

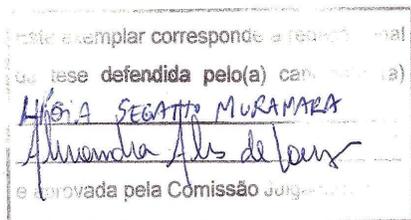
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Lígia Segatto Muranaka

**“MECANISMOS ENVOLVIDOS COM A SOBREVIVÊNCIA DE
XYLELLA FASTIDIOSA EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE E EFEITO DE
N-ACETIL-L-CISTEÍNA EM SEU BIOFILME.”**



Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética de Microrganismos.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Alessandra Alves de Souza.
Co-Orientador(a): Prof. Dr. Marco Aurélio Takita.

Campinas, 15 de junho de 2010

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

M931m	<p>Muranaka, Lígia Segatto Mecanismos envolvidos com a sobrevivência de <i>Xylella fastidiosa</i> em condições de estresse e efeito de N-Acetil-L-Cisteína em seu biofilme / Lígia Segatto Muranaka. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.</p> <p>Orientadores: Alessandra Alves de Souza, Marco Aurélio Takita. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Clorose variegada dos citros. 2. Tetraciclina. 3. Cobre. 4. Expressão gênica. 5. N-acetil-L-cisteína. I. Souza, Alessandra Alves de. II. Takita, Marco Aurélio. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">(rcdt/ib)</p>
--------------	--

Título em inglês: Mechanisms involved in *Xylella fastidiosa* survival under stress conditions and effect of N-Acetyl-L-Cysteine on its biofilm.

Palavras-chave em inglês: Citrus variegated chlorosis; Tetra cycline; Copper; Gene expression; N-acetyl-L-cysteine.

Área de concentração: Genética de Microorganismos.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Alessandra Alves de Souza, Anete Pereira de Souza, Marie-Anne Van Sluys.

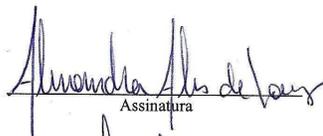
Data da defesa: 15/06/2010.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 15 de junho de 2010

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Alessandra Alves de Souza (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Anete Pereira de Souza


Assinatura

Profa. Dra. Marie-Anne van Sluys


Assinatura

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz

Assinatura

Prof. Dr. Wellington Luiz de Araujo

Assinatura

À minha família,
Por todo amor, ensinamentos e apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, pelos ensinamentos e dedicação. À minha mãe por acreditar e investir acima de tudo em nossa educação. Também pela compreensão e por ter estado sempre presente em minha vida. Aos meus avós pela educação e amor e ao meu irmão pela constante alegria e entusiasmo.

À Dra. Alessandra Alves de Souza pela orientação, ensinamentos e oportunidade de crescimento profissional e pessoal. Seu entusiasmo e interesse sempre me motivaram.

Ao Dr Marco Aurélio Takita pela co-orientação, frequentes discussões e grandes idéias e ao Dr. Luciano Kishi pela ajuda com a bioinformática.

Ao Dr. Marcos Antônio Machado pela oportunidade de realização do trabalho e por possibilitar acesso à toda infra-estrutura do Centro de Citricultura Sylvio Moreira durante o desenvolvimento de meus experimentos.

Ao professor Dr. Moacir Forassim e à professora Dra. Maria Fátima das Gracas F. Silva pela ajuda na realização dos experimentos com HPLC.

Aos professores que participaram da banca examinadora de qualificação e pré-banca pela leitura crítica do trabalho e sugestões.

A todos os integrantes do grupo da *Xylella*, Raquel Caserta, Mariana Silva, Carolina Munari, Jacqueline Olivato, Gabriela Carrer, Carolina Rossi, Helvécio, Alessandra e Marco Takita pelas frequentes discussões, compartilhamento de idéias e companherismo no laboratório. Aos amigos da pós-graduação Samantha, Valéria, Karen, Rodrigo, Layanne, Frank, Thiago e Rosângela que acompanharam minhas ansiedades, dificuldades e vitórias e aos amigos Stela e Betinho pelos momentos de descontração e todos os pesquisadores e estagiários do laboratório de biotecnologia por proporcionar um espaço agradável de trabalho.

