

ANÁLISE DO EFEITO DO ANTIBIÓTICO DA CLASSE DOS AMONIGLICOSÍDEOS SOBRE O CRESCIMENTO E EXPRESSÃO GÊNICA DE *XYLELLA FASTIDIOSA* EM CONDIÇÕES DE BIOFILME.

JACQUELINE C. OLIVATO^{1,2}; ALESSANDRA A. DE SOUZA¹

Nº 0700015

Resumo

Xylella fastidiosa, agente causal da clorose variegada dos citros, coloniza o xilema de plantas pela formação de agregados celulares aderentes, denominados biofilmes, cuja estrutura apresenta menor suscetibilidade a antibióticos. Estudos com *Pseudomonas aeruginosa* comprovaram que doses sub-inibitórias de tobramicina induzem a formação de biofilme. Em *P. aeruginosa*, o gene *arr* (aminoglycoside response regulator) é responsável por esta indução. Este gene codifica uma proteína de membrana interna (Arr), cujo substrato é um c-di-GMP, mensageiro secundário que regula a adesividade da superfície da célula. O c-di-GMP é regulado por dois domínios (EAL e GGDEF) presentes em Arr. Em *X. fastidiosa* foi detectada uma proteína hipotética com 36% de identidade com Arr, apresentando um domínio EAL na mesma região de Arr. Deste modo, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da tobramicina no biofilme de *X. fastidiosa*, assim como monitorar a expressão do gene XF0470 através de RT-qPCR. Os resultados deste trabalho indicam que doses sub-inibitórias de tobramicina podem induzir o aumento do biofilme em *X. fastidiosa*. A maior expressão do gene XF0470 sugere que, assim como o gene *arr* de *P. aeruginosa*, este gene tenha um papel biológico na indução do biofilme de *X. fastidiosa*, uma vez que, regulação positiva foi observada na presença de tobramicina.

Abstract

Xylella fastidiosa, the causal agent of Citrus Variegated Chlorosis, colonizes the xylem of plants by the formation of adherent cellular aggregates, named biofilms, whose structure show lower susceptibility to antibiotics. Studies on the pathogen *Pseudomonas aeruginosa* showed that sub-inhibitory doses of tobramycin induce the formation of biofilm. In *P. aeruginosa*, the *arr* (aminoglycoside response regulator) gene is responsible for this induction. This gene encodes an internal membrane protein (Arr), whose substrate is a c-di-

¹Bolsista CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista-Unesp, Rio Claro-SP. jaque@rc.unesp.br

²Orientador: Pesquisador, Centro APTA Citros Sylvio Moreira-IAC. alessandra@centrodecitricultura.br

GMP, secondary messenger that regulates the adhesiveness of the cell surface. c-di-GMP is regulated by two domains (EAL e GGDEF) present in Arr. In *X. fastidiosa*, it was detected a hypothetical protein with 36% of identity with Arr, showing an EAL domain in the same region of Arr. Therefore, this work aimed to evaluate the effect of tobramycin in the biofilm of *X. fastidiosa*, as well as to monitor the expression of the XF0470 gene through RT-qPCR. The results of this work indicate that sub-inhibitory doses of tobramycin can induce increase of biofilm biomass in *X. fastidiosa*. The higher expression of the XF0470 gene suggests that, as the *arr* gene of *P. aeruginosa*, this gene has a biological role in the induction of biofilm of *X. fastidiosa*, since positive regulation was observed in the presence of tobramycin.

Introdução

Xylella fastidiosa é o agente causal da clorose variegada dos citros (CVC), que afeta todas as variedades de laranja doce no Brasil, causando grandes prejuízos econômicos. Este microorganismo coloniza o xilema das plantas pela formação de agregados celulares aderentes, denominados biofilmes, cuja estrutura apresenta menor suscetibilidade a antibióticos, sendo este seu principal mecanismo de patogenicidade.

