

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA - ICB

Letícia Stephan Tavares

**DESENVOLVIMENTO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS A
PARTIR DO TRANSCRIPTOMA FOLIAR DE
Lippia alba e *Lippia rotundifolia*.**

Juiz de Fora - MG

Abril 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

Letícia Stephan Tavares

DESENVOLVIMENTO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS A PARTIR
DO TRANSCRIPTOMA FOLIAR DE
Lippia alba e *Lippia rotundifolia*.

**Tese de Doutorado do Curso de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências Biológicas na área Genética e
Biotecnologia.**

Orientador: Dr. Marcelo de Oliveira Santos

Co-orientador: Octávio Luiz Franco

Juiz de Fora, MG

2015

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

STEPHAN TAVARES, LETÍCIA .
DESENVOLVIMENTO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS A PARTIR DO
TRANSCRIPTOMA FOLIAR DE *Lippia alba* e *Lippia rotundifolia*. /
LETÍCIA STEPHAN TAVARES. -- 2015.
103 f.

Orientador: MARCELO DE OLIVEIRA SANTOS
Coorientador: OCTÁVIO LUIZ FRANCO
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora,
Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2015.

1. Peptídeos Antimicrobianos. 2. Transcriptoma. 3.
Modelagem in silico. 4. Antimicrobianos. I. DE OLIVEIRA
SANTOS, MARCELO, orient. II. FRANCO, OCTÁVIO LUIZ, coorient.
III. Título.

DESENVOLVIMENTO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS A PARTIR
DO TRANSCRIPTOMA FOLIAR DE
Lippia alba e *Lippia rotundifolia*.

Letícia Stephan Tavares

Tese de Doutorado do Curso de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências Biológicas na área Genética e
Biotecnologia.

Banca Avaliadora

Octávio Luiz Franco
Universidade Católica de Brasília

Taia Maria Berto Rezende
Universidade Católica de Brasília

Priscila V. Zabala Capriles Goliatt
Universidade Federal de Juiz de Fora

Vânia Lucia da Silva
Universidade Federal de Juiz de Fora

Marcelo de Oliveira Santos
ORIENTADOR
Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora – MG

Abril 2015

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Juiz de Fora através do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas por abrir as portas ao meu aprimoramento.

A Capes pelo financiamento permitindo que eu me dedicasse ao Doutorado.

Ao Prof. Marcelo, por acreditar em mim, por toda a paciência e dedicação em minha caminhada de iniciação científica a doutora, fomentando sonhos e fermentando ideias.

Ao Prof. Octávio pelos ensinamentos e por abrir as portas da UCB sempre que preciso.

Aos colegas do Laboratório de Genética e Biotecnologia por cada um a seu momento acrescentar tanto ao meu crescimento. Peço desculpas por não citar nomes, temendo esquecer momentaneamente alguém.

Ao colega Vinícius Carius pela inestimável ajuda com a modelagem e computadores em geral.

Aos colegas Sara Salles e Vinícius Schmitz pelos scripts que possibilitaram todo o processo de construção de ideias.

Ao colega Osmar Silva e William Porto pela presença na distância auxiliando com a modelagem.

Aos Professores Carlos Maranduba, José Marcelo, Raul, Lyderson e Saulo pela sempre boa vontade e conhecimento.

Aos membros da banca avaliadora Taia Rezende, Priscila Capriles, Vânia Silva por se disporem a colaborar avaliando este trabalho.

Aos professores Cláudio Diniz e Bethânia Drumond pelas sugestões oferecidas no processo de qualificação.

À Profa. Simoni Dias e sua aluna Loiane Lima pela orientação, carinho e boa vontade em ajudar.

Aos colegas Dani, Léo, Talitha, Natália, Ju, pela ajuda nos momentos de ócio criativo.

Aos antigos ICs, hoje mestrandos e doutorandos João Vítor e Francisco por me fazerem acreditar que posso ensinar,

Aos meus irmãos por me aturarem.

Ao meu filho por existir.

Aos sobrinhos Alice, Thomás e João Lucas por tornarem a vida mais leve.

A minha mãe por mostrar que somos feitos de material que “verga mas não quebra”.

Ao meu pai pela solidez de caráter.

A minha avó, pela saudade boa.

Ao meu amor por dar sentido a tudo.

“Eu sei que não sou nada e que talvez nunca tenha tudo. Aparte isso, eu tenho em mim todos os sonhos do mundo”

Fernando Pessoa

***“Mas o que sinto escrevo. Cumpro a sina.
Inauguro linhagens, fundo reinos
dor não é amargura.
Minha tristeza não tem pedigree,
já a minha vontade de alegria,
sua raiz vai ao meu mil avó.
Vai ser coxo na vida é maldição pra homem.
Mulher é desdobrável. Eu sou.”***

Adélia Prado

RESUMO

O uso incorreto de antibióticos vem se tornando, nos últimos anos, um grande problema de acordo Organização Mundial da Saúde, uma vez que tem aumentado o número de microrganismos resistentes aos medicamentos mais frequentemente utilizados. Em contrapartida a este problema de saúde pública, novos antibióticos com diferentes vias de ação têm sido pesquisados. Muitos destes antimicrobianos têm sido descobertos a partir da primeira linha de defesa de vegetais e de animais. Estas moléculas são denominadas Peptídeos Antimicrobianos (AMPs). No intuito de encontrar novos compostos com atividade antimicrobiana foram desenvolvidos 3 peptídeos com ação bactericida a partir do transcriptoma de *Lippia rotundifolia* e *L. alba*. O RNA normalizado foi sequenciado utilizando-se a plataforma 454 GS e a partir do mesmo foram gerados e modelados *in silico* peptídeos com estrutura e ação semelhantes a AMPs. Em seguida os peptídeos foram sintetizados e sua atividade validada por testes antimicrobianos. Os peptídeos Lalb1 e Lrot3 apresentaram resultados promissores e foram remodelados a partir de um desenho racional visando obter a melhor estrutura e atividade dos mesmos. Os peptídeos L.rot3.5 e L.rot3.6 apresentaram os resultados mais promissores contra os patógenos testados. Os resultados aqui demonstrados sugerem que o uso de transcriptomas é uma importante ferramenta para a descoberta de novos AMPs com ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Palavras-chave: Peptídeos Antimicrobianos, Transcriptoma, Modelagem *in silico*, Antibióticos.

ABSTRACT

Misuse of antibiotics has become, in recent years, worldwide problem according to the World Health Organization, since the number of resistant microorganisms for most commonly used drugs has increased. In contrast to this public health problem, new antibiotics with different courses of action have been researched. Many of these antibiotics have been discovered from the first line of plant and animal defense. This is a group of molecules called Antimicrobial Peptides (AMPs). In the present work three antimicrobial peptides showing bactericidal activity were developed from the transcriptome of *Lippia rotundifolia* and *L. alba*. The normalized RNA was sequenced in 454 GS platform and the RNA library was used for *in silico* searching and modeling peptides showing similar structure and action to AMP. The peptides were synthesized and their activity was validated by antimicrobial tests. The L.alb1 and L.rot3 peptides showed promising results and were modelled again by the use of rational design methodology to inbreed structure and activity. The L.rot3.5 and L.rot3.6 peptides showed the most promising results against the tested pathogens. The results reported here demonstrated that the discovery of new AMPs from transcriptome against Gram-positive and Gram-negative bacteria is an important tool for this purpose.

Keywords: Antimicrobial Peptides, Transcriptome, *in silico* modeling, Antibiotics.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Mecanismos potenciais de AMPs causando disrupção ou translocação da membrana plasmática. 10
- Figura 2:** Alvos intracelulares de AMPs. 11
- Figura 3:** Modelos de ação dos AMPs. 13
- Figura 4:** Esquema explicativo do processo de coleta de folhas de *Lippia* até a análise utilizando o BLAST2Go. 27
- Figura 5:** RNA total de *L. rotundifolia*. 34
- Figura 6:** Resultado Bioanalyser (Agilent Technologies) das amostras de RNA total de *Lippia rotundifolia*. 36
- Figura 7:** Comparação entre o tamanho das leituras em *L. alba* e *L. rotundifolia* geradas pelo transcriptoma das duas espécies. 38
- Figura 8:** Número de *contigs* montados para *Lippia rotundifolia* com o Newbler 2.6 e número de ORFs encontradas em cada uma das 3 *frames* de leitura. 40
- Figura 9:** Número de *contigs* montados para *Lippia alba* com o Newbler e número de ORFs encontradas em cada uma das 3 *frames* de leitura. 41
- Figura 10:** Peptídeo Lalb1 Tabela indicando peptídeos com estrutura semelhante e função antimicrobiana conhecida em banco de dados. 44
- Figura 11:** Peptídeo Lalb2. Tabela indicando peptídeos com estrutura semelhante e função antimicrobiana conhecida em banco de dados. 45
- Figura 12:** Peptídeo Lalb3 Tabela indicando peptídeos com estrutura semelhante e função antimicrobiana conhecida em banco de dados a partir do contig_aa01679. 46
- Figura 13:** Peptídeo Lalb4 Tabela indicando peptídeos com estrutura semelhante e função antimicrobiana conhecida em banco de dados a partir do contig_aa00242_6. 47

- Figura 14** Peptídeo Lalb5. Tabela indicando peptídeos com estrutura semelhante e função antimicrobiana conhecida em banco de dados a partir do contig_Aa1179_7. 48
- Figura 15** Peptídeo Lrot1. Tabela indicando peptídeos com estrutura semelhante e função antimicrobiana conhecida em banco de dados a partir do contig_aa00530_3. 49
- Figura 16** Peptídeo Lrot2. Tabela indicando peptídeos com estrutura semelhante e função antimicrobiana conhecida em banco de dados a partir do contig_aa00896. 50
- Figura 17** Peptídeo Lrot3. Tabela indicando peptídeos com estrutura semelhante e função antimicrobiana conhecida em banco de dados a partir do contig_aa00866. 51
- Figura 18:** *Lippia rotundifolia* - Número de possíveis AMPs obtidos após aplicação dos parâmetros selecionados em cada frame. 52
- Figura 19** *Lippia alba* - Número de possíveis AMPs obtidos após aplicação dos parâmetros selecionados em cada frame. 52
- Figura 20** Diagrama Helical Wheel dos Peptídeos Lrot 3.1; Lrot 3.2; Lrot3.3; Lrot 3.4; Lrot 3.5; Lrot 3.6; Lrot 3.7; Lrot 3.8; Lalb 1.2 e Lalb 1.3. 57
- Figura 21** Atividade Bacteriocida/ Bacteriostática dos peptídeos remodelados contra as Bactérias. 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Peptídeos sintéticos de <i>Lippia alba</i> (Lalb) e <i>Lippia rotundifolia</i> (Lrot).	30
Tabela 2:	Peptídeos sintéticos remodelados de <i>L. alba</i> e <i>L. rotundifolia</i> .	31
Tabela 3:	Conversão das concentrações dos 19 peptídeos testados.	33
Tabela 4	Estatística da montagem das leituras do Transcriptoma de folhas de <i>Lippia</i> sp.	39
Tabela 5	Peptídeos de <i>L. alba</i> e <i>L. rotundifolia</i> sintetizados após validação.	53
Tabela 6	Lista dos peptídeos remodelados a partir das sequências de Lalb1 e Lrot3	54
Tabela 7	Concentração inibitória mínima (MIC) em µg/mL dos peptídeos modelados contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.	60
Tabela 8	Porcentagem de inibição dos peptídeos remodelados contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.	61

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

µg/mL	Microgramas por mililitros
µL	Microlitros
mg	Miligramas
Mg/mL	Miligramas por mililitros
mM	Mili Molar
18S	Subunidade menor do ribossomo
28S	Subunidade maior do ribossomo
AMPs	Peptídeos Antimicrobianos
Arg	Arginina
ATCC	American type culture collection
Ay-AMP	O peptídeo antimicrobiano isolado de <i>Amaranthus hypocondriacos</i>
Bac 5	Peptídeo Antimicrobiano extraído de bactérias
Bac 7	Peptídeo Antimicrobiano extraído de bactérias
BLASTp	Busca em bancos de dados a partir da sequência de aminoácidos
Bombinin	Peptídeo desenvolvido por CSORDAS e MICHL, 1970
bp	Pares de bases nucleotídicas
CAPs	Peptídeos Antimicrobianos Catiônicos
cDNA	DNA complementar ao RNA
CESJF	Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora
Cn-AMP1	Peptídeo desenvolvido por MANDAL et al., 2009
DNA	Ácido desoxinucleico
DOPE	Optimização discreta de energia em Proteínas
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde
Kb	Kilobase
Lalb	Peptídeos identificados de <i>Lippia alba</i>
Lrot	Peptídeos identificados de <i>Lippia rotundifolia</i>
LPS	Lipossacarídeos
LR 1 e 2	Amostras de <i>Lippia rotundifolia</i>
Ls-AMP1	Peptídeo Antimicrobianos extraído de <i>Lippia sidoides</i>
e 2	

LTPs	Proteínas de Transferência de Lipídios
MBP	Proteínas de ligação à mirosinase
MEC-A	<i>S. aureus</i> resistente a Meticilina
MIC	Concentração inibitória mínima
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica
NGS	Sequenciamento de nova geração
nm	Nanômetros
NMR	Ressonância Nuclear Magnética
nt	Nucleotídeos
OMS	Organização Mundial da Saúde
Orfs	Open Reading frames – quadro de leitura aberta
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
PDB	Banco de Dados de Proteínas
pg	Picogramas
Pg-AMP1	Peptídeo antimicrobiano isolado de <i>Psidium guajava</i>
PR	Proteínas relacionadas aos patógenos
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
RMSD	Medida de distância entre os átomos
RNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA-seq	Sequenciamento de RNA
rRNA	RNA ribossômico
RT-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
SNP	Polimorfismo nuclear único (single nucleotide polymorphism)
Tad1	Peptídeo Antimicrobiano isolado de plantas de trigo
TSB	Meio de cultura
Thi2.1	AMP Thionina 2.1
TE	Tampão Tris EDTA
TSB	Meio de cultura (<i>Tryptone Soy Broth</i>)
UTI	Unidade de Tratamento Intensiva
UV	Luz ultravioleta
µg/mL	Microgramas por mililitros
µL	Microlitros

18S	Subunidade menor do ribossomo
28S	Subunidade maior do ribossomo
AMPs	Peptídeos Antimicrobianos
Arg	Arginina
ATCC	American type culture collection
Ay-AMP	O peptídeo antimicrobiano isolado de <i>Amaranthus hypocondriacos</i>
Bac 5	Peptídeo Antimicrobiano extraído de bactérias
Bac 7	Peptídeo Antimicrobiano extraído de bactérias
Bombinin	Peptídeo desenvolvido por CSORDAS e MICHL, 1970
bp	Pares de bases nucleotídicas
cDNA	DNA complementar ao RNA
Cn-AMP1	Peptídeo desenvolvido por MANDAL et al., 2009
DNA	Ácido desoxinucleico
DOPE	Optimização discreta de energia em Proteínas
Kb	Kilobase
Lalb	Peptídeos identificados de <i>Lippia alba</i>
Lrot	Peptídeos identificados de <i>Lippia rotundifolia</i>
LPS	Lipossacarídeos
LR 1 e 2	Amostras de <i>Lippia rotundifolia</i>
Ls-AMP1 e 2	Peptídeo Antimicrobianos extraído de <i>Lippia sidoides</i>
LTPs	Proteínas de Transferência de Lipídios
MBP	Proteínas de ligação à mirosinase
MEC-A	<i>S. aureus</i> resistente a Meticilina
MIC	Concentração inibitória mínima
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica
NGS	Sequenciamento de nova geração
nm	Nanômetros
NMR	Ressonância Nuclear Magnética
nt	Nucleotídeos
OMS	Organização Mundial da Saúde
Orfs	Open Reading frames – quadro de leitura aberta

PCR	Reação em cadeia da Polimerase
PDB	Banco de Dados de Proteínas
pg	Picogramas
Pg-AMP1	Peptídeo antimicrobianos isolado de <i>Psidium guajava</i>
PR	Proteínas relacionadas aos patógenos
RMSD	Medida de distância entre os átomos
RNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA-seq	Sequenciamento de RNA
rRNA	RNA ribossômico
RT-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
SNP	Polimorfismo nuclear único (single nuclear polymorfism)
Tad1	Peptídeo Antimicrobiano isolado de plantas de trigo
TSB	Meio de cultura
UV	Luz ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1	Peptídeos Antimicrobianos (AMPs)	7
2.2	O gênero <i>Lippia</i>	14
2.3	Transcriptomas	16
2.4	Modelagem molecular	18
2.5	Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde (IRAs)	21
3	OBJETIVO	24
3.1	Objetivos Específicos	24
4	METODOLOGIA	25
4.1	Amostras de Plantas	25
4.2	Extração de RNA e Síntese de cDNA	25
4.3	Sequenciamento do cDNA e Bioinformática	28
4.4	Script para busca de Peptídeos Antimicrobianos	28
4.5	Modelagem Molecular	29
4.6	Síntese de Peptídeos	29
4.7	Remodelagem de Peptídeos Promissores	30
4.8	Amostras de Bactérias	31
4.9	Ensaio Antimicrobianos	32
4.10	Ensaio para Verificar a Ação Bactericida ou Bacteriostática dos Peptídeos	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34

5.1	Obtenção do Transcriptoma Foliar de <i>L. alba</i> e <i>L. rotundifolia</i>	34
5.2	Seleção de ORFs para Modelagem de Peptídeos Antimicrobianos	42
5.3	Ação dos Peptídeos Modelados	58
5.4	Ação dos Peptídeos Remodelados	60
6	CONCLUSÃO	64
7	PERSPECTIVAS	65
8	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	66
9	ANEXO A: Artigo de Revisão – Strategies and molecular tools to fight antimicrobial resistance: resistome, transcriptome and antimicrobial peptides.	80
10	ANEXO B: Tutorial de Modelagem	92

1. INTRODUÇÃO

A descoberta e utilização dos antibióticos foi um dos maiores avanços científicos do século XX. No entanto, o uso indiscriminado destes fármacos nos últimos 60 anos tem contribuído para o aumento de microrganismos resistentes a múltiplos antimicrobianos (GILLINGS, 2013). O uso incorreto de antibióticos potentes e de amplo-espectro de ação tem contribuído para aumentar a pressão seletiva, resultando no aparecimento de cepas multirresistentes a antibióticos (BLAIR *et al.*, 2015; CRUZ *et al.*, 2014).

A resistência a antibióticos é um fenômeno natural, uma vez que as bactérias têm desenvolvido resistência contra a ação de antibacterianos naturais há bilhões de anos, coevoluindo com o aparecimento de novas formas de defesa (BLAIR *et al.*, 2015). No entanto, nos últimos anos, a resistência a antibióticos tem se tornado um

problema de saúde pública, uma vez que o número de bactérias e fungos resistentes tem aumentado, dificultando e encarecendo os tratamentos com os medicamentos mais frequentemente utilizados (PESCHEL e SAHL; 2006, MARTIN *et al.*, 2015). A ingestão errada (pelo uso desnecessário ou pelo descumprimento da prescrição médica), além da maneira como os antibióticos são eliminados, principalmente nos locais onde o esgoto não é tratado, é uma das causas da ampliação do número de bactérias resistentes. Isto ocorre, pois, antibióticos em concentrações subinibitórias podem atuar modificando a transcrição gênica bacteriana (GILLINGS, 2013). Algumas classes de antibióticos modulam a expressão de genes específicos alterando diversas funções, como: controle da síntese proteica, metabolismo de carboidratos, modificação em proteínas de ligação e de transporte, além de alterações em genes com funções ainda desconhecidas (GILLINGS, 2013)). De acordo com Fernández e Hancock (2012) existem três tipos principais de resistência a antibióticos: a intrínseca, adquirida e adaptativa. A resistência intrínseca compreende todas as propriedades inerentes do microrganismo que limitam a ação do antibiótico naquele determinado microrganismo, como por exemplo a resistência natural das Gram-positivas a antibióticos com ação sobre a membrana plasmática. Na resistência adaptativa, há uma alteração de natureza transitória no gene ou na expressão de proteínas, como resultado da exposição a uma determinada condição, como por exemplo, estresse, condições nutricionais ou níveis subinibitórios do próprio antibiótico (FERNÁNDEZ e HANCOCK; 2012). Já a resistência adquirida, ocorre devido a mutações em diferentes genes que controlam diversas rotas. Por exemplo, a rota de inibição da interação da droga com a célula-alvo pela modificação da proteína de reconhecimento e ligação na bactéria (SEO *et al.*, 2012) ou ainda pela transferência horizontal via elementos genéticos móveis (CRUZ *et al.*, 2014).

Tais ganhos de resistência são descritos em vários casos de bactérias resistentes a antibióticos de uso comum. O primeiro relato de resistência foi da década de 1940, quando foi descrito o *Staphylococcus aureus* resistente à penicilina. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Escherichia coli* ESBL – resistente a β -lactamases são comumente encontrados em hospitais em todo o mundo (CHENG *et al.*, 2015).

Além da busca por novos compostos antimicrobianos, é necessário investir em educação, para que a população faça uso correto dos antibióticos, evitando o

surgimento e manutenção de novas populações resistentes (CHENG *et al.*, 2015). Jansen e Aktipis (2014) alertam que o microbioma intestinal atua como um reservatório de genes de resistência que são transferidos da microbiota anfibiônica para a patogênica, sem que haja necessariamente competição entre bactérias sensíveis e resistentes e dessa maneira, a resistência pode ser transferida mais facilmente de uma espécie para outra. Genes de resistência aos antibióticos se acumulam em diversos ambientes, tais como hospitais. No entanto, são encontrados também na água e no solo, devido a práticas que sustentam a alta pressão seletiva bacteriana, como o uso de drogas profiláticas e terapêuticas aplicadas na agricultura, alimentação animal e na medicina (FERNÁNDEZ E HANCOCK; 2012). Genes de resistência também estão presentes no microbioma intestinal, e podem ser uma ameaça a efetividade das drogas em caso de infecção por bactérias patogênicas, devido a transferência horizontal de genes. A microbiota intestinal indígena pode, conseqüentemente, atuar como um reservatório para genes de resistência, os quais podem ser horizontalmente transferidos a patógenos invasores (JANSEN e AKTIPIS; 2014).

Buscando solucionar o problema de saúde pública relacionado ao crescente número de bactérias resistentes aos antibióticos de uso tradicional, a busca por novos compostos antimicrobianos tem aumentado nos últimos anos (FURUYA e LOWY; 2006, BLAIR *et al.*, 2015). Estudos realizados com peptídeos naturalmente produzidos por bactérias, fungos, plantas, invertebrados e vertebrados podem oferecer uma nova classe de antibióticos: os AMPs (Peptídeos Antimicrobianos). AMPs de origem natural ou sintética apresentam mecanismos de ação antimicrobiana diferentes dos antibióticos tradicionais, podendo ser utilizados como tratamentos alternativos em infecções causadas por microrganismos resistentes aos antibióticos comumente utilizados (ZUCCA, SCUTERA e SAVOIA, 2011).

AMPs já foram isolados de plantas, mamíferos, insetos, moluscos, e até mesmo bactérias e fungos mostram síntese de proteínas e peptídeos com atividade antimicrobiana (MORALEJO *et al.*, 1999; NATORI, 1994). Koike e colaboradores (2002) identificaram em plantas de trigo, expostas ao estresse causado pelo frio, o AMP *Tad1*, com estrutura semelhante às defensinas, que apresenta ação contra *Pseudomonas cichorii*. Pelegrini e colaboradores (2008) identificaram em sementes de *Psidium guajava* o peptídeo Pg-AMP1, com estrutura rica em glicina, que apresenta ação contra bactérias Gram-negativas. Montesinos (2007) descreve

AMPs de origem bacteriana, semelhantes às Bacteriocinas, que inibem bactérias fitopatogênicas. Moreira e colaboradores (2011) descreveram a ação do AMP Ls-AMP1 e Ls-AMP2 extraídos de *Lippia sidoides* com ação contra o fungo fitopatogênico *Botrytis cinerea*.

Os AMPs constituem uma classe de compostos antimicrobianos que atuam como primeira linha de defesa do sistema imune (TAVARES *et al.*, 2013). Eles têm sido estudados, não só com aplicação direta contra patógenos, mas também em combinação com antibióticos de uso clássico como vancomicina e ampicilina, obtendo maior atividade contra bactérias resistentes a medicamentos (MANDAL *et al.*, 2009; MARTIN *et al.*, 2015). Há uma grande diversidade de estruturas secundárias dentre os AMPs, embora a grande maioria apresente carga positiva e uma estrutura terciária anfifílica (SIVERTSEN *et al.*, 2014). Sivertsen e colaboradores (2014) estudaram, por modelagem molecular, pequenos peptídeos demonstrando que as conformações anfipáticas flexíveis são uma das principais propriedades de CAPs (peptídeos antimicrobianos catiônicos).

De acordo com Parachin e Franco (2014), cerca de 2.300 AMPs já foram depositados no banco de dados *The Antimicrobial Peptide Database* (APD), dentre estes, existem aproximadamente cem medicamentos baseados em peptídeos e entre 500–600 em testes pré-clínicos. Apesar deste número de sequências de AMPs nos bancos de dados, isolar novas moléculas usando as técnicas clássicas de purificação é um trabalho complexo e demorado, muitas vezes com baixo rendimento (TAVARES *et al.*, 2012). Desta forma, a síntese de peptídeos ainda é mais vantajosa, embora seja de custo elevado, quando é necessária uma quantidade maior de peptídeos para realização de ensaios de validação da atividade. O tamanho do peptídeo interfere diretamente no custo de sua síntese, sendo mais vantajoso economicamente a produção de AMPs menores do que 30 resíduos de aminoácidos

Lippia alba Mill. N. E. Brown (*erva-cidreira*) é uma planta medicinal comumente usada como antibiótico, sedativo, anti-inflamatório dentre outros usos populares, sendo utilizada na forma de infusões e decocções (HANNEBELLE *et al.*, 2008). A espécie tem importância econômica por ser produtora de linalol de alta qualidade, isto é, sem contaminantes como cânfora. O linalol é um metabólito secundário extraído na forma de óleo, com utilização pela indústria de perfumes (TIMÓTEO *et al.*, 2015). A *Lippia alba* pode ser dividida de acordo com sua

composição fotoquímica em três quimiotipos: citral, carvona e linalol (TIMÓTEO *et al.*, 2015). As plantas do gênero *Lippia* produzem vários tipos de terpenos que são acumulados principalmente nas folhas, por exemplo, *L. lacunosa* é rica em mirceno e mircenona, *L. rotundifolia* em limoneno e mirtenal (SINGULANI *et al.*, 2012). Outros membros da mesma ordem como olive (*Olea europaea*, family Oleaceae), alecrim (*Rosmarinus officinalis*, Lamiaceae) e menta (*Mentha sp*) são importantes fontes de compostos terpênicos que são utilizados pela indústria farmacêutica, alimentícia e de perfumaria (ALAGNA *et al.*, 2009).

Alguns trabalhos demonstram a ação de compostos extraídos de plantas do gênero *Lippia* contra patógenos. Botelho e colaboradores (2007) demonstraram a ação de *L. sidoides* contra patógenos da cavidade oral, tais como *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*. Moreira e colaboradores (2011) reportaram a ação de *L. sidoides* contra o fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Devido ao potencial antioxidante de *L. alba*, Gomide e colaboradores (2013) observou ação inibitória contra a célula tumoral A549.

