



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LÍVIA LEITÃO CARDOSO

META-ANÁLISE DE REDES METABÓLICAS DE PLANTAS SOB DIFERENTES
CONDIÇÕES DE ESTRESSE

FORTALEZA
2022

LÍVIA LEITÃO CARDOSO

META-ANÁLISE DE REDES METABÓLICAS DE PLANTAS SOB DIFERENTES
CONDIÇÕES DE ESTRESSE

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em
Biotecnologia do Centro de Ciências da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção
de grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Danilo de Menezes Daloso

Co-orientador: Msc. Francisco Bruno Silva Freire

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C264m Cardoso, Livia Leitão.
 Meta-análise de redes metabólicas de plantas sob diferentes condições de estresse / Livia Leitão Cardoso. –
 2022.
 53 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
 Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2022.
 Orientação: Prof. Dr. Danilo de Menezes Daloso.
 Coorientação: Prof. Me. Francisco Bruno Silva Freire.
1. Metabolômica. 2. Estresse. 3. Topologia. 4. Biologia de Sistemas. I. Título.
- CDD 661
-

LÍVIA LEITÃO CARDOSO

META-ANÁLISE DE REDES METABÓLICAS DE PLANTAS SOB DIFERENTES
CONDIÇÕES DE ESTRESSE

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em
Biotecnologia do Centro de Ciências da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção
de grau de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: 03/02/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Danilo de Menezes Daloso (Orientador)
Universidade Federal do Ceará

Dra. Priscila Ariane Auler
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Nicholas Costa Barroso Lima
Universidade Federal do Ceará

FORTALEZA

2022

AGRADECIMENTOS

A Jesus que me lembra todo dia que não estou só nesse mundo de provas e expiações.

À minha família que esteve comigo em todas as minhas etapas do curso, apoiando todos os meus projetos e ideias, principalmente minha mãe Vera, meu pai Werther e meu irmão Bryan. Sem eles eu não estaria aqui.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de Iniciação Científica.

À Universidade Federal do Ceará pelo suporte em infraestrutura e apoio durante esses 5 anos.

Ao professor Danilo Daloso que acreditou no meu potencial e me deu a oportunidade de trabalhar e crescer em um grupo de pesquisa de grande renome. Vou estar para sempre agradecida pelo apoio tanto acadêmico como pessoal.

Ao Bruno por ser um coorientador tão gentil e paciente com o meu processo de aprendizagem.

A todos os meus professores do curso, especialmente a Profa. Cristina, Profa. Márjory, Prof. Hermógenes e Prof. André que me guiaram durante as minhas atividades de extensão e projetos que me fizeram crescer academicamente e pessoalmente.

Ao Gilmar, por sempre estar disposto a ajudar os alunos até nos dias de apertado e pelo trabalho incrível junto à Coordenação da Biotecnologia UFC, onde nunca deixou a desejar.

Aos meus amigos da turma 8 de Biotecnologia da UFC, principalmente Gabrielle, Maria Eduarda, Caio, Ítalo, Finger e Bruno, que sempre vão estar comigo nas melhores lembranças, na união em tempos difíceis e aulas práticas com boas risadas.

Aos meus veteranos do curso de Biotecnologia da UFC, principalmente Symon, Lucas Romão, Agna e João Neto que sempre me acolheram e fizeram essa experiência e aprendizado ser mais leve e segura.

A todos os meus amigos e parceiros da Companhia de Dança da UFC (CIA da UFC) junto ao IEFES e SECULT-ARTE, especialmente ao Miguel, à Sabrina, à Yara, à Nayane, à Natascha, ao Jojo, à Tamara e a prof. Tati, pelo apoio através da arte e da dança, que foi fundamental para a minha jornada e descobrimento pessoal. A dança por quase 3 anos foi o que me sustentou em momentos de insegurança e me faz lembrar que temos que alimentar nossa alma com qualquer tipo de movimento, sempre!

Ao Podcast Biotec em Pauta e todos os seus membros, principalmente à Flávia, ao Anderson e ao Gabriel, que surgiu de tempos sombrios no começo da pandemia de 2020 e me

deu a oportunidade de trabalhar divulgando a ciência e a Biotecnologia com grandes amigos e estudantes na área, despertando também habilidades e ideais antes não exploradas.

Aos meus alunos-amigos Alexandre e Lucy que fiz durante minhas aventuras compartilhando e trocando experiências sobre a língua inglesa. Vocês acreditaram em mim de olhos fechados e me deram a confiança e a força que eu precisava para mudar a perspectiva da minha vida completamente.

À Beatriz Brasileiro que esteve presente em todas as minhas fases e foi crucial para o meu desenvolvimento pessoal e sempre ouvia os meus desabafos nos dias difíceis.

À minha terapeuta Janaina que me mostrou que o mundo é muito maior e mais simples do que eu pensava e me ajudou durante os períodos de crise, descontentamento e quando eu me sentia perdida.

RESUMO

Devido a necessidade de se obter genótipos com tolerância aos estresses abióticos, a resposta do metabolismo de plantas sob condições de estresse tem sido largamente estudada. Porém, a visão holística e integrativa dos dados para analisar propriedades em escala de redes e distinguir componentes com maior robustez para sobreviver ao meio adverso é escassa. Neste sentido, o objetivo principal deste trabalho foi analisar as mudanças na topologia e padrões de conectância das redes metabólicas de plantas sob condições de estresse. Para isso, realizamos uma meta-análise usando oito trabalhos previamente publicados que possuem dados de metabolômica sob condições de estresse por déficit hídrico, baixa temperatura, excesso de sal, ou limitação de nitrogênio. Os dados foram obtidos e analisados usando os softwares Cytoscape, para a criação de redes de correlação, e MetaboAnalyst, para análises multivariadas via PLS-DA (*Partial Least Square Discriminate Analysis*) e de biomarcadores. Os dados obtidos nas plantas sob estresse foram comparados com plantas na ausência de estresse, com intuito de: (i) analisar se o aparecimento de hubs é uma resposta comum em redes metabólicas de plantas sob estresse; (ii) identificar quais metabólitos possuem alto grau de conectância nas redes metabólicas de plantas na ausência e presença de condições de estresse; (iii) analisar a capacidade da análise PLS-DA em separar plantas na ausência ou presença de estresse; (iv) identificar padrões de resposta metabólica comum a diferentes tipos de estresse; (v) verificar as semelhanças e diferenças das informações obtidas das análises PLS-DA e de redes metabólicas. Os resultados demonstraram que a análise de PLS-DA é capaz de distinguir claramente plantas sob estresse de seus respectivos grupos controles usando dados de perfil metabólico. No entanto, não houve um padrão claro no que concerne aos parâmetros obtidos nas análises de redes metabólicas. Enquanto algumas espécies apresentaram diminuição na densidade da rede, outras, sob diferente tipo de estresse, ou até mesmo a mesma espécie sob o mesmo tipo, mas diferente nível de estresse, tiveram aumento neste parâmetro. Interessantemente, o cálculo do número de hubs de uma rede, recentemente estabelecido em nosso grupo, foi positivamente e negativamente correlacionado com a densidade ($r = 0.90$; $P < 0.001$) e a heterogeneidade ($r = -0.59$; $P = 0.014$) da rede, respectivamente. Isso demonstra o poder deste parâmetro, que, além de fornecer informações sobre a conectância e topologia da rede, ressalta quais hubs (metabólitos) mais influenciam a topologia da mesma. Compilando juntamente as hubs, a análise de biomarcadores e os metabólitos que mais contribuíram para a separação na análise de PLS-DA, nosso trabalho identificou quais metabólitos são possíveis marcadores de estresse em plantas, dentre os quais destaca-se asparagina, aminoácidos (Val, Ile, Leu, Gly, Phe e Trp), açúcares

(frutose e raffinose) e shikimato. Tomados em conjunto, nossa meta-análise fornece uma estratégia de análise de dados sistêmica para análise de dados de perfil metabólico de plantas sob estresse, em que diferentes ferramentas são utilizadas para identificar marcadores metabólicos, sendo possível sua extensão para áreas não relacionadas à biologia vegetal.

Palavras-chave: metabolômica; estresse; topologia; biologia de sistemas

ABSTRACT

Due to the need to obtain genotypes with tolerance to abiotic stress, the metabolic response of plants under stress conditions has been widely studied. However, a holistic and integrative view of data to analyse proprieties at network scale and to distinguish components with greater robustness to survive adverse environment is scarce. In this context, the main objective of this study was to analyse the changes in topology and connectivity of metabolic networks of plants under stress conditions. Thereunto, we carried out a meta-analysis using eight previously published works that contain metabolomics data under different stress conditions such as water deficit, low temperature, salt excess, or nitrogen limitation. The data was obtained and analysed using the Cytoscape software, for the creation of correlation-based networks, and MetaboAnalyst, for multivariate analysis via PLS-DA (*Partial Least Square Discriminate Analysis*) and biomarker analysis. The data obtained of plants under stress were compared to plants in the absence of stress, in order to: (i) analyse if the appearance of hubs is a common response in metabolic networks of plants under stress; (ii) identify which metabolites have high degree of connection in metabolic networks of plants in absence and presence of stress conditions; (iii) analyse the capacity of PLS-DA in separating plants in absence and presence of stress; (iv) identify common metabolic responses to different stress conditions; (v) verify the similarities and differences among PLS-DA and metabolic network analyses. The results demonstrated that PLS-DA is capable to distinguish plants under stress from its respective control groups using metabolite profiling data. However, there was no clear pattern regarding the parameters obtained in the analysis of metabolic networks. Whilst some species presented a decrease in network density, others, under different stress condition, had an increase in this parameter. Interestingly, the calculation of the number of hubs in a network, recently established in our group, was positively and negatively correlated with network density ($R^2 = 0.90$; $P < 0.001$) and heterogeneity ($R^2 = -0.59$; $P = 0.014$), respectively. This highlights the power of this parameters that, in addition to providing information about network density and topology, it also highlights which hubs (metabolites) have great influence on the network topology. Taking together the hubs, biomarker analyses and the metabolites that most contributed to the separation in PLS-DA, our work identified which metabolites are possible stress markers in plants, among which stands out asparagine, amino acids (Val, Ile, Leu, Gly, Phe and Trp), sugars (fructose and raffinose) and shikimate. Taken together, our meta-analysis provides a systemic data analysis approach for analyzing metabolite profiling data from plants

under stress, in which different tools are used to identify metabolic markers, being possible its extension to areas unrelated to plant biology.

Keywords: metabolomics; stress; topology; systems biology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fluxograma com passo a passo da metodologia desde a pesquisa dos artigos até a análise integrativa.	25
Figura 2	<i>Partial least squares- discriminant analysis</i> (PLS-DA) e <i>variable importance in projection</i> (VIP) scores obtidos da análise de dados metabolômicos de controle x seca suave x seca moderada x seca semi-severa x seca severa para <i>Oryza sativa</i> L.	
Figura 3	Redes metabólicas de correlação usando dados do perfil metabólico primário de <i>Oryza sativa</i> L. sob déficit hídrico.	25
Figura 4	<i>Partial least squares- discriminant analysis</i> (PLS-DA) (A) e <i>variable importance in projection</i> (VIP) scores obtidos da análise de dados metabolômicos de controle (WW) x déficit hídrico (WD) para <i>Vitis vinifera</i> L. Grenache.	28
Figura 5	Redes metabólicas de correlação usando dados do perfil metabólico primário de <i>Vitis vinifera</i> L. Grenache sob condições de controle e déficit hídrico (DH).	28
Figura 6	<i>Partial least squares- discriminant analysis</i> (PLS-DA) e <i>variable importance in projection</i> (VIP) scores obtidos da análise de dados metabolômicos de controle x seca moderada x seca severa de cana de açúcar.	30
Figura 7	Redes metabólicas de correlação usando dados do perfil metabólico primário de cultivares de cana de açúcar sob condições de controle, seca moderada e seca severa.	30
Figura 8	<i>Partial least squares- discriminant analysis</i> (PLS-DA) e <i>variable importance in projection</i> (VIP) scores obtidos da análise de dados metabolômicos de controle x 1 ciclo déficit hídrico x 2 ciclos déficit hídrico x re-irrigação (controle) x 1 ciclo de déficit hídrico e re-irrigação x 2 ciclos de déficit hídrico e re-irrigação para <i>Arabidopsis thaliana</i> .	32
Figura 9	Redes metabólicas de correlação usando dados do perfil metabólico primário de <i>Arabidopsis thaliana</i> com controle, 1 ciclo de seca, 2 ciclos de seca, re-irrigação controle, 1 ciclo re-irrigação com seca e dois ciclos re-irrigação com seca.	33

Figura 10	<i>Partial least squares- discriminant analysis</i> (PLS-DA) (A) e <i>variable importance in projection</i> (VIP) scores obtidos da análise de dados metabolômicos de 25°C e 10°C para Eucalipto.	36
Figura 11	Redes metabólicas de correlação usando dados do perfil metabólico primário de <i>E. globulus</i> e <i>E. glandi</i> sob condições de temperatura a 25°C e estresse térmico a 10°C.	36
Figura 12	<i>Partial least squares- discriminant analysis</i> (PLS-DA) (A) e <i>variable importance in projection</i> (VIP) scores obtidos da análise de dados metabolômicos de <i>Egletes viscosa</i> sob condições de controle x 40mM NaCl x 80mM NaCl.	37
Figura 13	Redes metabólicas de correlação usando dados do perfil metabólico primário de <i>Egletes viscosa</i> sob condições de controle, controle, 40mM de NaCl e 80mM de NaCl.	38
Figura 14	<i>Partial least squares- discriminant analysis</i> (PLS-DA) e <i>variable importance in projection</i> (VIP) scores obtidos da análise de dados metabolômicos de soja sob condições de controle x seca moderada x seca severa x re-irrigação.	40
Figura 15	Redes metabólicas de correlação usando dados do perfil metabólico primário de soja sob condições de controle, seca moderada, seca severa e re-irrigação.	41
Figura 16	<i>Partial least squares- discriminant analysis</i> (PLS-DA) e <i>variable importance in projection</i> (VIP) scores obtidos da análise de dados metabolômicos de cana de açúcar sob condições de controle x N 0% x N 30%.	43
Figura 17	Redes metabólicas de correlação usando dados do perfil metabólico de cana de açúcar sob condições de controle(A), nitrogênio 0%(B) e nitrogênio 30% (C).	44
Figura 18	Diagrama de Venn com metabólitos em comum para Biomarcadores, Hubs e VIP scores de Eucalipto no tratamento com frio.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Artigos pesquisados nos bancos de dados com título, espécie(s) e estresse analisado.	17
Tabela 2	Artigos escolhidos contendo dados de metabolômica, as espécies utilizadas e o tipo de estresse analisado	20
Tabela 3	Parâmetros de rede para o coeficiente r com controle e os 4 tratamentos envolvendo concentrações de água no solo para <i>Oryza sativa</i> L.	25
Tabela 4	Parâmetros de rede para o coeficiente r com condições de controle e déficit hídrico para <i>Vitis vinífera</i> L. Grenache.	27
Tabela 5	Parâmetros de rede para o coeficiente r com condições de controle, seca moderada e seca severa para cultivar de cana de açúcar.	30
Tabela 6	Parâmetros de rede para o coeficiente r com condições de controle, 1 ciclo de seca, 2 ciclos de seca, re-irrigação, 1 ciclo de re-irrigação com seca e 2 ciclos de re-irrigação com seca para <i>Arabidopsis thaliana</i> .	34
Tabela 7	Parâmetros de rede para o coeficiente r sob condições de 25°C e 10°C para eucalipto.	36
Tabela 8	Parâmetros de rede para o coeficiente r com tratamentos para <i>Egletes viscosa</i> .	38
Tabela 9	Parâmetros de rede para o coeficiente r com tratamentos para soja sob déficit hídrico.	41
Tabela 10	Parâmetros de rede para o coeficiente r com tratamentos para cana de açúcar sob limitação de nitrogênio.	43
Tabela 11	Metabólitos com intersecções para aparência nas análises Biomarkers, Hubs e VIP scores, o estresse e o tipo de metabolismo.	47

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

CNPQ - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DSPC - *Debiased Sparse Partial Correlation*

N - Nitrogênio

SMP - Potencial Matricial do Solo

Sds - Estresse Severo de Desidratação

PLS-DA - *Partial least squares- discriminant analysis*

VIP - *Variable importance in projection*

DH - Déficit hídrico

WW - Well watered

WD - Water deficit

HCL - *Hierarchical clustering analysis*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 HIPÓTESE.....	16
3 OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo Geral	16
3.2 Objetivos Específicos.....	16
4 METODOLOGIA.....	16
4.1 Tipo de Estudo	16
4.2 Obtenção de dados.....	17
4.3 Análise das redes metabólicas	19
4.4 Análise estatística multivariada	20
5 RESULTADOS	211
5.1 Caracterização dos estudos.....	21
5.2 Arroz sob déficit hídrico	233
5.3 Videira sob déficit hídrico.....	26
5.4 Cana de açúcar sob déficit hídrico	288
5.5 <i>Arabidopsis thaliana</i> sob déficit hídrico	3030
5.6 Eucalipto sob estresse térmico	333
5.7 <i>Egletes viscosa</i> sob estresse salino.....	355
5.8 Soja sob déficit hídrico	377
5.9 Cana de açúcar sob limitação de nitrogênio	4040
5.10 Análise integrativa dos dados de biomarkers, hubs e VIP scores	422
6 DISCUSSÃO	455
7 CONCLUSÃO.....	477
REFERÊNCIAS	488

1 INTRODUÇÃO

Diante do quadro de mudanças climáticas e crescimento populacional, o estudo das respostas das plantas à fatores promotores de estresse abióticos torna-se fundamental para suprir a necessidade global de aumentar a produtividade de espécies com grande importância econômica e biotecnológica (BIRAMI et al., 2020). Dito isso, é de extrema importância expandir horizontes sobre a resposta das plantas às mudanças ambientais, como a deficiência hídrica e o extremo calor, que tornam o cultivo de espécies mais sensíveis à essas condições difíceis e desafiadoras (FÀBREGAS & FERNIE, 2019). Para isso, análises sistêmicas tendem a romper as barreiras impostas pelas análises reducionistas por fornecer uma visão holística dos processos que regulam a tolerância ao estresse (MEDEIROS et al., 2015; G. M. SOUZA et al., 2016).