Estudos dos patógenos oportunistas *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* comprovaram que doses sub-inibitórias de tobramicina induzem a formação de biofilme (HOFFMAN et al., 2005), sendo este resultado uma possível reação de defesa específica à presença de aminoglicosídeos. Em *P. aeruginosa* o gene *arr* (aminoglycoside response regulator) foi essencial para essa indução, contribuindo para a resistência específica ao antibiótico. Este gene codifica uma proteína de membrana interna (Arr), cujo substrato é um c-di-GMP, mensageiro secundário que regula a adesividade da superfície da célula.

Utilizando-se a ferramenta BlastP com a sequência de aminoácidos da proteína codificada por *arr* em *P. aeruginosa*, foi encontrada em *X. fastidiosa* uma proteína hipotética (XF0470) com 36% de similaridade com *arr*. Arr apresenta dois domínios (EAL e GGDEF) responsáveis pela regulação de c-di-GMP. A proteína XF0470 apresenta um domínio EAL na mesma região de Arr. As análises prévias descritas acima indicam que o gene XF0470 pode apresentar função biológica similar ao *arr* em *P. aeruginosa*, o que seria o primeiro relato da função deste gene em *X. fastidiosa*. Deste modo, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da tobramicina na indução da formação do biofilme de *X. fastidiosa*, assim como monitorar a expressão do gene XF0470 através de RT-qPCR visando associar o papel biológico deste gene com a resistência de *X. fastidiosa* em biofilme.

Material e métodos

Foi utilizada a estirpe 9a5c de *X. fastidiosa*, isolada de plantas de laranja pêra com sintomas de CVC e plaqueada em meio PW sólido. As colônias foram inoculadas em meio PW líquido e crescidas por 7 dias para obtenção do inóculo, de acordo com os procedimentos descritos por Souza et al. (2004).

Para selecionar as doses sub-inibitórias, foi estabelecido o valor de concentração mínima inibitória (MIC) para *X. fastidiosa* na presença de tobramicina. Para tal, foram adicionadas diferentes concentrações de tobramicina no biofilme já formado em superfície de vidro em placas NUNC. Após 24 horas as células foram plaqueadas em meio PW sólido e mantidas a 28°C até crescimento de colônias. A concentração inicial utilizada para determinação da MIC foi 0,1 µg/mL, sendo aumentada gradativamente até total erradicação das células.

As 4 doses sub-inibitórias selecionadas para teste do efeito na indução do biofilme foram 0,2; 0,4; 0,8 e 1,2 µg/mL. Para avaliação deste efeito, as células foram inoculadas em placas NUNC contendo meio PW líquido, sendo utilizado um “coupon” de acrílico ou de vidro como superfície de adesão. Após 5 dias de crescimento, os “coupons” foram transferidos para outra placa NUNC contendo meio PW líquido + tobramicina nas diferentes concentrações selecionadas. Como controle, um “coupon” foi imerso em meio PW sem adição do antibiótico. Os acrílicos foram mantidos por mais 5 dias e em seguida foi avaliada a indução na formação de biofilme pela quantificação de exopolissacarídeos (EPS) e massa celular e diluição serial para contagem da UFC (unidade formadora de colônia). Foram realizadas três repetições biológicas.

A quantificação de EPS foi realizada pela retirada do biofilme formado dos acrílicos com água destilada e adição de 100 µL de metanol e 1 mL de ácido sulfúrico às amostras. A absorbância foi lida a 470nm. A quantificação de massa celular do biofilme formado na presença e ausência de antibiótico foi realizada pelo método de cristal violeta descrito por Espinosa-Urgel et al. (2000), em que foi feita a lavagem das superfícies de adesão com água destilada. Uma solução de cristal violeta a 1% foi adicionada em cada amostra, sendo feita a eluição da solução após 15 minutos pela adição de ácido acético. A absorbância da solução foi medida a 600nm.