Muitas das espécies do gênero *Lippia* são endêmicas de regiões em constante degradação ecológica, o que torna necessário o estudo destas espécies tanto pelo conhecimento de seu potencial farmacológico e também para o estudo e desenvolvimento de áreas de preservação desta biodiversidade (VICCINI *et al.*, 2005). Campos e colaboradores (2011) analisaram 28 espécies deste gênero correlacionando o tamanho do DNA e o número cromossômico das mesmas. *L. alba* possui número cromossômico $n=15$ e o valor DNA C igual a 1,32 pg, já *L. rotundifolia* com 28 cromossomos apresenta 1,7pg de DNA C. O valor DNA C corresponde a quantidade de DNA nuclear em células haploides, sendo usado como parâmetro para estabelecer a ploidia de um organismo (CAMPOS *et al.*, 2011).

O sequenciamento de última geração (NGS – *Next Generation Sequencing*) aplicado a transcriptomas tem possibilitado uma grande cobertura para a identificação das sequências de RNAs expressas em determinado tecido, fase do desenvolvimento ou condição fisiológica (MU *et al.*, 2014). A combinação do NGS e avanços de bioinformática tem aumentado o estudo de plantas não-modelo, permitindo identificar vias metabólicas (MU *et al.*, 2014), ação de fitormônios (SHI *et al.*, 2014), transcritos mitocondriais (STONE e STORCHOVA, 2014), dentre outros. O RNA-seq ou sequenciamento do mRNA é uma ferramenta poderosa utilizada na identificação dos transcritos totais. Seu uso facilita as análises de transcriptoma por

apresentar alta processividade, acurácia e reprodutibilidade (WALL *et al.*, 2009; GUZMAN *et al.*, 2014). Em plantas, a aplicação do RNA-seq tem acelerado a compreensão de padrões transcricionais relacionados a características tecido-específicas ou relacionadas aos diferentes estágios de desenvolvimento (GUZMAN *et al.*, 2014).

Segundo Mardis (2008), NGS têm diminuído o custo e o tempo do sequenciamento dos genomas, apresentando ainda maior acurácia e fidelidade.). O processo de sequenciamento em todas as plataformas é bastante similar e inclui: preparação da amostra (genômico ou cDNA), amplificação clonal paralela de moléculas individuais de DNA e o sequenciamento gerando pequenas sequências (WOLLARD *et al.*, 2011).

Em plantas, o RNA-seq é uma alternativa ao sequenciamento do genoma total e pode ser utilizado para identificação de transcritos específicos de algum estágio do desenvolvimento ou condição fisiológica (MU *et al.*, 2014). O perfil de transcritos possibilita identificar a composição de aminoácidos das proteínas a serem traduzidas, além de permitir a identificação de domínios proteicos conservados sendo, portanto, uma excelente maneira de estudar e identificar peptídeos antimicrobianos e proteínas envolvidas com a biossíntese de terpenos (MU *et al.*, 2014). Wollard e colaboradores (2011) descrevem várias aplicações da tecnologia NGS para a descoberta de novas drogas, investigação dos mecanismos de resistência dos patógenos a diferentes fármacos, diagnóstico clínico, dentre outras.

A montagem do transcriptoma de organismos não-modelo, tais como *Lippia* sp, tem sido um desafio uma vez que não há um genoma de referência (denominado *de novo* assembly). Desta maneira, são requeridas ferramentas de bioinformática e o desenvolvimento de estratégias capazes de fazer a montagem através da comparação das sequências com aquelas provenientes de organismos relacionados (JAYASENA *et al.*, 2014).

Apesar do potencial biotecnológico de *Lippia alba* e *Lippia rotundifolia*, ainda não há nenhum genoma ou transcriptoma para este grupo de plantas. Assim, no presente trabalho foi feito o transcriptoma de folhas destas duas espécies usando NGS com a plataforma 454 GS FLX.

A partir de trabalhos prévios com plantas do gênero *Lippia* que demonstram ação antimicrobiana e a presença de AMPs (QUINTÃO, 2009; MOREIRA *et al.*, 2011), este trabalho propõe aplicar a análise do perfil de expressão de genes a partir

de folhas das espécies *Lippia alba* e *L. rotundifolia*, afim de identificar novos antimicrobianos através do NGS. No presente estudo, foi realizado o primeiro transcriptoma de folhas das espécies de *L. alba* e *L. rotundifolia* objetivando inicialmente identificar sequências putativas codificadoras de peptídeos com ação antimicrobiana. Os peptídeos encontrados foram modelados, otimizados e sua ação testada *in vitro* contra microrganismos relacionados a IRAS (Infecções relacionadas à assistência à saúde).

Com o intuito de validar os peptídeos identificados e molelados no presente trabalho, ensaios de microdiluição em caldo (CLSI 2015) foram realizados contra diferentes espécies patogênicas a humanos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (AMPs)

Peptídeos antimicrobianos são pequenas sequências, geralmente menores que 50 resíduos e são considerados um importante mecanismo ancestral de resistência inata. Atuam de forma rápida e metabolicamente econômica como primeira linha de defesa contra patógenos, apresentando um amplo espectro de ação (EGOROV *et al.*, 2005; MONTESINOS, 2007). AMPs apresentam grande diversidade em sua sequência de aminoácidos, tamanho, origem e estrutura, mas a grande maioria possui duas importantes características funcionais: possuem carga positiva e apresentam alta proporção de resíduos hidrofóbicos (GURALP *et al.*, 2013). Tais

peptídeos são ativos em concentrações nanométricas ou micrométricas e a maioria dos AMPs provoca a morte da bactéria alvo através de mecanismos que não envolvem mediação por receptores e, em geral, utilizam mecanismos de permeabilização da membrana plasmática (GURALP *et al.*, 2013).

Os peptídeos antimicrobianos podem ser divididos em duas grandes classes, dependendo da sua biossíntese: a primeira é a grande e heterogênea categoria dos peptídeos que são sintetizados em grandes e modulares complexos enzimáticos, por fungos e bactérias, e que inclui os peptídeos não sintetizados ribossomicamente (ZUCCA, SCUTERA e SAVOIA, 2011). Dentre os peptídeos identificados nesta classe podemos citar: Bacitracina, Gramicidina S e polymixina B. A segunda categoria são aqueles peptídeos ribossomicamente sintetizados, que podem ainda ser subdivididos em duas classes de acordo com sua origem. Os peptídeos produzidos por bactérias são chamados de bacteriocinas, enquanto os peptídeos de origem eucariótica são designados por AMPs. (ZUCCA, SCUTERA e SAVOIA, 2011). Considerando que os AMPs podem ser classificados levando-se em conta diferentes características, tais como o organismo produtor, o mecanismo de ação, a conformação e estrutura bioquímica, hidrofobicidade, anfipaticidade e atividade antimicrobiana (PUSHPANATHAN, PARAMASAMY e JEYAPRAKASH, 2013).

De acordo com a carga elétrica, os AMPs podem ser divididos em aniônicos ou catiônicos. Os de carga negativa (-1 a -7) já foram identificados tanto em vertebrados quanto em invertebrados e mostraram atividade contra bactérias, fungos, vírus, nematódeos e insetos. No entanto, estes AMPs são menos reportados na literatura do que os AMPs catiônicos (CAPs) (HARRIS *et al.*, 2009). Os peptídeos de carga positiva (CAPs) atuam modulando a resposta imune do hospedeiro pela indução de quimiocinas e citocinas que recrutam e ativam células do sistema imune induzindo reparo e inibindo a angiogênese (ZUCCA, SCUTERA e SAVOIA, 2011). Os CAPs apresentam carga entre +2 e +11, devido aos resíduos de arginina e lisina, em geral em maior quantidade, sendo compostos por cerca de 50% de aminoácidos hidrofóbicos. A carga positiva dos CAPs é responsável pelo principal mecanismo de ação destes peptídeos: a disrupção da membrana celular do patógeno pela formação de poros ou outras formas de permeabilização (FJELL *et al.*, 2012).

Várias proteínas e peptídeos antimicrobianos já foram identificados como constituintes do sistema de defesa em vegetais, dentre as mais conhecidas temos as lecitinas, as proteínas relacionadas aos patógenos (PR), as glicoproteínas ricas em

hidroxiprolina, as proteínas semelhantes às ciclofilinas, as proteínas inativadoras de ribossomos e os inibidores de proteases (EGOROV *et al.*, 2005). A classe dos peptídeos antimicrobianos (AMPs), participa ativamente do mecanismo de defesa imune primária contra microrganismos (MONTESINOS; 2007).

Alguns estudos têm identificado que muitos AMPs não atuam apenas como agentes antimicrobianos diretos. Muitos agem como importantes efetores e reguladores do sistema imune inato e são capazes de modular a resposta imune através de várias atividades. São conhecidos o aumento da produção de citocinas, efeitos sobre a angiogênese, efeito pró e antiapoptótico sobre diferentes tipos celulares do sistema imune bem como ação adjuvante na promoção da resposta imune adaptativa (FJELL *et al.*, 2012). Guzmán-Rodríguez e colaboradores (2014) associaram esta ação antiangiogênica com a seletividade de alguns AMPs a células cancerosas. Ao identificar as células com a carga negativa em sua membrana, que não são comuns em células eucarióticas normais, os AMPs nomeados Thi2.1, Defensina Mitogênica, Kalata B1, dentre outros extraídos de plantas, atuam de maneira citotóxica além de inibirem a angiogênese, que é fundamental para a vascularização do tumor (GUZMÁN-RODRÍGUEZ *et al.*, 2014). Silva e colaboradores (2014) relatam que modelagem molecular e síntese de moléculas a partir de AMPs tipo defensinas podem gerar novas terapias antimicrobianas, além de poderem ser utilizados como adjuvantes para vacinas destinadas a pacientes imunodeprimidos.

O principal mecanismo de ação dos AMPs em células procarióticas, relaciona-se a interação com a membrana, sendo uma ação direta dos AMPs, pois leva a perturbação da membrana, disrupção da membrana e de eventos fisiológicos, como a interrupção da biossíntese da parede celular ou divisão celular. Outros modos de ação associados aos AMPs relacionam-se a translocação da membrana e interação com alvos no citoplasma. Em geral peptídeos positivamente carregados inicialmente interagem com as cabeças lipídicas negativamente carregadas da superfície da membrana citoplasmática (Figura 1). Estes peptídeos podem se inserir em orientação paralela ou perpendicular na bicamada lipídica levando a uma desorganização dos lipídeos. Fjell e colaboradores (2012) propõem em seu trabalho que alterações na estrutura da membrana incluindo afinamento, formação de poros, alteração na curvatura, modificações eletrostáticas e perturbações locais podem resultar da reorganização das moléculas de peptídeos na membrana. Outra forma de

ação envolve a translocação dos AMPs e sua difusão no citoplasma agindo sobre a síntese de DNA, controle da expressão gênica, estabilidade e endereçamento de proteínas (FJELL *et al.*, 2012).

A forma de ação dos AMPs, independente de sua classe ou estrutura, está inicialmente relacionada com o processo de atração a membrana celular devido à anfipaticidade do peptídeo. Esta atração ocorre devido a interação eletrostática entre os AMPs e as moléculas carregadas negativamente na superfície da membrana bacteriana. Em bactérias Gram-negativas os constituintes aniônicos são os lipossacarídeos (LPS), grupos fosfatos e lipídeos aniônicos, já as bactérias Gram-positivas o ácido teiólico apresenta carga negativa (DIAMOND *et al.*, 2009). Após ser atraído para a membrana bacteriana, o AMP pode atravessar a cápsula polissacarídea externa dos microrganismos e alcançar sua camada lipídica interna. Diamond e colaboradores (2009) descrevem que os resíduos de arginina (Arg) e triptofano (Trp) desempenham um papel fundamental na estabilização da interação peptídeo-membrana durante a inserção do peptídeo, devido às interações eletrostáticas das cadeias laterais com os grupos de cabeça fosfato e pela atração dos resíduos de triptofano por regiões interfaciais da bicamada lipídica.

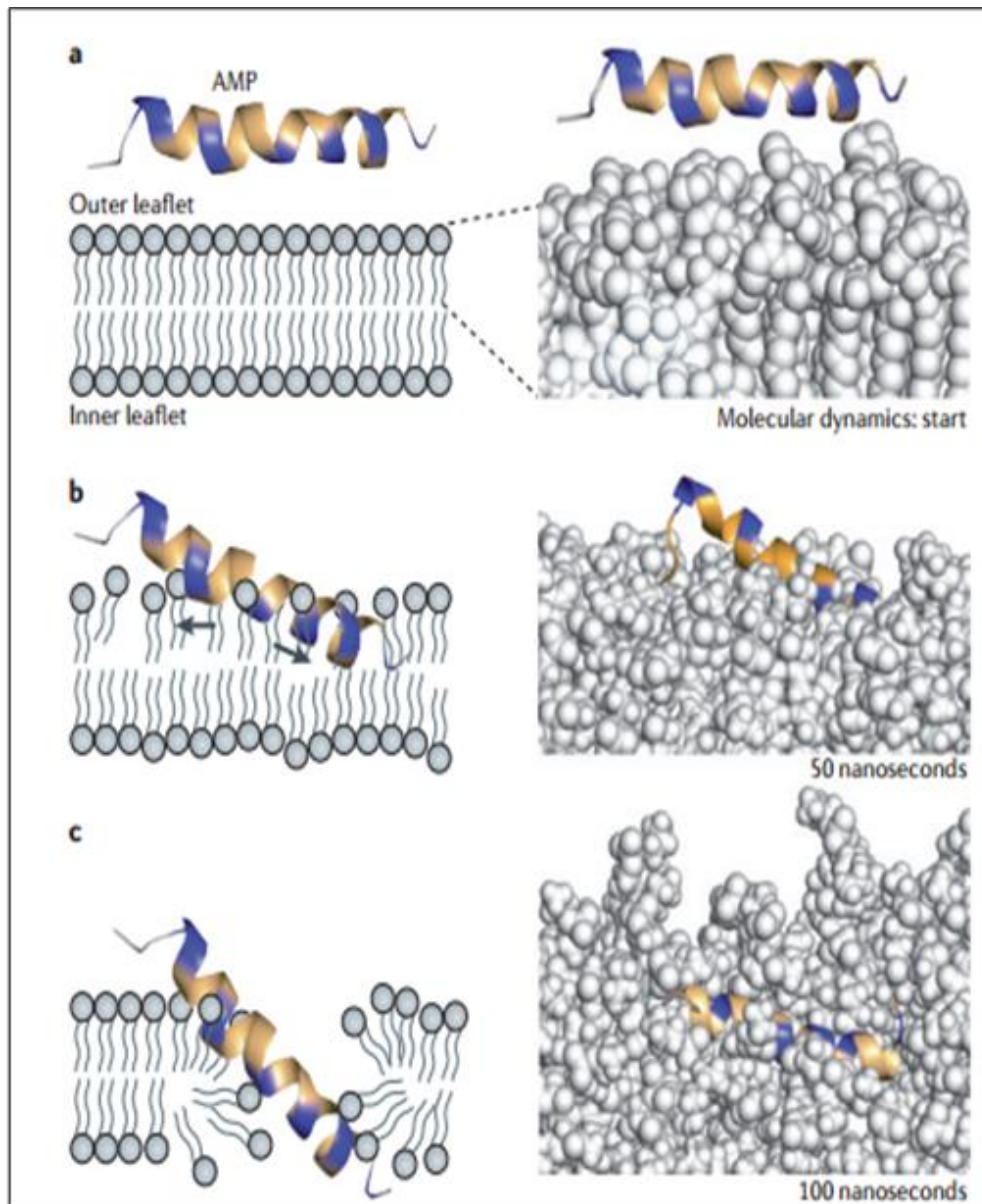


Figura 1: Possíveis mecanismos de ação de AMPs. Os AMPs estão representados como uma hélice, sendo que os resíduos positivamente carregados estão representados em azul e os demais resíduos em amarelo. A – Estágios iniciais de ação incluem o ataque à membrana plasmática. B – Inserção na superfície da membrana. C- Peptídeos de pequeno tamanho permeiam a membrana plasmática. (Adaptado de FJELL et al., 2012).

Depois de ligados à membrana, os AMPs adquirem uma estrutura secundária energeticamente favorável baseado na hidrofobicidade do peptídeo; por exemplo, a maioria dos peptídeos em α -hélice possuem níveis relativamente constantes de hidrofobicidade ao longo de seu eixo, o que os obriga a orientar-se em paralelo ou perpendicularmente em relação à membrana e a si mesmo (DIAMOND *et al.*, 2009).

Brogden (2005) ressalta que além do ataque a camada lipídica do patógeno, existem outros mecanismos de morte microbiana que não estão relacionados à lise celular, uma vez que muitos AMPs são translocados e atuam contra alvos intracelulares. Estes AMPs “intracelulares” atuam inibindo a síntese de parede celular, alterando a membrana citoplasmática, ativando de autolisina, ligação ao DNA, inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas e perda da atividade enzimática (Figura 2) (BROGDEN, 2005).

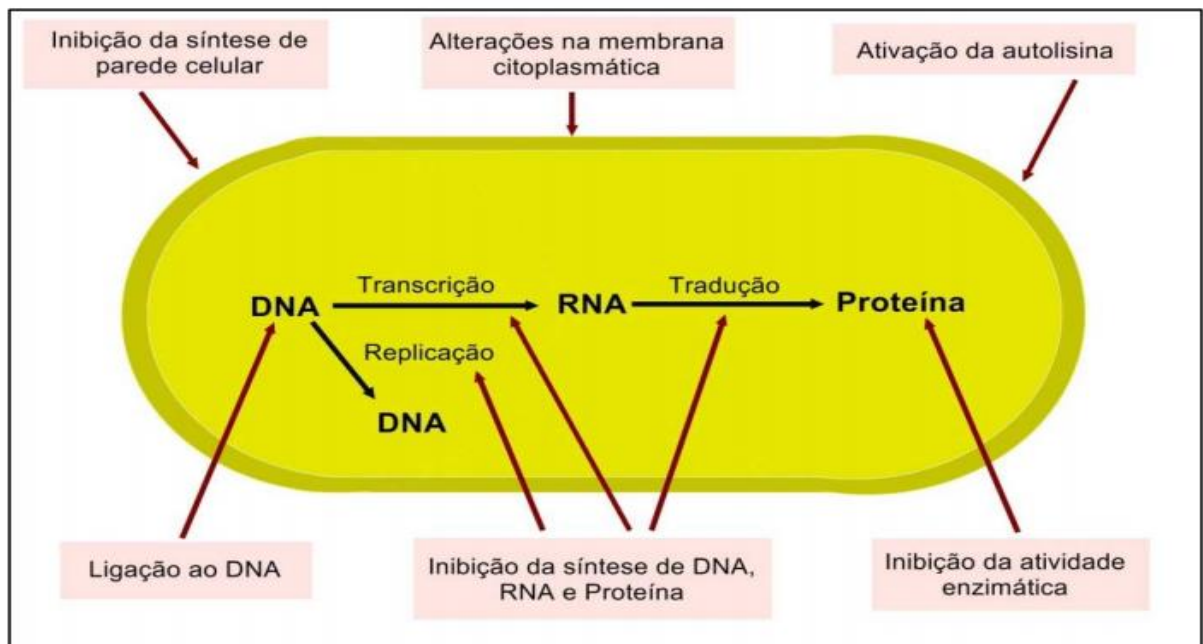


Figura 2: Alvos intracelulares de AMPs (Adaptado de BROGDEN, 2005).

Os AMPs podem ser classificados em quatro grupos, baseados em sua estrutura secundária: α -hélice, folhas β , peptídeos lineares e peptídeos dobrados.

Dentre os AMPs com estrutura α -hélice destacam-se as magaininas, cecropinas e o mexican que são os peptídeos mais bem estudados quanto a atividade relacionada à estrutura (SEO *et al.*, 2012). Em solução aquosa os peptídeos α -hélice são geralmente não estruturados e formam hélices anfipáticas com comportamento semelhante ao das membranas celulares dos patógenos no qual se inserem e promovem o rompimento. Vários mecanismos de ação são propostos, tais como estrutura de barril (barrel-stave model), estrutura de tapete (carpet model) e formação de poros (Toroidal pore model) (Figura 3).

Os AMPs com estrutura de folhas β como as α -, β -defensinas e protegrin são estabilizadas por pontes dissulfeto e formam estruturas relativamente rígidas. Em geral estes AMPs atuam rompendo a membrana bacteriana inserindo-se perpendicularmente na bicamada lipídica formando poros onde as regiões hidrofóbicas do peptídeo interagem com os grupos da cabeça polar dos lipídeos da membrana bacteriana (BROGDEN, 2005).

Os AMPs lineares são geralmente ricos em resíduos de aminoácidos como a prolina, triptofano, arginina e histidina e em geral não apresentam uma estrutura secundária estável. Como exemplo temos a Indolicina, que é rica em prolina e triptofano e os AMPs Bac 5 e Bac 7, que são ricos em prolina e arginina. Muitos peptídeos lineares não rompem a membrana do patógeno, sua ação antimicrobiana consiste em penetrar a membrana e agir sobre as proteínas bacterianas, no entanto a Indolicina, embora seja um peptídeo linear, interage com a membrana, pois seus resíduos de triptofano se ligam com os lipídeos da membrana (SEO *et al.*, 2012).

Os AMPs com estrutura em dobra (loop), tais com o Bactenecin, adotam esta conformação devido a uma ponte dissulfeto (SEO *et al.*, 2012).

De acordo com a identificação de domínios conservados, os AMPs podem ser divididos em diferentes famílias proteicas (TAVARES *et al.*, 2008). Dentre estas, incluem-se as defensinas (BROEKAERT *et al.*, 1995), proteínas de transferência de lipídios (LTPs) (GARCIA-OLMEDO *et al.*, 1995), proteínas de ligação à mirosinase (MBP) (RASK *et al.*, 2000), snakinas (SEGURA *et al.*, 1999), ciclotides (PELEGRINI, QUIRINO e FRANCO, 2007), albumina 2S (AGIZZIO *et al.*, 2006), proteínas ricas em glicina (PELEGRINI *et al.*, 2008) dentre outras.

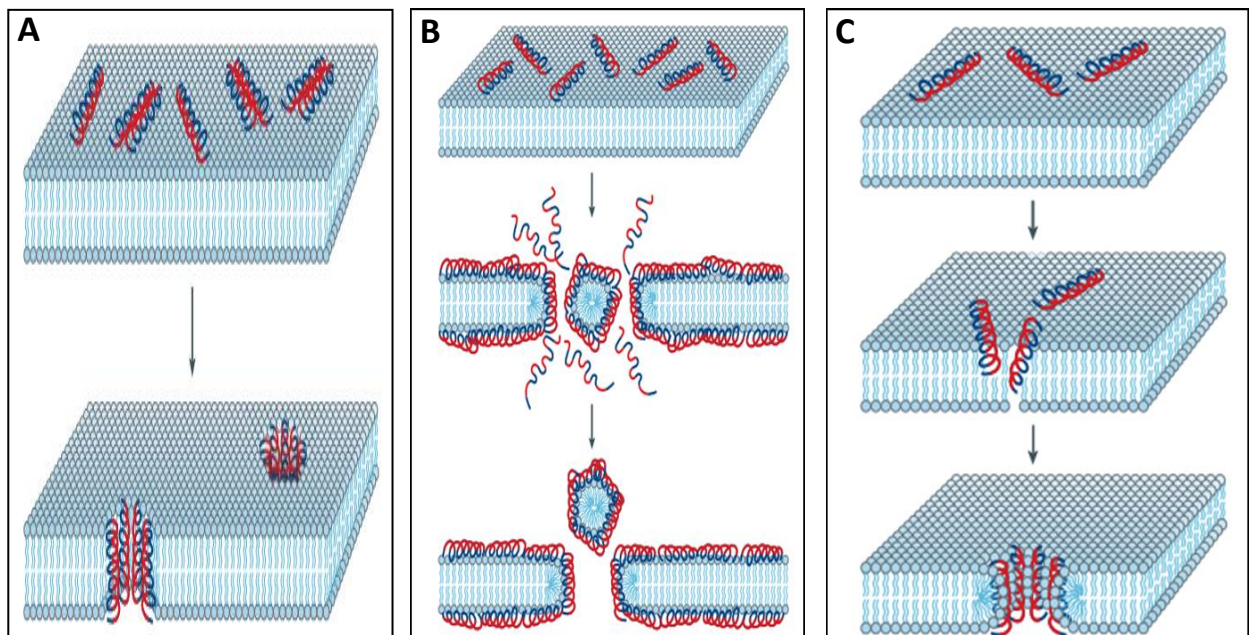


Figura 3: Modelos de ação dos AMPs. Resíduos hidrofóbicos dos AMPs coloridos de azul e os resíduos hidrofílicos coloridos em vermelho. A- Modelo *Barrel-stave*. Neste modelo os peptídeos se agregam e se inserem na bicamada lipídica da membrana sendo que os resíduos hidrofóbicos do peptídeo se organizam voltados para os lipídeos enquanto que os resíduos hidrofílicos formam o interior do poro. B – Modelo *Carpet*: Neste modelo os peptídeos se organizam em paralelo a superfície da bicamada lipídica e formam uma camada extensa ou tapete causando a disrupção da membrana bacteriana. C – Modelo *Toroidal*: Neste modelo os peptídeos se agregam e induz à monocamada lipídica a formação de um poro onde os resíduos hidrofóbicos dos peptídeos se voltam para os lipídeos e os resíduos hidrofílicos para a luz do poro. (Adaptado de BROGDEN, 2005).

Vários AMPs têm se mostrado eficientes contra microrganismos multi droga resistentes, e com menor propensão ao desenvolvimento de resistência, provavelmente em função do peculiar mecanismo de ação a que eles estão envolvidos, que é diferente daqueles amplamente conhecidos das drogas utilizadas no tratamento de doenças infecciosas (TAVARES *et al.*, 2013). Desta forma, os AMPs tornam-se promissores para desenvolvimento de possíveis fármacos (WIMLEY, 2010; PARSUPULETI e SCHMIDTCHEN, 2012; TORCATO *et al.*, 2013). Alguns AMPs podem ainda atuar de maneira sinérgica, potencializando a ação de antibióticos de uso convencional (TORCATO *et al.*, 2013). Em geral os AMPs são seletivos, apresentando maior preferência por membranas bacterianas que são negativamente carregadas do que pelas membranas eucarióticas que apresentam uma camada lipídica neutra (TORCATO *et al.*, 2013).

Alguns novos antibióticos de uso restrito têm sido testados, visando a inibição de bactérias causadoras de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS).

Yang e colaboradores (2007) clonaram e testaram a ação de uma colicina 5 contra *Escherichia coli* causadoras de infecções hospitalares em paciente imunodeprimidos. O peptídeo antimicrobiano Ay-AMP, isolado de *Amaranthus hypocondriacos*, apresenta ação antifúngica, além de ser resistente ao efeito de proteases e aquecimento, evidenciando seu potencial como fármaco (RIVILLAS-ACEVEDO e SORIANO-GARCÍA; 2007).