Ao se enfatizar a intensa demanda por alimentos primários, percebe-se que estão se esgotando os recursos disponíveis, pois a revolução verde está chegando no seu limite. Por isso é importante encontrar novas estratégias para melhorar a produtividade vegetal em um ambiente altamente estressante (EVANS, LAWSON, 2020). Contudo, para entender os mecanismos que regulam as respostas ao estresse das plantas, é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias que melhorem o cultivo e a tolerância ao estresse por meio da engenharia metabólica, biologia sintética e/ou domesticação *de novo* de parentes selvagens. Porém, infelizmente, o conhecimento sobre respostas ao estresse de planta tem sido limitado por não considerar a regulação em uma perspectiva sistêmica (SWEETLOVE, FERNIE, 2005; SOUZA et al., 2016; NETO et al., 2021). O entendimento sobre estrutura e topologia de redes metabólicas de plantas é bem escasso, o que explica a falta de sucesso em obter cultivares tolerantes ao estresse.

A visão holística e integrativa de dados é um dos grandes avanços da era pós sequenciamento dos genomas humano e de *Arabidopsis*, que impulsionou a pesquisa científica a comparar e relacionar dados de diferentes níveis e/ou com dinâmicas temporais complexas (MITCHELL, 2006). Com o advento da biologia de sistemas e do estabelecimento de diferentes softwares para elaboração de redes, conseguiu-se estabelecer um grafo de nós e linhas, que exemplifica as interações de elementos, como genes, proteínas ou metabólitos. Nós, também chamados de vértices, podem ser direcionados, especificando um começo (ponto de partida) e um fim (ponto de chegada), utilizados para representar o fluxo de um material de um substrato a um produto, e não-direcionados, utilizados para representar interações mútuas, como em uma rede de interação entre metabólitos (ALBERT et al., 2005). O grau de conectância dos nós da rede determinam sua topologia. Neste sentido, redes biológicas são majoritariamente do tipo

“scale-free” (redes de escala livre), as quais a distribuição do número de links por hub segue uma probabilidade do tipo “power law” (BARABÁSI & OLTVAI, 2004). Essas redes são caracterizadas por ter poucos nós altamente conectados, denominados hubs, que parecem ter um papel central na regulação da rede (JEONG et al., 2001).

Embora o conhecimento sobre a dinâmica das redes de escala livre de microorganismos seja bem avançado, estudos sobre redes metabólicas de plantas são ainda insuficientes. Visto o papel central do metabolismo vegetal na resposta de plantas sob estresse, entender a robustez das redes metabólicas vegetais é essencial para melhor compreender como as plantas se aclimatam e toleram fatores de estresse (SWEETLOVE & FERNIE, 2005). A robustez da rede descreve como as redes se mantêm conservadas em um estado funcional com erros e falhas (HARTWELL et al., 1999). Em teoria, as hubs são menos toleráveis às mudanças do que nós menos conectados (ALBERT et al., 2001). Consequentemente, identificar metabólitos que apresentam mais linhas conectadas com outros metabólitos, ou seja, que são hubs dentro da rede metabólica, pode ser útil para desvendar como plantas se aclimatam às mudanças do meio (SWEETLOVE, et al. 2005). No entanto, embora as hubs são primordiais para a sobrevivência de leveduras e outros microorganismos (JEONG et al., 2001), evidências ressaltam que hubs de redes de plantas não são essenciais para o organismo, uma vez que estes possuem um espectro maior de genes e proteínas que atuam de forma redundante e/ou compensatória (P. V. L. SOUZA et al., 2019). Portanto, não está claro se há uma correlação entre as hubs das redes metabólicas vegetais e o grau de importância deste nó para o organismo. Ademais, evidências ressaltam que a rede fotossintética (construída com parâmetros fisiológicos relacionados à fotossíntese) se torna mais densa sob estresse, ou seja, com maior conectividade entre os nós (DALOSO et al., 2014; G. M. SOUZA et al., 2004, 2005, 2009). No entanto, não está claro se o mesmo se aplica para a rede metabólica.

Diante do supra-exposto, entende-se ser pertinente investigar como a topologia e a conectividade de redes metabólicas são alteradas quando plantas são submetidas às condições de estresse. Embora a identificação de metabólitos com potencial biomarcador para fatores de estresse seja altamente relevante, diversos estudos utilizam como objeto de pesquisa apenas uma espécie vegetal e/ou um tipo de estresse. Como forma de romper essa barreira reducionista, as meta-análises surgem como um importante recurso na busca de marcadores de estresse e para melhorar nosso entendimento sobre como as plantas se aclimatam ao estresse. Neste sentido, realizamos uma revisão bibliográfica de artigos com dados de perfil metabólico previamente publicados de *Arabidopsis*, arroz, videira, café, soja e cana de açúcar sob estresse hídrico, eucalipto sob estresse térmico, cana de açúcar sob inanição de nitrogênio (N), e *Egletes viscosa*

(L.) sob estresse salino. Dados de perfil metabólico foram utilizados para construir redes metabólicas, o que permitiu investigar como a imposição do estresse altera a topologia e os parâmetros das redes metabólicas. Além disso, os dados foram analisados via PLS-DA e análise de biomarcadores, objetivando identificar as semelhanças e diferenças (vantagens e desvantagens) das informações obtidas das análises PLS-DA e de redes metabólicas.

2 HIPÓTESE

Plantas sob estresse possuem redes metabólicas mais conectadas (com maior densidade) e maior número de hubs, quando comparadas com redes de plantas na ausência de estresse.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar a topologia e o padrão de conectância de redes metabólicas de plantas sob estresse utilizando dados metabolômicos em estudos publicados.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar estudos que possuem dados de metabolômica de plantas sob estresse;
- Construir redes metabólicas com os dados obtidos;
- Analisar os parâmetros de rede para cada estudo;
- Analisar se o aparecimento de hubs é uma resposta comum em redes metabólicas de plantas sob estresse;
- Identificar quais metabólitos possuem alto grau de conectância nas redes metabólicas de plantas na ausência e presença de condições de estresse
- Analisar a capacidade da análise PLS-DA em separar plantas na ausência ou presença de condições de estresse
- Identificar padrões de resposta metabólica comum a diferentes tipos de estresse;
- Verificar as semelhanças e diferenças das informações obtidas das análises PLS-DA e de redes metabólicas;
- Identificar metabólitos marcadores para estresse abióticos em plantas.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de Estudo

Esse estudo corresponde a uma meta-análise de trabalhos previamente publicados, cuja finalidade foi de re-avaliar dados de metabolômica usando abordagens sistêmicas.

4.2 Obtenção de dados

Os artigos foram pesquisados e escolhidos de acordo com as palavras-chave ‘metabolomics’, ‘plant stress’, ‘abiotic stress’ e ‘systems biology’ nas ferramentas de pesquisa. As bases de dados utilizadas para a estratégia de busca foram: ScienceDirect (<https://www.sciencedirect.com/>) e Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os autores dos artigos foram contactados para o envio de dados suplementares e planilhas contendo dados brutos. Os trabalhos pesquisados estão descritos na Tabela 1, com o título do estudo, a(s) espécie(s) utilizadas e o estresse analisado. Após leitura dos 23 artigos, 8 estudos foram incluídos no trabalho, de acordo com a disponibilidade dos dados.

Tabela 1 – Artigos pesquisados nos bancos de dados com título, espécie(s) e estresse analisado.

Artigo	Título	Espécie(s)	Estresse analisado
Sanchez, <i>et al.</i> (2008)	“Plant metabolomics reveals conserved and divergent metabolic responses to salinity”	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Lotus japonicus</i> e <i>Oryza sativa</i>	Estresse salino
Sanchez, <i>et al.</i> (2011)	“Comparative ionomics and metabolomics in extremophile and glycophytic Lotus species under salt stress challenge the metabolic pre-adaptation hypothesis”	<i>Lotus creticus</i> , <i>Lotus corniculatus</i> , <i>Lotus tenuis</i> . e <i>L.creticus</i> .	Estresse salino
Sanchez, <i>et al.</i> (2012)	“Comparative metabolomics of drought acclimation in model and forage legumes”	<i>L. japonicus</i> , <i>L. filicaulis</i> , <i>L. burttii</i> , <i>L. filicaulis</i> , <i>L. corniculatus</i> <i>L tenuis</i> e <i>L. uliginosus</i> .	Déficit hídrico
Detmann, <i>et al.</i> (2012)	“Silicon nutrition increases grain yield, which, in turn, exerts a feed-forward stimulation of photosynthetic rates vai enhanced mesophyll conductance and alters primary metabolism in rice”	<i>Oryza sativa</i> L.	Déficit de silício
Obata and Fernie (2012)	“The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses”	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Déficit hídrico, estresse térmico, iônico, oxidativo, de

			luz e limitação de nutrientes
Nakabayashi, et al. (2014)	“Alternation of flavonoid accumulation under drought stress in <i>Arabidopsis thaliana</i> ”	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Déficit hídrico e estresse oxidativo
Todaka, et al. (2016)	“Temporal and spatial changes in gene expression, metabolite accumulation and phytohormone content in rice seedlings grown under drought stress conditions”	<i>O. sativa</i> cv. Nipponbare	Déficit hídrico
Gago, et al. (2017)	“Integrative field scale phenotyping for investigating metabolic components of water stress within a vineyard”	<i>Vitis vinifera</i>	Déficit hídrico
Vital, et al. (2017)	“An integrative overview of the molecular and physiological responses of sugarcane under drought conditions”	<i>Saccharum officinarum</i>	Déficit hídrico
Goufo, et al. (2017)	“Cowpea (<i>Vigna unguiculata</i> L. Walp.) Metabolomics: Osmoprotection as a Physiological Strategy for Drought Stress Resistance and Improved Yield”	<i>Vigna unguiculata</i> L. Walp	Déficit hídrico
Fonseca-Pereira, et al. (2018)	“The Mitochondrial Thioredoxin System Contributes to the Metabolic Responses Under Drought Episodes in Arabidopsis”	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Déficit hídrico
Rodrigues- Calcerrada, et al. (2018)	“A molecular approach to drought-induced reduction in leaf CO ₂ exchange in drought-resistant <i>Quercus ilex</i> ”	<i>Quercus ilex</i>	Déficit hídrico
Sarabia, et al. (2018)	“High-mass-resolution MALDI mass spectrometry imaging reveals detailed spatial distribution of metabolites and lipids in roots of barley seedlings in response to salinity stress”	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Estresse salino
Avila, et al. (2019)	“Starch accumulation does not lead to feedback photosynthetic downregulation in girdled coffee branches under carrying source-to-sink ratios”	<i>Coffea arabica</i>	Déficit hídrico
Domingues-Junior et al. (2019)	“A cold-change: how short low temperature exposure affects primary metabolism in leaves and stems of two eucalyptus species”	<i>E. globulus</i> e <i>E. grandis</i>	Estresse Térmico

Batista, et al. (2019)	“Salicylic acid modulates primary and volatile metabolites to alleviate salt stress-induced photosynthesis impairment on medicinal plant <i>Egletes viscosa</i> ”	<i>Egletes viscosa</i>	Estresse salino
Fàbregas and Fernie (2019)	“The Metabolic response to drought”	<i>Arabidopsis thaliana</i> e <i>Oryza sativa</i> L.	Déficit hídrico
Lawas, et al. (2019)	“Effects of heat, drought and their combined effects on morphological structure and physicochemical properties of rice (<i>Oryza sativa</i> L.) starch”	<i>Oryza sativa</i>	Déficit hídrico e estresse térmico combinados
Shaar-Moshe, et al. (2019)	“Phenotypic and metabolic plasticity shapes life-history strategies under combinations of abiotic stresses”	<i>Brachypodium distachyon</i>	Estresse salino, térmico e déficit hídrico
Chang, et al. (2019)	“Morphological and metabolic responses to salt stress of rice (<i>Oryza sativa</i> L.) cultivars which differ in salinity tolerance”	<i>Oryza sativa</i> L.	Estresse salino
Gupta, et al. (2019)	“Spatio-temporal metabolite and elemental profiling of salt stressed barley seeds during initial stages of germination by MALDI-MSI and μ -XRF spectrometry”	<i>Hordeum vulgare</i>	Estresse salino
Mesquita, et al. (2020)	“Physiological approach to decipher the drought tolerance of a soybean genotype from Brazilian savana”	<i>Glycine max</i>	Déficit hídrico
Bottcher, et al. (2021)	“Sugercane cell suspension reveals major Metabolic changes under different nitrogen starvation regimes”	<i>Saccharum officinarum</i>	Limitação de nitrogênio

Fonte: elaborada pela autora

4.3 Análise das redes metabólicas

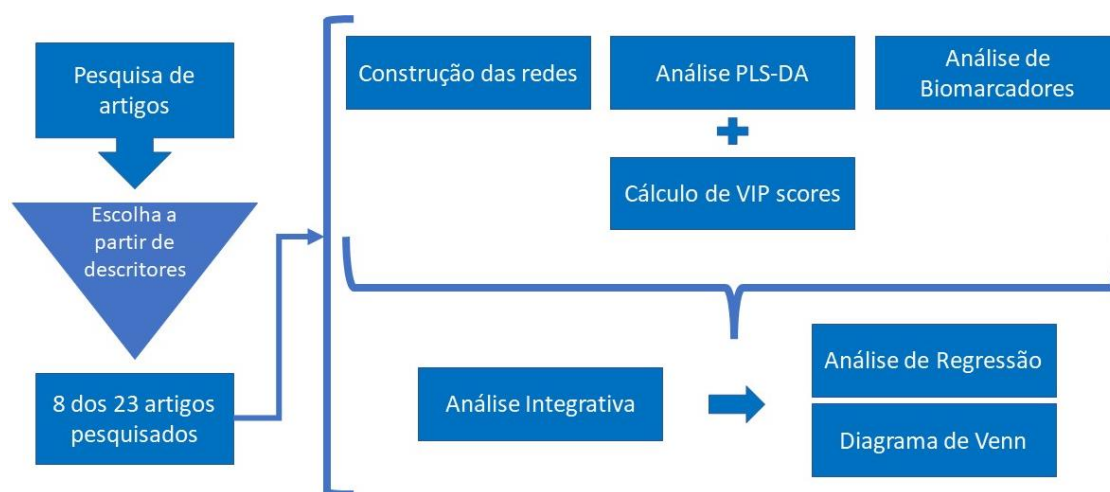
Redes de correlação foram criadas entre metabólitos primários de espécies sob condições de estresse utilizando o plugin METSCAPE no Cytoscape® v. 3.7.2 (SHANNON et al, 2003). Para cada estudo escolhido na revisão bibliográfica, foram criadas redes para os grupos controle e estresse. Os nós correspondem aos metabólitos e as linhas (links) à força de conexão entre nós em módulo (positivo ou negativo), obtido pela análise *Debiased sparse partial correlation* (DSPC) (BASU et al., 2017). As redes foram construídas utilizando a

restrição de força das conexões para um limite específico do coeficiente DSPC ($-0.5 > r > 0.5$). Parâmetros de rede como coeficiente de clusterização, heterogeneidade, densidade e centralização foram obtidas como descrito previamente (ASSENOV et al., 2008). Além disso, determinamos outros três parâmetros: preferential attachment, número de hubs da rede e número de hubs que apareceram após a imposição do estresse (FREIRE et al., 2021).