A expressão do gene XF0470 sob diferentes concentrações de tobramicina foi avaliada após extração de RNA total das células crescidas na presença de antibiótico, além

do controle. A extração foi feita utilizando o kit de extração Qiagen (RNeasy mini kit). A concentração do RNA foi medida a 260nm e a integridade por corrida eletroforética em gel de agarose 1%. A avaliação da expressão gênica foi feita por PCR quantitativo em tempo real RT-qPCR, utilizando-se os primers para gene alvo XF0470 e o controle endógeno (*petC*), previamente marcados com FAM, através do sistema LUX (Invitrogen). O controle endógeno foi utilizado para normalizar as amostras das possíveis diferenças de concentrações de cDNA. Como calibrador foi utilizado o controle (Biofilme sem tobramicina). A quantificação relativa foi feita utilizando o ABI PRISM 7000 Sequence Detector System (Applied Biosystems). As reações foram feitas em triplicatas utilizando sempre controle sem cDNA para detectar possíveis contaminações.

Resultados e discussão

Para determinação da MIC, o crescimento sob as diferentes concentrações de tobramicina foi analisado, a MIC estabelecida foi de 15 µg/mL. Observou-se que as concentrações sub-inibitórias entre 0,1 e 1,0 µg/ml induziram o crescimento da bactéria, comparado ao controle sem a tobramicina, ocorrendo um pico de indução da concentração de 0,4 µg/ml (FIGURA 1). Desta forma, algumas doses foram selecionadas para determinação da UFC por diluição em série, sendo elas: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,8 µg/ml (com crescimento maior que o controle), 1,2; 2,0 e 3,0 µg/ml (com crescimento igual ou inferior ao controle). Os resultados obtidos indicam maior indução do biofilme nas doses de 0,1 a 0,4 (TABELA 1), ficando evidente um pico de indução na concentração de 0,4µg/mL (FIGURA 1)

TABELA 1. Análise do crescimento do biofilme de *X. fastidiosa* pelo método de diluição serial em diferentes concentrações de tobramicina

Concentração	Crescimento	Diluição	Número de colônias
Controle	++++	10 ⁶	2
0,1	++++	10 ⁶	2
0,2	++++	10 ⁶	1
0,3	++++	10 ⁶	2
0,4	++++	10 ⁶	12
0,8	++++	10 ⁵	8
1,2	+++	10 ⁵	2
2,0	++	10 ⁴	14
3,0	+	10 ³	-

++++ = crescimento muito intenso

+++ = crescimento moderado

+ = muito pouco crescimento

++++ = crescimento intenso

++ = pouco crescimento

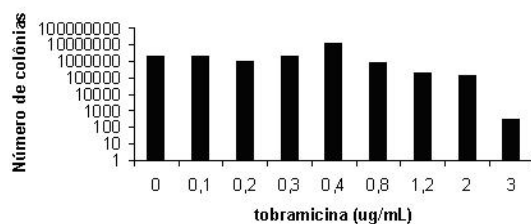


FIGURA 1. Número de UFC em diferentes concentrações de tobramicina

A partir da análise dos resultados, as concentrações selecionadas para avaliação de crescimento do biofilme foram 0,2; 0,4; 0,8 e 1,2 $\mu\text{g/mL}$. O resultado obtido para a quantificação de EPS destas 4 doses indica maior produção de exopolissacarídeos superior ao controle na concentração de 0,4 $\mu\text{g/mL}$. A dose de 1,2 $\mu\text{g/mL}$ apresentou produção de EPS inferior ao controle, sendo que as doses 0,2 e 0,8 $\mu\text{g/mL}$ não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle de acordo com o teste estatístico realizado no programa ASSISTAT, aplicando o teste t , com 5 % de probabilidade (FIGURA 2). Tais dados sugerem indução na produção do biofilme em doses ate 0,4 $\mu\text{g/mL}$. Contudo estes dados precisam ser repetidos para confirmação desta hipótese, uma vez que as análises da quantificação de massa celular pelo método de cristal violeta indicaram produção de biofilme inferior ao controle em todas as concentrações testadas, sendo que a quantidade de biofilme reduziu de acordo com o aumento da dose de tobramicina (FIGURA 3).