O número de AMPs com ação confirmada tem crescido nos últimos anos. Em 2013 o banco de dados *The Antimicrobial Peptides Database*, de acordo com Craik e colaboradores (2013) apresentava 2300 peptídeos identificados. Em fevereiro de 2015, este mesmo banco de dados armazena 2517 AMPs com ação confirmada, dos quais 245 são bacteriocinas, sendo dois deles oriundos de arquea, sete de protistas, 13 de fungos, 314 de plantas e 1895 de animais, mostrando o rápido crescimento na identificação e na pesquisa com AMPs. A base de dados Lamp (Linking Antimicrobial Peptides) armazena 5547 AMPs em sua base de dados, dos quais 3904 são naturais e 1643 são AMPs sintéticos.

2.2. O GÊNERO *LIPPIA*

O gênero *Lippia* (Verbenaceae) compreende cerca de duzentas espécies com ampla distribuição nos neotrópicos, sendo que no Brasil podem ser encontradas 111 (RUFINO *et al.*, 2012). As espécies de *Lippia* estão distribuídas nas regiões áridas do sudoeste dos EUA, nas florestas tropicais decíduas da América Central e nos campos rupestres e cerrados do Brasil, regiões de altos índices de endemismos. Sua distribuição se estende até o Uruguai e região central da Argentina. Na África, sua ocorrência também coincide com centros de alto endemismo, na região leste, associada às montanhas mais altas e picos alpinos (SALIMENA, 2000). São caracterizadas por serem plantas arbustivas ou subarbustivas e pequenas árvores. O gênero está incluído na tribo Lantanae Briq., subtribo Lantaninae e é morfológicamente mais semelhante à *Lantana*, do qual difere por apresentar fruto esquizocárpico (SALIMENA, 2010).

As plantas deste gênero são comumente utilizadas na medicina popular contra dores de estômago, doenças respiratórias, sedativo, tratamento de hipertensão,

antisséptico, inseticida e ainda na indústria de perfumes (RUFINO *et al.*, 2012, TIMÓTEO *et al.*, 2015). *L. alba* é conhecida pela produção de óleos essenciais, sendo que o linalol é bastante utilizado na produção de perfumes, sendo um dos constituintes do Chanel nº 5 (produzido desde 1921 utilizando óleo essencial de *Aniba rosaeodora*) (RUFINO *et al.*, 2012; TIMÓTEO *et al.*, 2015). De acordo com o composto majoritário, *L. alba* é dividida em três quimiotipos principais: citral, carvona e linalol (TIMÓTEO *et al.*, 2015).

Dentro do gênero *Lippia* muitas espécies apresentam potencial farmacológico, tendo sido testados diferentes tipos de extratos contra vários microrganismos. Aguiar e colaboradores (2008) obtiveram resultados promissores na busca de novos antimicrobianos ao testarem diferentes extratos brutos (hexânico, clorofórmico, acetônico, etanólico, metanólico e aquoso) de raiz, caule e folhas de *L. alba* (Erva-cidreira) contra bactérias *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* e *Monilia sitophila*, com halos de inibição próximos daqueles produzidos pelos antibióticos canamicina e cetoconazol utilizados no ensaio. Outra espécie bastante estudada, *L. sidoides* (Alecrim-pimenta), apresentou ação antifúngica a partir de extratos de óleos descrita contra *Candida albicans*, *Microsporum canis*, *Malassezia pachydermatis* (FONTENELLE *et al.*, 2007) e extratos proteicos contra *Botrytis cinerea* (MOREIRA *et al.*, 2011). Testes realizados com o óleo essencial de *L. sidoides* não apresentaram alterações toxicológicas em camundongos (FONTENELLE *et al.*, 2007).

Estudos realizados por Moreira (2011) com o extrato proteico bruto de flores de *L. rotundifolia* mostraram atividade contra *Escherichia coli*, *Proteus*, *Klebsiella* e *Streptococcus pyogenes* tornando promissora a identificação das proteínas antimicrobianas existentes nestas espécies. Já o extrato proteico bruto de flores de *L. lacunosa* apresentou atividade bactericida contra bactérias causadoras de mastite bovina, despertando grande interesse no potencial antimicrobiano desta espécie e de outras do mesmo gênero (QUINTÃO, 2009).

Gomide e colaboradores (2013) demonstraram o potencial antitumoral do óleo essencial de *L. sidoides* e *L. salviifolia* em linhagens de MT26 (carcinoma de cólon de camundongo).

Desta forma, faz-se necessário o aprofundamento em relação aos genes codificadores de proteínas ou peptídeos chamados AMPs nestas espécies, para em seguida, realizar a expressão destas proteínas, o que irá possibilitar inúmeros testes

contra vários microrganismos patogênicos, especialmente aqueles causadores de infecção hospitalar.

2.3. TRANSCRIPTOMAS

O sequenciamento de última geração (*next-generation sequencing* – NGS) se refere a vários avanços no sequenciamento de DNA que ocorreram na década de 2001-2010. Estas tecnologias geram um enorme número de pequenos fragmentos de DNA que são sequenciados e ordenados de maneira a determinar a sequência de Adenina, Timina, Citosina e Guanina de várias moléculas de DNA simultaneamente. Tais tecnologias geram de milhões a bilhões de sequências a partir da montagem de fragmentos contendo de 50 a 1.000 nucleotídeos (MU *et al.*, 2014).

As tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) têm sido aplicadas em estudos com diversos organismos e objetivos, tais como estudos de genômica funcional. Diversas são as plataformas de sequenciamento *next-generation* e estas estão mudando a maneira como a expressão gênica é estudada. Os métodos de sequenciamento *next-generation high-throughput*, isto é, de alta processividade, tais como a Plataforma Roche 454 GS FLX, foi a primeira usada para o sequenciamento de alto rendimento. Recentemente, novas tecnologias têm apresentado uma relação custo/benefício mais satisfatória, permitindo a análise de transcriptomas de plantas modelo assim como de plantas não modelo. Estas tecnologias possibilitam identificar grande número de sequências expressas, podendo ainda descobrir novos genes e mostrar a expressão de muitos transcritos raros (LUO *et al.*, 2010). O sequenciador 454 GS FLX gera milhões de bases de sequências de cDNA usadas na análise do transcriptoma (BARAKAT *et al.*, 2009) apresentando leituras longas e acuradas que permitem uma série de aplicações, como anotação de genoma, identificação de novos transcritos, detecção de variantes de *splicing*, análise de expressão, montagem de genes inteiros e descoberta de SNP (JARVIE e HARKINS, 2008).

Misturas complexas de RNA podem ser analisadas numa abordagem chamada “RNA-seq”. Esta técnica consiste em sequenciar o transcriptoma que contém todos

os transcritos de um tecido ou tipo celular, para tal o RNA é convertido em cDNA (DNA complementar) possibilitando a aplicação em comparações entre tecidos saudáveis e doentes, plantas modelo e não modelo, dentre outras aplicações (WOOLLARD *et al.*, 2011).

Vários estudos de RNA-seq abrem caminho para uma cobertura completa de transcriptomas com excelente resolução para a análise de nível e estrutura de transcritos, processados e não processados em diferentes condições (MARGUERAT, WILHELM e BÄHLER, 2010). Para sequenciamento de transcriptomas, esta plataforma foi amplamente usada (MOROZOVA e MARRA, 2008), e mais recentemente, outras tecnologias como o Illumina também são utilizadas. O sequenciamento *next-generation* tem grande potencial para a caracterização de transcriptomas por causa da grande quantidade de dados gerados a custos relativamente menores quando comparados aos métodos Sanger de sequenciamento tradicional (WALL *et al.*, 2009).

O comprimento médio das leituras obtidas com o GS FLX em experimentos com transcriptoma de plantas geralmente fica em torno dos 200pb, enquanto que para DNA genômico esta média fica entre 250-300pb (JARVIE e HARKINS, 2008). O comprimento das leituras também é afetado pelo primer usado (oligo-dT ou random primer) na síntese da primeira fita de cDNA. O uso de um primer do tipo oligo-dT para a síntese da primeira fita de cDNA, bem como purificações de mRNA após a extração do RNA Total, deve reduzir a presença dos rRNA na biblioteca sequenciada (WALL *et al.*, 2009). Além disso, após a síntese do cDNA dupla fita, esta biblioteca pode ou não ser normalizada. Para pequenos sequenciamentos, uma biblioteca não normalizada deve produzir um maior número de sequências gênicas completas quando comparadas às normalizadas. À medida que o sequenciamento aumenta isto se inverte e as bibliotecas normalizadas tendem a capturar mais sequências completas de cDNA (WALL *et al.*, 2009).

Quando sequenciamos uma planta não modelo pode-se ainda mapear as leituras, comparando-as ao genoma/transcriptoma de uma planta modelo próxima disponível, visando identificar possível homologia entre elas, sendo então chamadas de genoma de referência (JARVIE e HARKINS, 2008, GUZMAN *et al.*, 2014). As leituras geradas pelas tecnologias *next-generation* podem ser alinhadas a um genoma de referência conhecido ou montadas *de novo*. A escolha por uma das duas abordagens deve levar em conta o objetivo pretendido, os custos e o tempo

demandado. Mesmo quando a opção é pelo alinhamento de leituras a um genoma de referência disponível pode-se enfrentar dificuldades com o alinhamento a regiões repetitivas ou regiões que faltam neste genoma de referência, resultantes de gaps ou variantes estruturais. Bibliotecas *mate-pair* podem ajudar a resolver alguns destes problemas (METZKER, 2010).

O uso de transcriptomas gerados para fazer genética reversa é uma ferramenta interessante para descoberta de novas proteínas, principalmente as mais raras ou cuja prospecção via proteômica seja mais difícil devido a uma série de complicadores como baixa produção de proteínas. A partir das sequências primárias de nucleotídeos, identificados através da análise dos transcriptomas, cuja sequência codifica peptídeos com possível ação antimicrobiana, realizamos a modelagem da sequência de aminoácidos obtida, de maneira a prever a estrutura e modo de ação do peptídeo em estudo.

2.4. MODELAGEM MOLECULAR

A diversidade de sequências e estruturas dos AMPs (Peptídeos Antimicrobianos) muitas vezes torna difícil relacionar sua estrutura e sua atividade. Desta forma o desenvolvimento de novos e mais potentes AMPs torna-se um desafio. Buscando facilitar esta compreensão, utilizamos ferramentas de bioinformática chamados de “modelos linguísticos” para o desenvolvimento de peptídeos antimicrobianos. O *design* racional é baseado no conhecimento da carga e hidrofobicidade dos AMPs para determinar sua melhor atividade. Estes modelos de design racional ainda buscam prever a forma que o peptídeo toma quando em solução ou quando interage com o microrganismo (CHERKASOV *et al.*, 2008).

O MODELLER é um programa utilizado na ausência de estruturas experimentalmente determinadas em proteínas. Este programa permite determinar a estrutura de um peptídeo computacionalmente, e através de comparações com outras estruturas de proteínas já depositadas em banco de dados (mesmo que sejam apenas domínios conservados) estabelecer um modelo para a conformação estrutural do peptídeo estudado (ESWAR *et al.*, 2008). Desta maneira o MODELLER

permite a predição do melhor modelo para a estrutura de peptídeo ou proteína em análise (ESWAR *et al.*, 2008).

O procedimento de modelagem molecular é realizado em etapas sucessivas. Inicialmente identificam-se as proteínas que servem como molde (*templates*), em seguida faz-se a modelagem propriamente dita (construção de coordenadas) e finalmente a validação dos modelos gerados.

Para realizar a modelagem molecular dos peptídeos pela análise *in silico* de transcriptomas é necessário identificar proteínas com alto nível de similaridade local em relação à sequência dos fragmentos disponíveis, que foram utilizadas como molde. A identificação dos melhores moldes foi feita através da utilização da ferramenta BLASTp (ALTSCHUL *et al.*, 1997), disponível no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), com o objetivo de encontrar regiões locais de similaridades entre as sequências informadas e as estruturas tridimensionais (pdb) depositadas no Protein Data Bank (PDB - <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>). A análise dos resultados gerados baseou-se nos melhores valores de *Max score* e *Query coverage*, calculados através da matriz de substituição de aminoácidos BLOSUM62 (HENIKOFF e HENIKOFF, 1992; STYCZYNSKI *et al.*, 2008); além disso, a inexistência de *gaps* entre as sequências foi considerado um fator determinante para a escolha do molde.

Definido o molde, realiza-se o alinhamento múltiplo entre as sequências dos peptídeos em estudo e a sequência dos respectivos moldes, utilizando o programa Clustal W (THOMPSON, HIGGINS e GIBSON, 1994), baseado na matriz de peso BLOSUM.

A modelagem por similaridade foi realizada utilizando o software MODELLER 9v.8 (SALI e BLUNDELL, 1993), permitindo a construção dos modelos tridimensionais, que se basearam no resultado do alinhamento das sequências geradas pelo transcriptoma (sequência alvo) e a sequência dos moldes. Foram então calculadas as restrições espaciais da estrutura molde, e através do alinhamento, estas foram aplicadas à sequência alvo. O modelo foi derivado pela minimização das violações das restrições espaciais (obtidos pelo alinhamento) do molde, e construído pela imposição dessas restrições de ângulos e distâncias na sequência alvo. Depois de geradas as estruturas para cada modelagem, estas são classificadas segundo DOPE (*Discrete Optimized Protein Energy*) e GA341 *score*; que são métodos estatísticos utilizados para classificar as estruturas de acordo com sequência alvo

(SHEN e SALI, 2006) e/ou maiores valores para GA341 (MELO, SÁNCHEZ e SALI, 2002). Satisfazendo tais parâmetros, a estrutura selecionada irá possuir maior minimização energética, portanto são mais estáveis e aptas a serem utilizadas nas etapas seguintes. A visualização dos modelos gerados foi feita através do software PyMol.

A etapa final do processo de modelagem consistiu em avaliar os diferentes níveis de organização estrutural. Nessa etapa, foram analisados os vários níveis de empacotamento global do peptídeo, os possíveis erros estruturais em regiões localizadas e os parâmetros estequiométricos. O servidor PDB2PQR (DOLINSKY *et al.*, 2004) (<http://kryptonite.nbc.net/pdb2pqr/>) foi utilizado para a criação dos mapas eletrostáticos dos modelos gerados; estes mapas foram elaborados a partir da equação de Poisson-Boltzmann, que avaliou as interações eletrostáticas entre biomoléculas em soluções iônicas disponibilizando o potencial de superfície da mesma (diretamente influenciado pela concentração de íons na superfície) (FOGOLARI, BRIGO e MOLINARI, 2002). O programa que utilizamos para avaliar os parâmetros estereoquímicos dos modelos foi o PROCHECK (http://www.jcsg.org/prod/scripts/validation/sv_final.cgi) (MORRIS *et al.*, 1992), o qual avalia os comprimentos de ligação, os ângulos planos, a planaridade dos anéis de cadeias laterais, a quiralidade, as conformações das cadeias laterais, a planaridade das ligações peptídicas, os ângulos das torções da cadeia principal e das cadeias laterais, o impedimento estérico entre pares de átomos não ligados e a qualidade do Mapa de Ramachandran (RAMACHANDRAN e SASISEKHARAN, 1968). Esse mapa mostra os ângulos de torção da cadeia principal da estrutura distribuídos em três regiões principais: as regiões mais favoráveis e as regiões permitidas, onde os pares de ângulos não possuem impedimentos espaciais, e a região não permitida, onde os aminoácidos não podem estar devido à sobreposição dos átomos. Uma estrutura ideal é esperada ter aproximadamente 90% de aminoácidos nas regiões mais favorecidas e esse percentual é um dos melhores indicadores da qualidade estrutural de uma proteína (RAMACHANDRAN e SASISEKHARAN, 1968).

O programa 3DSS (<http://cluster.physics.iisc.ernet.in/3dss/>) foi usado para o cálculo do RMSD (*Root Mean Square Deviation* – distância entre os átomos), que mostra a similaridade entre duas estruturas, sendo obtido através da sobreposição estrutural do modelo obtido por modelagem molecular e a estrutura utilizada como molde (SUMATHI *et al.*, 2006). A coerência entre os moldes e os modelos gerados é

avaliada através do ProSa-web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>), que disponibiliza valores de Z-score (WIEDERSTEIN e MANFRED, 2007). Este programa indica a qualidade do modelo através da medida do desvio da energia total da estrutura com relação a distribuição de energia derivada de conformações aleatórias e comparações com todas as cadeias proteicas de tamanhos similares disponíveis no PDB.

2.5 INFECÇÕES RELACIONADAS A ASSISTÊNCIA À SAÚDE (IRAS)

A partir da utilização de antibióticos como ferramenta terapêutica para doenças infecciosas, houve redução da mortalidade causada por tais doenças, mas o número de doenças infecciosas persiste (TAVARES *et al.*, 2013). O abuso do uso de antibióticos tem favorecido a seleção de bactérias resistentes, como um mecanismo evolutivo de adaptação ao ambiente. Enquanto a pressão seletiva pelo uso de antimicrobianos for mantida, mecanismos adaptativos serão transmitidos para novas gerações, através do fluxo gênico. Os genes de resistência podem ser transmitidos via transposons e integrons, ficando inseridos no genoma, ou via plasmidial, permanecendo como um genoma extra cromossômico (EL-HALFAWY e VALVANO, 2012). O fenômeno de resistência antimicrobiana acontece na natureza independente do contato com antibióticos; desta maneira a resistência já foi observada em ambientes naturais, especialmente em solos (TAVARES *et al.*, 2013). Devido ao número limitado de classes de antibacterianos utilizados, tem sido comum a resistência cruzada dentro das classes de bactérias. A resistência cruzada é um mecanismo de resistência a uma droga que confere simultaneamente resistência a outra droga. Este fenômeno agrava o problema de saúde pública uma vez que um mesmo patógeno pode ser resistente a vários antibióticos (PUSHPANATHAN, PARAMASAMY e JEYAPRAKASH, 2013).

Até a década de 1990 tais infecções causadas por antimicrobianos resistentes eram chamadas de “infecções hospitalares”, no entanto esta terminologia foi substituída por “infecções relacionadas à assistência em saúde” (IRAS) que é mais ampla do que apenas a ambientes hospitalares (PADOVEZE e FORTALEZA, 2014).

As IRAS apresentam impacto sobre a letalidade hospitalar, duração da internação e custos. O aumento das condições que induzem à internação de indivíduos cada vez mais graves e imunocomprometidos, somado ao surgimento da resistência a antimicrobianos, confere às IRAS especial relevância para a saúde pública. Além disso, os países em desenvolvimento sofrem com maior carga de IRAS, podendo ser até 20 vezes superior aos países desenvolvidos. Fatores associados à escassez e qualificação de recursos humanos, aliados à estrutura física inadequada em serviços de saúde e ao desconhecimento de medidas de controle de IRAS, contribuem para esse cenário (PADOVEZE e FORTALEZA, 2014).

Dentre as bactérias resistentes a múltiplas drogas temos a *Escherichia coli* que pertence a um grupo de enterobactérias comensais isoladas de animais. Apresentam vários mecanismos de resistência a antibióticos como bombas de efluxo e elementos móveis de resistência que permitem que este microrganismo se adapte a variações ambientais e seja fonte de transmissão de genes de resistência (AARTS e MARGOLLES, 2015). Machado e colaboradores (2013) demonstraram que 1,8% das amostras fecais de pessoas saudáveis no sul de Portugal, apresentaram *E. coli* com genes de resistência a sulfonamidas. Tais genes foram identificados principalmente em integrons, reforçando o papel das Enterobacteriaceae como transmissor potencial de genes de resistência (MACHADO *et al.*, 2013). Há relatos ainda do número crescente de bactérias multi-resistentes nos hospitais de grandes centros urbanos.

Cheng e colaboradores (2015) demonstraram recentemente que pacientes contaminados com *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina tiveram uma maior mortalidade após 90 dias de infecção do que pacientes com *S. aureus* não resistentes a meticilina, independente da gravidade inicial da infecção (CHENG *et al.*, 2015). Em pacientes de UTI (Unidade de Terapia Intensiva) com *Klebsiella pneumoniae* e *E. coli* resistentes a carbapenems a mortalidade foi maior 50% em relação aos pacientes com bacteremias não resistentes (CHENG *et al.*, 2015).

A partir do perfil traçado, de emergência de bactérias coevoluídas com antimicrobianos e por isso resistentes a vários mecanismos de ação dos mesmos. Torna-se de grande importância a pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos que possam ser utilizados para o desenvolvimento de fármacos. Desta maneira a busca por AMPs a partir de plantas medicinais comumente

utilizados na medicina popular é uma boa estratégia para minimizar o problema causado principalmente pelas IRAS.

3. OBJETIVO

Prospectar peptídeos antimicrobianos de folhas de *Lippia alba* e *L. rotundifolia*, identificar genes ou fragmentos de genes codificadores de peptídeos antimicrobianos e, caracterizar, sintetizar e testar tais peptídeos antimicrobianos visando o desenvolvimento de antimicrobianos efetivos contra patógenos.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Obter o transcriptoma de folhas de *Lippia alba* e *L. rotundifolia*
- ✓ Comparar as sequências de cDNA obtidas com aquelas existentes em bancos de dados e identificar *in silico* os domínios conservados dos AMPs;
- ✓ Modelar a estrutura tridimensional a partir das sequências primárias;
- ✓ Identificar transcritos candidatos a peptídeos antimicrobianos através da identificação de domínios e estruturas conservadas;
- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana dos peptídeos;
- ✓ Otimizar a sequência dos peptídeos visando ação bactericida e/ou bacteriostática.
- ✓ Remodelar os peptídeos com menor MIC e testar sua atividade antimicrobiana;

4. METODOLOGIA

4.1. AMOSTRAS DE PLANTAS

Foram coletadas folhas frescas de *Lippia alba* e *Lippia rotundifolia*, Verbenaceae, já previamente identificadas pelo taxonomista, na Estação Experimental localizada no Campus da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brasil (21°46'48.4"S 43°22'24.4" W). Ambas as espécies de *Lippia* foram coletadas pela manhã (antes da 10h) entre os meses de julho e agosto do ano de 2010. As amostras de comprovação das espécies de *Lippia* estão depositadas no herbário CESJ na Universidade Federal de Juiz de Fora com os números de tomo *L. alba*: 48374 e *L. rotundifolia*: 31376.

4.2. EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DO cDNA

Folhas de *Lippia alba* e *Lippia rotundifolia* foram coletadas e acondicionadas separadamente em nitrogênio líquido. As folhas foram selecionadas por serem jovens, não apresentarem sinais de herbivoria ou infestação por fungos. A extração do RNA total foi feita conforme orientação do *Rneasy Midi Kit* (Qiagen, Carlsbad, CA, USA) a partir de 400mg de folhas, de acordo com as informações do fabricante. A qualidade do mRNA extraído foi analisada por eletroforese em gel de Agarose 1%. Para avaliar a integridade e quantificar o RNA total foi utilizado o *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies, Inc).

O cDNA foi sintetizado usando o SMARTer PCR cDNA *Synthesis kit* e o *Advantage PCR kit* (Clontech, Palo Alto, CA, USA), o número e a duração dos ciclos do PCR foram otimizados de acordo com instruções do fabricante. A primeira fita de cDNA foi feita usando o SMARTer PCR cDNA *Synthesis kit* com um primer do tipo oligo-dT, de acordo com as instruções do fabricante. A reação foi feita a partir de 1

μg do RNA total e, ao final, eluída em $40\mu\text{L}$ de tampão TE (10 mM Tris [pH 8.0], 0,1mM EDTA). Para a síntese da segunda fita, foi feito o LD-PCR usando o *Advantage PCR kit* (Clontech, Palo Alto, CA, USA). Conforme instruções do manual, foi usado $1\mu\text{L}$ da reação de primeira fita. O programa de amplificação executado foi: desnaturação inicial por 1 min a 95°C , seguido por 18 ciclos para *L. alba* e 21 para *L. rotundifolia* na seguinte condição:

L. alba

Desnaturação: 15s a 95°C ;

Pareamento: 30s a 65°C ;

Extensão: 3min. a 68°C

} 18 ciclos

L. rotundifolia

Desnaturação: 15s a 95°C ;

Pareamento: 30s a 65°C ;

Extensão: 3min. a 68°C

} 21 ciclos

O cDNA dupla fita foi quantificado e qualificado no UV *Spectrometer Biommate 3* (Thermo, USA) e sua qualidade analisada em gel de agarose 1%. Para melhor compreensão das etapas de extração do RNA e síntese do dsDNA (*double strand DNA*) vide o esquema abaixo (Figura 4).

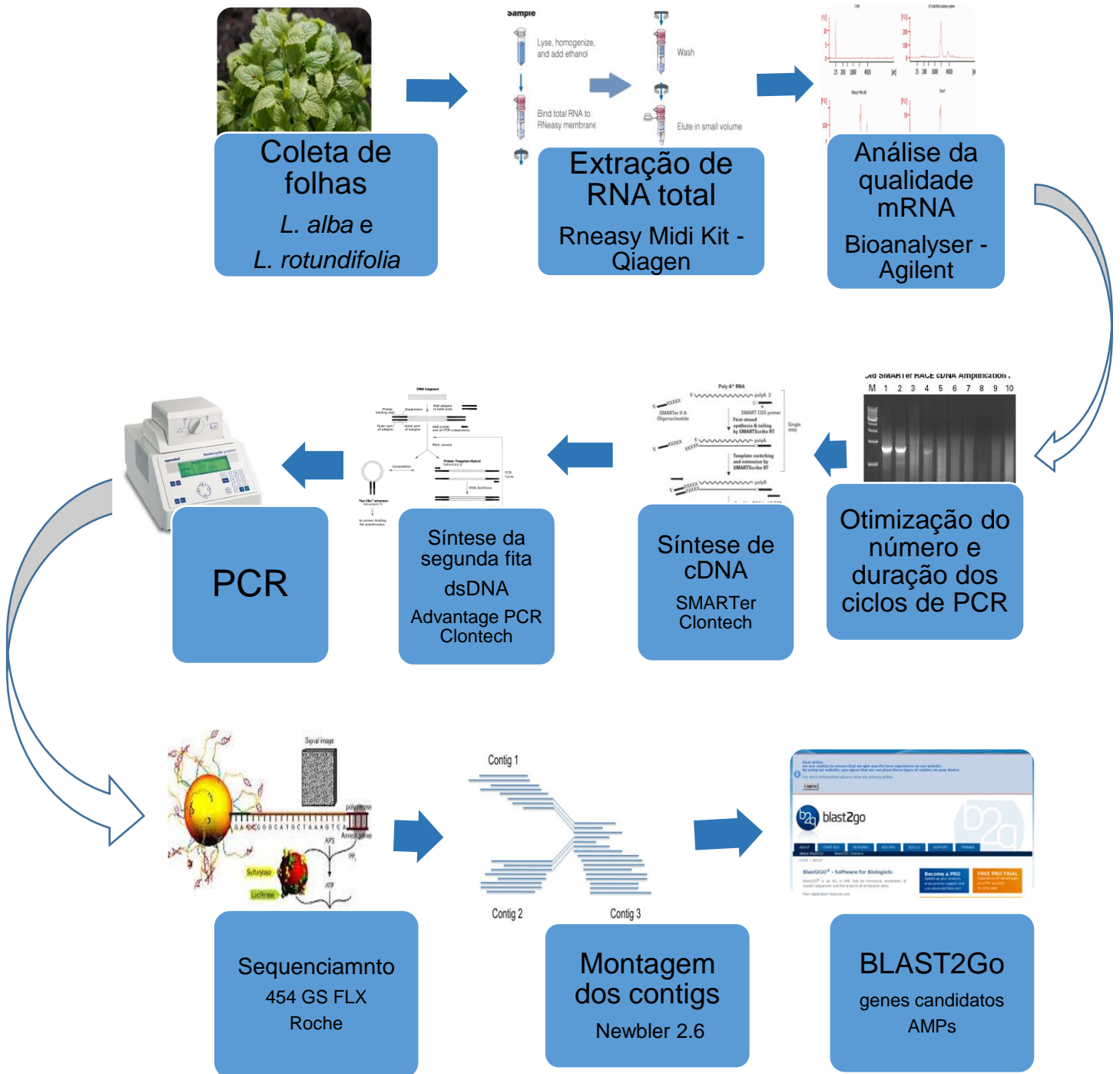


Figura 4. Esquema explicativo do processo de coleta de folhas de *Lippia* até a análise utilizando o BLAST2Go.