4.4 Análise estatística multivariada

Os dados de perfil metabólico foram analisados por *Partial Least Square Discriminate Analysis* (PLS-DA) usando a plataforma Metaboanalyst (CHONG et al., 2018). PLS-DA é uma análise de redução de escala amplamente usada em estudos de metabolômica (WORLEY & POWERS, 2015). Além de diferenciar grupos amostrais, a análise de PLS-DA também fornece quais variáveis (metabólitos) mais contribuem para a diferenciação dos grupos amostrais. A contribuição de cada variável é evidenciada através dos valores de VIP (variable importance in projection) scores. Metabólitos com valores VIP acima de 1 são considerados importantes representantes para a discriminação observada no PLS-DA (XIA & WISHART, 2011). Os dados de perfil metabólico foram normalizados por raiz cúbica e usando a opção pareto scaling na plataforma Metaboanalyst® 5.0 (PANG et al., 2021).

Figura 1 – Fluxograma com passo a passo da metodologia desde a pesquisa dos artigos até a análise integrativa.



Fonte: elaborada pela autora

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização dos estudos

Os artigos escolhidos para as análises de rede e multivariadas estão descritos na Tabela 2, com os objetivos, tipo de estresse e espécie analisada bem como os principais resultados obtidos.

Tabela 2 - Artigos escolhidos da revisão bibliográfica, as espécies utilizadas, o tipo de estresse analisado e objetivos e resultados principais.

Artigo	Espécie(s)	Estresse analisado	Objetivos	Resultados
Todaka, et al. (2016)	<i>O. sativa</i> cv. Nipponbare	Déficit hídrico	Analisar os mecanismos moleculares fundamentais para a resposta a diferentes estresses.	Seca semi-severa e seca severa estimularam a acumulação de açúcares primários e seca severa estimulou a acumulação da maioria dos aminoácidos.
Gago, et al. (2017)	<i>Vitis vinifera</i>	Déficit hídrico	Obter dados de nível de copa de videiras sob 3 tratamentos de irrigação; realizar medições de estresse hídrico em folha e caule e análise de metabolismo primário.	Aumento nos níveis de aminoácidos (ex.: valina, isoleucina, treonina) e diminuição de açúcar-álcoois (myo- inositol e galactinol) em déficit hídrico.
Vital, et al. (2017)	<i>Saccharum officinarum</i>	Déficit hídrico	Analisar os mecanismos moleculares e fisiológicos nas respostas ao déficit hídrico.	Diminuição nos níveis de sacarose e aumento nos níveis de glicose e frutose; Acúmulo da maioria dos aminoácidos, porém alanina diminui sob seca moderada.
Fonseca-Pereira, et al. (2018)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Déficit hídrico	Explorar a significância do sistema Trx em	Aumento geral dos níveis de metabólitos primários em todos

				Arabidopsis seguido da exposição a único e repetidos eventos de déficit hídrico.	os genótipos ambos seguidos de seca por 10 dias e na recuperação, principalmente ácidos orgânicos, açúcares e alcoólicos.
Domingues-Junior et al. (2019)	<i>E. globulus</i> e <i>E. grandis</i>	Estresse Térmico		Investigar a dinâmica de mudanças de curto período do metabolismo primário de tecidos foliares e do tronco em baixas temperaturas.	Os níveis de aminoácidos e carboidratos foliares foram reduzidos em temperaturas baixas, especialmente isoleucina, leucina, valina e sacarose.
Batista, et al. (2019)	<i>Egletes viscosa</i>	Estresse salino		Avaliar a influência do ácido salicílico no crescimento e metabolismos primários e secundários da planta medicinal <i>Egletes viscosa</i> sob estresse salino.	Salinidade aumentou os níveis de 10 aminoácidos e diminui os níveis de ácido glicólico, ácido quínico e ácido cítrico.
Mesquita, et al. (2020)	<i>Glycine max</i>	Déficit hídrico		Investigar os traços fisiológicos de dois genótipos parentais de soja sob secagem progressiva do solo.	O genótipo tolerante foi capaz de preferencialmente alocar carbono para a raiz, apresentando menos danos na fotossíntese e pospondo a desidratação foliar, mantendo a homeostase e metabolismo fotossintético.
Bottcher, et al. (2021)	<i>Saccharum officinarum</i>	Limitação de nitrogênio	de	Obter informações detalhadas da limitação	Limitação de nitrogênio afetou a

de nitrogênio no metabolismo primário e secundário de cana de açúcar usando suspensão de células em 3 regimes de N.	biossíntese de aminoácidos e carboidratos, o que associado com as mudanças nos compostos fenólicos, indica a regulação positiva dos mecanismos de compensação de carbono no tronco.
---	---

Fonte: elaborada pela autora

5.2 Arroz sob déficit hídrico

Plantas de arroz foram submetidas a cinco níveis de água do solo, sendo um tratamento controle (plantas irrigadas) e quatro outros com níveis decrescentes de água no solo, sendo estes seca suave, seca moderada, seca semi-severa, com o potencial matricial do solo (SMP) de -9.8, -31 e -309.9, respectivamente e seca severa com estresse severo de desidratação (Sds) (TODAKA, et al. 2019). Apenas os tratamentos mais severos, isto é, com menor conteúdo de água no solo, foram separados do tratamento controle pela análise de PLS-DA. Interessantemente, os dois níveis com maior restrição hídrica também foram separados por PLS-DA (Figura 1A). Dezoitos metabólitos apresentaram VIP score maior que 1, representando, portanto, aqueles que mais contribuíram para a discriminação dos tratamentos observados no PLS-DA (Figura 1B).

A densidade aumentou 1.8 vezes na seca moderada quando comparada ao controle, portanto apresentando maior conectância. Quanto a heterogeneidade, esta foi de aproximadamente 2 vezes menor na seca moderada e 5 vezes menor na seca severa, quando comparadas ao controle (Tabela 3). Além disso, seca moderada, seca semi-severa e seca severa apresentaram 2.7, 1.6 e 1.1 vezes mais hubs do que controle. Dentre os tratamentos de seca, as secas moderada e pesada apresentaram maiores valores de aparecimento de hubs e *preferential attachment*. Dentre os metabólitos identificados como hubs, arginina apresentou 8 conexões, trehalose e putrescina 7 e manose e triptofano 6.

Figura 1 – *Partial least squares- discriminant analysis* (PLS-DA) (A) e *variable importance in projection* (VIP) scores (B) obtidos da análise de dados metabolômicos de controle x seca suave x seca moderada x seca semi-severa x seca severa para *Oryza sativa* L. Metabólitos destacados em rosa, verde, roxo e azul são os significativos que possuem maiores contribuições para a formação de clusters com confiança variável alta e metabólitos com VIP scores do PLS-DA acima de 1.

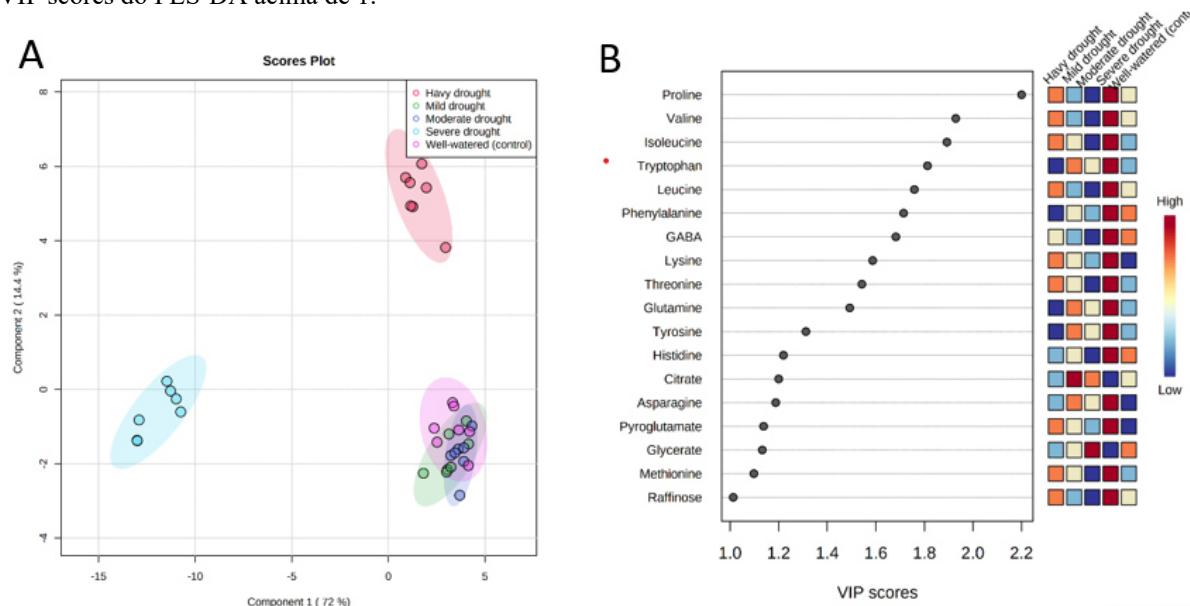
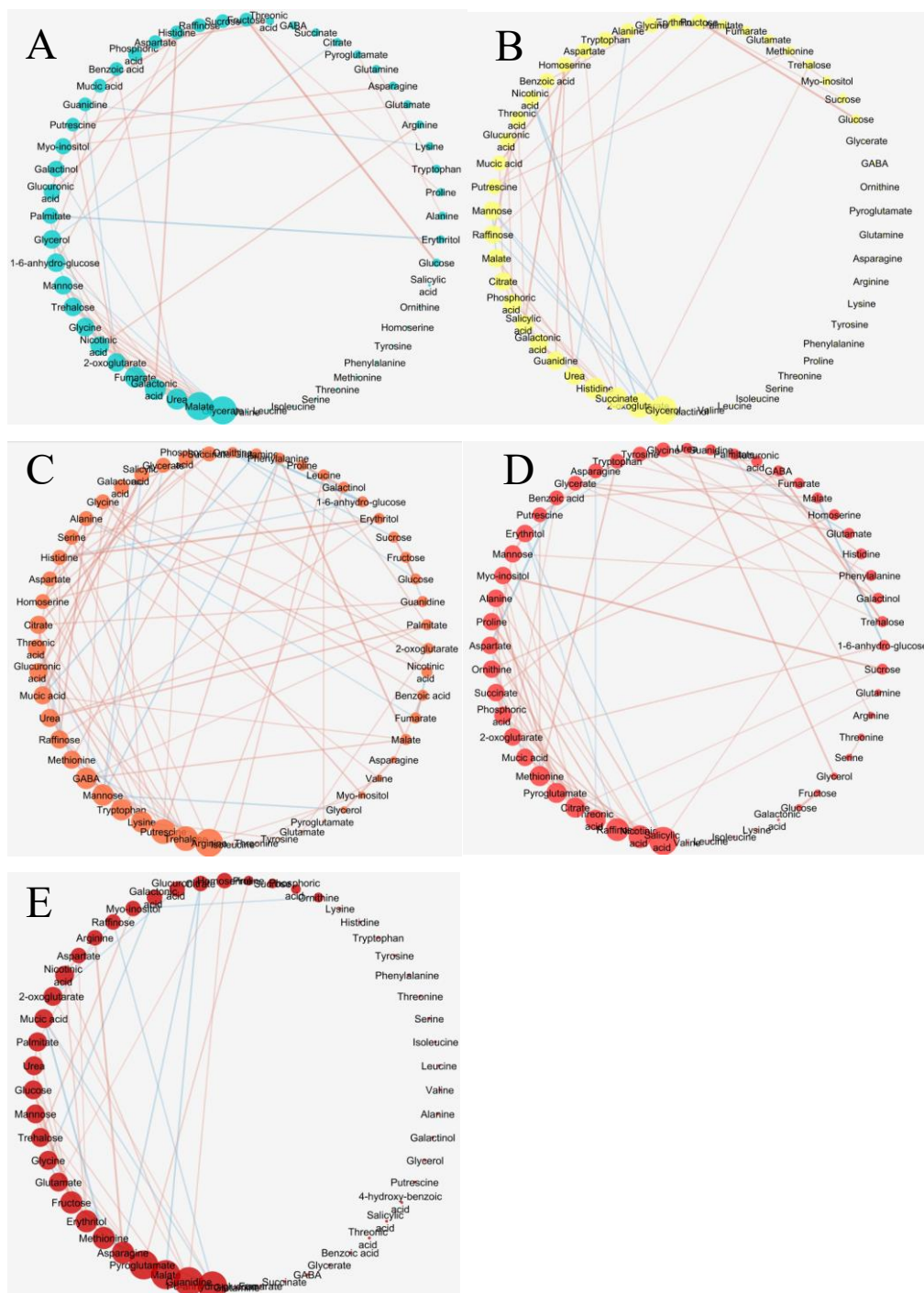


Figura 2 - Redes metabólicas de correlação usando dados do perfil metabólico de *Oryza sativa* L. sob déficit hídrico para o controle (A), seca suave (B) seca moderada (C), seca semi-severa (D) e seca severa (E). Os nós indicam metabólitos enquanto as linhas representam a força de conexão entre os nós, medido por DSPC. O tamanho dos nós para cada metabólito representa maiores conexões e, consequentemente, maior grau de conectância. Linhas em azul e vermelho representam correlações positivas e negativas, respectivamente.



Fonte: elaborada pela autora

Tabela 3 - Parâmetros obtidos nas análises de redes metabólicas em plantas de *Oryza sativa* L. irrigadas (controle) ou submetidas à quatro níveis de deficiência hídrica no solo. *Hubs presentes no controle e que continuaram classificadas como hubs sob estresse.

	Controle	Seca suave	Seca moderada	Seca semi-severa	Seca severa
Densidade	0.040	0.031	0.072	0.054	0.033
Heterogeneidade	0.938	0.930	0.430	0.631	0.184
Número de Hubs	16	13	43	25	18
Preferential Attachment*	-	6	14	12	9
Aparecimento de hubs	-	7	29	13	9

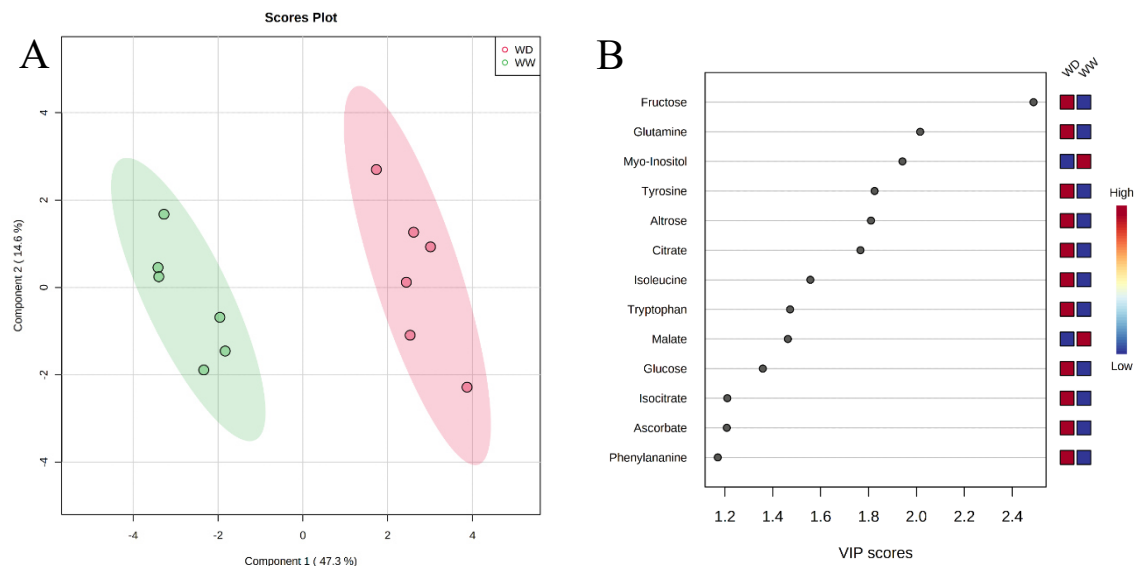
Fonte: elaborada pela autora

5.3 Videira sob déficit hídrico

Cultivares de *Vitis vinifera* L. Grenache foram submetidas a dois tratamentos de níveis de água no solo, consistindo em plantas irrigadas e sob seca (GAGO, et al., 2017). Plantas de videira submetidas à deficiência hídrica (DH) apresentaram mudanças substanciais no perfil metabólico, indicado pela clara separação pelo componente 1 da análise de PLS-DA (Figura 3A). Treze metabólitos apresentaram VIP score maior que 1. Dentre estes, apenas malato apresentou nível maior em plantas irrigadas, quando comparado com plantas submetidas à DH (Figura 3B).