Aos técnicos de laboratório e funcionários do Centro de Citricultura Sylvio Moreira pelo apoio no laboratório e para a realização dos experimentos em casa de vegetação, que além do apoio no laboratório, também foram amigos.

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o meu aprendizado durante mais essa etapa.

*“Se procurar bem você acaba encontrando.
Não a explicação (duvidosa) da vida,
Mas a poesia (inexplicável) da vida”.*
Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

MURANAKA, L. S. **Mecanismos envolvidos com a sobrevivência de *Xylella fastidiosa* em condições de estresse e efeito de N-Acetil-L-Cisteína em seu biofilme.** 2010. 161p. Dissertação de mestrado- Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Xylella fastidiosa é uma bactéria Gram-negativa que causa várias doenças em diferentes espécies de plantas, como a clorose variegada dos citros (CVC) em *Citrus sinensis*, cujos danos econômicos são da ordem de milhões de dólares anuais. O desenvolvimento dos sintomas tem sido associado ao bloqueio dos vasos do xilema causado pela formação de um biofilme pela bactéria. Recentemente foi verificado que o biofilme de *X. fastidiosa* é mais resistente a compostos antimicrobianos que a forma planctônica. Essa resistência tem se mostrado um fenômeno complexo que não pode ser explicado por um único mecanismo, e sim por multifatores. Nesse sentido, a proposta desse trabalho foi identificar, por microarranjos de DNA, genes possivelmente associados à adaptação do biofilme na presença de compostos antimicrobianos, em concentrações letais para células em crescimento planctônico, mas que não inibiram o crescimento do biofilme. Foram encontrados 223 (7,87%) CDS induzidas na presença de cobre e 150 (5,29%) reprimidas. Com tetraciclina foram 450 (15,89%) induzidas e 449 (15,85%) reprimidas. Muitas sequências codificadoras envolvidas com funções da síntese proteica, metabolismo energético, divisão celular e movimentação foram moduladas negativamente em ambas as situações, sugerindo que tais modificações contribuiriam para um provável estado de resistência. Com a adição da dose subinibitória de cobre também foi observada a indução de genes relacionados à adesão e produção de toxinas, que estão envolvidos com a virulência da bactéria em planta, o que sugere esta seria aumentada possivelmente induzindo maior severidade de sintomas. Já com tetraciclina o oposto foi observado, repressão de genes relacionados à formação do biofilme e produção de toxinas. No entanto, identificamos a indução de um possível mecanismo de resposta SOS, pela qual genes relacionados ao sistema toxina-antitoxina seriam superexpressos. Esse sistema provavelmente está envolvido com a morte celular programada e formação de células persistentes. Assim é possível concluir que doses subinibitórias de compostos antimicrobianos poderiam ao invés de matar, induzir a virulência da bactéria, como ocorrido com o cobre, ou a formação de células persistentes, como observado com a tetraciclina. Outra abordagem desse trabalho foi à realização de experimentos *in vitro* e *in vivo* com um análogo de cisteína, o N-acetyl-L-cysteina (NAC), que já vem sendo utilizado na medicina para desestruturação de biofilmes de bactérias patogênicas de humanos. Resultados da

quantificação da massa celular, número de células viáveis e exopolissacarídeos totais revelaram que todas as doses de NAC (1, 2 e 6 mg/mL) testadas nos experimentos *in vitro* diminuíram a formação do biofilme e inibiram o crescimento de *X. fastidiosa*, o que indica um possível efeito tóxico dessa substância. Nos experimentos *in vivo* foi observada uma grande redução dos sintomas de CVC em plantas de *C. sinensis* infectadas e tratadas com diferentes doses de NAC. Esses estudos abrem uma real perspectiva ao uso dessa substância para o manejo da CVC.

Palavras chave: CVC, Tetraciclina, Cobre, Expressão gênica, NAC.