4.3. SEQUENCIAMENTO DO cDNA E BIOINFORMÁTICA

Uma amostra da biblioteca não normalizada de cDNA dupla fita (dsDNA) foi enviada para sequenciamento no *Interdisciplinary Center for Biotechnology Research* (ICBR/USA). O dsDNA foi analisado em gel e em seguida a biblioteca foi preparada a partir dele e sequenciada na plataforma 454 GS FLX (Roche 454 *Life Sciences*, Branford, CT, USA). O sequenciamento foi feito a partir de 1/8 de placa e foram utilizados os reagentes da série Titanium. Para a montagem das sequências obtidas foi utilizado o Newbler 2.6. As sequências obtidas foram comparadas ao banco de dados do NCBI usando o algoritmo BLAST2Go para determinar a similaridade das sequências a genes relacionados aos peptídeos antimicrobianos, bem como identificar outros genes expressos em folhas de *Lippia rotundifolia* e *L. alba* (Figura 4).

4.4. SCRIPT PARA BUSCA DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Foi elaborado um script para encontrar sequências de nucleotídeos correspondentes a orfs (*open reading frame*) com tamanho de 30 a 120 nucleotídeos, correspondentes a peptídeos entre 10 a 40 resíduos de aminoácidos. Sequências contendo códons para prolina e cisteína foram descartadas. Outros critérios utilizados para inclusão na análise foram: carga positiva, momento hidrofóbico entre -0,5 e 0,14, média hidrofóbica entre 0,03 e infinito e hidrofobicidade maior que 30% (CHERKASOV *et al.*, 2008).

4.5. MODELAGEM MOLECULAR

A modelagem das estruturas tridimensionais dos peptídeos encontrados foi feita a partir do alinhamento das sequências de aminoácidos deduzidas do cDNA sequenciado, visando identificar a posição dos átomos pesados dos diferentes modelos propostos. As sequências geradas foram analisadas utilizando o APD (Antimicrobial Peptide Database <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) e ao HydroMCalc description (<http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/HydroCalc/HydroMCalc.html>). As sequências geradas foram testadas contra possíveis moldes utilizando a ferramenta BLASTp (ALTSCHUL *et al.*, 1997), disponível no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). A modelagem por homologia foi realizada utilizando o software MODELLER 9v.8 (SAHOO *et al.*, 2012, KUMAR *et al.*, 2014). (Ver Tutorial de Modelagem em Anexo B). Em seguida, foi feita a validação dos moldes selecionados pelo MODELLER, estabelecendo o mapa eletrostático, o mapa de Ramachandran, o valor RMSD e o valor de Z-score (Tutorial de Validação em Anexo B).

4.6. SÍNTESE DE PEPTÍDEOS

A sequência dos peptídeos utilizados no presente estudo encontra-se na Tabela 1. Os peptídeos foram sintetizados pela *Shanghai Hanhong Chemical Co, LTD.*, República Popular da China, segundo o método de síntese em fase sólida através da estratégia F-moc (HIRATA *et al.*, 1994). Os peptídeos foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RT-HPLC). A massa molecular e a pureza dos peptídeos sintetizados foram confirmadas por espectrometria de massas MALDI-TOF. Em seguida, os peptídeos foram liofilizados, acondicionados em tubos cônicos e enviados para a Universidade Federal de Juiz de Fora – Instituto de Ciências Biológicas – Laboratório de Genética e Biotecnologia. Os peptídeos sintetizados com pureza superior a 97% foram empregados em ensaios biológicos. Os peptídeos foram diluídos em Tween 20 0,5% e DMSO 0,5% (v/v) (2,5 mg/mL solução estoque), e armazenados a -20 °C, até o uso.

Tabela 1: Peptídeos sintéticos de *Lippia alba* (Lalb) e *Lippia rotundifolia* (Lrot).

Peptídeo	Sequência	Tamanho (resíduos de aminoácidos)	Massa Molecular (Da)
Peptídeos Sintéticos Modelados			
Lalb1	MSLLERKLLMHFLRV	15	1886.42
Lalb2	MIGLLVSDHRSW	10	1413.67
Lalb3	MFVLKLVTFVDR	12	1467.85
Lalb4	MSGSLKLVVHSLQEIHLGKTLVGVLR	27	2928.60
Lalb5	MRFAIREGGKTVGAGVIQSIIE	22	2332.77
Lrot1	MFRQYLIFNTFIFLATLNYHFVGMSVSV	28	3360.03
Lrot2	MKGIAAGLQNTG	12	1160.37
Lrot3	MRIGLRFVLM	10	1335.63
Lrot4	MGLLSDHLYKAAEKKL	16	1817.2

4.7. REMODELAGEM DE PEPTÍDEOS PROMISSORES

Após os ensaios antimicrobianos preliminares, dois peptídeos (Lalb1 e Lrot3) foram remodelados de acordo com Joshi e colaboradores (2012) (Tabela 2). A partir do peptídeo Lalb1 foi remodelado o Lalb1.2 (resíduos de Glicina adicionados em ambas as extremidades) e o Lalb1.3 (troca dos resíduos de Glutamina por Lisina). A partir de Lrot3 foram gerados quatro peptídeos híbridos unindo em sua extremidade N-terminal quatro diferentes peptídeos antimicrobianos cuja atividade já fora descrita na literatura denominados Bombinin (CSORDAS e MICHL, 1970), PGLa (ANDREU *et al.*, 1985), Alloferon 1 (CHERNYSH *et al.*, 2002) e Cn-AMP1 (MANDAL *et al.*, 2009, SILVA *et al.*, 2012) (Tabela 2). Em seguida as sequências híbridas foram rearranjadas visando aumentar a anfipaticidade do peptídeo, para tal foi usado usando um *helical wheel diagrams*. Para tornar a estrutura de alfa-hélice estável

resíduos de glicina foram preferidos nas pontas N- e C-Terminais (SILVA *et al.*, 2012).

Tabela 2: Peptídeos sintéticos remodelados de *L. alba* e *L. rotundifolia*.

Peptídeo	Sequência	Tamanho	Massa Molecular (Da)
Peptídeos Sintéticos Remodelados			
Lalb1.2	GLMKLLRELLHMFSRVG	17	1886.42
Lalb1.3	GLMKLLRKLLHMFSRVG	17	1413.67
Lrot3.1	GIGALSAKGMRIGLRFVLM	19	1467.85
Lrot3.2	GMASKAMRIGLRFVLM	16	2928.60
Lrot3.3	HGVSGHGMRIGLRFVLM	17	2332.77
Lrot3.4	SVAGRAMRIGLRFVLM	16	3360.03
Lrot3.5	GIAGLLRSFVRMLAKIMGG	19	1160.37
Lrot3.6	GSVLRAIMRMFAKLMG	16	1335.63
Lrot3.7	GIHGVVRSFMRMLGHLG	17	1817.2
Lrot3.8	GSVIRALMRMFARLVG	16	1777.24

4.8. AMOSTRAS DE BACTÉRIAS

A atividade antibacteriana dos peptídeos gerados foi testada contra as Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 33591 (resistente a meticilina) e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (produtora de β -lactamase). Já as Gram-negativas testadas foram *Escherichia coli* ATCC 35218, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13866, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Salmonella enterica* sorovar Tiphy isolado clínico. As cepas foram doadas pelo

Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana da UFJF e pela Universidade Católica de Brasília (UCB). O meio de cultivo utilizado foi o TSB (Tryptone Soy Broth - Triptona 5g/L, Extrato de Levedura 2,5g/L, Dextrose 1g/L e Cloreto de Sódio 10g/L). As condições de cultivo foram de 35° C (± 2 °C), durante 16 a 20h, após este período as amostras foram armazenadas em geladeira até o uso quando uma a duas colônias isoladas foram selecionadas para inóculo.

4.9. ENSAIOS ANTIMICROBIANOS

Os bioensaios foram realizados em microplacas de 96 poços de polipropileno de acordo com a CLSI (2015). A partir de uma colônia cultivada *over-night* foi feito o inóculo inicial foi de aproximadamente 1×10^8 unidades formadoras de colônia (UFC mL^{-1}) padronizadas por espectrometria segundo a CLSI (2015) que corresponde a uma absorbância de 0,08 a 0,10 em comprimento de onda de 625nm. Em cada poço da placa de polipropileno foi usado 100 μL de meio Ágar Mueller Hinton (SIGMA-ALDRICH- USA) inoculado com o microrganismo e 100 μL do peptídeo sintéticos, em diferentes concentrações, solubilizados em tween 20 e DMSO (0,5% v/v) e diluídos em água. Para determinar a concentração inibitória mínima (MIC) os peptídeos foram testados com as concentrações finais de 128, 64, 32, 16 e 8 $\mu\text{g/mL}$ por 24 horas a 37° C (Tabela 3). Foi usado como controle negativo o inóculo tratado com o Tampão de Solubilização (Tween 20, DMSO 0,5% v/v). Já o controle positivo testado foi uma solução de cloranfenicol nas concentrações finais de 1.280; 128; 64 e 32 $\mu\text{g/mL}$ diluídos em água. Cada experimento foi realizado em triplicata. O crescimento das células foi monitorado por 24 horas através da medida da absorbância turbimétrica a 600nm utilizando um leitor de placas VarioSkan (Thermo Fisher Sci, Vantaa, Finland). Após a montagem das placas foi feita uma diluição seriada de 10^8 até 10^0 utilizando uma alça de 1 μL como forma de fazer o controle do número de UFCs. Após feita a diluição 1 μL da concentração 10^0 é retirado e plaqueado em Ágar Mueller Hinton. Esta placa é mantida a 37°C por 24 horas quando então é feita a contagem das colônias formadas.

Tabela 3: Conversão das concentrações dos 19 peptídeos testados.

Peptídeo	Massa Molecular	128µg/mL	64µg/mL	32µg/mL	16µg/mL	8µg/mL
Lalb1	1886,42	67,8 µM	33,9 µM	16,9 µM	8,5 µM	4,2 µM
Lalb2	1413,67	90,54 µM	45,27 µM	22,6 µM	11,3 µM	5,65 µM
Lalb3	1467,85	87,2 µM	43,6 µM	21,8 µM	10,9 µM	5,45 µM
Lalb4	2928,60	43,7 µM	21,85 µM	10,9 µM	5,46 µM	2,73 µM
Lalb5	2332,77	54,9 µM	27,45 µM	13,72 µM	6,86 µM	3,43 µM
Lrot1	3360,03	38,1 µM	19,05 µM	9,52 µM	4,76 µM	2,38 µM
Lrot2	1160,37	110,3 µM	55,15 µM	27,57 µM	13,8 µM	6,89 µM
Lrot3	1335,63	95,8 µM	47,9 µM	23,95 µM	11,97 µM	5,98 µM
Lrot4	1817,2	70,4 µM	35,2 µM	17,6 µM	8,8 µM	4,4 µM
Lalb1.2	1886,42	67,8 µM	33,9 µM	16,95 µM	8,47 µM	4,23 µM
Lalb1.3	1413,67	90,5 µM	45,25 µM	22,62 µM	11,31 µM	5,65 µM
Lrot3.1	1467,85	87,2 µM	43,6 µM	21,8 µM	10,9 µM	5,45 µM
Lrot3.2	2928,60	43,7 µM	21,85 µM	10,9 µM	5,46 µM	2,73 µM
Lrot3.3	2332,77	54,8 µM	27,4 µM	13,7 µM	6,85 µM	3,42 µM
Lrot3.4	3360,03	38,1 µM	19,05 µM	9,52 µM	4,76 µM	2,38 µM
Lrot3.5	1160,37	110,3 µM	55,15 µM	27,57 µM	13,78 µM	6,89 µM
Lrot3.6	1335,63	95,8 µM	47,9 µM	23,95 µM	11,97 µM	5,98 µM
Lrot3.7	1817,2	70,4 µM	35,2 µM	17,6 µM	8,8 µM	4,4 µM
Lrot3.8	1777,24	72,02 µM	36,01 µM	18 µM	9 µM	4,5 µM

4.10. ENSAIO PARA VERIFICAR A AÇÃO BACTERICIDA OU BACTERIOSTÁTICA DOS PEPTÍDEOS

Após 24 horas uma alíquota de 10µL de cada um dos ensaios antimicrobianos foi inoculada em 100µL de meio TSB líquido em uma placa de 96 poços e incubada por 16h a 37° C, em seguida a leitura foi feita por espectrometria a 625nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. OBTENÇÃO DO TRANSCRIPTOMA FOLIAR DE *L. alba* E *L. rotundifolia*

Após a extração do RNA total de *L. alba* e *L. rotundifolia* a qualidade da extração foi analisada por eletroforese (Figura 5) em gel de agarose não desnaturante a 1% de concentração. Esta análise permite observar a integridade do RNA através da razão entre as bandas do RNA ribossômico 18S e 28S. A Figura 5 mostra as amostras formando um rastro (*smear*) entre 2 -3Kb e a banda de rRNA 28S próxima da altura de 1,5Kb tem aproximadamente o dobro da intensidade da banda do rRNA 18S na altura de 0,8Kb. Esta razão 2:1 (28S:18S) é um bom indicador de que o RNA esteja intacto.

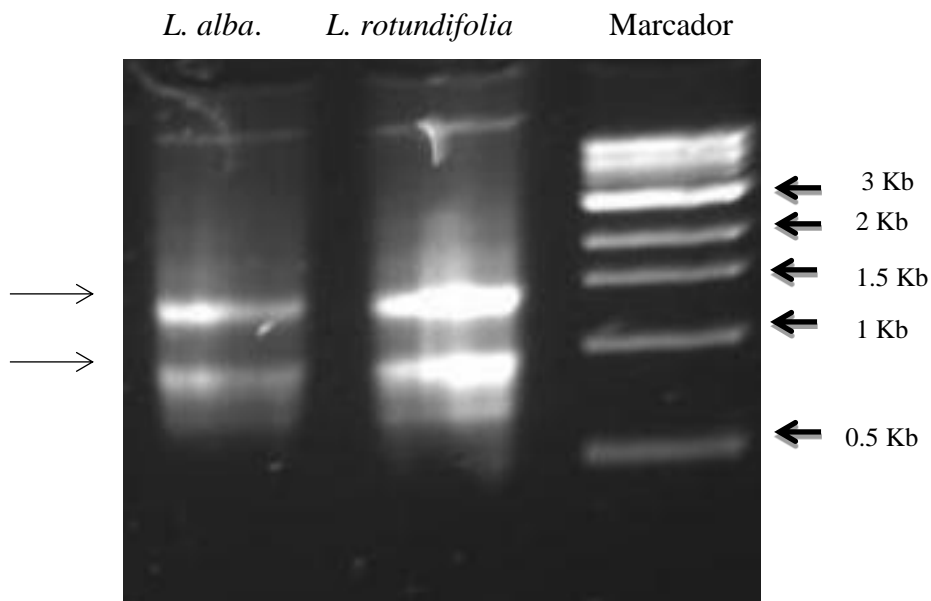


Figura 5: Gel de Agarose não desnaturante. Concentração 1%. RNA corado com SYBR Green. Gel mostrando a integridade do RNA total extraído de folha de *Lippia alba* e *Lippia rotundifolia*. Marcador 1kb Ladder.

No gel da figura 5, podemos observar que não há a formação de um rastro abaixo das bandas de rRNA (identificadas por setas) indicando que o RNA não se encontra degradado. No entanto, em ambas as amostras há uma pequena banda na parte superior do gel, que pode ser contaminação com DNA genômico, mesmo após o tratamento com DNase, de acordo com as instruções do fabricante. Devido a dúvida quanto a contaminação com DNA e ao leve rastro identificado no gel foi realizada a análise da qualidade do RNA utilizando o Agilent 2100 Bionalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Este equipamento exige pequenas quantidades de RNA total (até 200 pg de RNA total) e utiliza um corante fluorescente que permite avaliar tanto a integridade quanto a concentração de RNA na amostra. O princípio é o mesmo de uma eletroforese em gel de agarose, mas a corrida é capilar e é gerado um eletroferograma, que é analisado automaticamente pelo aparelho, que detecta qualquer traço de degradação. O resultado é exibido na forma de um gráfico (Figura 6), através do qual é possível calcular a razão 28S/18S com maior precisão a partir dos respectivos picos. Esta razão calculada entre os picos fornece o RIN (*RNA Integrity Number*) que varia de 1 a 10, permitindo inferir com maior precisão a qualidade do RNA inicial.

O gráfico gerado (Figura 6) mostra claramente os picos referentes ao 18S e 28S, o que garante a integridade do RNA total, conforme descrito anteriormente. O valor de referência RIN (*RNA integrity number*) determina a integridade do RNA não apenas pela razão entre o RNA ribossomal, mas também através da presença ou ausência de produtos de degradação na amostra. O valor de RIN gerado para *Lippia alba* (CL16) foi de 7.4 e para *Lippia rotundifolia* (LR2) foi de 8.2.

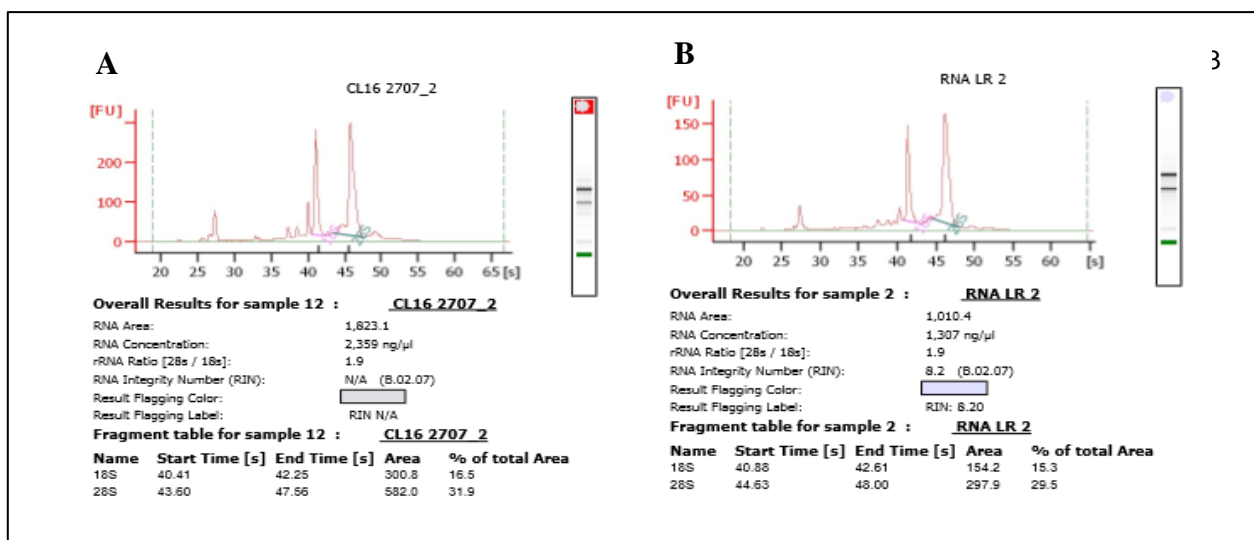


Figura 6. Resultado da análise da integridade e quantidade do RNA utilizando o Bioanalyser (Agilent Technologies). A. Amostra de *L. alba* quimiotipo CL16. B. Amostra de *Lrotundifolia* extração número 2.

A síntese do cDNA foi feita de acordo com as instruções do fabricante. A primeira fita foi sintetizada a partir da quantidade máxima sugerida (1μg) de RNA total usando um oligo-dT, com o objetivo de reduzir a presença de sequências ribossomais nas bibliotecas a serem sequenciadas (WALL *et al.*, 2009). Primer oligo-dT pareiam com as extremidades 3' poli-A dos mRNAs aumentando o número de amplificação dos transcritos codificadores de proteínas. No entanto, o mesmo pode afetar o comprimento das leituras (WALL *et al.*, 2009). A biblioteca de cDNA gerada não foi normalizada, isto é, o número de transcritos redundantes não foi diminuído. Esta estratégia mostrou-se vantajosa já que foi realizado o sequenciamento de apenas 1/8 de placa o que gera um maior número de sequências gênicas completas quando comparadas às normalizadas. À medida que o sequenciamento aumenta, isto se inverte e as bibliotecas normalizadas tendem a capturar mais sequências completas de cDNA (WALL *et al.*, 2009).

Para a síntese da segunda fita de cDNA foi feita a otimização do número de ciclos. Foram testados 15, 18, 21, 24, 27 e 30 ciclos para o LD-PCR. *L. alba* atingiu o *plateau* de amplificação com 18 ciclos, enquanto *L. rotundifolia* o número ótimo determinado foi 21 ciclos. Após a síntese do cDNA, a maioria dos produtos obtidos variou de 500pb a 5Kb.

A biblioteca não-normalizada enriquecida de dsDNAs (*double-stranded* cDNA), devido à amplificação com primer Oligo-dT, foi sequenciada em corrida feita em 1/8 de placa no 454 GS FLX. Este sequenciamento resultou em aproximadamente 19 Mpbs para *L. alba* gerando um total de 104 631 leituras e 19 302 161pb (Tabela 4). Já o sequenciamento de *L. rotundifolia* produziu cerca de 15

Mpbs, sendo 86 733 leituras e 15 498 162pb. O tamanho médio das leituras (Tabela 4) foi de 184 48pb e 178 69pb para *L. alba* e *L. rotundifolia* respectivamente. Este tamanho médio das leituras próximo a 200pb (Figura 7) foi também encontrado em experimentos com transcriptoma realizados com o sequenciador GS FLX (JARVIE E HARKINS, 2008). Este valor reflete o fato dos *reads* serem aparados por causa da baixa qualidade dos homopolímeros dT. Quando comparado ao de algumas outras plataformas NGS, o maior comprimento médio das leituras geradas pela 454 GS FLX facilita a montagem *de novo* e anotação funcional das sequências em trabalhos com organismo não-modelo (WALL *et al.*, 2009; KUMAR e BLAXTER, 2010). Swarbreck e colaboradores (2011) obtiveram comprimento de leitura de 186pb no transcriptoma de folhas de *Avena barbata*. Resultados semelhantes, quanto ao comprimento das leituras, foram descritos por Natarajan e Parani (2011). Quando comparadas a outras plataformas de sequenciamento de última geração, estas leituras de aproximadamente 200pb facilitam a montagem *de novo*, uma vez que *L. alba* e *L. rotundifolia* não são organismos modelo e por isso não possuem um genoma de referência (KUMAR e BLAXTER, 2010; WALL *et al.*, 2009).

Uma das maiores vantagens da montagem *de novo*, Segundo Xiao e colaboradores (2013) para transcriptomas é a independência entre o correto alinhamento dos *reads* e a predição dos locais de *splicing* (processamento do RNA), que são necessários em uma montagem baseada em um genoma de referência. No entanto, a montagem *de novo*, apresenta como desafio o tamanho do Transcriptoma, que requer o uso de uma grande quantidade de conjunto de dados (*datasets*) para que seja feita a identificação das variantes de *splicing* alternativo.

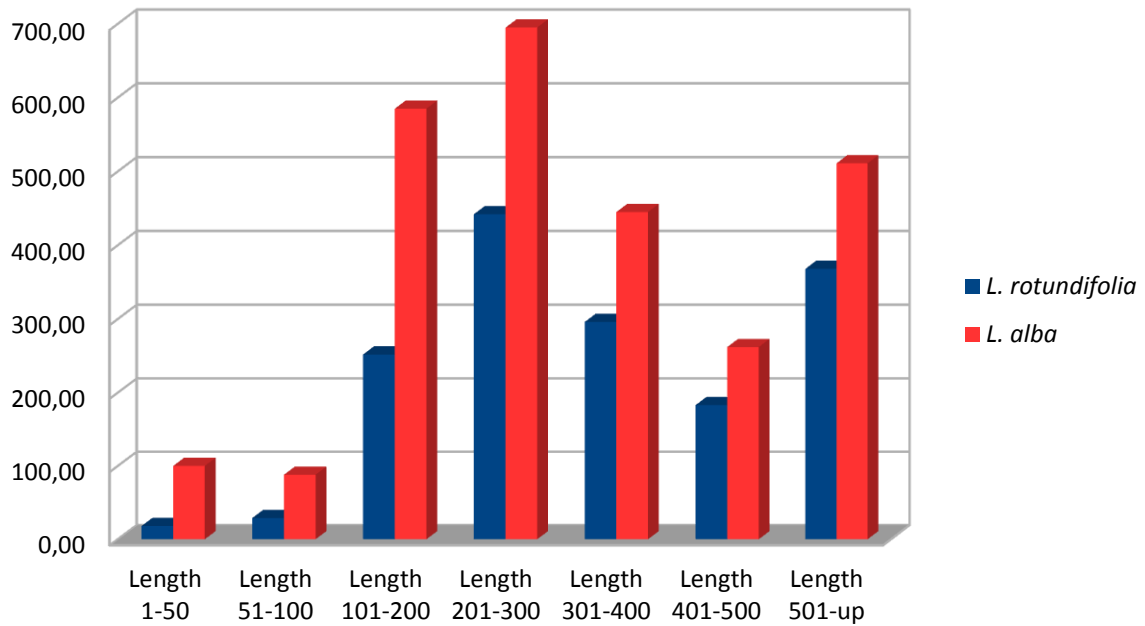


Figura 7. Comparação entre o tamanho das leituras em *L. alba* (vermelho) e *L. rotundifolia* (azul) geradas pelo transcriptoma das duas espécies.

Após gerar as leituras (*reads*) no 454 GS FLX, as sequências foram montados *de novo* com o programa Newbler 2.6 (Roche 454) gerando um total de 1 483 *contigs* na montagem de *L. rotundifolia* e 2 655 *contigs* para *L. alba*. Utilizamos um padrão de sobreposição de 60pb entre os *reads* ao invés dos 30pb (padrão do programa) visando diminuir o número de *contigs* quiméricos (Tabela 4).

O algoritmo utilizado pelo Newbler 2.6, o Overlapping-Layout-Consensus (KUMAR e BLAXTER, 2010), envolve uma comparação inicial, em pares, de todas as leituras para a detecção de sequências únicas de bases, chamadas *mers*, que são usadas para determinar sobreposições entre elas. *Mers* comuns a duas ou mais leituras são alinhados para determinar um *layout* aproximado da sequência, sendo que apenas alguns *mers* são selecionados para isso. Por esta razão é importante escolher *mers* que não ocorram em regiões repetitivas, uma vez que o resultado poderia ser o alinhamento incorreto de leituras. O *layout* final é o resultado do alinhamento múltiplo de sequências. Três parâmetros afetam a descoberta de sobreposições e, conseqüentemente, a robustez da montagem: o tamanho do *mer*, o comprimento mínimo de sobreposição e à porcentagem mínima de sobreposição (GUEDES, 2011).