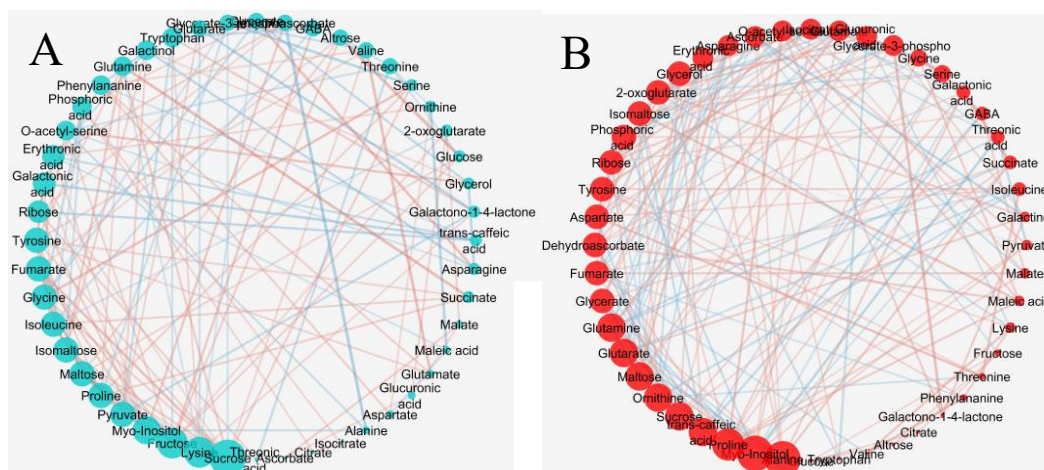
A densidade da rede metabólica no tratamento de DH foi 1.3 vezes maior que o controle, apresentando, portanto, maior conectância. Com relação à heterogeneidade, plantas sob DH apresentaram valor de 0.352, sendo menor que a situação controle (0.425) (Tabela 4). No que concerne o número de hubs, o DH apresentou 34 metabólitos definidos como hubs, enquanto o controle apenas 21. Dentre estes, destaca-se alanina, *myo*-inositol e prolina, que apresentaram maior número de links (12, 12 e 11, respectivamente). Dezenove metabólitos foram classificados como novas hubs na situação de estresse e quinze se mantiveram como hubs nas duas condições, controle e DH (Tabela 4).

Figura 3 - *Partial least squares- discriminant analysis* (PLS-DA) (A) e *variable importance in projection* (VIP) scores (B) obtidos da análise de dados de perfil metabólico de plantas de videira (*Vitis vinifera* L. Grenache) sob condições irrigadas (WW) e déficit hídrico (WD). Metabólitos incluídos na Figura B apresentaram VIP score maior que 1, sendo, assim, importante contribuidores para a separação observada no PLS-DA (Figura A).



Fonte: elaborada pela autora

Figura 4 – Redes metabólicas de correlação usando dados de perfil metabólico de *Vitis vinifera* L. Grenache sob condições irrigadas (A) e déficit hídrico (B). Os nós indicam metabólitos enquanto as linhas representam a força de conexão entre os nós, medido por DSPC. O tamanho dos nós para cada metabólito representa maiores conexões e, consequentemente, maior grau de conectância. Linhas em azul e vermelho representam correlações positivas e negativas, respectivamente.



Fonte: elaborada pela autora

Tabela 4 - Parâmetros de rede para o coeficiente r com condições de controle e déficit hídrico para *Vitis vinífera* L. Grenache. *Hubs que se formaram no controle e continuaram no estresse.

	Controle	Déficit hídrico (DH)
Densidade	0.117	0.154
Heterogeneidade	0.425	0.352
Número de Hubs	21	34
Preferential Attachment*	-	15
Aparecimento de hubs	-	19

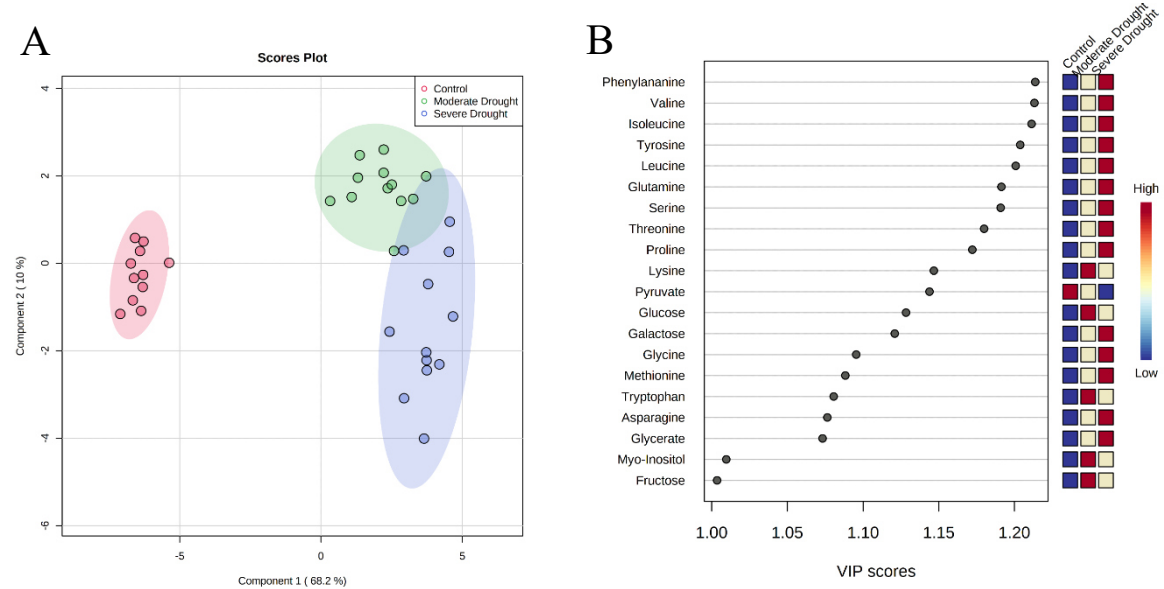
Fonte: elaborada pela autora

5.4 Cana de açúcar sob déficit hídrico

Plantas de cana de açúcar (cultivar RB867515) foram submetidas a condições irrigadas, seca moderada com potencial hídrico foliar de -0.5 Mpa e seca severa com potencial hídrico foliar de -1 Mpa (VITAL, et al., 2017). O perfil metabólico de folhas de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica foi alterado, evidenciado pela clara separação das plantas irrigadas (controle) das plantas estressadas pelo componente 1 da análise de PLS-DA (Figura 5A). Essas diferenças se devem, principalmente, ao acúmulo diferencial de 20 metabólitos, que apresentaram VIP score maior que 1 (Figura 5B).

As redes metabólicas de plantas sob seca moderada apresentaram menor densidade, quando comparada ao controle, apresentando, assim, rede metabólica menos conectada. Em contrapartida, seca severa apresentou leve aumento (1.1) na densidade, em comparação ao controle (Tabela 5). Com relação à heterogeneidade, plantas estressadas apresentaram maiores valores, sendo 1.4 e 1.1 maior nas secas moderada e severa, em relação ao controle (Tabela 5). O maior número de hubs foi na seca severa, com 17, enquanto o controle e a seca moderada apresentaram 15 e 8 hubs, respectivamente. Dentre estes, os metabólitos com maiores conexões na seca moderada foram alanina, aspartato e frutose, com 3, 3 e 2 conexões, respectivamente, enquanto na seca severa foram valina, aconitrato e frutose, que apresentaram 4, 3 e 3 conexões, respectivamente. Cabe ressaltar que Leucina, assim como frutose, foram identificados como hubs nas duas condições de seca.

Figura 5 - *Partial least squares- discriminant analysis* (PLS-DA) (A) e *variable importance in projection* (VIP) scores (B) obtidos da análise de dados metabolômicos de controle x seca moderada x seca severa de cana de açúcar. Metabólitos destacados em rosa são os significativos que possuem maiores contribuições para a formação de clusters com confiança variável alta e metabólitos com VIP scores do PLS-DA acima de 1.



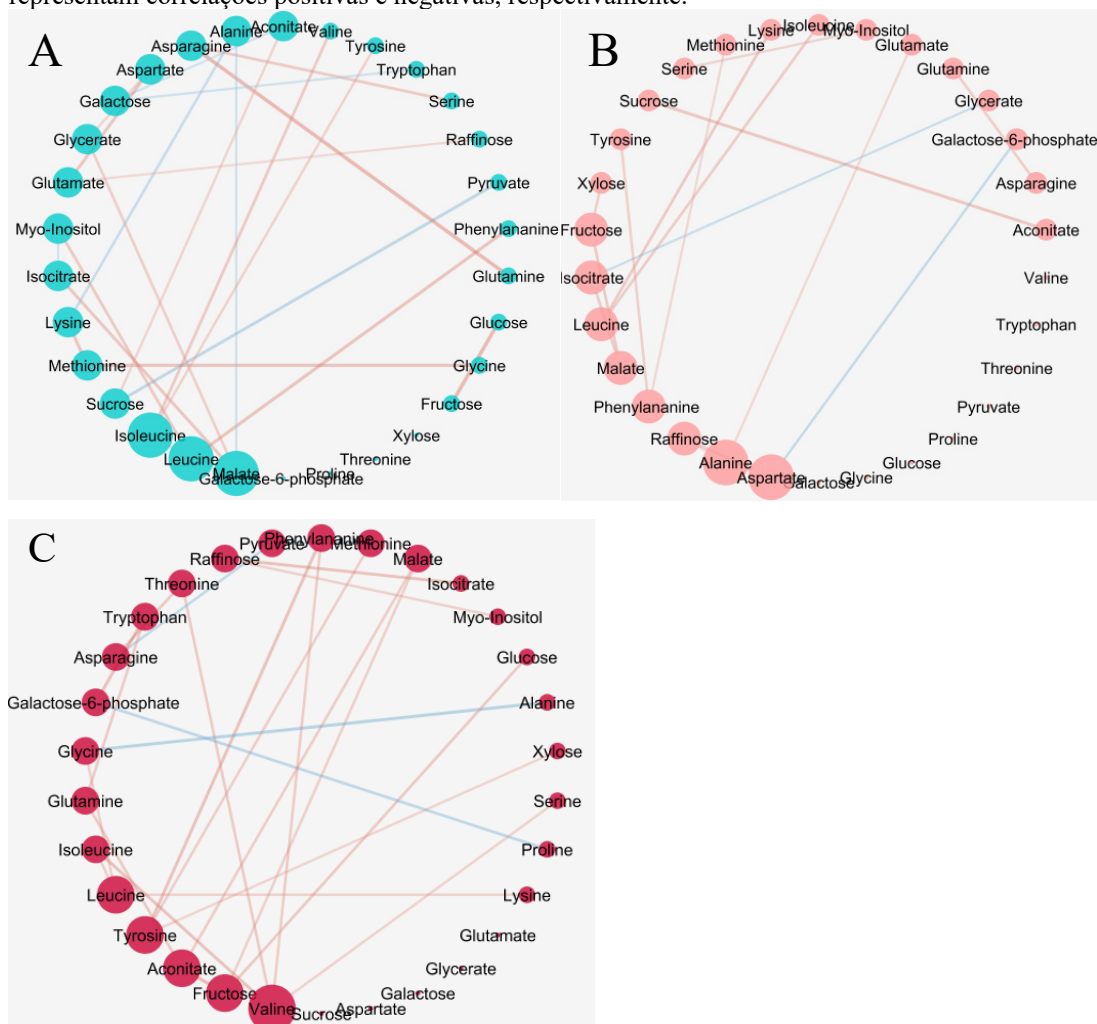
Fonte: elaborada pela autora

Tabela 5 - Parâmetros de rede para o coeficiente r com condições de controle, seca moderada e seca severa para cultivar de cana de açúcar. *Hubs que se formaram no controle e continuaram no estresse.

	Controle	Seca moderada	Seca severa
Densidade	0.051	0.037	0.055
Heterogeneidade	0.577	0.800	0.637
Número de Hubs	15	8	17
Preferential Attachment*	-	5	6
Aparecimento de hubs	-	3	11

Fonte: elaborada pela autora

Figura 6 – Redes metabólicas de correlação usando dados do perfil metabólico de cana de açúcar sob condições controle (A), seca moderada (B) e seca severa (C). Os nós indicam metabólitos enquanto as linhas representam a força de conexão entre os nós, medido por DSPC. O tamanho dos nós para cada metabólito representa maiores conexões e, consequentemente, maior grau de conectância. Linhas em azul e vermelho representam correlações positivas e negativas, respectivamente.



Fonte: elaborada pela autora

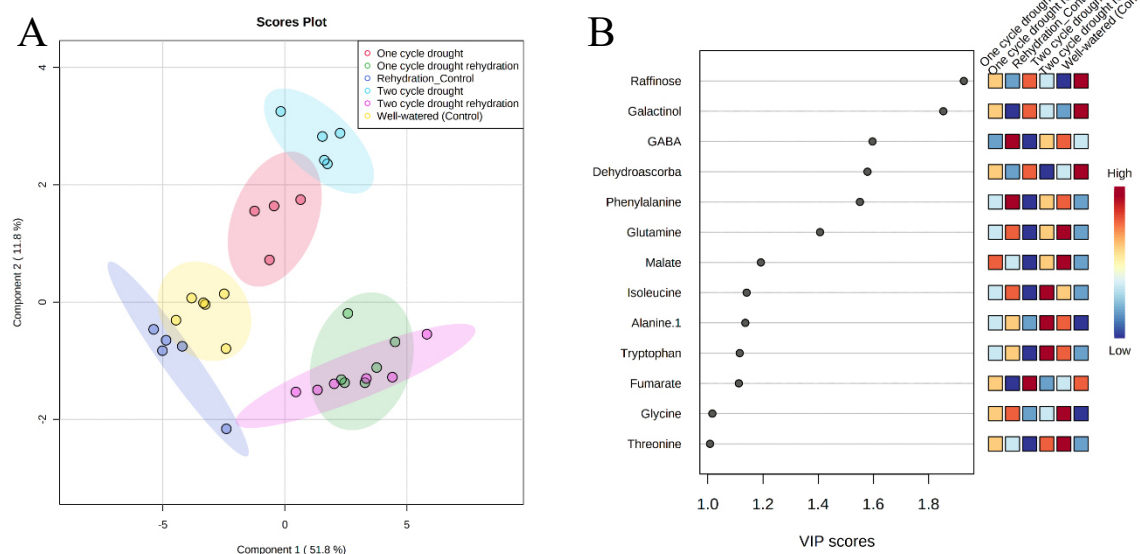
5.5 *Arabidopsis thaliana* sob déficit hídrico

Plantas de *Arabidopsis thaliana* L. Col.0 foram submetidas a um ou dois ciclos de déficit hídrico (DH), caracterizado por um período sob DH seguido de recuperação via re-irrigação (FONSECA-PEREIRA et al., 2018). O perfil metabólico de plantas sob DH e após re-irrigação foi comparado com plantas mantidas em constante irrigação. Plantas sob DH, sobretudo aquelas submetidas a dois ciclos, foram separadas das plantas irrigadas ou re-irrigadas pelo componente 2 da análise de PLS-DA (Figura 7A). Similarmente, as plantas re-irrigadas, ou seja, que passaram por um ou dois ciclos de DH e foram posteriormente re-irrigadas, foram separadas das plantas controle pelo componente 1 (Figura 7A). O acúmulo diferencial de treze metabólitos, incluindo aminoácidos, ácidos orgânicos, raffinose e

galactinol, contribuíram substancialmente para a discriminação observada no PLS-DA (Figura 9B).