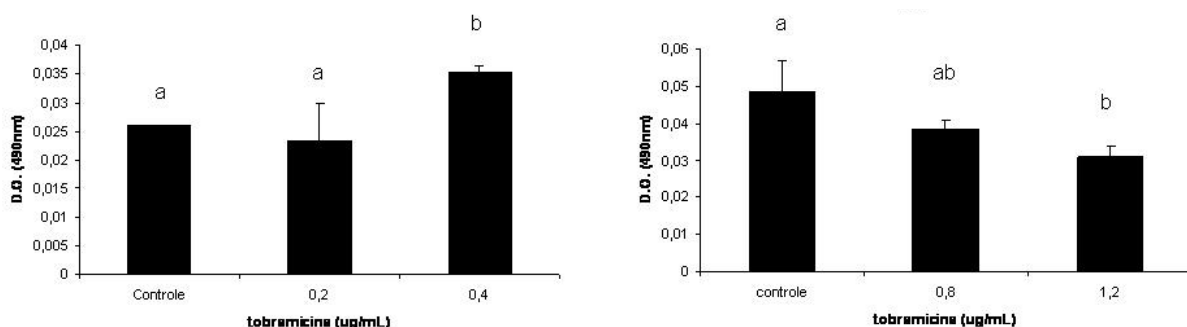


FIGURA 2. Produção de EPS em diferentes concentrações de tobramicina. Letras iguais não diferem estatisticamente a nível de 5% de probabilidade.

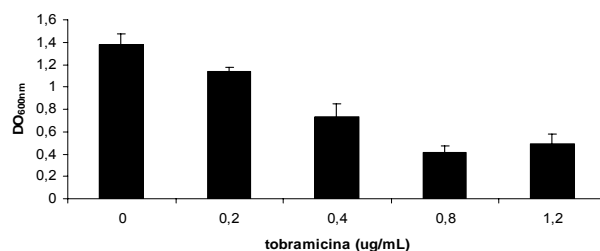


FIGURA 3. Massa celular obtida em diferentes concentrações de tobramicina

As análises de RT-PCR mostraram uma indução na expressão do gene XF0470 nas células do biofilme submetidas a 0,4; 0,8 e 1,2 $\mu\text{g/ml}$, ocorrendo maior expressão na dose de 0,8 $\mu\text{g/ml}$ (FIGURA 4). A maior expressão do gene XF0470, assim como o gene *arr* em *P. aeruginosa*, reforça a hipótese de que este gene pode participar da indução do biofilme de *X. fastidiosa* em resposta a tobramicina. Uma das possibilidades para comprovação desta hipótese seria obter mutante para este gene e posterior avaliação do possível fenótipo de diminuição do biofilme. Contudo, outros dois genes encontrados no genoma da *X. fastidiosa* (XF2624 e XF0401) e anotados como proteínas hipotéticas, também apresentam similaridade com *arr* de *P. aeruginosa*. Por este motivo, é imprescindível determinar qual dos genes realmente poderia estar associado com a resposta a aminoglicosídeos.

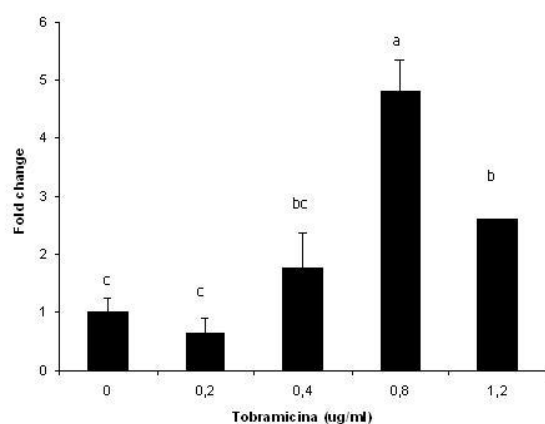


FIGURA 4. Análise da expressão gênica de XF0470 no biofilme de *X. fastidiosa* com 0; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,2 $\mu\text{g/ml}$ de tobramicina. Letras iguais não diferem estatisticamente a nível de 5% de probabilidade.

Referências bibliográficas

HOFFMAN, L.R. et al., Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation, **Nature**, v. 436, n.03912, p.1171-1175, 2005.

SOUZA, A.A et al., Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* adhesion during biofilme formation in vitro, **FEMS Microbiology letters**, v. 237, p. 341-353, 2004.

ESPINOSA-URGEL, M. et al, Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds, **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 9, p. 2363-2369, 2000