Tabela 4. Estatística da montagem das leituras do Transcriptoma de folhas de *Lippia* sp.

Espécies		<i>L. alba</i>		<i>L. rotundifolia</i>	
Informação		Número de sequências	Bases (pb)	Número de sequências	Bases (pb)
Sequenciamento	Número de leituras	104 631	19 302 161	86 733	15 498 162
	Medida do comprimento das leituras	-	18 448	-	17 869
	Leituras usadas na montagem	103 245	16 809 351	85 111	13 563 237
Contigs	Leituras montadas em <i>Contigs</i>	48 623	8 058 681	33 946	5 666 344
	Número de <i>Contigs</i>	2 686	937 010	1 483	593 568
	Medida do comprimento dos <i>Contigs</i>	-	34 885	-	40 094
	N50	-	433	-	475
	Menor	-	1	-	1
	Maior	-	2 815	-	2 822
Singletons	Número de singletons	45 265	-	46 277	-

Os *contigs* montados com o Newbler 2.6 foram separados de acordo com o *frame* de leitura, isto é, a sequência correspondente a um códon de início (UAG) e que, por isso poderia ser utilizada como uma ORF (*open reading frame*) para a transcrição do DNA em mRNA e posteriormente em peptídeo/proteína. Entende-se por *frame* a matriz de leitura da sequência de nucleotídeos gerados em cada *contig*

a partir do primeiro, segundo ou terceiro nucleotídeo da sequência. Foi observada ainda a presença de códons de parada próximos aos códons de início, deixando neste caso, de ser considerado como uma ORF por não ser uma região realmente codificadora. Em *L. rotundifolia* foram identificados 625 ORFs na *frame 1*, 685 ORFs na *frame 2* e 661 ORFs na *frame 3* (Figura 8) a partir dos 1483 *contigs* gerados pelo Newbler 2.6. Já em *L. alba* dos 2655 *contigs* obtivemos 910 ORFs na *frame 1*, 964 ORFs na *frame 2* e 864 ORFs na *frame 3* (Figura 9).

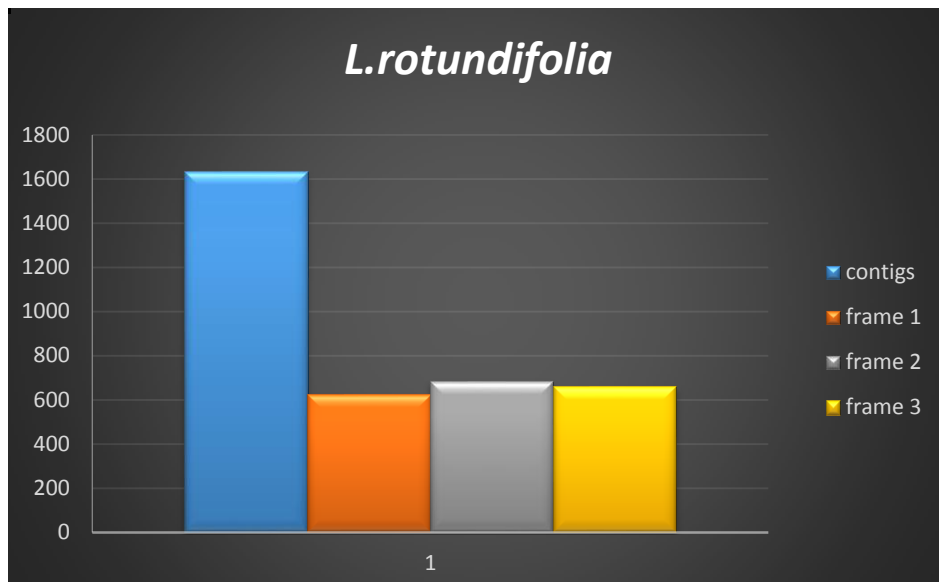


Figura 8: Número de *contigs* montados para *Lippia rotundifolia* com o Newbler 2.6 e número de ORFs encontradas em cada um dos 3 *frames* de leitura. Em azul o número total de *contigs*, Vermelho o número de ORFs no *frame 1*. Verde o número de ORFs do *frame 2* e em Roxo o número de ORFs gerados no *frame 3*.

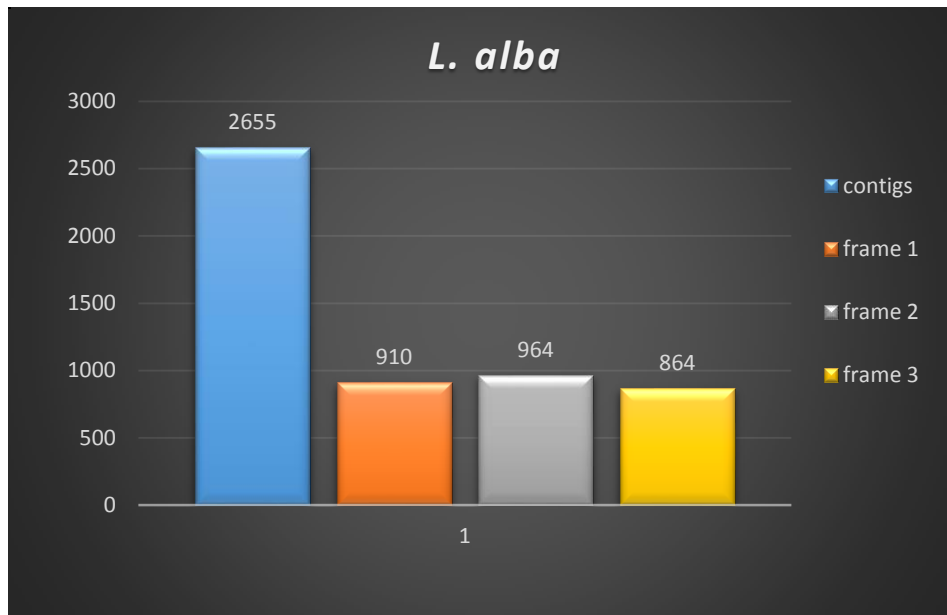


Figura 9: Número de *contigs* montados para *Lippia alba* com o Newbler 2.6 e número de ORFs encontradas em cada um dos 3 *frames* de leitura. Em azul o número total de *contigs*, Vermelho o número de ORFs no *frame* 1. Verde o número de ORFs do *frame* 2 e em Roxo o número de ORFs gerados no *frame* 3.

A anotação funcional dos *contigs* gerados pela montagem do Newbler foi paralelamente submetida ao Blast2Go. Os termos GO compõem vocabulários estruturados e descrevem produtos gênicos de acordo com sua participação em determinado processo biológico, como componente celular ou ainda por sua função molecular, independente da espécie. Esses termos já são usados por vários bancos de dados colaboradores do consórcio, e seu principal objetivo é gerar uniformidade facilitando as buscas nos mesmos (GUEDES, 2011).

Utilizando-se o Blast2Go, os *contigs* gerados foram comparados com as sequências de nucleotídeos já existentes no NCBI, através de comparação com o banco de dados nr (*non-redundant*) do NCBI usando o algoritmo Blastx e *evaluate* de corte $1.0E^{-3}$. Com isso foram identificados *contigs* similares a inúmeras enzimas relacionadas ao metabolismo secundário, resposta ao estresse, dentre outras. Algumas das anotações feitas foram similares a peptídeos antimicrobianos tais como *Glicine rich-repeat* (*L. rotundifolia* contig 1197 – 254pb), *Leucine rich-repeat protein* (*L. alba* contig 135 – 319nt) além de sequências de enzimas componentes do metabolismo secundário como a Geranil sintase (*L. alba* contig 219 – 1684nt), Geranil difosfato sintase (*L. rotundifolia* contig 342 – 803nt) (Anexo C).

5.2. SELEÇÃO DE ORFS PARA MODELAGEM DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Após aplicar os parâmetros estabelecidos no script, sobre cada uma das ORFs dos 3 frames de todos os *contigs* montados, o número total de sequências a serem modeladas foi reduzido, permitindo a análise das mesmas de acordo com os passos do MODELLER e sua posterior validação. A modelagem molecular envolve etapas sucessivas de identificação de proteínas como molde (*templates*) para as ORFs selecionadas anteriormente, a modelagem propriamente dita (construção de coordenadas) e a validação dos modelos gerados.

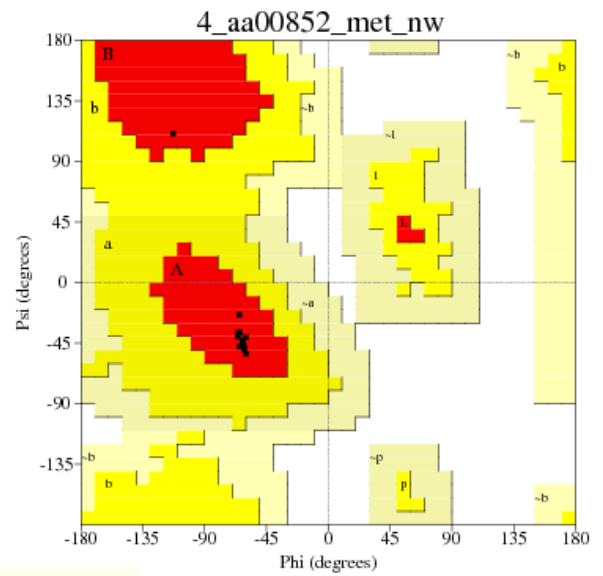
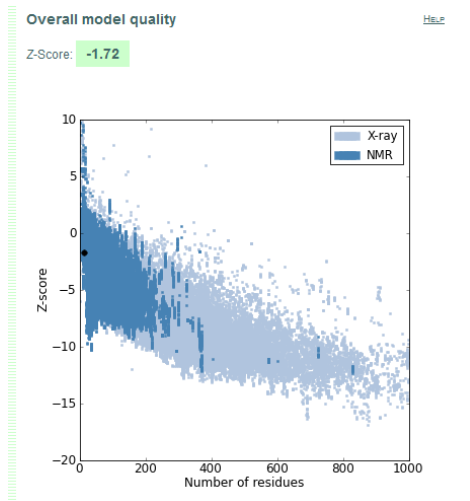
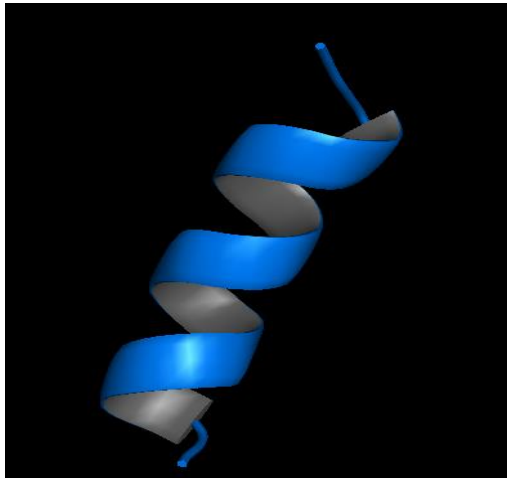
A identificação dos melhores moldes foi feita através da utilização da ferramenta BLASTp (ALTSCHUL *et al.*, 1997), disponível no National Center for Biotechnology Information (NCBI), com o objetivo de encontrar regiões locais de similaridades entre as sequências informadas e as estruturas tridimensionais (pdb) depositadas no Protein Data Bank (PDB - <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>). A análise dos resultados gerados baseia-se nos melhores valores de Max score e Query coverage, calculados através da matrix de substituição de aminoácidos BLOSUM62 (HENIKOFF e HENIKOFF, 1992; STYCZYNSKI *et al.*, 2008); além disso, a inexistência de gaps entre as sequências foi considerada um fator determinante para a escolha do molde.

A modelagem comparativa foi realizada utilizando o software MODELLER 9v.8 (SALI e BLUNDELL, 1993), no qual a construção dos modelos tridimensionais ocorre a partir do resultado obtido pelo alinhamento da sequência do possível AMPs e a sequência dos moldes. Foram calculadas as restrições espaciais da estrutura molde, gerando 100 estruturas para cada modelagem, as quais foram classificadas segundo DOPE (*Discrete Optimized Protein Energy*) e GA341 score; que são métodos estatísticos utilizados para classificar as estruturas de acordo com seus níveis de energia. Modelos com os menores valores para DOPE (SHEN e SALI, 2006) e/ou maiores valores para GA341 (MELO, SÁNCHEZ e SALI, 2002) possuem maior minimização energética, portanto são mais estáveis e aptos a serem utilizados nas etapas seguintes. A visualização dos modelos gerados foi feita através do software PyMol. Em seguida, os modelos gerados foram comparados aos dos

servidores Itasser e Quark e então avaliados como aptos ou não aptos a serem sintetizados (Figura 10 a 17).

Ao comparamos a sequência de cada um dos peptídeos com o seu molde, podemos observar que cada peptídeo escolhido possivelmente terá uma ação semelhante ao seu molde. Desta maneira, Lalb1 tem 40% de similaridade com o AMP Decoralin, segundo o APD2 (antimicrobial peptides database) que por sua vez apresenta ação já publicada contra Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (KONNO *et al.*, 2007) (Figura 10). Já o modelo de Lrot3, publicado com o nome de Temporin-A1j (WANG *et al.*, 2010), por sua vez apresentou ação contra bactérias Gram-positivas e negativas (Figura 17).

No *frame* 1 do sequenciamento, das 625 ORFs foram gerados 4 possíveis AMPs, já no *frame* 2 encontramos 10 possíveis AMPs e no *frame* 3 foram encontrados 7 possíveis AMPs (Figura 18). Foram encontrados poucos AMPs usando esses critérios em 1/8 de placa sequenciadas de *L. rotundifolia*, desse modo aplicamos os mesmos critérios do script, modelagem e validação para os *contigs* de *L. alba* (Figura 19)



STAMP Results

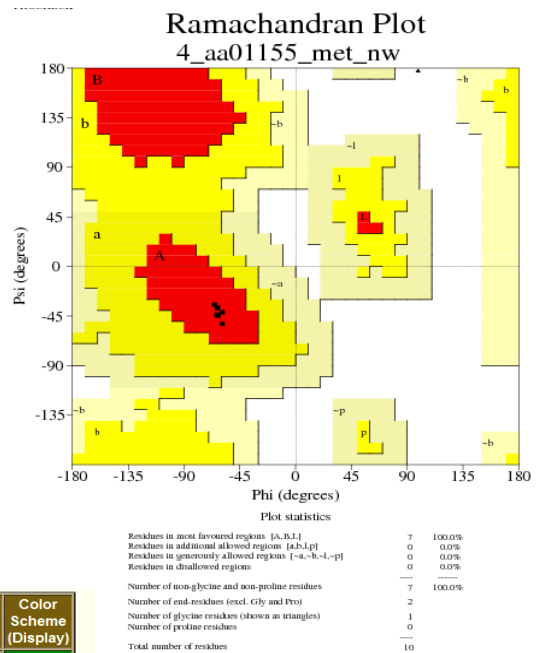
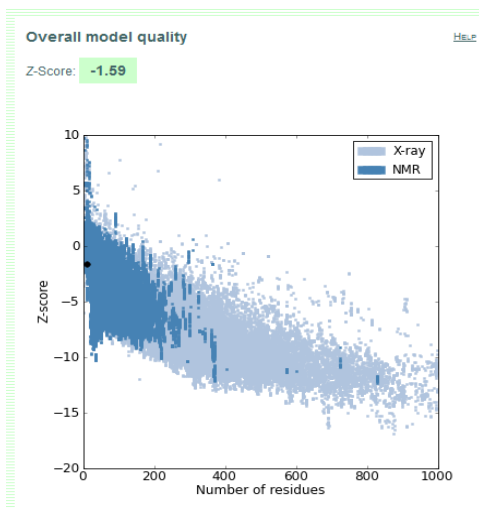
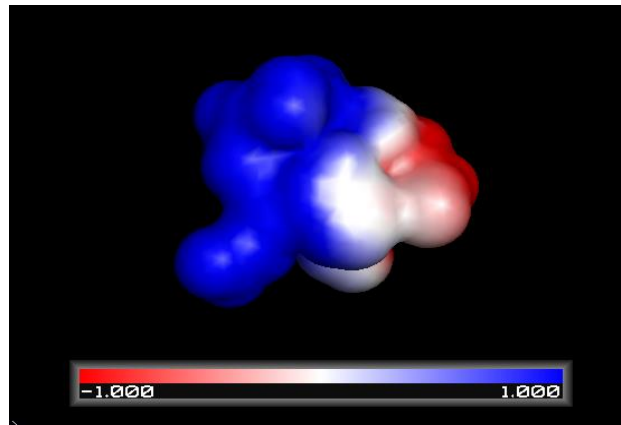
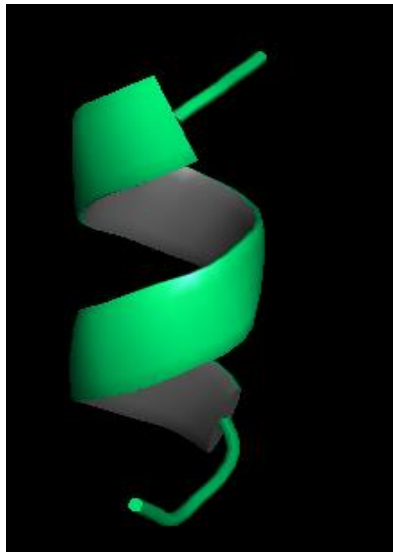
PDB ID	Chain ID	Superimposes	Sequence identity (%)	Stamp score (Max 10)	RMDS (Å)	Color Scheme (Display)
2GYP	A	[Fixed Molecule]	100.00	10.000	-	Green
4_AA00852.B99990040_ESCOLHIDO.PDB	-	✓	33.33	9.644	0.649	Orange

Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	13	100.0%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	0	0.0%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	0	0.0%
Residues in disallowed regions	0	0.0%
Number of non-glycine and non-proline residues	13	100.0%
Number of end-residues (excl. C-ly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	0	
Number of proline residues	0	
Total number of residues	15	

Contig/ peptideo	Similaridade APD2	ID APD2	Nome/Classe	Fonte	Ação	Referência
4_contig_aa00852 MSLLERKLLMHFLRV	40%	AP00723	Decoralin	Insetos	Gram + , Gram - e fungos	Peptides, 2007, 28:2320- 2327
	38,88%	AP01923	Halictine 2	insetos	Gram + , Gram - fungos, células de mamíferos e células cancerosas	Amino Acids. 2010 Aug;39(3):763-75.

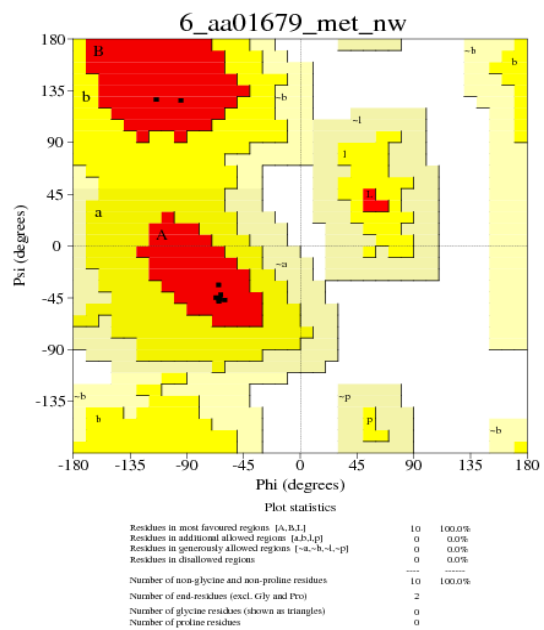
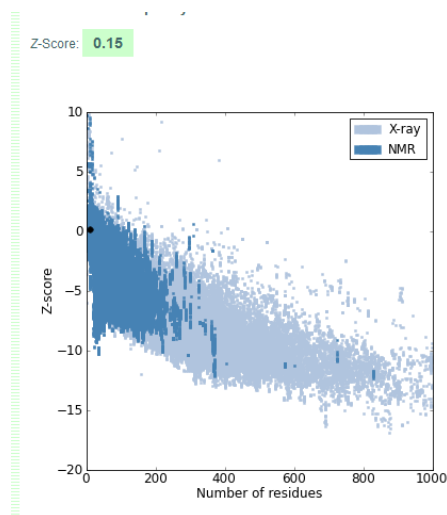
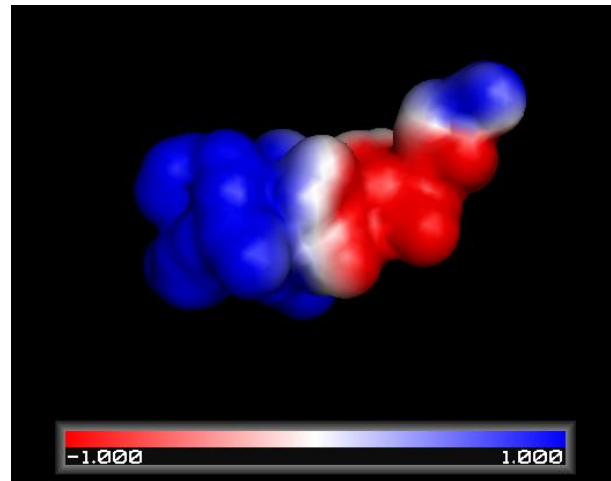
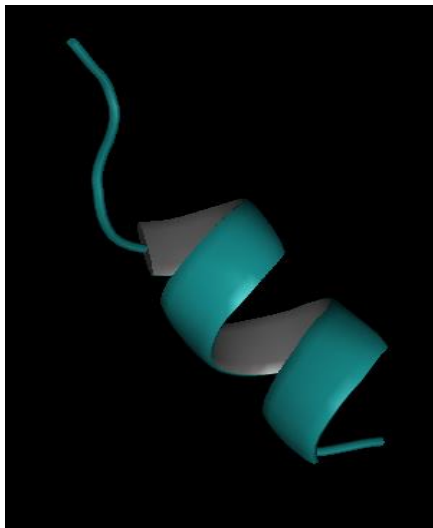
Figura 10: Peptídeo Lalb 1 Tabela indicando peptídeos com estrutura semelhante e função antimicrobiana conhecida em banco de dados. Contig 4_aa00852 gerado a partir de modelo 2GYPA e análises de validação com Ramachandran 100% indicando aminoácidos em regiões favoráveis. Valor RMSD menor que 2, e Z-Score fixo na região azul escuro do gráfico.



PDB ID	Chain ID	Superimposes	Sequence identity (%)	Stamp score (Max 10)	RMSD (Å)	Color Scheme (Display)
1Q2F	A	[Fixed Molecule]	100.00	10.000	-	Green
4_AA01155_B99990053-ESCOLHIDO.PDB	-	✓	30.00	9.075	1.480	Orange

Contig/Peptídeo	Similaridade APD2	ID-APD2	Fonte	Nome/Classe	Ação	Referência
4_contig_aa01155_MGREWWMRV1	40%	AP00726	Synthetic Combinatorial Libraries	Combi-1	Gram+ & Gram- Fungi	J. Appl. Bacteriol. 1995; 78: 39-46
	40%	AP00551	Synthesis	Combi-2	Gram+ & Gram-	J. Pept Res 2005; 65: 491-501
	33,33%	AP00512	Cow	Lactoferrin (Lf) peptide 2	Virus, Fungi, HIV	J. Pept Res 2001; Mar; 57(3):240-9

Figura 11: Peptídeo Lab2. Tabela indicando peptídeos com estrutura semelhante e função antimicrobiana conhecida em banco de dados. Contig_aa01172 gerado a partir do modelo 1Q2F e análises de validação com Ramachandran 100% indicando aminoácidos em regiões favoráveis. Valor RMSD menor que 2, e Z-Score fixo na região azul escuro do gráfico.

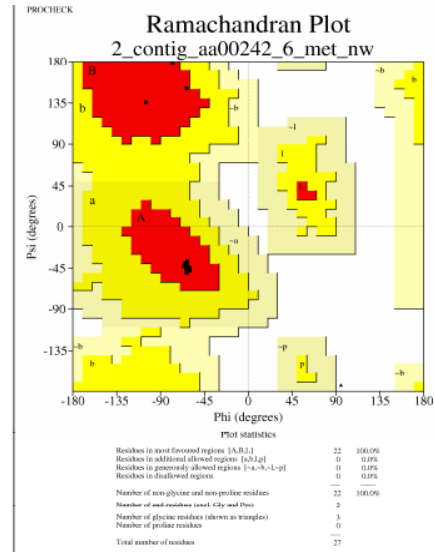
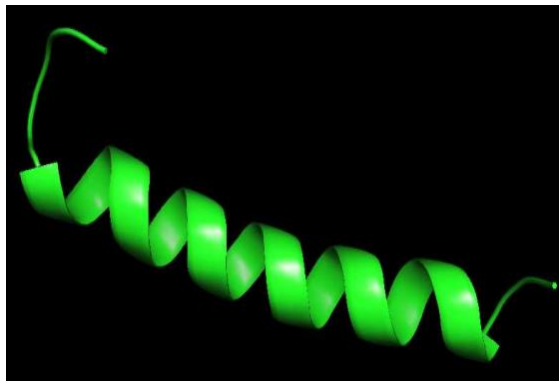


STAMP Results

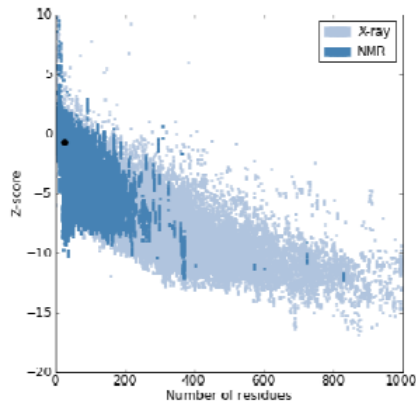
PDB ID	Chain ID	Superimposes	Sequence Identity (%)	Stamp score (Max 10)	RMSD (Å)	Color Scheme (Display)
3DL8	C	[Fixed Molecule]	100.00	10.000	-	Green
6_AA01679.B99990079_ESCOLHIDO.PDB	-	✓	18.18	7.834	1.436	Orange

Contig/Peptide	Similaridade-APD2	ID-APD2	Fonte	Nome/Classe	Ação	Referência
6_contig_aa01679-MFVLKLVTFVDR	40,0%	AP01579	Xizang-plateau frog	Japonicin-1Npb	Gram+	Biochimie. 2010; May; 92(5):475-81
	38,88%	AP00262	Sapos Litoria genimaculate Litoria eucnemis	Maculatin-2.1	Gram+ & Gram-, Cancer cells	J. Pept. Sci. 1998; 4: 111-115
	38,46%	AP00398	Rainbow trout Oncorhynchus mykiss	Salmocidin-2B	Gram-	Henry MA, Secombes CJ. 1999

Figura 12: Peptídeo Lalb3 Tabela indicando peptídeos com estrutura semelhante e função antimicrobiana conhecida em banco de dados a partir do contig_aa01679. Molde 3DL8 e análises de validação com Ramachandran 100% indicando aminoácidos em regiões favoráveis. Valor RMSD menor que 2, e Z-Score fixo na região azul escuro do gráfico.