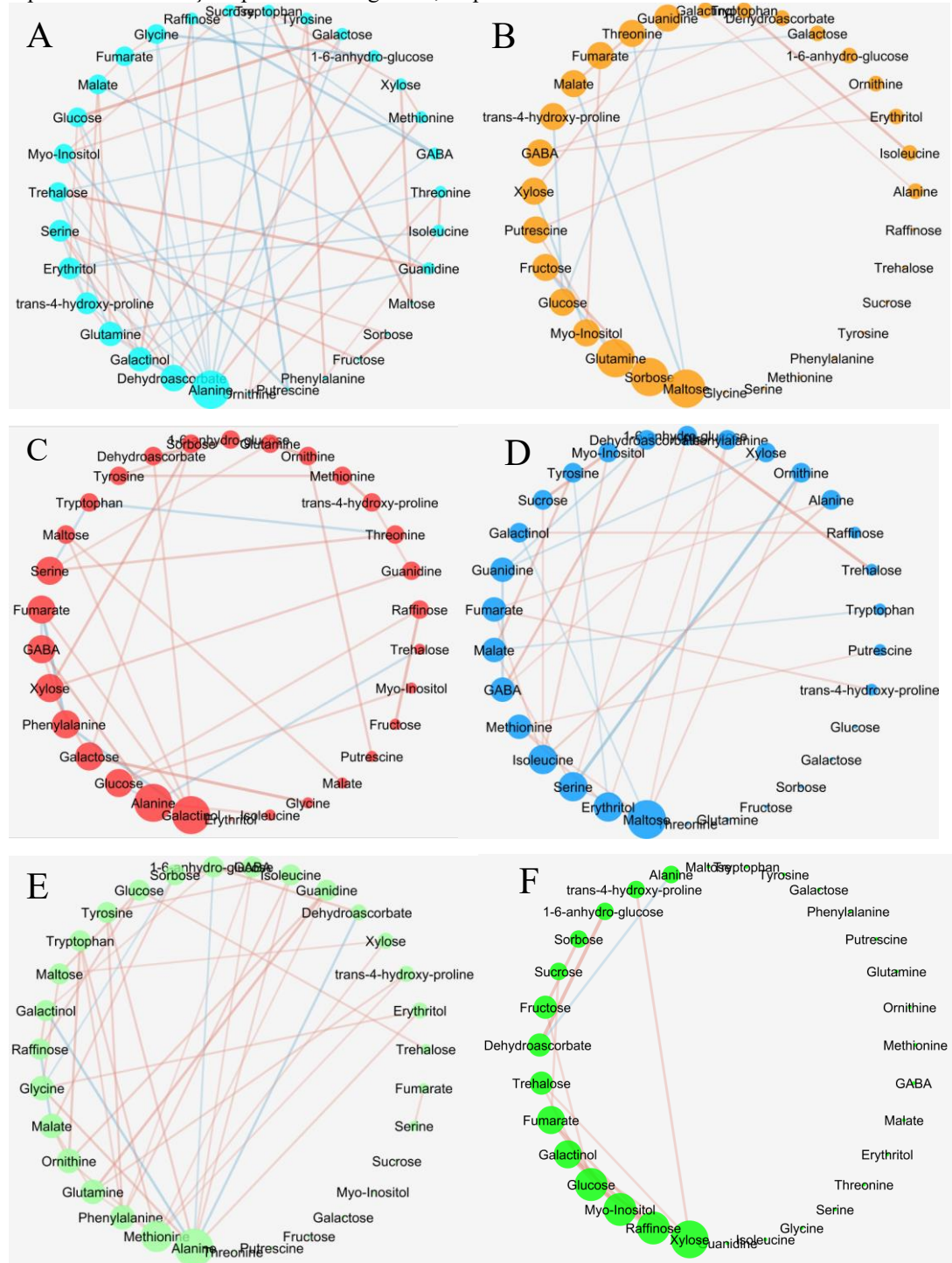
As redes de plantas sob DH apresentaram menor densidade que o controle, sendo, assim, menos conectadas. Porém, a heterogeneidade foi maior e menor em plantas sob um ou dois ciclos de DH, respectivamente, em relação ao controle (Tabela 6). Curiosamente, plantas sob um ciclo de DH não apresentaram hubs na rede metabólica, enquanto plantas sob dois ciclos de DH tiveram apenas dois metabólitos classificados como hubs, contra 13 do controle. Cabe ressaltar que esses dois hubs já eram classificados como hubs em plantas irrigadas, ou seja, o aparecimento de hubs após um ou dois ciclos de DH foi nula.

Figura 7 - *Partial least squares- discriminant analysis* (PLS-DA) (A) e *variable importance in projection* (VIP) scores (B) obtidos da análise de dados metabolômicos de controle x 1 ciclo déficit hídrico x 2 ciclos déficit hídrico x re-irrigação (controle) x 1 ciclo de déficit hídrico e re-irrigação x 2 ciclos de déficit hídrico e re-irrigação para *Arabidopsis thaliana*. Metabólitos destacados em rosa, verde, azul e roxo são os significativos que possuem maiores contribuições para a formação de clusters com confiança variável alta e metabólitos com VIP scores do PLS-DA acima de 1.



Fonte: elaborada pela autora

Figura 8 - Redes metabólicas de correlação de usando dados de perfil metabólico de *Arabidopsis thaliana* sob condições de controle(A), 1 ciclo de seca(B), 2 ciclos de seca(C), re-irrigação controle (D), 1 ciclo re-irrigação com seca(E) e dois ciclos re-irrigação com seca(F). Os nós indicam metabólitos enquanto as linhas representam a força de conexão entre os nós, medido por DSPC. O tamanho dos nós para cada metabólito representa maiores conexões e, consequentemente, maior grau de conectância. Linhas em azul e vermelho representam correlações positivas e negativas, respectivamente.



Fonte: elaborada pela autora

Tabela 6 - Parâmetros de rede para o coeficiente r com condições de controle, 1 ciclo de seca, 2 ciclos de seca, re-irrigação, 1 ciclo de re-irrigação com seca e 2 ciclos de re-irrigação com seca para *Arabidopsis thaliana*. *Hubs que se formaram no controle e continuaram no estresse.

	Controle	1 ciclo de seca	2 ciclos de seca	Re- irrigação (controle)	1 ciclo re- irrigação com seca	2 ciclos re- irrigação com seca
Densidade	0.127	0.043	0.071	0.067	0.084	0.037
Heterogeneidade	0.514	0.742	0.449	0.743	0.720	1.377
Número de Hubs	13	0	2	8	18	6
Preferential Attachment*	-	0	2	-	6	0
Aparecimento de hubs	-	0	0	-	12	6

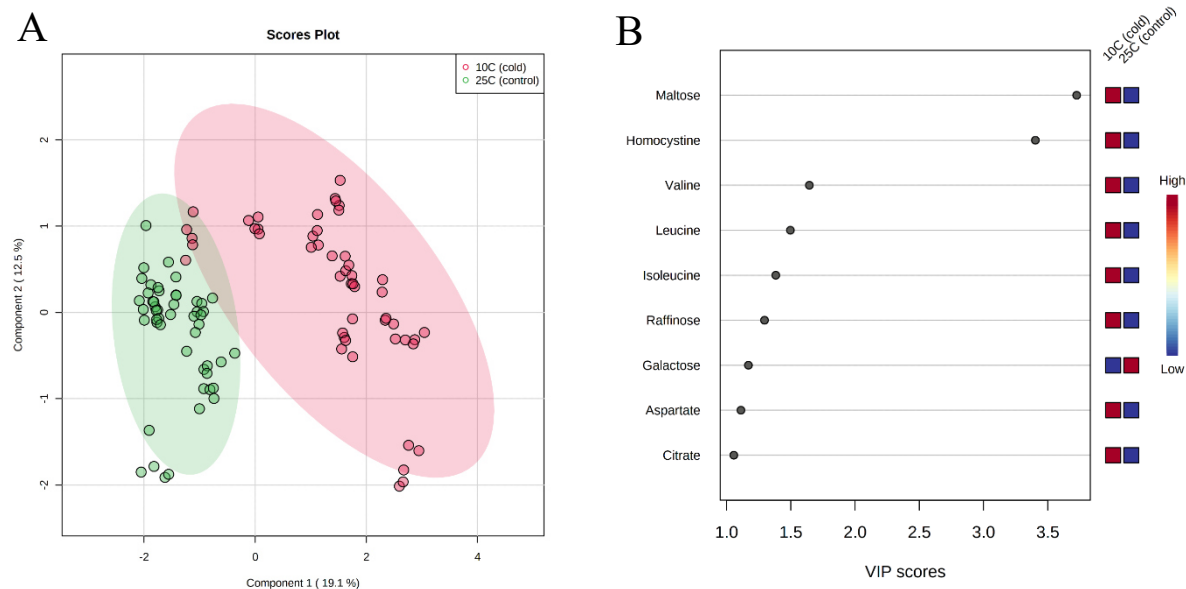
Fonte: elaborada pela autora

5.6 Eucalipto sob estresse térmico

Plantas de dois genótipos de Eucalipto foram submetidas a condições de 25°C e 10°C para avaliar os efeitos do frio no perfil metabólico (DOMINGUES-JUNIOR et al., 2019). A submissão de plantas de eucalipto à baixa temperatura (10 °C) por 24 horas alterou o perfil metabólico das folhas, como demonstrado pela separação dos tratamentos controle (25 °C) e tratamento por frio (10°C) pelo componente 1 do PLS-DA (Figura 9A). Nove metabólitos, incluindo alguns açúcares, aminoácidos e citrato, apresentaram VIP score maior que 1 (Figura 9B), sendo, assim, importantes marcadores para a diferenciação observada no PLS-DA.

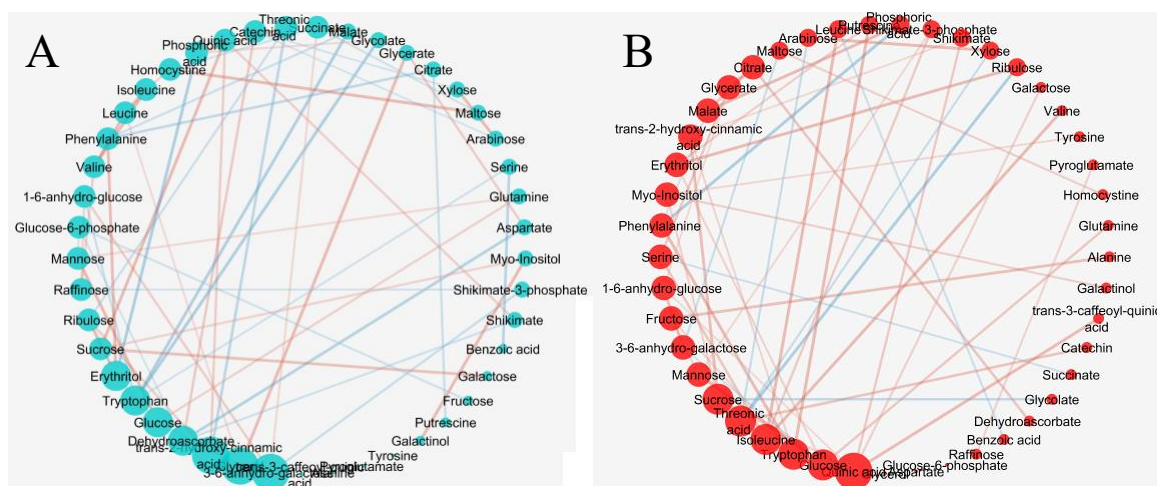
A rede metabólica de plantas estressadas apresentou densidade 1.2 vezes maior que o controle, enquanto a heterogeneidade foi 1.1 maior no controle (Tabela 7). Em contrapartida, o número de hubs no frio foi de 23, sendo 1.8 vezes maior que o controle, que teve apenas 13. O número de aparecimento de hubs no frio foi de 11, enquanto outras 12 eram e permaneceram classificadas como hubs nas duas condições (Tabela 7). Dentre as hubs, 3,6-anidrogallactose, ácido trans-2-hidroxi-cinâmico e glicerol apresentaram grau de conectância 5, seguido de triptofano e glicose, ambos com 4 conexões.

Figura 9 - *Partial least squares- discriminant analysis* (PLS-DA) (A) e *variable importance in projection* (VIP) scores (B) obtidos da análise de dados metabolômicos a 25°C e 10°C para Eucalipto. Metabólitos destacados em rosa são os significativos que possuem maiores contribuições para a formação de clusters com confiança variável alta e metabólitos com VIP scores do PLS-DA acima de 1.



Fonte: elaborada pela autora

Figura 10 - Redes metabólicas de correlação usando dados de perfil metabólico de *E. globulus* e *E. glandi* sob condições de temperatura a 25°C (A) e estresse térmico a 10°C (B). Os nós indicam metabólitos enquanto as linhas representam a força de conexão entre os nós, medido por DSPC. O tamanho dos nós para cada metabólito representa maiores conexões e, consequentemente, maior grau de conectância. Linhas em azul e vermelho representam correlações positivas e negativas, respectivamente.



Fonte: elaborada pela autora

Tabela 7 - Parâmetros de rede para o coeficiente r sob condições de 25°C e 10°C para Eucalipto. *Hubs que se formaram no controle e continuaram no estresse.

	25°C (controle)	10°C (estresse)
Densidade	0.047	0.056
Heterogeneidade	0.587	0.514
Número de Hubs	13	23
Preferential Attachment*	-	12
Aparecimento de hubs	-	11

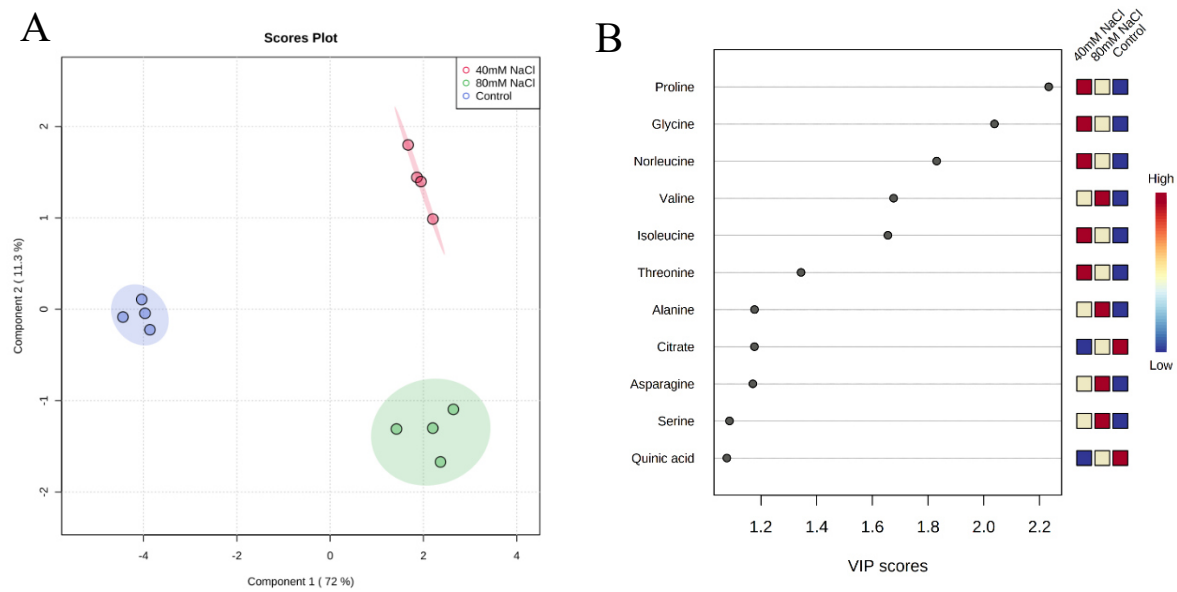
Fonte: elaborada pela autora

5.7 *Egletes viscosa* sob estresse salino

Plantas de *Egletes viscosa* foram cultivadas com 6 tratamentos variando as concentrações de cloreto de cálcio (40 e 80mM) (BATISTA et al., 2019). A análise de PLS-DA indica que o estresse salino alterou substancialmente o perfil metabólico de folhas de *Egletes viscosa*, como evidenciado pela separação dos tratamentos com NaCl do tratamento controle pelo componente 1. Além disso, os tratamentos 40 mM e 80 mM de NaCl foram separados pelo componente 2, indicando diferentes perfis metabólicos sob essas concentrações de NaCl (Figura 11A). Onze metabólitos apresentaram VIP score maior que 1, sendo a maioria deles com níveis menores no controle (Figura 11B).

