. **Peptides**, v.44, p.163-167, 2013.

PROSDOCIMI, F. *et al.* Bioinformática: Manual do Usuário. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.29, 2002.

REDDY, K.V.R.; YEDERY, R.D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises (Review). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.24, p.536-547, 2004. [DOI:10.1016/j.ijantimicag.2004.09.005](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.09.005)

RIET-CORREA, B.; CASTRO, M.B.; LEMOS, R.A.A.; RIET-CORREA, G.; MUSTAFA, V.; RIET-CORREA, F. *Brachiaria* spp. Poisoning of ruminants in Brazil (Review Article). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.3, p.183-192, 2011.

ROSA, B.; REIS, R.A.; RESENDE, K.T.; KRONKA, S.N.; JOBIM, C.C. Valor Nutritivo do Feno de *Brachiaria decumbens* Stapf cv. Basilisk Submetido a Tratamento com Amônia Anidra ou Uréia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, n.4, p.815-822, 1998.

SATURNINO, K.C. Intoxicação experimental por *Brachiaria decumbens* em ovinos (Dissetação de Mestrado). **Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**, Programa Mestrado em Ciência Animal, 2009.

SATURNINO, K.C.; MARIANI, T.M.; BARBOSA-FERREIRA, M.; BRUM, K.B.; FERNANDES, C.E.S.; LEMOS, R.A.A. Intoxicação experimental por *Brachiaria decumbens* em ovinos confinados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.3, p.195-202, 2010.

SEGATTO, R.A. Análise de genes de resistência no transcriptoma de *Urochloa decumbens* cv. Basilisk (Monografia). Graduação em Biotecnologia, Dourados – MS: **UFGD**, 48 p., 2014.

SELS, J.; MATHYS, J.; CONINCK, B.M.A.; CAMMUE, B.P.A., BOLLE, M.F.C. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.46, p.941-950, 2008.

SELSTED, M.E.; OUELLETTE, A.J. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response (Review). **Nature Immunology**, v.6, n.6, 2005.

SEO, J.K.; LEE, M.J.; GO, H.J.; KIM, G.D.; JEONG, H.D.; NAM, B.H.; PARK, N.G. Purification and antimicrobial function of ubiquitin isolated from the gill of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Molecular Immunology**, v.53, p.88-98, 2013.

SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins – a large family of homologous proteins. **The FASEB Journal**, v.4, p.3198-3208, 1990.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v.14, n.11, p.53-62, 2004. [DOI:10.1093/glycob/cwh122](https://doi.org/10.1093/glycob/cwh122)

SINHA, M.; SINGH, R.P.; KUSHWAHA, G.S.; IQBAL, N.; SINGH, A.; KAUSHIK, S.; KAUR, P.; SHARMA, S.; SINGH, T.P. Current Overview of Allergens of Plant Pathogenesis Related

Protein Families (Review). Hindawi Publishing Corporation, **The Scientific World Journal**, v.2014, article ID 543195, 19p. 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/543195>

SOUZA, M.A.; COSTA, J.S.; TORRES, A.L.; CAVAGNOLI, C. O uso do teste de tetrazolio e Blotter Test para a avaliação fisiológica e sanitária de sementes comerciais de cultivares de *Brachiaria* spp. **Revista FACTU Ciência**. Ano 7, n.12, Unaí: FACTU, p.27-50, 2007.

STOTZ, H.U.; SPENCE, B.; WANG, Y. A defensin from tomato with dual function in defense and development. **Plant Mol Biol** 71: 131-143, 2009.

TERRAS, F.R.; EGGERMONT, K.; KOVALEVA, V.; RAIKHEL, N.V.; OSBORN, R.M.; KESTER, A.; REES, S.B.; VANDERLEYDEN, J.; CAMMUE, B.P.; BROEKAERT, W.F. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. **Plant Cell** v.7, p.573-588, 1995.

THOMAS, S.; KARNIK, S.; BARAI, R. S.; JAYARAMAN, V. K.; IDICULA-THOMAS, S. CAMP: a useful resource for search on antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Research**, v.38, 2010.

VAN LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.44, p.135-162, 2006.

VRIENS, K.; CAMMUE, B.P.A.; THEVISSSEN, K. Antifungal Plant Defensins: Mechanisms of Action and Production. **Molecules**, v.19, p.12280-12303, 2014. [DOI:10.3390/molecules190812280](https://doi.org/10.3390/molecules190812280)

WANG, Z.; GERSTEIN, M. SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nat Rev Genet** v.10, n.1, p.57-63, 2009. [DOI:10.1038/nrg2484](https://doi.org/10.1038/nrg2484)

WENZL, P., ARANGO, A., CHAVES, A. L., BUITRAGO, M. E., PATIÑO, G. M., MILES, J., & RAO, I. M. A Greenhouse Method to Screen Brachiariagrass Genotypes for Aluminum Resistance and Root Vigor. **Crop Science** v.46, 968-963, 2006.

WHEELER, D. L. *et al.* Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**, v. 35, 2007.

XIONG, J. Essential Bioinformatics. **Cambridge University**, UK, 1<sup>a</sup> ed., 339p., 2006.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms (Review). **Nature**, v.415, n.24, 2002.