Z-Score: -0.74



PDB ID	Chain ID	Superimposes	Sequence identity (%)	Stamp score (Max 10)	RMSD (Å)	Color Scheme (Display)
3JQH	A	[Fixed Molecule]	100.00	10.000	-	Green
2_CONTIG_AA00242_6_B99990063-3JQH.PDB	-	✓	4.76	7.900	2.447	Orange

Contig/ peptideo	Similaridade APD2	ID APD2	Nome/Classe	Fonte	Ação	Referência
2_contig_aa00242_6 MSGSLKLVVHSLQ EIHGKTLVGVLR	46,42%	AP01648	Pelteobagrín	catfish	Gram+ & Gram-, Fungi,	Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2011 Feb;158(2):149-54
	39,28%	AP00142	GLK-19	sintético	Gram-, Virus, HIV,	Nucleic Acids Res. 2009 Jan;37(Database issue):D933-7

Figura 13: Peptídeo Lalb4 Tabela indicando peptídeos com estrutura semelhante e função antimicrobiana conhecida em banco de dados a partir do contig_aa00242_6. Molde 3JQH e análises de validação com Ramachandran 100% indicando aminoácidos em regiões favoráveis. Valor RMSD menor que 2, e Z-Score fixo na região azul escuro do gráfico.

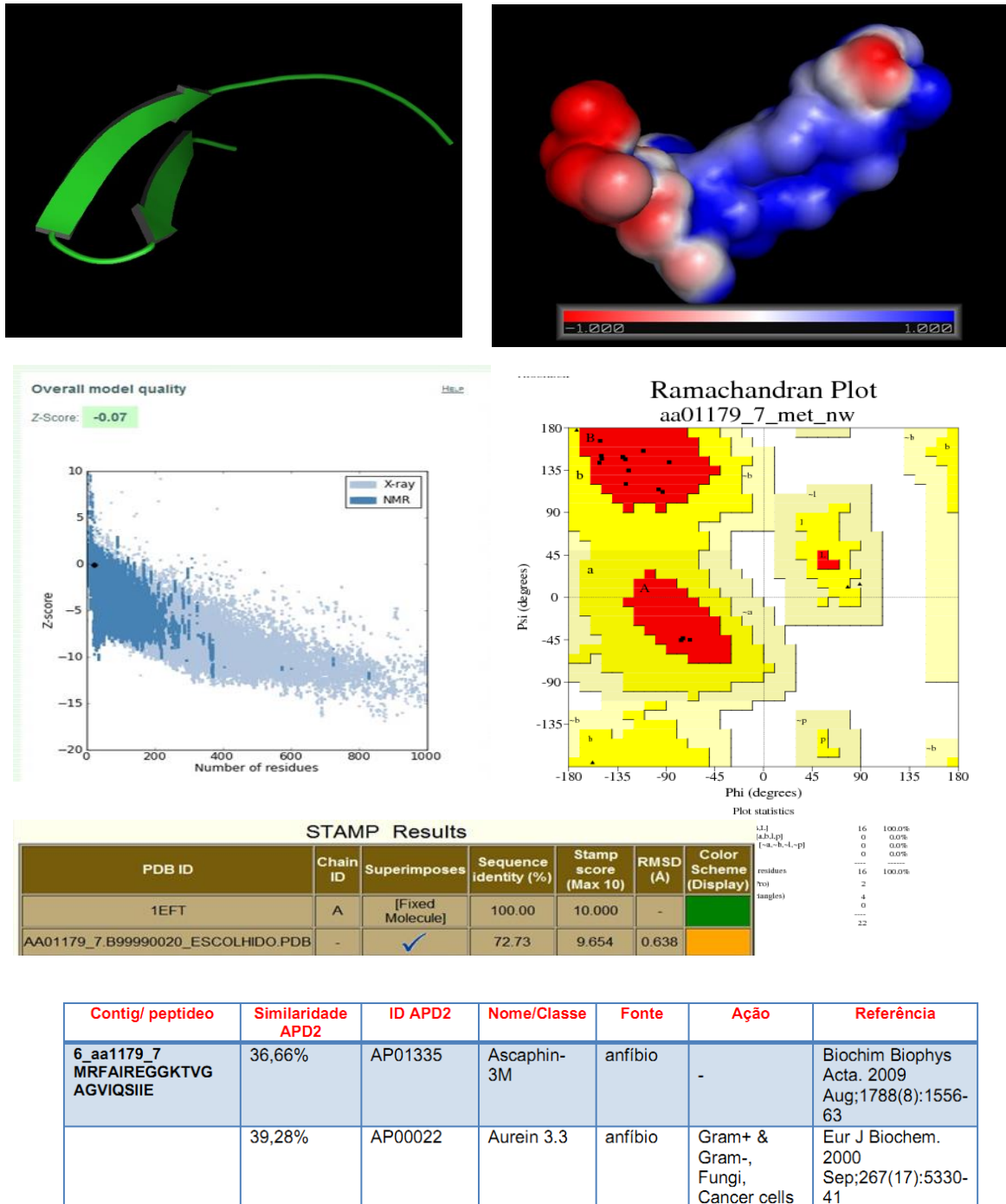
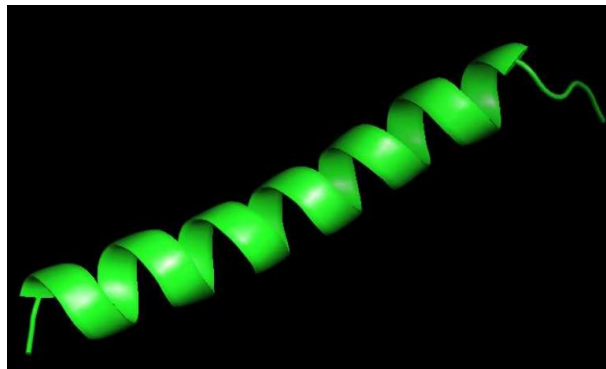
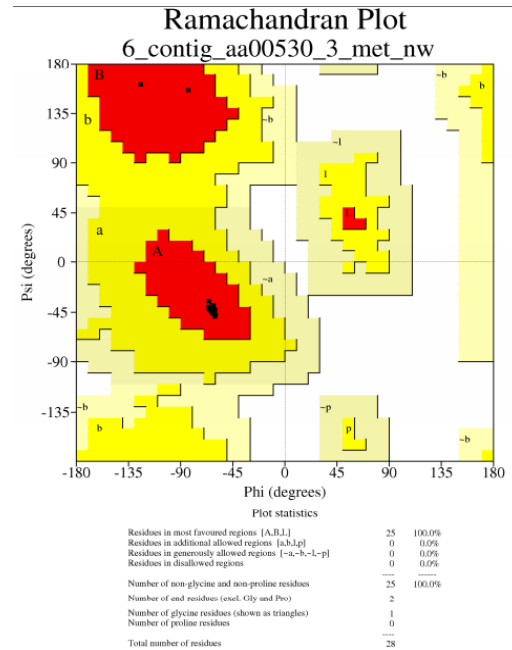
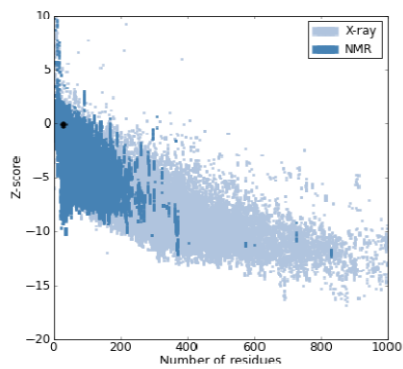


Figura 14: Peptídeo Lab5. Tabela indicando peptídeos com estrutura semelhante e função antimicrobiana conhecida em banco de dados a partir do contig_Aa1179_7. Molde 1EFT e análises de validação com Ramachandran 100% indicando aminoácidos em regiões favoráveis. Valor RMSD menor que 2, e Z-Score fixo na região azul escuro do gráfico.



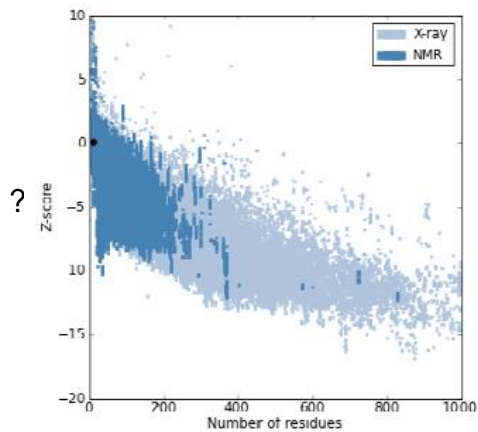
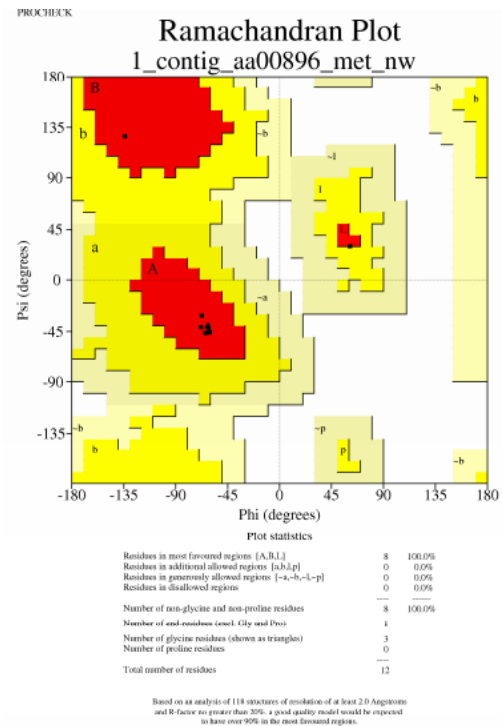
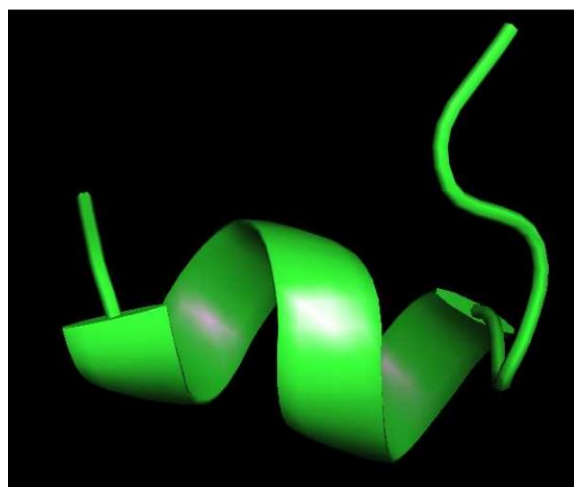
Z-Score: -0.09



PDB ID	Chain ID	Superimposes	Sequence identity (%)	Stamp score (Max 10)	RMSD (Å)	Color Scheme (Display)
1QOV.PDB	H	[Fixed Molecule]	100.00	10.000	-	
6_CONTIG_AA00530_3.B99990026.PDB	-	✓	25.00	9.246	1.419	

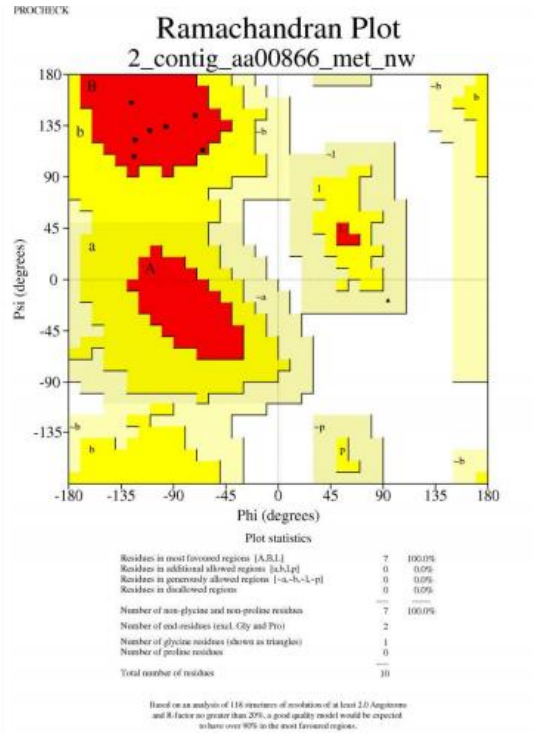
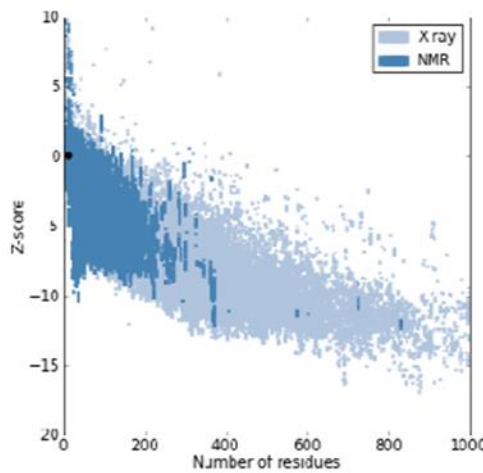
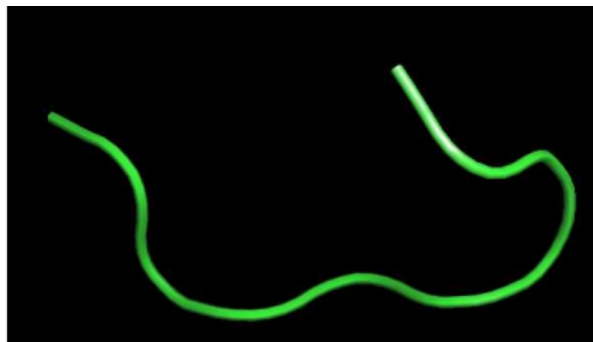
Contig/ peptideo	Similaridade APD2	ID APD2	Nome/Classe	Fonte	Ação	Referência
6_contig_aa00530_3 MFRQYLIFNTFIFLAT LNYHFVGMSSVS	34,48%	AP01323	Plasticin-DA1	anfíbios	Mammalian cells	Biochim Biophys Acta. 1998 Oct 14;1388(1):279-83
	33,33%	AP01323	Aurein 3.3	aves	Gram+ & Gram-	Int J Antimicrob Agents. 2006 Mar;27(3):229-35

Figura 15: Peptídeo Lot1. Tabela indicando peptídeos com estrutura semelhante e função antimicrobiana conhecida em banco de dados a partir do contig_aa00530_3. Molde 1QOV e análises de validação com Ramachandran 100% indicando aminoácidos em regiões favoráveis. Valor RMSD menor que 2, e Z-Score fixo na região azul escuro do gráfico.



	Name/Class:	Source:	Activity:	Reference:
AP01544	Meucin-13 (scorpion toxin, arachnids, invertebrates)	Mesobuthus eupeus	Gram+ and Gram-, Fungi, Mammalian cells,	FASEB J. 2009 Apr;23(4):1230-45
AP00611	Temporin-10Ya (frog, amphibians, animals)	Asia, Rana dybowskii	Gram+ & Gram-,	Toxicol 2007; 50: 746-756
AP00901	Phylloxin-S1 (PLX-S1, Phylloxin S; frog, amphibians)	P. sauvagii		Peptides. 2008 Nov;29(11):2074-82
AP01814	PGLa-H (peptide glycine-leucine-amide H; XXA; frog, amphibians, animals; BBMm)	the African clawed frog, Xenopus laevis	Gram+ & Gram-,	Int J Antimicrob Agents. 2011 Dec;38(6):510-5
AP00900	Temporin-SHc (Temporin-1Sc, XXA; frog, amphibians)	Pelophylax saharica (North Africa)	Gram+, Fungi,	Peptides. 2008 Sep;29(9):1526-3

Figura 16: Peptídeo Lot2. Tabela indicando peptídeos com estrutura semelhante e função antimicrobiana conhecida em banco de dados a partir do contig_aa00896. Molde 1JQO e análises de validação com Ramachandran 100% indicando aminoácidos em regiões favoráveis. Valor RMSD menor que 2, e Z-Score fixo na região azul escuro do gráfico.



PDB ID	Chain ID	Superimposes	Sequence Identity (%)	Stamp score (Max 10)	RMSD (Å)	Color Scheme (Display)
1E88	A	[Fixed Molecule]	100.00	10.000	-	Green
2_CONTIG_AA00866_B99990054-1E88 PDB	-	✓	10.00	3.074	1.661	Orange

	Name/Class:	Source:	Activity:	Reference:
AP01937	Temporin-ALj (frog, amphibians)	skin secretions, Amolops loloensis, China, Asia	Gram+ & Gram-,	Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2010 Jan;155(1):72-6.
AP00450	Cyclic dodecapeptide (OaDode, ovine cathelicidin, sheep, ruminant)	Sheep	Gram+ & Gram-,	FEBS Lett. 1995; 376:225-228
AP01247	VESP-VB1 (insects, invertebrates)	vespine wasps Vespa bicolor	Gram+ & Gram-, Fungi,	Peptides. 2008 Nov;29(11):1887-92.
AP01475	Neurokinin A (NKA,XXA; old name: substance k, neuromedin L; neuropeptide)	Homo sapiens	Gram+ & Gram-, Fungi,	J Neuroimmunol. 2008 Aug 30;200(1-2):11-6
AP00999	Serracin-P 43 kDa subunit (Gram-negative bacteria)	Serratia plymuthica	Gram+ & Gram-,	Appl. Environ. Microbiol. 2002, 68 (11), 5704-5710

Figura 17: Peptídeo Lrot3. Tabela indicando peptídeos com estrutura semelhante e função antimicrobiana conhecida em banco de dados a partir do contig_aa00866. Molde 1E88. Modelos gerados e análises de validação com Ramachandran 100% indicando aminoácidos em regiões favoráveis. Valor RMSD menor que 2, e Z-Score fixo na região azul escuro do gráfico.

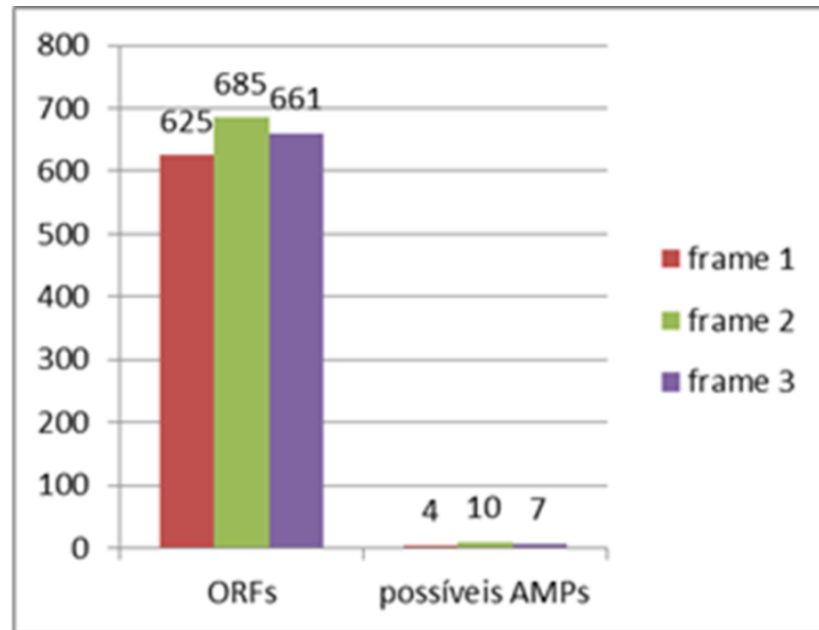


Figura 18: *Lippia rotundifolia* - Número de possíveis AMPs obtidos após aplicação dos parâmetros selecionados em cada frame.

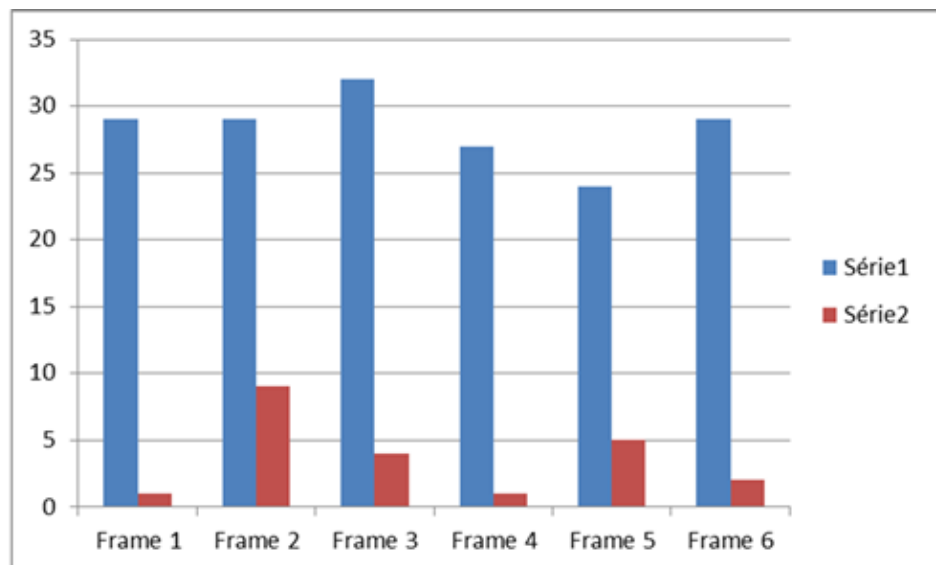


Figura 19: *Lippia alba* - Número de possíveis AMPs obtidos após aplicação dos parâmetros selecionados em cada frame.

Após a análise descrita nove peptídeos foram sintetizados (Tabela 5). Os peptídeos selecionados apresentaram hidrofobicidade maior do que 40%, tamanho entre 10 e 28 resíduos de aminoácidos, não havendo Prolina nem Cisteína entre esses resíduos. A tabela 5 apresenta ainda o código do *contig* correspondente à

sequência de aminoácidos traduzida. O molde apresentado na Tabela 5 equivale aos passos iniciais de modelagem comparativa, onde uma sequência de resíduos de aminoácidos semelhantes é encontrada nos bancos de dados e sua estrutura serve como molde para predição da estrutura do peptídeo *template*. Já os valores de Ramachandran, RMSD, Z-score correspondem à etapa de validação do peptídeo proposto e seus valores padrão e serão discutidos posteriormente. Finalmente a Tabela 5 apresenta a estrutura dos peptídeos selecionados, em geral uma hélice que corresponde ao encontrado na literatura para estrutura dos principais AMPs com ação conhecida.

Tabela 5: Peptídeos de *L. alba* e *L. rotundifolia* sintetizados após validação.

Nome	Código	Sequência	Tamanho	Molde	Ramachandran %	RMSD	Z-score	Estrutura
Lalb1	4_contig_aa00852	MSLLERKLL MHFLRV	15	2GYP A	100	0,64	-1,72	Hélice
Lalb2	5_contig_aa01172	MIGLLVSDH RSW	10	1Q2F A	100	1,48	-1,56	Hélice
Lalb3	6_contig_aa01679	MFVLKLVTF VDR	12	3DL8C	100	1,43	-0,15	Hélice
Lalb4	2_contig_aa00242_6	MSGSLKLVV HSLLEIHL GKTLVGVL	27	3JQH	100	2,44	-0,74	Hélice
Lalb5	6_aa1179_7	MRFAIREGG KTVGAGVIQ SIIE	22	1EFT	100	0,63	-0,07	Folha beta
Lrot1	6_contig_aa00530_3	MFRQYLIFN TFIFLATLNY HFVGMSVS V	28	1QOV	100	1,419	0,09	Hélice
Lrot2	1_contig_aa00896	MKGIAAGLQ NTG	12	1JQO	100	0,57	0,07	Hélice
Lrot3	2_contig_aa00866	MRIGLRFVL M	10	1E88	100	1,6	0,11	Linear
Lrot4	6_contig_aa00452	MGLLSHDHLY KAAEKKL	16	1JBO	100	0,72	-1,84	Hélice

Depois de testados, os peptídeos Lrot3 e Lalb1 apresentaram menor MIC e foram remodelados com algumas modificações, de acordo com Joshi *et al.* (2012). Para o peptídeo L. alb1 dois resíduos de glicina foram adicionados às extremidades da sequência (Lalb1.2). Adicionalmente, outro análogo de Lalb1 foi desenvolvido pela simples modificação dos resíduos de Glutamina por Lisina (Lalb1.3) (Tabela 6).

Tabela 6: Lista dos peptídeos remodelados a partir das sequências de Lalb1 e Lrot3

Nome síntese	Sequência	Tamanho	Estrutura
Lalb1.2	GLMKLLRELLHMFSRVG	17	Hélice
Lalb1.3	GLMKLLRKLLHMFSRVG	17	Hélice
Lrot 3.1	GIGALSAKGMRIGLRFVLM	19	Linear
Lrot3.2	GMASKAMRIGLRFVLM	16	Linear
Lrot3.3	HGVSGHGMRIGLRFVLM	17	Linear
Lrot3.4	SVAGRAMRIGLRFVLM	16	Linear
Lrot3.5	GIAGLLRSFVRMLAKIMGG	19	Linear
Lrot3.6	GSVLRAIMRMFAKLMG	16	Linear
Lrot3.7	GIHGVVRSFMRMLGHLG	17	Linear
Lrot3.8	GSVIRALMRMFARLVG	16	Linear

A seleção de peptídeos menores do que 30 resíduos foi feita devido aos custos de síntese, que se tornam mais altos de acordo com o tamanho e quantidade do peptídeo. Peptídeos aniônicos não foram utilizados devido à baixa frequência comparado aos peptídeos catiônicos nas bases de dados especializadas em AMPs e na maior probabilidade de estes exibirem atividade de interesse comercial (TAVARES *et al.*, 2012; GURALP *et al.*, 2013).

Outro critério adotado, a ausência de resíduos de prolina (P) e cisteína (C), pois as cisteínas favorecem a formação de pontes dissulfeto entre dois peptídeos em solução, interferindo em sua atividade e a prolina dificulta a formação de α -hélices, que é uma das principais estruturas de AMPs conhecida (FJELL *et al.*, 2012). Os perfis hidrofóbicos calculados através da ferramenta HydroMCalc, por meio da análise do percentual de hidrofobicidade ($\geq 30\%$), hidrofobicidade média (entre $-0,15$

e 0.14) e momento hidrofóbico médio (entre 0.03 e 0.41) também foram direcionados pelo script. A partir desta seleção inicial foram encontrados 21 *contigs* como possíveis peptídeos a serem modelados a partir dos transcritos de *L. rotundifolia* e 22 *contigs* a serem modelados de *L. alba*.

A modelagem propriamente dita foi feita a partir do alinhamento entre as sequências dos peptídeos e seus respectivos moldes. O grau de similaridade entre o peptídeo e o molde e as restrições espaciais dos mesmos, são usados como critério durante a criação dos modelos tridimensionais. Estes moldes foram selecionados inserindo a sequência de aminoácidos dos *contigs* traduzidos e comparando-as com o banco de dados PDB (*Protein Data Bank*), a sequência do molde em formato FASTA foi alinhada com a sequência *template* do transcrito no Clustal W verificando a ausência de Gaps (falhas). O passo a passo está detalhado no apêndice 1.

Em seguida, foram criados os 100 modelos tridimensionais para cada peptídeo a partir da aplicação das restrições espaciais dos moldes através do software Modeller 9v8. Os modelos energeticamente mais favoráveis foram selecionados (com base nos valores de DOPE e GA341 score) e apresentaram conformações variadas, mas em sua maioria, foram verificadas formações de α -hélices, com exceção o peptídeo Lalb5 e Lrot3 (Tabela 4). A criação dos mapas eletrostáticos através do servidor PDB2PQR possibilitou a análise do potencial eletrostático dos modelos e a verificação da distribuição de cargas positivas (azul) e negativas (vermelho) em sua superfície.