A densidade e heterogeneidade das redes metabólicas apresentaram baixas variações entre plantas controle e submetidas a estresse salino, com exceção do tratamento 80 mM de NaCl em que a heterogeneidade da rede foi 2.1 vezes menor que controle. O tratamento 80 mM de sal apresentou aumento substancial (2.2 vezes) no número de hubs, sendo 19 novas hubs. Valina, norleucina e ácido forfórico foram os metabólitos que apresentaram maiores graus de conexão, com 20, 19 e 18, respectivamente, no tratamento 80 mM (Tabela 8).

Figura 11 - *Partial least squares- discriminant analysis* (PLS-DA) (A) e *variable importance in projection* (VIP) scores (B) obtidos da análise de dados metabolômicos de *Egletes viscosa* sob condições de controle x 40mM NaCl x 80mM NaCl. Metabólitos destacados em rosa e verde são os significativos que possuem maiores contribuições para a formação de clusters com confiança variável alta e metabólitos com VIP scores do PLS-DA acima de 1.



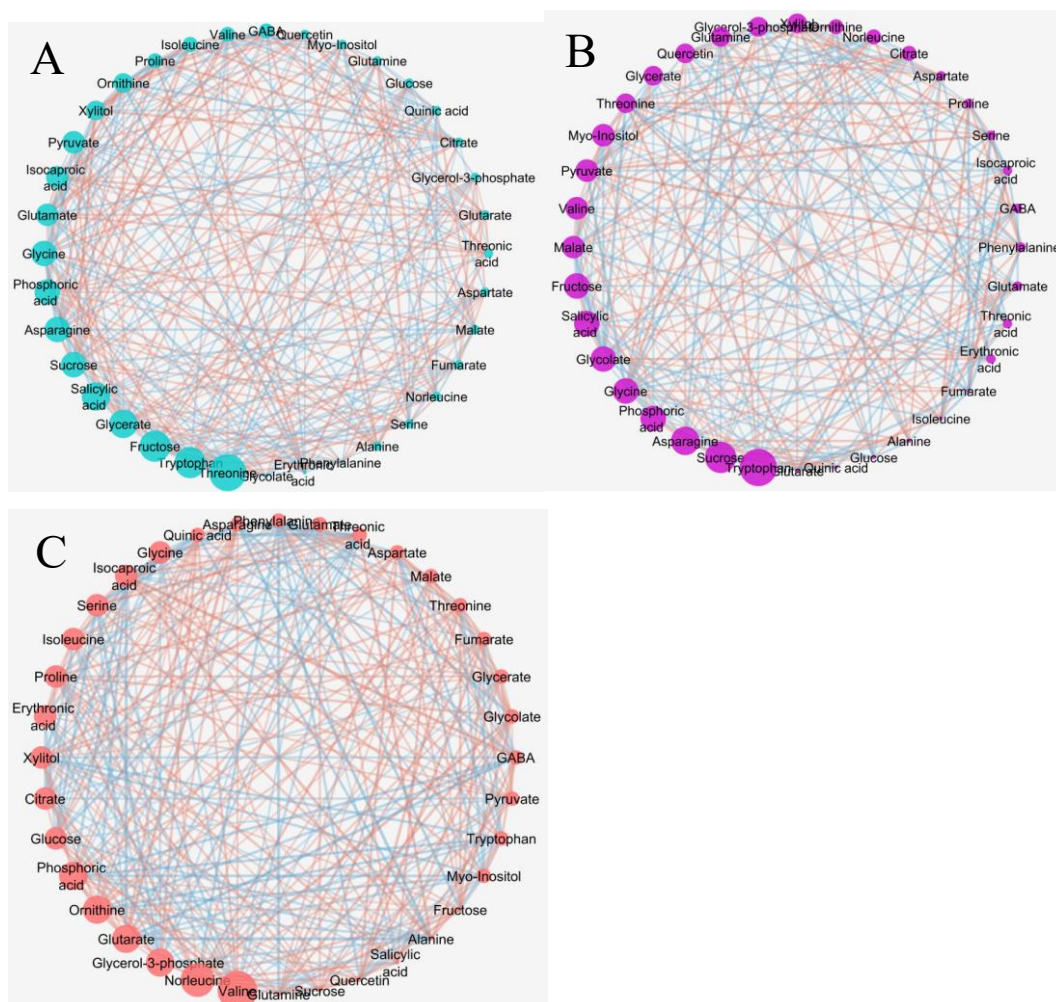
Fonte: elaborada pela autora

Tabela 8 - Parâmetros de rede para o coeficiente r com tratamentos para *Egletes viscosa*. *Hubs que se formaram no controle e continuaram no estresse.

	Controle	40mM NaCl	80mM NaCl
Densidade	0.448	0.390	0.471
Heterogeneidade	0.147	0.161	0.069
Número de Hubs	14	8	31
Preferential Attachment	-	7	12
Aparecimento de hubs	-	1	19

Fonte: elaborada pela autora

Figura 12 - Redes metabólicas de correlação usando dados do perfil metabólico de *Egletes viscosa* sob condições de controle(A), 40mM de NaCl(B) e 80mM de NaCl(C). Os nós indicam metabólitos enquanto as linhas representam a força de conexão entre os nós, medido por DSPC. O tamanho dos nós para cada metabólito representa maiores conexões e, consequentemente, maior grau de conectância. Linhas em azul e vermelho representam correlações positivas e negativas, respectivamente.



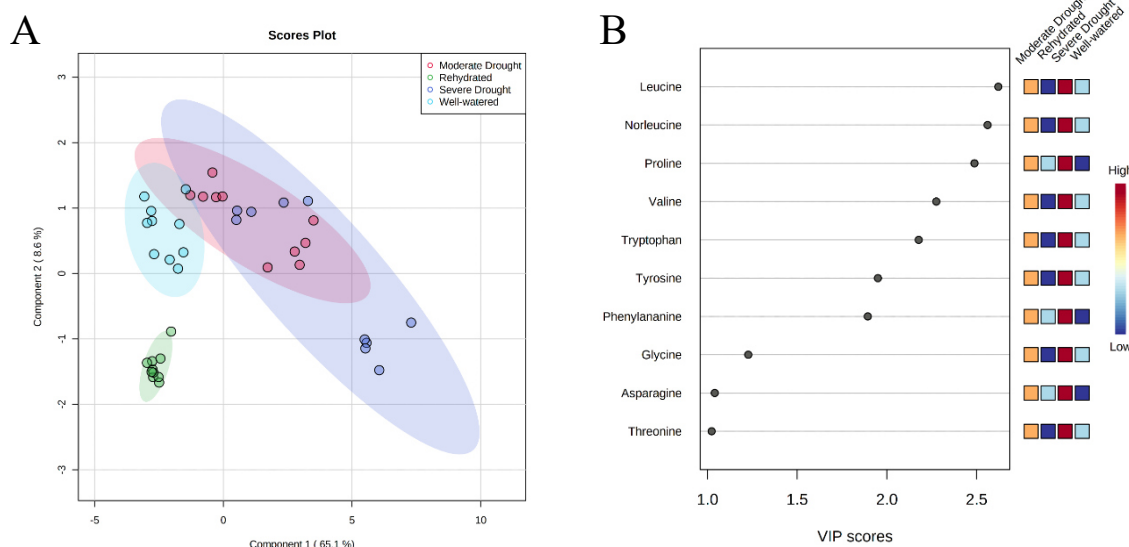
Fonte: elaborada pela autora

5.8 Soja sob déficit hídrico

Plantas de soja foram submetidas a dois níveis de DH (moderada e severa). O perfil metabólico destas plantas foi comparado com plantas irrigadas continuamente (controle) e plantas que foram re-irrigadas após os tratamentos de DH (MESQUITA et al., 2020). O perfil metabólico das plantas irrigadas diferiu de todos os tratamentos, sendo separado das plantas sob DH e das plantas re-irrigadas pelos componentes 1 e 2, respectivamente (Figura 13A). Dez metabólitos, todos pertencendo a rotas associadas ao metabolismo de aminoácidos, apresentaram VIP score maior que 1 (Figura 13B).

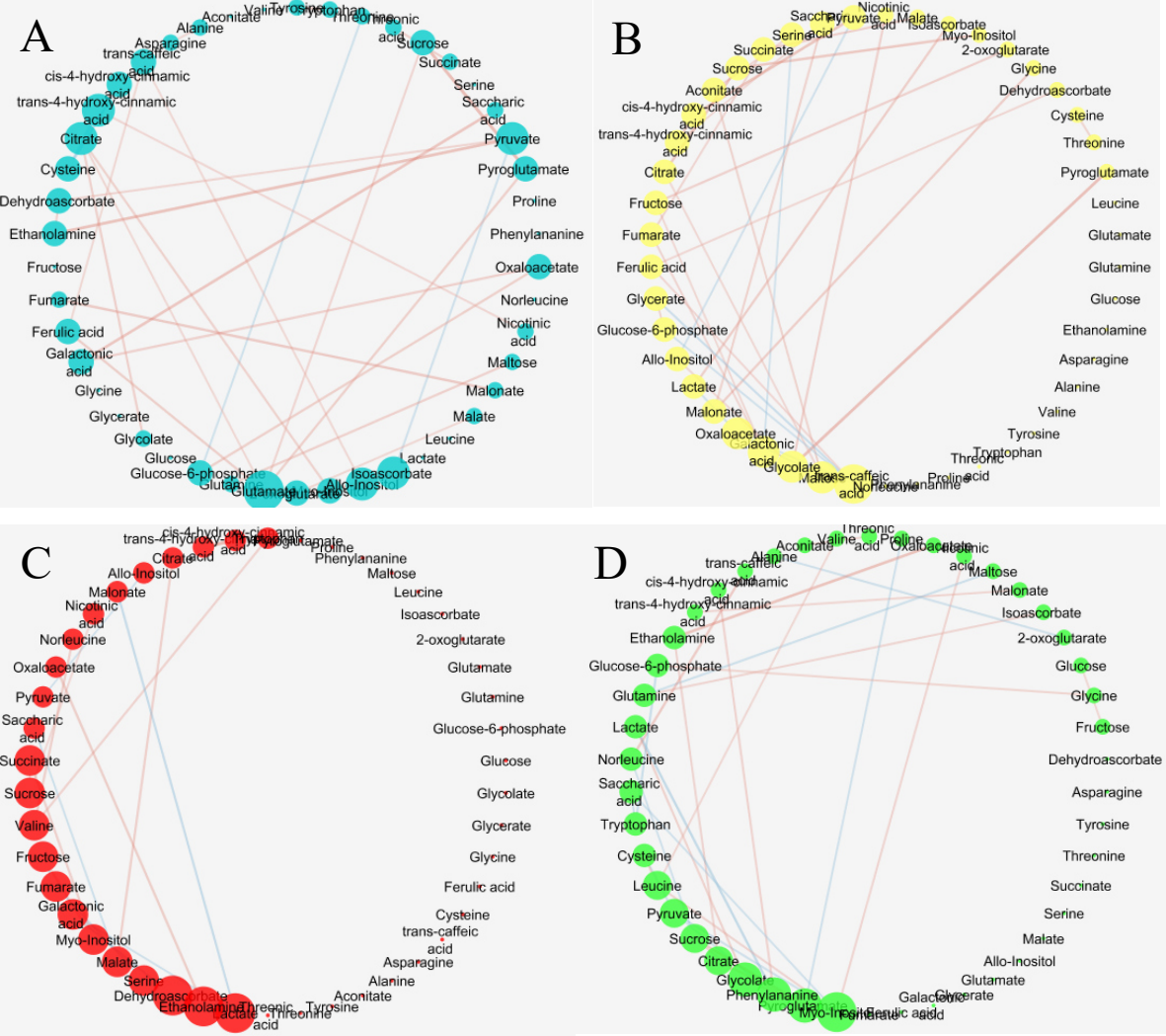
A densidade da rede metabólica foi 1.6 vezes menor na seca severa quando comparada ao controle, enquanto não houve variação na densidade da rede de plantas sob seca moderada ou re-irrigadas. No entanto, a heterogeneidade da rede aumentou em todos os tratamentos, comparado com o controle, sendo a maior diferença reportada para o tratamento de seca severa, que apresentou aumento de 1.5 vezes em relação ao controle. Dentre os tratamentos, a seca moderada apresentou os maiores valores de hubs (22), sendo 11 novas hubs e outras 11 já classificadas como hubs na situação controle e que permaneceram altamente conectadas na situação de estresse, evidenciado pelo valor de preferential attachment (Tabela 9). Os metabólitos com maiores graus de conexão na seca moderada foram ácido transcafeico, ácido galactônico e glicolato com 4, 3 e 3 graus, respectivamente, enquanto que na seca severa foram deidroascorbato, etanolamina e lactato, que apresentaram 3 conexões, e frutose e fumarato, que apresentaram 2 conexões cada.

Figura 13 - *Partial least squares- discriminant analysis* (PLS-DA) (A) e *variable importance in projection* (VIP) scores (B) obtidos da análise de dados metabolômicos de soja sob condições de controle x seca moderada x seca severa x re-irrigação. Metabólitos destacados em rosa, verde e azul são os significativos que possuem maiores contribuições para a formação de clusters com confiança variável alta e metabólitos com VIP scores do PLS-DA acima de 1.



Fonte: elaborada pela autora

Figura 14 - Redes metabólicas de correlação usando dados dde perfil metabólico de soja sob condições de controle(A), seca moderada(B), seca severa(C) e re-irrigação (D). Os nós indicam metabólitos enquanto as linhas representam a força de conexão entre os nós, medido por DSPC. O tamanho dos nós para cada metabólito representa maiores conexões e, consequentemente, maior grau de conectância. Linhas em azul e vermelho representam correlações positivas e negativas, respectivamente.



Fonte: elaborada pela autora

Tabela 9 - Parâmetros de rede para o coeficiente r com tratamentos para soja sob déficit hídrico. *Hubs que se formaram no controle e continuaram no estresse.