ABSTRACT

MURANAKA, L. S. **Mechanisms involved in *Xylella fastidiosa* survival under stress conditions and effect of N-Acetyl-L-Cysteine on its biofilm.** 2010. 161p. Dissertação de mestrado- Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Xylella fastidiosa is a Gram-negative bacterium that causes several diseases in different plant species, including citrus variegated chlorosis (CVC) in sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck), whose economic damage is of millions of dollars annually. The symptoms development has been associated with the blockage of xylem vessels caused by bacterial biofilm formation. Recently it was found that the biofilm of *X. fastidiosa* is more resistant to antimicrobial compounds than the planktonic cells. This resistance has been considered as a complex phenomenon that cannot be explained by a single mechanism, but by multi-factors. Accordingly, the intent of this study was to identify through DNA microarray technology, genes possibly involved in adaptation of biofilm cells to the presence of antimicrobial compounds in concentrations that are lethal to cells in planktonic growth, but do not inhibit the cell growth in biofilm. We found 223 (7.87%) genes induced in presence of copper and 150 (5.29%) genes repressed. For tetracycline, there were 450 (15.89%) induced genes and 449 (15.85%) repressed ones. Many genes encoding proteins related to protein synthesis, energy metabolism and cell division were negatively modulated in both, copper and tetracycline treatments, suggesting that these changes could contribute to a state of resistance. When a subinhibitory dose of copper was applied we could also observe the induction of genes related to adhesion and thus biofilm formation and toxin production, suggesting that the bacterial virulence should be increased. The opposite was found for tetracycline. However, we observed the induction of a possible SOS response mechanism in which genes related to a toxin-antitoxin system was overexpressed. This system is probably involved with programmed cell death and formation of persistent cells. We then concluded that sub-inhibitory doses of antimicrobial compounds could induce bacterial virulence as occurred for copper, or the formation of persistent cells, as observed for tetracycline rather than kill the cells. Another approach of this work was to carry out experiments *in vitro* and *in vivo* with an analogue of cysteine, N-acetyl-L-cysteine (NAC), which has been already used in medicine as a drug for disruption of biofilms formed by human pathogenic bacteria. Results of cellular mass quantification, number of viable cells and total exopolysaccharide content revealed that all doses (1.0, 2.0 and 6.0 mg / mL) of NAC tested in *in vitro* experiments decreased the biofilm

formation and inhibited growth of *X. fastidiosa*, which indicated that this substance could also be toxic for the bacteria. *In vivo* experiments showed a strong reduction in CVC symptoms in *C. sinensis* plants infected and treated with different doses of NAC. These studies open a real prospect for the use of this compound in CVC management.

Keywords: CVC, Tetracycline, Copper, Gene expression, NAC.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xiv
LISTA DE TABELAS	xvi
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
Importância econômica do agronegócio dos citros	5
Impacto da CVC na citricultura	7
Características gerais da bactéria e transmissão	10
Seqüenciamento de <i>X. fastidiosa</i> e os estudos do genoma funcional	13
O papel das adesinas: adesão e movimentação sistêmica	17
Respostas dos biofilmes ao estresse causado por compostos antimicrobianos	20
Medidas de controle para doenças decorrentes da formação do biofilme de bactérias patogênicas de humanos	24
CAPÍTULO 1.	26
Mecanismos envolvidos com a sobrevivência de <i>Xylella fastidiosa</i> em condições de estresse	26
RESUMO	26
1. OBJETIVO	27
1.1 Objetivo Geral	27
1.2 Objetivos Específicos	27
2. MATERIAL E METODO	27
2.1 Estirpe de <i>X. fastidiosa</i>	27
2.2 Obtenção de células em biofilme resistentes a concentrações de compostos antimicrobianos que foram MIC para condição planctônica.	27
2.3 Extração de RNA e síntese de cDNA	28
2.4 Microarranjos de DNA (Microarray).	28
2.5 Análise e comparação de seqüências de DNA e proteínas	30
2.6 RT-qPCR (Transcrição Reversa procedida por Reação da Polimerase em Cadeia em Tempo Real)	30
2.6.1 Desenho dos <i>primers</i> , análise da eficiência de amplificação e especificidade ...	31
2.6.2 Condições gerais de uso da técnica	31
2.6.3. Experimentos para escolha do controle endógeno	32
2.7. Validação dos experimentos de microarranjos	33
2.8 Análise da expressão de alguns genes diferencialmente expressos com 15 dias nas diferentes etapas de formação do biofilme de <i>X. fastidiosa</i>	34
RESULTADOS	34
3.1. Extração de RNA e síntese de cDNA	34
3.2. Microarranjos de DNA (Microarray)	36
3.2.1 Análise da expressão gênica global de <i>Xylella fastidiosa</i> , em biofilme, submetida às doses subinibitória de cobre e tetraciclina.....	36
3.2.1.1. Cultivo com 3mM de CuSO ₄	36
Biossíntese proteica e metabolismo celular	38
Reguladores transcricionais	39
Metabolismo de ferro.....	39
Homeostase do cobre	40
Bombas de efluxo e transporte	40
Virulência e patogenicidade	40