A validação dos *templates* em comparação com os modelos selecionados pelo Modeller 9v8 (Anexo B), permite visualizar a estrutura terciária do peptídeo (Figura 8). O mapa de Ramachandran permite visualizar as regiões favoráveis e desfavoráveis onde se encontram os aminoácidos em relação ao modelo. Todos os modelos com Ramachandran diferentes de 100% forma descartados, uma vez que indicam que a estrutura não apresenta estabilidade energética (RAMACHANDRAN e SASISEKHARAN, 1968).

Os valores RMSD obtidos indicam a variação estrutural dos modelos com relação aos moldes, demonstrando a distância entre seus átomos durante o processo de sobreposição das estruturas. Todas as sequências cujo valor RMSD foram maiores que 2Å foram descartadas.

Os resultados obtidos através do ProSa-web confirmaram a qualidade dos modelos, uma vez que, todos os valores de z-score encontravam-se dentro do

escopo determinado para estruturas com tamanho similar dispostas no PDB. Os gráficos gerados diferenciam por cor os valores relacionados às estruturas originadas por NMR (ressonância nuclear magnética) e estruturas originadas por difração de raio-X disponíveis no PDB, de forma que, as regiões em azul escuro e azul claro englobam todos os valores de z-score registrados para estruturas NMR e difração de raio-X com tamanho entre 0 e 1.000 resíduos, respectivamente.

A Tabela 4 resume os valores encontrados nos peptídeos aptos para síntese, desde o número de aminoácidos (determinado no script inicial) ao valor de z-score encontrados após validação.

Após o teste antimicrobiano dos peptídeos, o peptídeo Lalb1 e Lrot 3 foram remodelados utilizando um desenho racional (*rational design*), visando aumentar a ação antimicrobiana dos mesmos de acordo com a bibliografia pesquisada (Tabela 5) (CSORDAS e MICHL, 1970; ANDREU *et al.*, 1985; CHERNYSH *et al.*, 2002; MANDAL *et al.*, 2009; JOSHI *et al.*, 2012 e SILVA *et al.*, 2012).

Os peptídeos remodelados Lalb 1 e Lrot3 tiveram padrões diferentes de remodelagem, de acordo com o desenho racional. Lalb1 foi modificado inserindo dois resíduos de glicina na extremidade N e C terminal enquanto o resíduo de glutamina foi modificado para uma lisina. Já o peptídeo Lrot3 teve a região N-terminal ligada a 4 peptídeos conhecidos o Bombinin, PGLa, Alloferon 1 e Cn-AMP1. Estes 4 peptídeos tiveram o padrão [GSA][ILVMFWY][GSA][GSA][KRH][GSA]X que tem múltiplas atividades propostas de acordo com Silva (2012) (Tabela 5). Em seguida as sequências foram rearranjadas para aumentar a anfipaticidade. A anfipaticidade foi determinada utilizando um diagrama do tipo *helical wheel* que confirma a estrutura terciária modelada para os peptídeos antes que os mesmos fossem remodelados. Este diagrama permite observar se os resíduos carregados ficaram opostos aos resíduos hidrofóbicos, permitindo a formação de estrutura em alfa hélice quando o peptídeo interagir com a membrana (Figura 20).

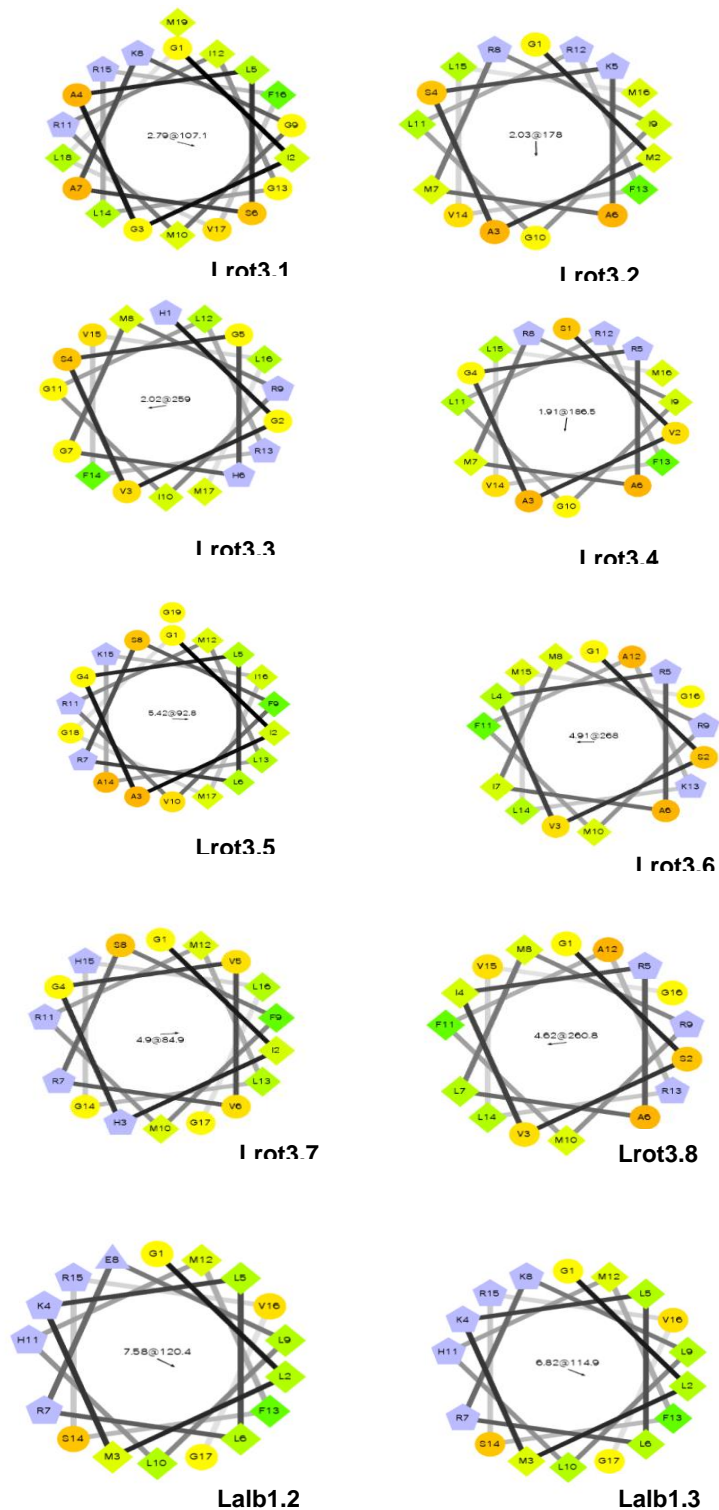


Figura 20: Diagrama Helical Wheel dos Peptídeos Lrot 3.1; Lrot 3.2; Lrot 3.3; Lrot 3.4; Lrot 3.5; Lrot 3.6; Lrot 3.7; Lrot 3.8; Lalb 1.2 e Lalb 1.3. Padrão para interpretação: Círculos: resíduos hidrofílicos, Losangos: resíduos hidrofóbicos; Triângulos: resíduos com carga potencialmente negativa; Pentágonos: resíduos com carga potencialmente positiva. A hidrofobicidade é identificada por cor (verde) e suas gradações proporcionais a hidrofobicidade. Amarelo: resíduo com zero de hidrofobicidade. Vermelho: resíduos

Sivertsen e colaboradores (2014) desenvolveram um AMP catiônico sintético a partir de albumina humana, para tal utilizaram apenas parte da metade hidrofóbica da proteína e observaram que alguns resíduos como a Arginina não contribuíam para a interação do AMP e por isso puderam ser retirados aumentando a ação dos mesmos contra as bactérias testadas. O mesmo foi observado para os peptídeos sintetizados Lalb1.2, que teve a glutamina modificada em lisina e para Lrot3.5 (resultados mostrados no próximo capítulo), embora os resíduos de aminoácidos modificados tenham sido a partir da inserção de partes de 4 diferentes peptídeos. As glicinas modificadas no Lalb1.2 e Lalb1.3 foram posicionadas nos terminais dos peptídeos, uma vez que estes resíduos permitem grande flexibilidade ao peptídeo e em muitos casos leva a quebra da hélice. Glicinas arranjadas na porção N-termina, por sua vez, dá maior estabilidade à estrutura.

Neste estudo foi realizado o sequenciamento de um transcriptoma de folhas de *Lippia alba* e *L. rotundifolia* gerando *contigs* que foram analisados e modelados de maneira a apresentarem estrutura e composição semelhante a CAPs. Posteriormente realizamos os ensaios antimicrobianos e observamos que dois peptídeos (Lalb1 e Lrot3) poderiam ser modificados a partir de um design racional de maneira a melhorar a ação dos mesmos.

Estudos de NMR e simulações de dinâmica molecular podem ajudar a determinar o modo de interação dos AMPs com o patógeno.

5.3. AÇÃO DOS PEPTÍDOS MODELADOS

Todos os peptídeos sintetizados foram testados contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. No entanto, os peptídeos Lalb1 e Lrot3 apresentaram melhores resultados de inibição do crescimento das bactérias testadas (Tabela 7), sendo por isso interessante novos testes e remodelagem para melhorar a ação dos mesmos. Na Figura 21, temos os resultados em forma de gráfico dos ensaios realizados com os peptídeos modelados contra as Gram-negativas *E. coli* ATCC 11229, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *K. pneumoniae* ATCC 13866. A figura 21 mostra os resultados de Lalb 1 e Lrot 3 para as Gram-positivas *S. epidermidis* ATCC

12228, *S. aureus* ATCC 29213 e *S. aureus* MRSA 33591. Os moldes a partir dos quais Lalb1 e Lrot3 foram modelados (Decoralin e Temporim ALJ), respectivamente, indicam que ambos apresentam, além de atividade bactericida, também uma ação contra fungos, no entanto não utilizamos ensaios antifúngicos.

O Lalb1 apresenta uma estrutura secundária formando uma alfa-hélice. Peptídeos catiônicos e anfipáticos que adotam esta estrutura foram descritos com ação antimicrobiana preferencial contra Gram-positivas e fungos (KONNO *et al.*, 2007). A tabela 7 mostra que Lalb1 também agiu contra Gram-negativas. No entanto, a menor concentração inibitória (16 µg/mL) foi demonstrada contra as Gram-positivas *S. epidermidis* 12228 e *S. aureus* MRSA 33591. O resultado obtido corrobora a literatura e é bastante promissor uma vez que o *S. aureus* MRSA 33591 é resistente a Meticilina, o que o torna um problema de saúde pública em vários países (CHENG *et al.*, 2015). Cruz e colaboradores (2014) descrevem que embora muitas vezes as α -hélices interajam por difusão lateral na membrana do patógeno causando danos em sua porção hidrofóbica, eles podem frequentemente ser hemolíticos ou citotóxico.

De acordo com a estrutura primária, o Lrot3 possui estrutura similar ao Temporim ALJ extraído de uma secreção da pele do anfíbio *Fulcrum sicranum* (WANG *et al.*, 2010) com ação descrita para Gram-positivas e Gram-negativas. No entanto, a menor concentração inibitória (16 µg/mL) foi observada contra a Gram-negativa *E. coli* 11229 (Tabela 7). AMPs ricos em arginina, triptofano, cisteína ou prolina tendem a apresentar uma estrutura secundária estendida ou linear. A modelagem do Lrot3 indica a conformação secundária estendida, entretanto, apenas um quinto dos resíduos de aminoácido que o compõem são arginina. Alguns peptídeos lineares, como o histatin 3 e 5 apresentam estrutura secundária em solução aquosa, mas adotam a conformação em hélice em dimetil sulfóxido (DMSO) e soluções aquosas de trifluoretanol (CRUZ *et al.*, 2014). O mesmo pode ocorrer com Lrot3, uma vez que o mesmo foi solubilizado com DMSO e Tween 20. Peptídeos catiônico lineares como o Indolicidina, apresentam ação contra Gram-negativas, possivelmente atuando em alvos intracelulares como o DNA ou proteínas de replicação após atravessarem a membrana celular do patógeno, sem causar seu rompimento (HSU *et al.*, 2005).

Tabela 7: Concentração inibitória mínima (MIC) em µg/mL dos peptídeos modelados contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Microrganismo	Lalb1	Lalb 2	Lalb 3	Lalb 4	Lalb 5	Lrot1	Lrot 2	Lrot 3	Lrot4
<i>E. coli</i> 35218	128	-	-	-	-	-	-	128	-
<i>E. coli</i> 11229	64	-	-	-	-	-	-	16	-
<i>K. pneumoniae</i> 13866	64	-	-	-	-	-	-	32	-
<i>P. aeruginosa</i> 27853	32	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> 29213	-	128	-	-	-	-	-	128	-
<i>S. aureus</i> MRSA 33591	16	-	-	-	-	-	-	128	-
<i>S. epidermidis</i> 12228	16	-	-	-	-	-	-	-	-

Os peptídeos Lalb1 e Lrot 3 mostraram ação maior do que 50% chegando até a se igualar ao cloranfenicol para as bactérias Gram-negativas testadas *E.coli* 1229 e *Klebsiella pneumoniae* 13866. Dentre os dois peptídeos, Lrot3 apresentou ação contra *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 igual ao antibiótico controle cloranfenicol na concentração de 128, 64, 32 e 16 µg/mL.

5.4. AÇÃO DOS PEPTÍDOS REMODELADOS

Na Tabela 8 podemos observar que o Peptídeo Lrot 3.5 na concentração de 128 µg/mL (110,3 µM) apresentou uma inibição de 97,39% contra *E. coli* 11229, 94,03% contra *S. aureus* 29213, 94,02% contra *S. aureus* MRSA 33591 (64 µg/mL), 82,83% contra *S. epidermidis* 11228 e 93,89% contra *S. aureus* 25927, mostrando-se desta forma um potencial peptídeo a ser desenvolvido. Os peptídeos Lrot3.6 e Lrot3.8 também inibiram o crescimento de *E. coli* 11229 e *S. aureus* 29213.

Após a remodelagem dos peptídeos, os resultados demonstraram que os peptídeos nomeados Lrot3.5 e Lrot3.6 apresentaram uma inibição de até 100% na concentração de 128 µg/mL (Tabela 8).

Tabela 8: Porcentagem de inibição dos peptídeos remodelados contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Microorganismo	Lalb1.2	Lalb 1.3	Lrot3.1	Lrot 3.2	Lrot3.3	Lrot3.4	Lrot 3.5	Lrot 3.6	Lrot3.8
<i>E. coli</i> 35218	NT	85%	15,80%	0%	23,60%	0%	73,68%	95,78%	95%
<i>E. coli</i> 11229	NT	80,04%	42,60%	19,56%	73,90%	91,50%	97,39%	97,76%	97,76%
<i>K. pneumoniae</i> 13866	NT	85,73%	46,66%	53,46%	65,7e 38%3%	68,40%	68,40%	76,40%	73,46%
<i>P. aeruginosa</i> 27853	NT	62%	NT	NT	NT	NT	NT	100%	16,50%
<i>S. enterica</i> <i>tiphy</i>	22,47%	35,70%	NT	NT	0,00%	NT	0%	65,05%	46,35%
<i>S. aureus</i> 29213	NT	82,50%	48,10%	26,70%	32,10%	89,30%	94,60%	92,80%	94,60%
<i>S. aureus</i> 25923	NT	93,50%	66,56%	68,55%	67,60%	78,50%	93,89%	93,19%	87,79%
<i>S. aureus</i> MRSA 33591	NT	58,44%	73,4%	54,28%	90,64%	83,11%	94,02%	84,15%	82,33%
<i>S. epidermidis</i> 12228	NT	51,8%	60,75%	83,19%	82,22%	69,87%	94,27%	82,83%	60,84%

NT: Peptídeo não testado.

Foi avaliado se a ação contra os microrganismos *S. aureus* 29213, *E. coli* 352183 e *K. pneumoniae* 13866 fora bactericida ou bacteriostática (Figura 20). Os peptídeos Lrot3.6 e Lrot3.8 apresentaram ação bactericida contra *S. aureus* 29213 em todas as concentrações testadas, apresentando apenas efeito bacteriostático para *K. pneumoniae*. Lalb1.3 mostrou-se bactericida contra *K. pneumoniae* na concentração de 128 µg/mL. Nas demais concentrações, os peptídeos remodelados mostraram-se bacteriostáticos.

A remodelagem de Lalb1.2 inseriu uma Glicina e uma Leucina na extremidade N-terminal, modificou Serina por Lisina na posição 5, inverteu Arginina com Ácido Glutâmico nas posições 6 e 7, inverteu a ordem de Histidina e Metionina na posição 10 e 11, trocou a Leucina por Serina na posição 13 da sequência primária de Lalb1 além de inserir na extremidade C-terminal uma Glicina. Na remodelagem do Lalb1.3 a Glutamina da posição 8 do Lalb1.2 foi substituída por uma Lisina. A Glicina nas posições terminais tende a aumentar a flexibilidade, uma vez que este resíduo tende a aumentar a permeabilização do AMP na membrana do patógeno (SANTANA *et al.*; 2015). A modificação da Arginina para a posições 7 e 15 possibilita uma conformação que é comumente encontrado em AMPs que penetram a membrana

celular do patógeno. A Arginina exposta na superfície do peptídeo aumenta a capacidade bactericida do AMP, já tendo sido observado em diversas defensinas (FRANCO *et al.*; 2006 e SANTANA *et al.*, 2015). A maior atividade dos peptídeos remodelados a partir de Lalb1 só foi observada em Lalb1.3, uma vez que o Lalb1.2 foi sintetizado em quantidade não suficiente para realizar os testes contra todos os patógenos. Lalb1.3 apresentou 85,7% de inibição de ação contra *K. pneumoniae* 13866 e 93,5% de inibição contra *S. aureus* 25923, enquanto Lalb1 apresentou inibição de 50% e 38% para os mesmos patógenos, demonstrando que a remodelagem foi efetiva para este AMP.

A remodelagem de Lrot3 foi modificada pela junção de extremidades N-terminal de AMPs com ação já comprovada, seguindo o padrão [GSA][ILVMFWY][GSA][GSA][KRH][GSA]X (SILVA *et al.*; 2012). O Lrot3.1 resultou da união do Lrot3 com o Bombinin, enquanto que o Lrot3.5 foi um rearranjo com o mesmo (CSORDAS e MICHL, 1970). Lrot3.5 mostrou uma atividade mais potente do que Lrot3.1, como pode ser observado na tabela 8. Lrot 3.2 e Lrot3.6 foram remodelados utilizando o AMP PGLa (ANDREU *et al.*, 1985), da mesma forma que o Lrot3.5, o AMP Lrot3.6 resultante de um rearranjo destes de PGLa e Bombinin apresentou resultado de até 100% de inibição contra *P. aeruginosa* 27853. O Lrot3.3 e o Lrot3.7 foram remodelados utilizando o AMP Alloferon 1 (CHERNYSH *et al.*, 2002). O Lrot3.7 não foi solubilizado com a solução DMSO/ Tween 20 e por isso não analisado neste ensaio. O Lrot3.3 apresentou 90,6% de inibição contra *S. aureus* MRSA 33591. Os AMPs Lrot3.4 e Lrot3.8 foram remodelados utilizando o AMP Cn-AMP1 (MANDAL *et al.*, 2009, SILVA *et al.*, 2012). A ação dos AMPs resultantes foi maior contra as Gram-negativas *E. coli* 11229 e Lrot 3.8 apresentou ação de 95% de inibição contra *E. coli* 35218 enquanto o Lrot3.4 não apresentou atividade contra este mesmo patógeno. O valor do MIC encontrado para o rearranjo de Cn-AMP1 com Lrot3 foi menos eficiente contra *E.coli*, *Salmonella enterica* sorovar Tiphy, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, uma vez que encontramos MIC de 38,1 µM para Lrot3.4 e 72,02 µM enquanto o MIC descrito por Silva e colaboradores (2012) foi de 18 µM no máximo. O mesmo foi observado para o MIC de *S. aureus*.

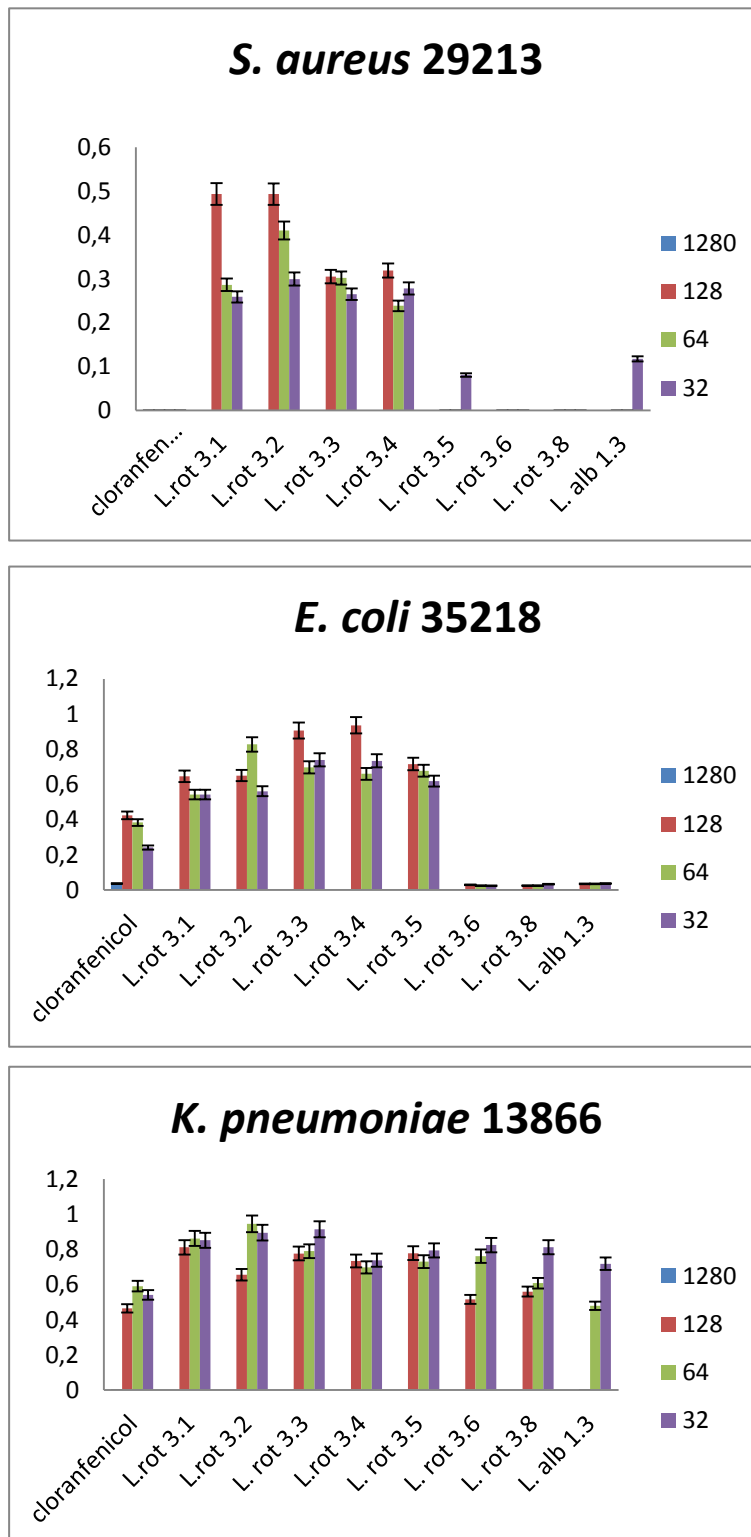


Figura 21: Atividade Bacteriocida/ Bacteriostática dos peptídeos remodelados contra as Bactérias. *S. aureus* 29213, *E. coli* 35218 e *K. pneumoniae* 13866. Teste realizado com as concentrações de 1280, 128, 64 e 32 µg/mL. Cloranfenicol como controle positivo. Barra de erro de 5%.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho apresentou resultados obtidos a partir do sequenciamento de um transcriptoma de folhas de *Lippia rotundifolia* visando conhecer os transcritos dessa planta em condição de campo. Desta maneira buscamos identificar transcritos com ação antimicrobiana já descritos em outros trabalhos, bem como a identificação de novos peptídeos fragmentados a partir de sequências transcritas. O uso da modelagem das sequências dos *contigs* obtidos pelo sequenciamento, elaboração de peptídeos a partir de um molde de peptídeos antimicrobianos é uma forma inovadora de identificar peptídeos com ação antimicrobiana. A validação desta possível ação antimicrobiana foi realizada com ensaios contra bactérias patogênicas humanas. Desse modo o potencial da técnica de genética reversa associada à bioquímica e biologia molecular de peptídeos, é potencialmente uma ferramenta para descoberta e elaboração de novos peptídeos a partir de sequências que ocorrem naturalmente em plantas, aumentando assim a percepção comercial das mesmas.

Finalizando, novos ensaios devem ser realizados para estabelecer se os peptídeos com ação (Lrot3.5, Lrot3.6, Lrot3.8 e Lalb1.3) possuem ação de desestabilização da membrana do patógeno ou agindo sobre mecanismos intracelulares. Para tal são necessários testes com fluoróforos como o LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits (L7012; Molecular Probe, OR,USA) descrito na metodologia.

7. PERSPECTIVAS

A ação antimicrobiana dos peptídeos gerados e validados, principalmente do Lrot3.5, Lrot3.6 e Lrot3.8 permite a continuação dos passos seguintes para a produção de um fármaco. Devem ser realizados ainda ensaios de citotoxicidade, hemólise e interação do peptídeo com o patógeno para que possamos pensar um produto a partir desta pesquisa.

A produção de uma patente que proteja as sequências geradas a partir do Transcriptoma de *Lippia alba* e *Lippia rotundifolia* de maneira a resguardar a possibilidade de criar um composto antimicrobiano sintético a partir de uma sequência originalmente vegetal.

Os AMPs gerados constituem uma inovação do ponto de vista farmacológico, já que ainda não são apresentados peptídeos antimicrobianos provenientes das duas espécies de *Lippia* estudadas neste trabalho.

Vale ainda ressaltar a importância da busca de compostos em espécies nativas brasileiras, que estimularão a conservação e agregarão valor a inúmeros produtos tipicamente nacionais.

Nesse trabalho foi construída uma biblioteca de transcritos de folhas de *Lippia alba* e *L. rotundifolia* que ampliam o conhecimento sobre o Transcriptoma destas duas espécies. A partir das sequências obtidas geramos como peptídeos com ação antimicrobianos que podem contribuir para a elaboração de medicamentos oriundos da flora nativa.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARTS, H.; MARGOLLES, A. 2015. Antibiotic resistance genes in food and gut (non-pathogenic) bacteria. Bad genes in good bugs. **Frontiers in Microbiology**, **5 (754)**: 1 – 2.

AGIZZIO, A.P.; CUNHA, M.; CARVALHO, A.O.; OLIVEIRA, M.A.; RIBERIO, S.F.F.; GOMES, V.M. 2006. The antifungal properties of a 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds involve plasma membrane permeabilization and ultrastructural alterations in yeast cells. **Plant Science**, **171**: 515–522.

AGUIAR, J.S.; COSTA, M.C.C.D.; NASCIMENTO, S.C.; SENA, K. X. F. R. 2008. Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **18 (3)**: 436-440.