	Controle	Seca moderada	Seca severa	Re-irrigação
Densidade	0.029	0.029	0.018	0.030
Heterogeneidade	0.797	0.813	1.165	0.944
Número de Hubs	19	22	12	16
Preferential Attachment*	-	11	5	8
Aparecimento de hubs	-	11	7	8

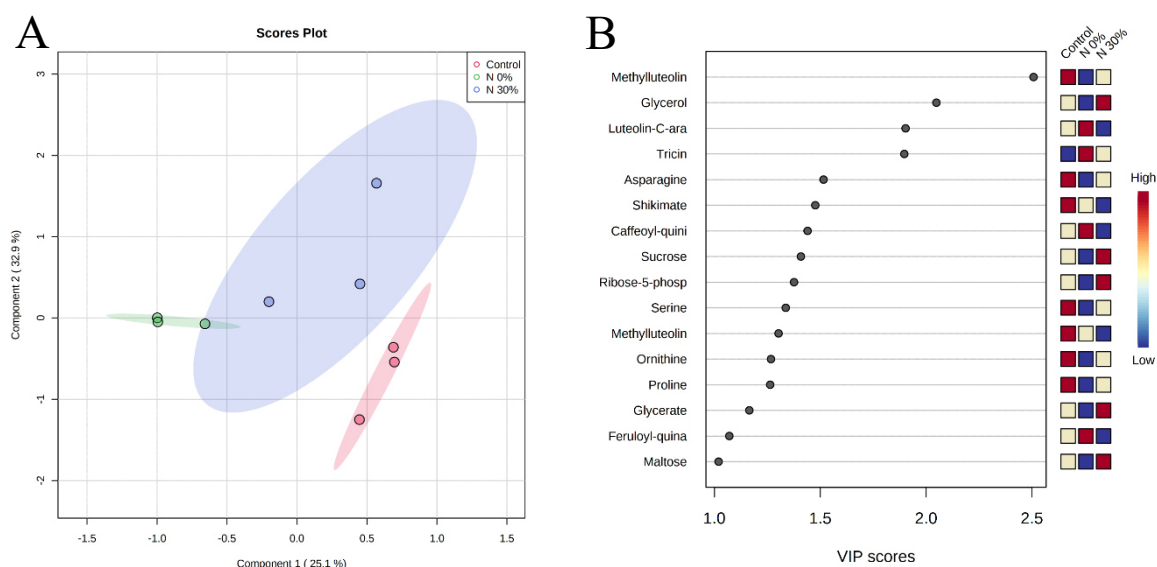
Fonte: elaborada pela autora

5.9 Cana de açúcar sob limitação de nitrogênio

Nesse trabalho, suspensão de células de plantas de cana de açúcar foram submetidas a 2 regimes de privação de nitrogênio, a 0% e 30% (BOTTCHER et al., 2021). O déficit total de nitrogênio (N 0%) alterou substancialmente o perfil metabólico de células de cana-de-açúcar, como evidenciado pela separação completa do tratamento controle pelo componente 1, enquanto o tratamento N 30% apresentou comportamento intermediário entre N 0% e o controle (Figura 15A). Dezesesseis metabólitos, pertencentes a diferentes grupos de compostos, apresentaram VIP score maior que 1 (Figura 15B).

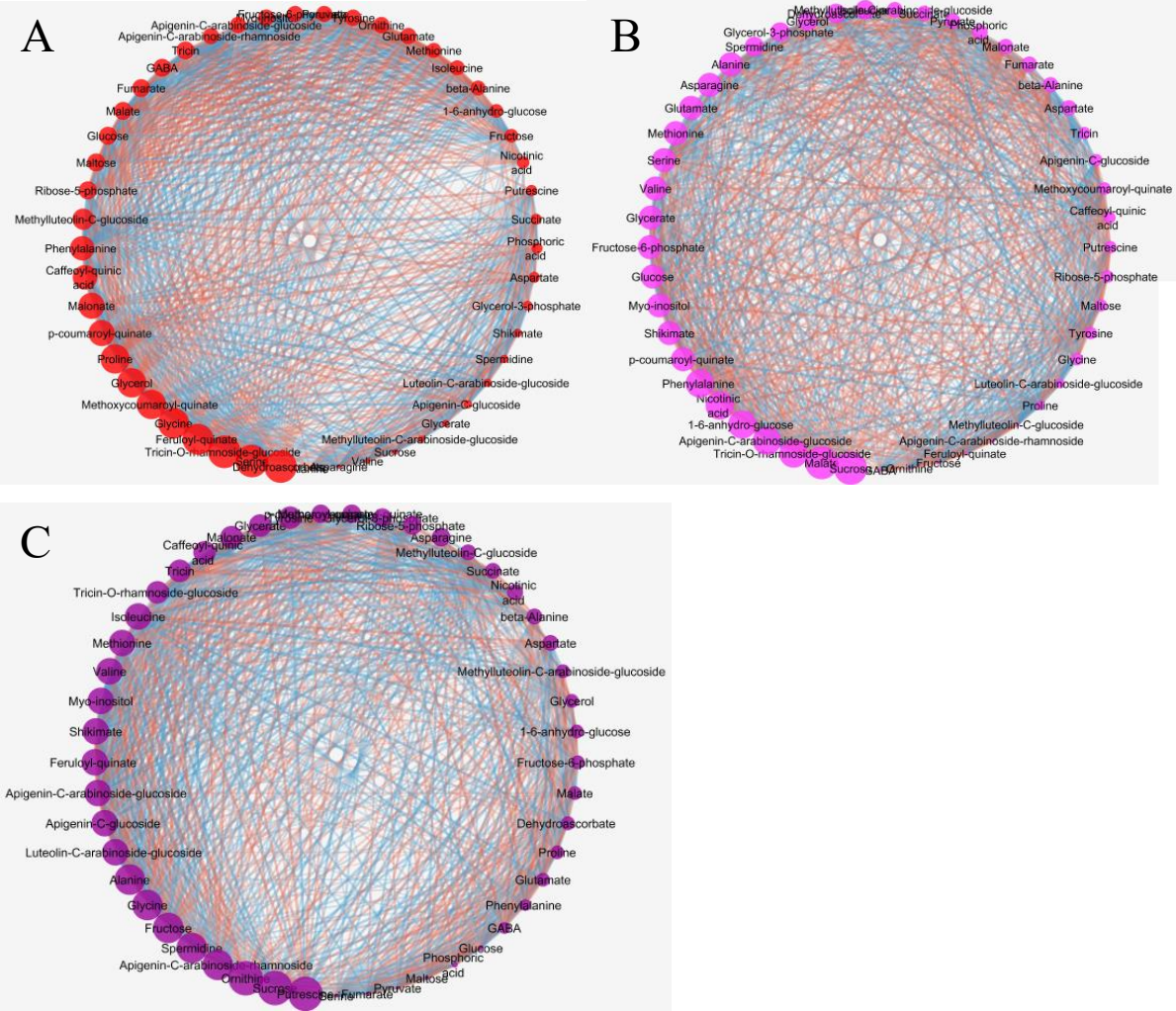
A densidade da rede metabólica para ambas as condições de N apresentou pequenas diminuições. No entanto, a heterogeneidade foi 2.4 e 1.7 vezes menor nas condições de limitação de N 0% e 30%, respectivamente (Tabela 10). O número de hubs também não foi alterado, embora 13 e 15 novas hubs foram identificadas nos tratamentos N 0% e N 30%, respectivamente. Dentre as novas hubs, destaque para sacarose, que apresentou 35 e 36 conexões nos tratamentos N 0% e N 30%, respectivamente (Tabela 10).

Figura 15 - *Partial least squares- discriminant analysis* (PLS-DA) (A) e *variable importance in projection* (VIP) scores (B) obtidos da análise de dados metabolômicos de cana de açúcar sob condições de controle x N 0% x N 30%. Metabólitos destacados em verde e azul são os significativos que possuem maiores contribuições para a formação de clusters com confiança variável alta e metabólitos com VIP scores do PLS-DA acima de 1.



Fonte: elaborada pela autora

Figura 16 - Redes metabólicas de correlação usando dados do perfil metabólico de cana de açúcar sob condições de controle(A), nitrogênio 0%(B) e nitrogênio 30% (C). Os nós indicam metabólitos enquanto as linhas representam a força de conexão entre os nós, medido por DSPC. O tamanho dos nós para cada metabólito representa maiores conexões e, conseqüentemente, maior grau de conectância. Linhas em azul e vermelho representam correlações positivas e negativas, respectivamente.



Fonte: elaborada pela autora

Tabela 10 - Parâmetros de rede para o coeficiente r com tratamentos para cana de açúcar sob limitação de nitrogênio. *Hubs que se formaram no controle e continuaram no estresse.

	Controle	N 0%	N 30%
Densidade	0.667	0.652	0.660
Heterogeneidade	0.170	0.070	0.096
Número de Hubs	26	24	28
Prerential Attachment*	-	11	13
Aparecimento de hubs	-	13	15

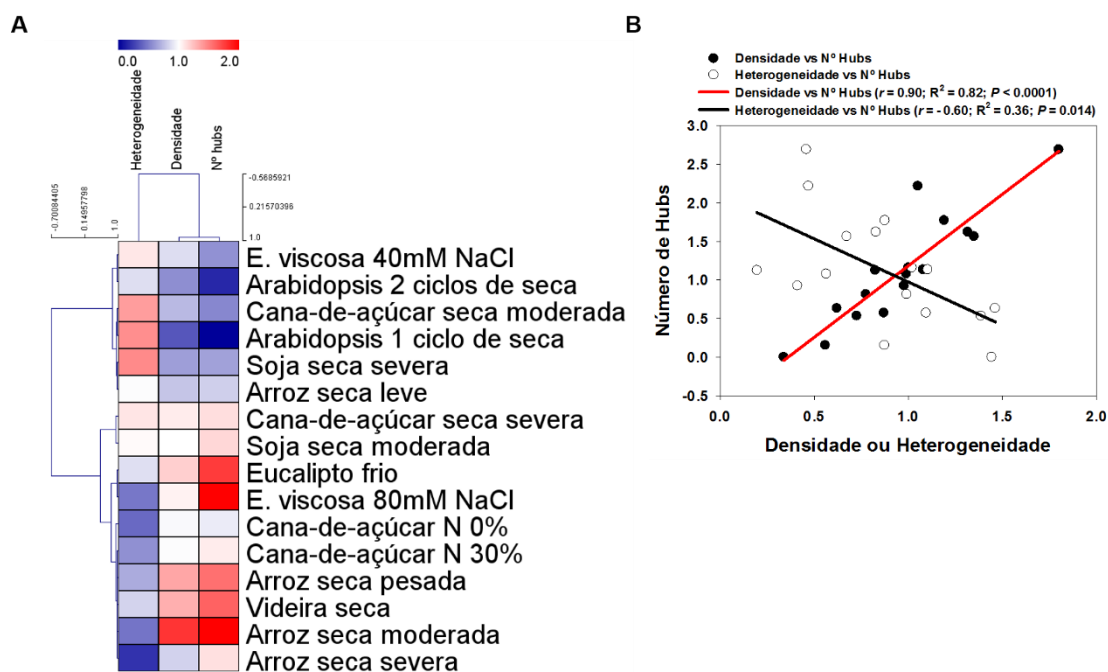
Fonte: elaborada pela autora

5.10 Análise integrativa dos dados

Como forma de integrar os dados gerados neste trabalho, nós utilizamos duas abordagens. Primeiro, nós investigamos as mudanças relativas nos parâmetros de rede de cada estudo. Para isso, os valores de heterogeneidade, densidade e número de hubs (Nº Hubs) obtidos sob estresse foram normalizados dividindo-os pelos valores encontrados no respectivo controle do experimento. O objetivo dessa análise foi de investigar se há um padrão de resposta destes parâmetros sob estresse. No entanto, não foi observado um padrão de resposta em relação ao tipo de estresse e, em alguns casos, nem mesmo dentro da espécie. A análise de clusterização hierárquica (HCL – *hierarchical clustering analysis*) agrupou diferentes espécies e tratamentos de acordo com a diminuição da densidade e Nº hubs, enquanto outro grande grupo foi agrupado de acordo com o aumento nesses parâmetros. Um grupo intermediário contendo cana-de-açúcar sob seca severa e soja sob seca moderada foram clusterizados separadamente, pois apresentaram pequenos aumentos em todos os parâmetros (Figura 17A).

A análise de HCL também ressaltou que os parâmetros densidade e Nº hubs são altamente correlacionados. Diante disso, nós investigamos a relação do Nº hubs com densidade e heterogeneidade da rede através de análise de correlação de Pearson e regressão. O Nº hubs foi positivamente e negativamente correlacionado com a densidade ($r = 0.90$; $P < 0.001$) e a heterogeneidade ($r = -0.59$; $P = 0.014$) da rede, respectivamente (Figura 17B).

Figura 17 - Análise comparativa dos parâmetros obtidos nas análises de redes metabólicas de plantas sob estresse abióticos. A: Comparação das mudanças relativas nos parâmetros heterogeneidade, densidade e número de hubs (Nº Hubs) nos diferentes estudos. Os dados do heat map representam os valores obtidos na situação de estresse descrita à direita do heatmap em relação ao seu respectivo controle. Valores em vermelho e azul representam respectivamente aumento e diminuição nos parâmetros de rede na situação de estresse, quando comparado ao controle. B: Relação entre os parâmetros obtidos nas análises de redes metabólicas. Os dados do gráfico referem-se aos mesmos usados para a realização do heatmap, sendo número de hubs disposto no eixo Y, enquanto o eixo X ressalta os dados de heterogeneidade e densidade da rede. As linhas vermelha e preta se referem à análise de regressão realizada no software Sigma Plot. Os valores da correlação de Pearson (r), do coeficiente de regressão (R^2) e a significância da regressão (P) estão destacados na legenda acima da figura.

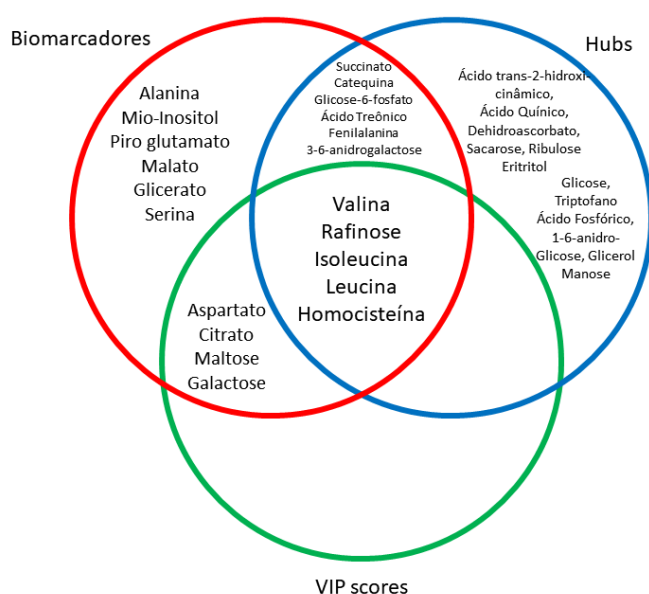


Fonte: elaborada pela autora

Após, nós unimos as informações obtidas nas análises de PLS-DA e de redes com uma análise de identificação de biomarcadores, realizada também na plataforma Metaboanalyst v. 5.0. As análises de biomarcadores são realizadas usando somente dois tratamentos, controle e estresse. Assim, em experimentos em que mais de um nível de estresse foi utilizado, foram obtidos marcadores para cada nível de estresse. Os metabólitos marcadores de estresse foram então agrupados em Diagrama de Venn juntamente com os metabólitos incluídos nas listas de VIP score da análise de PLS-DA e as hubs identificadas nas análises de rede (Figura 18 - exemplo de Diagrama de Venn gerado em cada experimento). A construção dos Diagramas de Venn foram realizadas em software especializado (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) para identificar metabólitos que estejam na intersecção das três análises (biomarcadores, PLS-DA e de redes), para cada experimento, tratamento e nível de estresse. Por exemplo, cinco metabólitos apareceram na intersecção das três análises no experimento de plantas de eucalipto sob frio (Figura 18). Posteriormente, nós

agrupamos as informações de todos os experimentos como forma de verificar quais metabólitos mais apareceram nessas intersecções. Os metabólitos com maior número de intersecções nos diferentes tratamentos estão dispostos na Tabela 11. Dentre estes, asparagina apresentou o maior número de intersecções (6) e em três estresses diferentes (déficit hídrico, estresse salino e limitação de N). Ademais, diversos aminoácidos (Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Gly e Pro), glicerato e os açúcares raffinose e frutose também apresentaram duas ou mais intersecções, sendo que muitos destas intersecções envolveram diferentes tipos de estresse (Tabela 11).

Figura 18 – Diagrama de Venn com metabólitos em comum para Biomarcadores, Hubs e/ou VIP scores de Eucalipto no tratamento com frio.



Fonte: elaborada pela autora

Tabela 11 – Metabólitos com intersecções para aparência nas análises Biomarkers, Hubs e VIP scores, o estresse e o tipo de metabolismo.