Elementos genéticos móveis	40
Morte celular programada	41
3.2.1.2. Cultivo com 100 µg/ mL de tetraciclina	41
Biossíntese proteica e metabolismo celular	46
Reguladores transcricionais	46
Metabolismo de ferro.....	47
Bombas de efluxo e transporte	47
Virulência e patogenicidade.....	47
Elementos genéticos móveis	48
Morte celular programada.....	48
3.2.2. Comparação dos dados de microarranjos com adição de cobre com os de tetraciclina.....	50
3.3. RT-qPCR (Transcrição reversa procedida por reação em cadeia da polimerase em tempo real).....	53
3.3.1. Eficiência de amplificação e especificidade dos <i>primers</i>	53
3.3.2. Experimentos para escolha do controle endógeno	56
3.4. Validação dos experimentos de microarranjos	57
3.5. Análise da expressão de alguns genes diferencialmente expressos nas diferentes etapas de formação do biofilme de <i>X. fastidiosa</i>	59
3.5.1. Cultivo com 3 mM de CuSO ₄	59
3.5.2. Cultivo com 100 µg/ mL de tetraciclina.....	62
4. DISCUSSÕES	65
4.1. Análise dos microarranjos com adição de cobre ou tetraciclina.....	65
Biossíntese proteica e metabolismo celular	66
Reguladores transcricionais	69
Metabolismo de ferro.....	71
Homeostase de cobre	72
Bombas de efluxo e transporte	73
Virulência e Patogenicidade.....	75
Elementos genéticos Móveis.....	77
Morte celular programada.....	78
Visão geral da resposta de resistência de <i>X. fastidiosa</i> para cada um dos compostos utilizados.....	82
4.2. Validação dos experimentos com doses subinibitórias de cobre e tetraciclina	85
4.3 Análise da expressão de alguns genes diferencialmente expressos com 15 dias nas diferentes fases de formação do biofilme de <i>X. fastidiosa</i>	86
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
CAPÍTULO 2	89
Efeito de N-Acetil-L-Cisteína no biofilme de <i>Xylella fastidiosa</i>	89
RESUMO	89
1 OBJETIVO	90
1.1. Objetivo Geral.....	90
1.2. Objetivos Específicos	90
2. MATERIAL E MÉTODO	90
2.1. Estirpe de <i>X. fastidiosa</i>	90
2.2. Obtenção de biofilme para os ensaios com NAC.....	90
2.3. Concentrações de NAC utilizadas nos experimentos... 912.4. Avaliações do efeito de NAC no biofilme de <i>X. fastidiosa in vitro</i>	91
2.4.1 Massa celular.....	91
2.4.2. Quantificação de Exopolissacarídeos.	92

2.4.3. Análise do número de unidades formadoras de colônias.....	92
2.5. Avaliações do efeito de NAC no biofilme de <i>X. fastidiosa in vivo</i>	93
2.5.1. Transmissão da CVC de plantas de laranja pêra infectadas para mudas sadias.	93
2.5.2 Experimentos com NAC nas mudas infectadas.	94
2.5.3. Coleta das amostras para HPLC e PCR quantitativo em tempo real (qPCR). ...	96
2.5.4. Quantificação absoluta da população bacteriana por qPCR	96
2.5.5 Isolamento de bactérias dos pecíolos das folhas através de diluição seriada.....	97
2.5.6. Análise quantitativa de N-acetil-L-cisteína por HPLC.....	97
2.5.6.1. Procedimento de derivatização de NAC e análise cromatográfica.....	98
2.5.6.2. Construção da curva analítica.....	99
2.5.6.3. Limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD).	99
2.5.6.4. Validação do método analítico	99
2.5.6.5. Medidas de estabilidade do padrão.	100
3. RESULTADOS.....	100
3.1. Experimentos <i>in vitro</i>	100
3.1.1. Massa celular.....	100
3.1.2. Quantificação do EPS	101
3.1.3. Análise do número de unidades formadoras de colônias.....	103
3.2. Experimentos <i>in vivo</i>	104
3.2.1. Quantificação absoluta do número de bactérias por qPCR.....	108
3.2.2. Isolamento das bactérias	109
3.2.3. Quantificação de NAC por HPLC	111
3.2.3.1. Derivatização de NAC	111
3.2.3.2. Curva analítica e limites de quantificação e detecção.....	113
3.2.3.3. Validação do método analítico	115
3.2.3.4. Quantificação do NAC nas amostras coletadas	116
3.2.3.5. Estudo de degradação ambiental do NAC.....	116
4. DISCUSSÕES	117
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	124
BIBLIOGRAFIA	126
ANEXOS.....	