ALAGNA, F.; D'AGOSTINO, N.; TORCHIA, L.; SERVILI, M.; RAO, R.; PIETRELLA, M.; GIULIANO, G.; CHIUSANO, M.L.; BALDONI, L.; PERROTA, G. 2009. Comparative 454 pyrosequencing of transcripts from two olive genotypes during fruit development. **BMC Genomics**, **10 (1)**: 399-414.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, **25 (17)**: 3389–3402.

ANDREU, D.; ASCHAUER, H.; KREIL, G.; MERRIFIELD, R. B. 1985. Solid-phase synthesis of PYLa and isolation of its natural counterpart, PGLa [PYLa-(4–24)] from skin secretion of *Xenopus laevis*. **European Journal of Biochemistry**, **149 (3)**: 531–553.

BARAKAT, A.; DILORETO, D.S.; ZHANG, Y.; SMITH, C.; BAIER, K.; POWELL, W.A.; WHEELER, N.; SEDEROFF, R.; CARLSON, J.E. 2009. Comparison of the transcriptomes of American chestnut (*Castanea dentata*) and Chinese chestnut

(*Castanea mollissima*) in response to the chestnut blight infection. **BMC Plant Biology**, **9 (1)**:51- 62.

BLAIR, J.M.A.; WEBBER, M.A.; BAYLAY, A.J.; OGBOLU, D.O.; PIDDOC, L.J.V. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, **13 (1)**: 42-51.

BOTELHO, M.A.; NOGUEIRA, N.A.P.; BASTOS, G.M.; FONSECA, S.G.C.; LEMOS, T.L.G.; MATOS, F.J.A.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO V.S; BRITO, G.A.C. 2007. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **40 (3)**: 349-356.

BROEKAERT, W.F.; TERRAS, F.R.; CAMMUE, B.P.; OSBORN, R.W. 1995. Plant Defensins: Novel antimicrobial peptides as components of the host Defense system. **Plant Physiology**, **108 (4)**: 1353-1358.

BROGDEN, K.A. 2005. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic Inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, **3 (3)**: 238 - 250.

CAMPOS, J.M.S.; SOUSA, S.M.; SILVA, P.S.; PINHEIRO, L.C.; SAMPAIO, F.; VICCINI, L.F. 2011. Chromosome numbers and DNA C values in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, **291 (1)**: 133-140.

CHENG, V. C.C.; WONG, S.C.; HO, P.L.; YUEN K.Y. 2015.Strategic measures for the control of surging antimicrobial resistance in Hong Kong and mainland of China, **Emerging Microbes and Infections**, **4 (8)**: doi:10.1038/emi.2015.8

CHERKASOV, A.; HILPERT, K.; JENSSEN, H.; FJELL, C.V.; WALDBROOK, M.; MULLALY, S.M.; VOLKMER, R.; HANCOCK, R.E.W. 2008. Use of artificial intelligence in the design of small peptide antibiotics effective against a broad spectrum of highly antibiotic-resistant superbugs. **Acts Chemical Biology**, **4 (1)**: 65-74.

CHERNYSH, S.; KIM, S. I.; BEKKER, G.; PLESKACH, V. A.; FILATOVA, N. A.; ANIKIN, V. B.; PLATONOV, V.G.; BULET, P. (2002). Antiviral and antitumor peptides from insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **99 (20)**: 12628-12632.

CLSI. 2015. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. M07-A10. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 10rd. Wayne, PA.

CRAIK, D.J.; FAIRLIE, D.P.; LIRAS, S.; PRICE, D. 2013. The future of peptide-based drugs. **Chemistry. Biology. Drug Development**, **81 (1)**: 136–147.

CRUZ, J.; ORTIZ, C.; GUZMÁN, F.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; TORRES, R. 2014. Antimicrobial peptides: promising compounds against pathogenic microorganisms. **Current Medicinal Chemistry**, **21 (20)**: 2299-2321.

CSORDAS, A.; MICHL, H. 1970. Isolierung und strukturaufklärung eines hämolytisch wirkenden polypeptides aus dem abwehrsekret europäischer unken. **Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly**. **101 (1)**: 182-189.

DIAMOND, G.; BECKLOFF, N.; WEINBERG, A.; KISICH, K.O. 2009. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. **Current Pharmaceutical Design**, **15 (21)**: 2377-2392.

DOLINSKY, T. J.; NIELSEN, J. E.; Mc CAMMON, J. A.; BAKER, N. A. 2004. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup, execution, and analysis of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. **Nucleic Acids Research**, **32 (2)**: 665-667.

EGOROV, T.A; ODINTSOVA, T.I; PUKHALSKY, V.Y; GRISHIN, E.V. 2005. Diversity of wheat anti-microbial peptides. **Peptides**, **26**: 2064-2073.

EL-HALFAWY, O.M.; VALVANO, M. A. 2012. Non-genetic mechanisms communicating antibiotic resistance: rethinking strategies for antimicrobial drug design. **Expert Opinion on Drug Discovery**, **7 (10)**: 923–933.

ESWAR, N.; WEBB, B.; MARTI-RENOM, M.A.; MADHUSUDHAN, M.S.; ERAMIAN, D.; SHEN, M.Y. 2006. Comparative protein structure modeling using MODELLER. **Current Protocol and Procedures Bioinformatics. Protein Science** (Chapter 5).

FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. 2012. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, **25 (4)**: 661-681.

FJELL, C.D.; HISS, J.A.; HANCOCK, R.E.W.; SCHNEIDER, G. 2012. Designing antimicrobial peptides: form follows function. **Nature Reviews Drug Discovery**, **11 (1)**: 37-51.

FOGOLARI, F.; BRIGO, A.; MOLINARI, H. 2002. The Poisson–Boltzmann equation for biomolecular electrostatics: a tool for structural biology. **Journal of Molecular Recognition**, **15 (6)**: 377–392.

FONTENELLE, R.O.S.; MORAIS, S.M.; BRITO, E.H.S.; KERNTOPF, M.R.; BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.N.; TOME, A.R.; QUEIROZ, M.G.R.; NASCIMENTO, N.R.F.; SIDRIM, J.J.C. 2007. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, **59 (5)**: 934–940

FRANCO, O.L.; MURAD, A.M.; LEITE, J.R.; MENDES, PA.; PRATES, M.V.; BLOCH, C. 2006. Identification of a cowpea γ -thionin with bactericidal activity. **FEBS Journal**, **273(15)**: 3489-3497.

FURUYA, E.Y.; LOWY, F.D. 2006. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. **Nature Review Microbiology**, **4 (1)**: 36–45.

GARCIA-OLMEDO, F.; MOLINA, A.; SEGURA, A.; MORENO, M. 1995. The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. **Trends in Microbiology**, **3 (2)**: 72-74

GILLINGS, M.R. 2013 Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome, and microbial pangenome. **Frontiers in Microbiology**, **4**: 1- 10.

GOMIDE, M.S.; LEMOS, F.O.; LOPES, M.T.P.; ALVES, T.M.A.; VICCINI, L.F.; COELHO, C.M. 2013. The effect of the essential oils from five different *Lippia* species on the viability of tumor cell lines. **Rev. Bras. Farmacognosia**, **23 (6)**: 895-902.

GUEDES, F.A.F. 2011. Pirosequenciamento do transcriptoma de folha de *Lippia alba* por meio da plataforma 454 GS Flx (Roche). **Msc. Dissertação, UFJF**.

GURALP, S.A.; MURGH, Y.E.; ROUILLARD, J.M.; GULARI, E. 2013. From Design to Screening: A new antimicrobial peptide discovery pipeline. **PLOS ONE**, **8 (3)**: 59305 - 59312.

GUZMAN, F.; KULCHESKI, F.R.; TURCHETTO-ZOLET, A.C.; MARGIS, R. 2014. De novo assembly of *Eugenia uniflora* L. transcriptome and identification of genes from the terpenoid biosynthesis pathway. **Plant Science**, **229**: 238-246.

GUZMÁN-RODRÍGUEZ, J.J.; OCHOA-ZARZOSA, A.; LÓPEZ-GÓMEZ, R.; LÓPEZ-MEZA, J. 2014. Plant antimicrobial peptides as potential anticancer agents. **BioMed Research International**. Article ID 735087

HARRIS, F.; DENNISON, S.R.; PHOENIX, D.A. 2009. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. **Current Protein and Peptide Science**, **10 (6)**: 585-606.

HENIKOFF, S.; HENIKOFF, J.G. 1992. Amino acid substitution matrices from protein blocks. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **89 (22)**: 10915-10919.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; DERMONT, C.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F. 2006. The essential oil of *Lippia alba*: Analysis of samples from french overseas departments and review of previous works. **Chemistry & Biodiversity**, **3 (10)**: 1116-1125.

HIRATA, I.Y.; CEZARI, M.H.S.; NAKATE, C.R.; BOSCHKOV P.; ITO, A.S.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L. 1994. Internally quenched fluorogenic protease substrates: solid phase synthesis and fluorescence spectroscopy of peptides containing ortho-amino benzoyl/dinitrophenyl groups as donor-acceptor pairs. **Letter Peptide Science**, **1(6)**: 299-308.

HSU, C.H.; CHEN, C.; JOU, M.L.; LEE, A.Y.; LIN, Y.C.; YU, Y.P.; HUANG, W.T.; WU, S.H. 2005. Structural and DNA-binding studies on the bovine antimicrobial peptide, indolicidin: evidence for multiple conformations involved in binding to membranes and DNA. **Nucleic Acids Research**, **33 (13)**: 4053-4064.

JANSEN, G.; AKTIPIIS, C.A. 2014. Resistance is mobile: The accelerating evolution of mobile genetic elements encoding resistance. **Ashdin Publishing Journal of Evolutionary Medicine**, **2**. ID 235873.

JARVIE, T.; HARKINS, T. 2008. Transcriptome sequencing with the genome sequencer FLX system. **Nature Methods**, **5 (9)**: 6-8.

JAYASENA, A.S.; SECCO, D.; BERNATH-LEVIN, K.; BERKOWITZ, O.; WHELAN, J.; MYLNEET, J.S. 2014. Next generation sequencing and de novo transcriptomics to study gene evolution. **Plant Methods**, **10(1)**: 34-47.

JOSHI, S.; BISHT, G.S.; RAWAT, D.S.; MAITI, S.; PASHA, S. 2012. Comparative mode of action of novel hybrid peptide CS-1a and its rearranged amphipathic analogue CS-2a. **FEBS Journal**, **279 (20)**: 3776-3790.

KOIKE, M.; OKAMOTO, T.; TSUDA, S.; RYOSO, I. 2002. A novel plant defensin-like gene of winter wheat is specifically induced during cold acclimation. **Biochemical Biophysical Research Communications**, **298 (1)**: 46–53.

KONNO, K.; RANGEL, M.; OLIVEIRA, J.S.; DOS SANTOS CABRERA; M.P.; FONTANA, R.; HIRATA, I.Y.; HIDE, I.; NAKATA, Y.; MORI, K.; KAWANO, M.; FUCHINO, H.; SEKITA, S.; NETO, J.R. (2007). Decoralin, a novel linear cationic α -helical peptide from the venom of the solitary eumenine wasp *Oreumenes decoratus*. **Peptides**, **28 (12)**: 2320-2327.

KUMAR, P.S; KUMAR, Y.N; PRASAD, U.V; YESWANTH, S; SWARUPA, V; SOWJENYA, G; VENKATESH, K; SRIKANTH, L; RAO, V.K; SARMA, P. V. G. K. 2014. *In silico* designing and molecular docking of a potent analog against *Staphylococcus aureus* porphobilinogen synthase. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, **6(3)**: 158-166.

KUMAR, S.; BLAXTER, M.L. 2010. Comparing de novo assemblers for 454 transcriptome data. **BMC Genomics**, **11 (1)**: 571-583.

LUO, H.; LI, Y.; SUN, C.; WU, Q.; SONG, J.; SUN, Y.; STEINMETZ, A.; CHEN, S. 2010. Comparison of 454-ESTs from *Huperzia serrata* and *Phlegmariurus carinatus* reveals putative genes involved in lycopodium alkaloid biosynthesis and developmental regulation. **BMC Plant Biology**, **10 (1)**: 209-225.

MACHADO, E.; COQUE, T.M.; CANTÓN, R.; SOUSA, J.C.; PEIXE, L. 2013. Commensal Enterobacteriaceae as reservoirs of extended-spectrum betalactamases, integrons, and sul genes in Portugal. **Frontiers in Microbiology**, **4 (80)**: 1 -7.

MANDAL, S.M.; DEY, S.; MANDAL, M.; SARKAR, S.; MARIA-NETO, S.; FRANCO, O.L. 2009. Identification and structural insights of three novel antimicrobial peptides isolated from green coconut water. **Peptides**, **30 (40)**: 633–637.

MARDIS, E.R. 2008. Next-Generation DNA sequencing methods. **Annu. Rev. Genomics Human Genetics**, **9**: 387-402.

MARGUERAT, S.; BÄHLER, J. 2010. RNA-seq: from technology to biology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, **67 (4)**: 569–579.

MARTIN, E.C.; MICHEL, A.; RAYNAL, B.; BADIOU, C.; LAURENT, F.; VANDENESCH, F.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J.; LINA, G.; DUMITRESCU, O. 2015. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300 resists staphylococcal protein A modulation by antibiotics and antimicrobial peptides. **International journal of antimicrobial agents**, **45 (1)**: 19-24.

MELO, F.; SÁNCHEZ, R.; SALI, A. 2002. Statistical potentials for fold assessment. **Protein Science**, **11 (2)**: 430–448.

METZKER, M.L. 2010. Sequencing technologies: the next generation. **Nature Reviews Genetics**, **11 (1)**: 31-46.

MONTESINOS, E. 2007. Antimicrobial peptides and plant disease control. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, **270 (1)**: 1 –177.

MORALEJO, F.J.; CARDOZA, R.E.; GUTIERREZ, S.; MARTÍN, J.F. 1999. Thaumatin production in *Aspergillus awamori* by use of expression cassettes with strong fungal promoters and high gene dosage. **Applied Environmental Microbiology**, **65 (3)**: 1168-1174.

MOREIRA, J.S.; ALMEIDA, R.G.; TAVARES, L.S.; SANTOS, M.O.; VICCINI, L.F.; VASCONCELOS, I.M.; OLIVEIRA, J.T.A.; RAPOSO, N.R.B.; DIAS, S.M.; FRANCO, O.L. 2011. Identification of Botryticidal Proteins with Similarity to NBS–LRR Proteins in Rosemary Pepper (*Lippia sidoides* Cham.) Flowers. *Protein Journal*, **30 (1)**: 32–38.

MOROZOVA, O.; MARRA, M.A. 2008. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. **Genomics**, **92 (5)**: 255-264.

MORRIS, A.L.; MACARTHUR, M.W.; HUTCHINSON, E.G.; THORNTON, J.M. 1992. Stereochemical quality of protein structure coordinates. **Proteins**, **12**: 345–364.

MU, H.N.; LI, H.G.; WANG, L.G.; YANG, X.L.; Sun, T.Z.; XU, C. 2014. Transcriptome sequencing and analysis of sweet osmanthus (*Osmanthus fragrans* Lour.). **Genes Genomics**, **36 (6)**: 777-788.

NATARAJAN, P.; PARANI, M. 2011 De novo assembly and transcriptome analysis of five major tissues of *Jatropha curcas* L. using GS FLX titanium platform of 454 pyrosequencing. **BMC Genomics**, **12 (2)**: 191-202.

NATORI, S. 1994. Function of antimicrobial proteins in insects. **Antimicrobial Peptide**, **186**: 123-132.

PADOVEZE, M.C.; FORTALEZA, C.M.C.B. 2014. Infecções relacionadas à assistência à saúde. **Revista de Saúde Pública**, **48 (6)**: 995-1001

PARACHIN, N.S.; FRANCO, O.L. 2014. New edge of antibiotic development. **Frontier in Microbiology**, **5 (147)**: 1-2.

PARSUPULETI, M.A.; SCHMIDTCHEN, M.M. 2012. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. **Critical Reviews in Biotechnology**, **32 (2)**: 143–171.

PELEGRINI, P.A.; QUIRINO, B.F.; FRANCO, O.L. 2007. Plant cyclotides: An unusual class of defense compounds. **Peptides**, **28 (7)**: 1475–1481.

PELEGRINI, P.B.; MURAD, A.M.; SILVA, L.P.; SANTOS, R.C.P.; COSTA, F.T.; TAGLIARI, P.D.; BLOCH, C.J.; NORONHA, E.L.; MILLER, R.N.G.; FRANCO, O.L. 2008. Identification of a novel storage glycine-rich peptide from guava (*Psidium guajava*) seeds with activity against gram-negative bacteria. **Peptides**, **29 (8)**:1271-9.

PESCHEL, A.; SAHL, H.G. 2006. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. **Nature Reviews Microbiology**, **4 (7)**: 529- 536.

PUSHPANATHAN, M.; PARAMASAMY, G.; JEYAPRAKASH, R. (2013). Antimicrobial Peptides: versatile biological properties. *International journal of peptides*, ID 675391.

QUINTÃO, C.C.R. 2009. Evaluation *in vitro* of the antimicrobial activity and citotoxicity of natural substances against microorganisms that cause bovine mastites. **Msc. Dissertação, UFJF**.

RAMACHANDRAN, G.N.; SASISEKHARAN, V. 1968. Conformations of polypeptides and proteins. **Advances in Proteins Chemistry**, **23**: 283-437.

RASK, L.; ANDRÉASSON, E.; EKBOM, B.; ERIKSSON, S.; PONTOPPIDAN, B.; MEIJER, J. 2010. Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. **In Plant Molecular Evolution**, **42**: 93-113.

RIVILLAS-ACEVEDO, L.A.; SORIANO-GARCÍA, M. 2007. Isolation and biochemical characterization of an antifungal peptide from *Amaranthus hypochondriacus* seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **55 (25)**: 10156–10161.

RUFINO, E.R; SIQUEIRA, W.J; MARQUES, M.O.M; COLOMBO, C.A; AZEVEDO FILHO, J.A; MARTINS, A.L.M. 2012. Selection of new clones of linalool chemotype from genetic recombination in *Lippia alba*. **Bragantia**, **71 (2)**: 155-164.

SAHOO, B.R; SWAIN, B; BASU, M; PANDA, P; MAITI, N.K; SAMANTA, M. 2012. 3D modeling and molecular dynamics simulation of an immune-regulatory cytokine, interleukin-10, from the Indian major carp, *Catla catla*. **Journal of molecular modeling**, **18(5)**: 1713-1722.

SALI, A.; BLUNDELL, T.L. 1993. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of Molecular Biology**, **234 (3)**: 779-815.

SALIMENA, F.R.G. 2000. Revisão taxonômica de *Lippia* sect. *Rhodolippia* Schauer (Verbenaceae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Brasil **D.Sc. Thesis. Universidade de São Paulo**.

SALIMENA, F.R.G. 2010. Uma nova espécie de *Lippia* L. (Verbenaceae) do cerrado brasileiro. **Acta Botânica Brasileira**, **24 (1)**: 232-234.

SANTANA, M.J.; DE OLIVEIRA, A.L.; JÚNIOR, L.H.Q.; MANDAL, S.M.; MATOS, C.O.; DIAS, R.D.O.; Franco, O.L.; LIÃO, L.M. 2015. Structural insights into Cn-AMP1, a short disulfide-free multifunctional peptide from green coconut water. **FEBS letters**, **589 (5)**: 639-644.

SEGURA, A.; MORENO, M.; MADUEÑO, F.; MOLINA, A.; GARCÍA-OLMEDO, F. 1999. Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. **Molecular Plant Microbe Interaction**, **12 (1)**: 16–23.

SEO, M.D.; WON, H.S.; KIM, J.H.; MISHIG-OCHIR, T.; LEE, B.J. 2012. Antimicrobial peptides for therapeutic applications: A review. **Molecules**, **17 (10)**: 12276-12286.

SHEN, M.Y.; SALI, A. 2006. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. **Protein Science**, **15 (11)**: 2507-2524.

SHI, G.; HUANG, F.; GONG, Y.; XU, G.; YU, J.; HU, Z.; CAI, Q.; YU, D. 2014. RNA-Seq analysis reveals that multiple phytohormone biosynthesis and signal transduction pathways are reprogrammed in curled-cotyledons mutant of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. **BMC genomics**, **15 (1)**: 510-523.

SILVA, O.N.; PORTO, W.F.; MIGLIOLO, L.; MANDAL, S.M.; GOMES, D.G.; HOLANDA, H.H.S.; SILVA, R.S.P.; DIAS, S.C.; COSTA, M.P.; COSTA, C.R.; SILVA, REZENDE, T.; FRANCO, O.L. 2012. Cn-AMP-1: A new promiscuous peptide with potential for microbial infections treatment. **Biopolymers**, **98 (4)**: 322-331.

SILVA, P.M.; GONÇALVES, S.; SANTOS, N.C. 2014. Defensins: antifungal lessons from eukaryotes. **Frontiers in Microbiology**, **5 (97)**: 1-17.

SINGULANI, J.L.; SILVA, P.S.; RAPOSO, N.R.B.; DE SIQUEIRA, E.P.; ZANI, C.L.; ALVES, T.M.A.; VICCINI, L.F. 2012. Chemical composition and antioxidant activity of *Lippia* species. **Journal of Medicinal Plants Research**, **6 (27)**: 4416-4422.

SIVERTSEN, A.; ISAKSSON, J.; LEIROS, H. K. S.; SVENSON, J.; SVENDSEN, J. S.; BRANDSDAL, B. O. 2014. Synthetic cationic antimicrobial peptides bind with their hydrophobic parts to drug site II of human serum albumin. **BMC structural biology**, **14(1)**: 4 -18.

STONE, J.D.; STORCHOVA, H. 2014. The application of RNA-seq to the comprehensive analysis of plant mitochondrial transcriptomes. **Molecular Genetics and Genomics**, **290 (1)**: 1-9.

STYCZYNSKI, M. P.; JENSEN, K. L.; RIGOUTSOS, I.; STEPHANOPOULOS, G. 2008. BLOSUM62 miscalculations improve search performance. **Nature Biotechnology**, **26 (3)**: 274-275.

SUMATHI, K.; ANANTHALAKSHMI, P.; ROSHAN, M. N. A. M.; SEKAR, K. 2006. 3dss: 3-dimensional structural superposition. **Nucleic Acids Research**, **34 (2)**: 128–134.

SWARBRECK, S.M.; LINDQUIST, E.A.; ACKERLY, D.D.; ANDERSEN, G.L. 2011. Analysis of leaf and root transcriptomes of soil-grown *Avena barbata* plants. **Plant and Cell Physiology**, **52 (2)**: 317–332.

TAVARES, L.S.; RETTORE, J.V.; FREITAS, R.M.; PORTO, W.F.; DO NASCIMENTO DUQUE, A.P.; DE LACORTE SINGULANI, J.; SILVA, O.N.; DETONI, M.L.; VASCONCELOS, E.G.; DIAS, S.C.; FRANCO; O.L.; SANTOS, M. O. 2012. Antimicrobial activity of recombinant Pg-AMP1, a glycine-rich peptide from guava seeds. **Peptides**, **37 (2)**: 294-300.

TAVARES, L.S.; SANTOS M.O.; VICCINI, L.F.; MOREIRA, J.S.; MILLER, R.N.G.; FRANCO, O.L. 2008. Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers. **Peptides**, **29 (10)**: 1842–1851.

TAVARES, L.S.; SILVA, C.F.S.; SOUZA, V.C.; SILVA, V.L.; DINIZ, C.G.; SANTOS, M.O. 2013. Strategies and molecular tools to fight antimicrobial resistance: resistome, transcriptome, and antimicrobial peptides. **Frontiers in Microbiology**, **4 (412)**: 1-11.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,

position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, **22 (22)**: 4673-4680.

TIMÓTEO, P.; KARIOTI, A.; LEITÃO, S.G.; VINCIERI, F.F.; BILIA, A.R. 2015. A validated HPLC method for the analysis of herbal teas three chemotypes of Brazilian *Lippia alba*. **Food Chemistry**, **175**: 366-373.

TORCATO, I.M.; HUANG, Y.H.; FRANQUELIM, H.G.; GASPAR, D.; CRAIK, A.J.; CASTANHO, M.A.R.B.; HENRIQUES, S.T. 2013. Design and characterization of novel antimicrobial peptides, R-BP100 and RW-BP100, with activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta** **1828 (3)**: 944–955.

VICCINI, L.F.; PIERRE, P. M. O.; PRAÇA, M. M.; SOUZA DA COSTA, D.; DA COSTA ROMANEL, E.; DE SOUSA, S.; PEREIRA PEIXOTO, P. H.; GONÇALVES SALIMENA, F. R. 2005. Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**. **256 (1-4)**: 171-178.

WALL, P.K.; LEEBENS-MACK, J.; CHANDERBALI, A.S.; BARAKAT, A.; WOLCOTT, E.; LIANG, H.; LANDHERR, L.; TOMSHO, L.P.; HU, Y.; CARLSON, J.E.; MA, H.; SCHUSTER, S.C.; SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; ALTMAN, N.; PAMPHILIS, C.W. 2009. Comparison of next generation sequencing technologies for transcriptome characterization. **BMC Genomics**, **10 (1)**: 347-366.

WANG, M.; WANG, Y.; WANG, A.; SONG, Y.; MA, D.; YANG, H.; MA, Y.; LAI, R. 2010. Five novel antimicrobial peptides from skin secretions of the frog, *Amolops loloensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, **155 (1)**: 72-76.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M.J. 2007. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, **35 (2)**: 407–410.

WIMLEY, W.C. 2010. Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. **ACS Chemistry Biology**; **5 (10)**: 905–917.

WOOLLARD, P.M.; MEHTA, N.A.L.; VAMATHEVAN, J.J.; HORN, S.V.; BONDE, B.K.; DOW, D.J. 2011. The application of next-generation sequencing technologies to drug discovery and development. **Drug Discovery Today**, **16**, (11): 512- 519.

XIAO, M.; ZHANG, Y.; CHEN, X.; LEE, E.J.; BARBER, C.J.S.; CHAKRABARTY, R.; DESGAGNÉ-PENIX, I.; HASLAM, T.M.; KIM, Y.B.; LIU, E.; MAC NEVIN, G.; MASADA-ATSUMI, S.; REED, D.W.; STOUT, J.M.; ZERBE, P.; ZHANG, Y.; BOHLMANN, J.; COVELLO, P.S.; DE LUCA, V.; PAGE, J.E.; RO, D.K.; BOHLMANN, V.J.J.; FACCHINI, P.J.; SENSENM, C.W. 2013. Transcriptome analysis based on next-generation sequencing of non-model plants producing specialized metabolites of biotechnological interest. **Journal of Biotechnology**, **166** (3): 122-134.

YANG, H.; WAN, L.; XIAOWEI, L.; CAI, L.; CHEN, L.; LI, S.; LI, Y.; CHENG, J.; LU, X. 2007. High level expression of His-tagged colicin 5 in E. coli and characterization of its narrow-spectrum bactericidal activity and pore-forming action. **Protein Expression and Purification**, **54** (2): 309–317.

ZUCCA, M.; SCUTERA, S.; SAVOIA D. 2011. Antimicrobial Peptides: New Frontiers in the Therapy of Infections. Drug Development - A Case Study Based Insight into Modern Strategies. **INTECH Open Access Publisher**, **6**: 123 – 164.

8. ANEXO A – Artigo de Revisão - Strategies and molecular tools to fight antimicrobial resistance: resistome, transcriptome, and antimicrobial peptides

9. ANEXO B: Tutorial Modelagem