Metabólitos	Número de Intersecções	Tipo de estresse	Metabolismo
Asparagina	6	DH, sal, -N	Aminoácidos
Valina	4	DH, frio, sal	Aminoácidos/substrato ETF/ETFqO
Isoleucina	4	DH, frio, sal	Aminoácidos/substrato ETF/ETFqO
Leucina	3	DH, sal	Aminoácidos/substrato ETF/ETFqO
Rafinose	3	DH, frio	Açúcares/Osmoproteção
Glicina	3	DH, sal	Fotorespiração
Fenilalanina	3	DH	Aminoácido/metabolismo secundário
Frutose	3	DH	Açúcar/Sinalização
Glicerato	2	DH, -N	Fotorespiração
Prolina	2	DH, sal	Aminoácidos/Ajustamento osmótico
Triptofano	2	DH	Aminoácidos/metabolismo secundário
Shikimate	2	-N	Metabolismo secundário

Fonte: elaborada pela autora

6 DISCUSSÃO

Diante do quadro de mudanças climáticas, em que secas mais severas e prolongadas e temperaturas extremas tendem a ser mais comuns, é importante entender como as plantas se aclimatam às condições de estresse abióticos para otimizar a produtividade agrícola sob condições estressantes através da engenharia metabólica de plantas (CATTIVELLI et al., 2008). Para isso, o uso de análises sistêmicas são fundamentais para desvendar os mecanismos de aclimação e adaptação das plantas a estresse abióticos (EVANS & LAWSON, 2020). Neste sentido, análises estatísticas multivariadas e de redes são corriqueiramente usadas para melhorar o entendimento de dados produzidos em larga escala, como os derivados de plataformas ômicas (GAGO et al., 2014; GU et al., 2014). No entanto, não está claro quais são as limitações de cada uma dessas análises e como elas podem ser usadas conjuntamente usando dados de metabolômica.

Neste estudo, nós realizamos uma meta-análise usando dados de perfil metabólico de plantas sob estresses com intuito de reinterpretar os dados previamente publicados usando

abordagens sistêmicas e investigar quais os padrões de resposta metabólica emergem a partir da integração de análises sistêmicas de plantas sob diferentes condições de estresse. No entanto, parcialmente contrário à nossa hipótese, nem todas as espécies vegetais possuem redes metabólicas com maior densidade e maior número de hubs, quando comparadas com redes de plantas na ausência de estresse (Figura 17). Portanto, nossos resultados sugerem que não há um padrão de resposta em termos de mudanças na topologia e conectividade da rede metabólica em resposta ao estresse. Esses resultados ressaltam a dificuldade de (i) identificar marcadores metabólicos para múltiplos estresses e (ii) escolher alvos biotecnológicos que otimizem a tolerância ao estresse em diferentes espécies (FLEXAS, 2016; BERTOLLI et al., 2014).

Embora não houve um padrão de resposta nas redes metabólicas, a integração destes dados com as análises de PLS-DA e de biomarcadores permitiu identificar metabólitos chave para a aclimação de plantas de diferentes espécies a tipos de estresse distintos. De maneira geral, a análise de PLS-DA usando dados de perfil metabólico permitiu separar claramente plantas estressadas das plantas em situação controle, similar a outros estudos que usaram PLS-DA ou PCA (*principal component analysis*) (OBATA et al., 2015; FONSECA-PEREIRA et al., 2019; FILIPPOU et al., 2021). Ademais, as intersecções obtidas pelos Diagramas de Venn usando dados de PLS-DA, de redes e de biomarcadores permitiram identificar quais metabólitos são possivelmente mais importantes para a aclimação das plantas aos diferentes tipos e níveis de estresse. Neste sentido, variando de um metabólito em *Arabidopsis* sob seca à treze em cana-de-açúcar sob seca severa, diversos metabólitos apareceram na intersecção do Diagrama de Venn em mais de um tipo e nível de estresse. Dentre estes, destaque maior para asparagina, que apresentou 6 intersecções (Tabela 11), sendo que seu conteúdo aumentou em cinco das seis condições de estresse em relação ao respectivo controle. Asparagina é um metabólito pertencente à rota de síntese de glutamina e da assimilação de amônio, sendo, assim, importante para o metabolismo do nitrogênio (GAUFICHON et al., 2015).

A resposta das plantas à seca envolve a ativação de uma complexa cascata de sinalização e resulta em substanciais alterações metabólicas (FÀBREGAS & FERNIE, 2019). Neste sentido, estudos de genética reversa tem demonstrado que diversas rotas metabólicas são importantes para a aclimação à seca. Por exemplo, foi descoberto que, sob estresse, plantas ativam rotas alternativas para fornecer substrato para a respiração mitocondrial, através, por exemplo, da degradação de proteínas, lisina, aminoácidos de cadeia ramificada (Leu, Ile e Val) e aminoácidos aromáticos (Tyr, Trp e Phe) (ARAÚJO et al., 2011). Neste estudo, diversos desses aminoácidos foram identificados nas intersecções do Diagrama de Venn. Além de otimizar o metabolismo energético através da rota alternativa da respiração ETF/ETFQO

(PIRES et al., 2015), fenilalanina e triptofano, juntamente com shikimato, são importantes substratos para o metabolismo secundário, notadamente ativado em situações de estresse (TOHGE et al., 2017; 2018). Os demais metabólitos com maior número de intersecções estão relacionados a ajustamento osmótico (prolina, frutose e raffinose) e com a fotorrespiração (glicina e glicerato), outros dois mecanismos amplamente documentados de contribuírem para a aclimação ao estresse (GUILHERME et al., 2018; SOUSA et al., 2019; KAUR & ASTHIR, 2015).

As análises de redes de diferentes espécies sob estresse permitiram avaliar o poder do parâmetro “número de hubs” recentemente estabelecido em nosso grupo (FREIRE et al., 2021). Este parâmetro foi criado com intuito de identificar quais são as hubs nas redes metabólicas. Com isso, é possível avaliar a dinâmica da topologia da rede e quais nós (metabólitos) continuam, deixam de ser ou se tornam hubs em uma nova situação de crescimento, ex: após imposição do estresse ou após a transição do escuro para a luz (FREIRE et al., 2021). Interessantemente, o número de hubs foi altamente correlacionado com a densidade da rede ($R^2 = 0.90$; $P < 0.001$), que é um parâmetro bem estabelecido e amplamente usado (SAITO et al., 2012). No entanto, a densidade da rede fornece uma ideia apenas sobre a conectividade da rede *per se*, ao passo que, além disso, o número de hubs fornece quais hubs mais influenciam a topologia da rede de acordo com as condições em que a planta está submetida. Portanto, o parâmetro “número de hubs” parece promissor para investigar a dinâmica das hubs em redes biológicas. Estudos futuros são agora necessários para investigar a aplicabilidade deste parâmetro em outras redes biológicas.

7 CONCLUSÃO

A integração das análises de rede, PLS-DA e de biomarcadores permitiu identificar quais metabólitos são possíveis marcadores dos estresses abióticos testados aqui, dentre os quais destaca-se asparagina, aminoácidos (Val, Ile, Leu, Gly, Phe, Pro e Trp), açúcares (frutose e raffinose) e shikimato. Nossa meta-análise fornece uma estratégia de análise de dados sistêmica para análise de dados de perfil metabólico de plantas sob estresse, em que diferentes ferramentas são utilizadas para identificar marcadores metabólicos. Ademais, nossas análises fornecem boas perspectivas para o estabelecimento do parâmetro “número de hubs” em estudos de biologia de sistemas.

REFERÊNCIAS

- ALBERT, R. (2005). Scale-free networks in cell biology. **Journal of Cell Science**, 118(21), 4947–4957. <https://doi.org/10.1242/jcs.02714>
- ARAÚJO, W. L., *et al.* (2010). Identification of the 2-hydroxyglutarate and isovaleryl-CoA dehydrogenases as alternative electron donors linking lysine catabolism to the electron transport chain of Arabidopsis mitochondria. **Plant Cell**, 22(5), 1549–1563. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.075630>
- ASSENOV, Y., *et al.* (2008). Computing topological parameters of biological networks. **Bioinformatics**, 24(2), 282–284. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm554>
- ASSENOV, Yassen *et al.*, Computing topological parameters of biological networks, **Bioinformatics**, Volume 24, Issue 2, 15 January 2008, Pages 282–284, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm554>
- AVILA, R. T., Martins, *et al.* (2020). Starch accumulation does not lead to feedback photosynthetic downregulation in girdled coffee branches under varying source-to-sink ratios. **Trees - Structure and Function**, 34(1). <https://doi.org/10.1007/s00468-019-01893-8>
- BARABÁSI, AL., OLTVAI, Z. Network biology: understanding the cell's functional organization. **Nat Rev Genet** 5, 101–113 (2004). <https://doi.org/10.1038/nrg1272>
- BASU, S., *et al.* (2017). Sparse network modeling and metscape-based visualization methods for the analysis of large-scale metabolomics data. **Bioinformatics**, 33(10), 1545–1553. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx012>
- BATISTA, V. C. V., *et al.* (2019). Salicylic acid modulates primary and volatile metabolites to alleviate salt stress-induced photosynthesis impairment on medicinal plant *Egletes viscosa*. **Environmental and Experimental Botany**, 167(June), 103870. <<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103870>>

BIRAMI, B., Nägele, T., *et al.* (2020), Hot drought reduces the effects of elevated CO₂ on tree water-use efficiency and carbon metabolism. **New Phytol**, 226: 1607-1621. <https://doi.org/10.1111/nph.16471>

BOTTCHER, A., *et al.* (2021). Sugarcane cell suspension reveals major metabolic changes under different nitrogen starvation regimes. **Bragantia**, 80(Stitt 1999). <https://doi.org/10.1590/1678-4499.2021-0009>

CATTIVELLI, L., *et al.* (2008). Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. **Field Crops Research**, 105(1–2), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2007.07.004>

CHONG, Jasmine, XIA Jianguo, MetaboAnalystR: an R package for flexible and reproducible analysis of metabolomics data, **Bioinformatics**, Volume 34, Issue 24, 15 December 2018, Pages 4313–4314, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty528>

DETMANN, K. C., *et al.* (2012). Silicon nutrition increases grain yield, which, in turn, exerts a feed-forward stimulation of photosynthetic rates via enhanced mesophyll conductance and alters primary metabolism in rice. **New Phytologist**, 196(3), 752–762. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04299.x>

DOMINGUES-JUNIOR, A. P., *et al.* (2019). A cold change: how short low temperature exposure affects primary metabolism in leaves and stems of two eucalyptus species. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, 31(4), 429–444. <https://doi.org/10.1007/s40626-019-00156-8>

DA FONSECA-PEREIRA, P., *et al.* (2019). The Mitochondrial Thioredoxin System Contributes to the Metabolic Responses under Drought Episodes in Arabidopsis. **Plant and Cell Physiology**, 60(1), 213–229. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy194>

EVANS, J. R., & LAWSON, T. (2020). From green to gold: Agricultural revolution for food security. **Journal of Experimental Botany**, 71(7), 2211–2215. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa110>

FÀBREGAS, N., & FERNIE, A. R. (2019). The metabolic response to drought. *Journal of Experimental Botany*, 70(4), 1077–1085. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery437>

FILIPPOU, P., *et al.* (2021). Systems biology reveals key tissue-specific metabolic and transcriptional signatures involved in the response of *Medicago truncatula* plant genotypes to salt stress. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 2133–2147. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.04.018>

FLEXAS, J. (2016). Genetic improvement of leaf photosynthesis and intrinsic water use efficiency in C3 plants: Why so much little success? *Plant Science*, 251, 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.05.002>

FREIRE, F. B. S., *et al.* (2021). Mild reductions in guard cell sucrose synthase 2 expression leads to slower stomatal opening and decreased whole plant transpiration in *Nicotiana tabacum* L. *Environmental and Experimental Botany*, 184(December 2020). <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104370>

GAGO, J., *et al.* (2014). Opportunities for improving leaf water use efficiency under climate change conditions. *Plant Science*, 226, 108–119. <
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.04.00>>

GAGO, J., *et al.* (2017). Integrative field scale phenotyping for investigating metabolic components of water stress within a vineyard. *Plant Methods*, 13(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0241-z>

GAUFICHON, L., ROTHSTEIN, S. J., & SUZUKI, A. (2016). Asparagine metabolic pathways in arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 57(4), 675–689. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv184>

G. M. SOUZA e MARCOS S. BUCKERIDGE (2004). Sistemas complexos: novas formas de ver a Botânica. *Revista Brasil. Bot.*, V.27, n.3, p.407-419, jul.-set. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbb/a/4NqfQKWYDH8WvcXLmPRQxDR/?format=pdf&lang=pt>

G. M. SOUZA., *et al.* The complexity-stability hypothesis in plant gas exchange under water deficit. **Brazilian Journal of Plant Physiology** [online]. 2005, v. 17, n. 4 [Accessed 20 January 2022], pp. 363-373. Available from: < <https://doi.org/10.1590/S1677-04202005000400004> >.

G.M. SOUZA, *et al.* (1999). Toward a systemic plant physiology. **Theor. Exp. Plant Physiol.** 28, 341–346 (2016). <https://doi.org/10.1007/s40626-016-0071-9>

GUILHERME, E. A., *et al.* (2019). Increase in assimilatory nitrate reduction and photorespiration enhances CO₂ assimilation under high light-induced photoinhibition in cotton. **Environmental and Experimental Botany**, 159(October 2018), 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.12.012>

HARTWELL, L., Hopfield, J., Leibler, S. *et al.* From molecular to modular cell biology. **Nature** 402, C47–C52 < <https://doi.org/10.1038/35011540> >.

JEONG, H., MASON, S., BARABÁSI, AL. *et al.* Lethality and centrality in protein networks. **Nature** 411, 41–42 (2001). <https://doi.org/10.1038/35075138>

KAUR, G., & ASTHIR, B. (2015). Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. **Biologia Plantarum**, 59(4), 609–619. <https://doi.org/10.1007/s10535-015-0549-3>

MEDEIROS, D.B., *et al.* (2015), Systems biology of stomatal movements. **Plant Cell Environ**, 38: 1457-1470. < <https://doi.org/10.1111/pce.12517> >

MESQUITA, R. O., *et al.* (2020). Physiological approach to decipher the drought tolerance of a soybean genotype from Brazilian savana. **Plant Physiology and Biochemistry**, 151(March), 132–143. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.03.004>

NETO, J.B. *et al* (2021). Drought and climate change impacts on plant metabolism: A review. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 8, p. e16710817060. < <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i8.17060> >.

PANG Zhiqiang, *et al.* (2021). Linking Plant Secondary Metabolites and Plant Microbiomes: A Review. **Frontiers in Plant Science**, v. 12. < <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.621276> > Available in: < <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2021.621276> >

PAULO V. L. Souza, *et al.* (2019) Function and Compensatory Mechanisms Among the Components of the Chloroplastic Redox Network, **Critical Reviews in Plant Sciences**, 38:1, 1-28, < <https://doi.org/10.1080/07352689.2018.1528409> >.

PIRES, M. V., *et al.* (2016). The influence of alternative pathways of respiration that utilize branched-chain amino acids following water shortage in Arabidopsis. **Plant Cell and Environment**, 39(6), 1304–1319. <https://doi.org/10.1111/pce.12682>

ROSADO-SOUZA, L., *et al.* (2015). Exploring natural variation of photosynthetic, primary metabolism and growth parameters in a large panel of Capsicum chinense accessions. **Planta**, 242(3), 677–691. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2332-2>

SAITO, R., *et al.* (2012). A travel guide to Cytoscape plugins. **Nat Methods** 9, 1069–1076 < <https://doi.org/10.1038/nmeth.2212> >

SHANNON, Paul *et al.*, Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks, **Genome Res**, 2003, 13: 2498-2504. <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.1239303>

S. H. YOOK, *et al.* (2001). Weighted Evolving Networks. **Phys. Rev. Lett.** v. 86, 5835. < <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.86.5835> > Available in: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.86.5835>

Sousa, R. H. V., *et al.* (2019). Impairment of peroxisomal APX and CAT activities increases protection of photosynthesis under oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, 70(2), 627–639. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery354>

TODAKA, D., *et al.* (2017). Temporal and spatial changes in gene expression, metabolite accumulation and phytohormone content in rice seedlings grown under drought stress conditions. **Plant Journal**, 90(1), 61–78. <https://doi.org/10.1111/tpj.13468>

TOHGE, T., DE SOUZA, L. P., & FERNIE, A. R. (2017). Current understanding of the pathways of flavonoid biosynthesis in model and crop plants. **Journal of Experimental Botany**, 68(15), 4013–4028. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx177>

TOHGE, T., PEREZ DE SOUZA, L., & FERNIE, A. R. (2018). On the natural diversity of phenylacylated-flavonoid and their in planta function under conditions of stress. **Phytochemistry Reviews**, 17(2), 279–290. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9531-3>

VITAL, C. E., *et al.* (2017). An integrative overview of the molecular and physiological responses of sugarcane under drought conditions. **Plant Molecular Biology**, 94(6), 577–594. <https://doi.org/10.1007/s11103-017-0611-y>