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Concentrações de cobre e sua toxicidade para células planctônicas e em biofilme ..	2
Figura 2. Concentrações de tetraciclina e sua toxicidade para células planctônicas e em biofilme.	3
Figura 3. Produção de laranja pelos Estados brasileiros em 2005.....	6
Figura 4. Zoneamento citrícola considerado no levantamento de CVC de 2005.....	8
Figura 5. Principais sintomas da CVC.	9
Figura 6. Algumas das espécies de cigarrinhas transmissoras da CVC.....	10
Figura 7. Eletromicrografia de varredura mostrando uma visão geral da câmara do cibário em <i>O. facialis</i>	11
Figura 8. Em videiras, <i>X. fastidiosa</i> é responsável pela doença de Pierce.....	12
Figura 9. Modelo do processo de formação e maturação do biofilme por estágios.	16
Figura 10. Modelo da colonização dos vasos da planta por <i>X. fastidiosa</i> proposto.	17
Figura 11. Micrografia eletrônica de <i>X. fastidiosa</i> mostrando uma abundância de pequenos pili tipo I e os longos pili tipo IV.....	18
Figura 12. Esquema da estrutura de um pili tipo IV em <i>P. aeruginosa</i>	19
Figura 13. Esquema mostrando as etapas, que foram realizadas pela empresa NimbleGen, de um experimento de microarranjo.....	30
Figura 14. Extração de RNA de biofilmes de <i>X. fastidiosa</i>	35
Figura 15. Gel desnaturante mostrando o padrão eletroforético de bandas das amostras de RNA.	35
Figura 16. <i>Scatter Plot</i> das CDS analisadas com a adição de cobre.....	36
Figura 17. CDS diferencialmente expressas com cobre agrupadas nas categorias funcionais após reanotação.....	37
Figura 18. <i>Scatter Plot</i> das CDS analisadas com adição de tetraciclina.....	42
Figura 19. Genes diferencialmente expressos com tetraciclina agrupados nas categorias funcionais após reanotação.....	43
Figura 20. Gráfico de Venn representando as CDS comumente induzidas ou reprimidas com experimentos com cobre e tetraciclina.....	50
Figura 21. Gráficos de Venn.	50
Figura 22. Clusterização Hierárquica.	51
Figura 23. Clusterização pelo algoritmo do <i>K-means</i>	52
Figura 24. Gel de agarose 1% mostrando especificidade dos primers	54
Figura 25. Gel de agarose 1% mostrando especificidade dos primers	54
Figura 26. Validação dos experimentos com adição de cobre.	58
Figura 27. Validação dos experimentos com adição de tetraciclina.....	58
Figura 28. Expressão relativa de cada gene durante as diferentes fases de formação do biofilme analisadas após a adição de cobre.....	60
Figura 29. Mediana dos valores de <i>fold change</i> das diferentes fases de formação do biofilme, para cada gene.	61
Figura 30. <i>Heat Map</i> mostrando o padrão de expressão dos genes analisados em cada fase de formação do biofilme.....	62
Figura 31. Expressão relativa de cada gene durante as diferentes fases de formação do biofilme analisadas após a adição de tetraciclina.....	63
Figura 32. Mediana dos valores de <i>fold change</i> das diferentes fases de formação do biofilme, para cada gene.	65
Figura 33. <i>Heat Map</i> mostrando o padrão de expressão dos genes analisados em cada fase de formação do biofilme.....	65
Figura 34. Modelo sobre o possível efeito da indução de hemaglutininas.	76
Figura 35. Resistência a compostos antimicrobianos das células em biofilme.....	80

Figura 36. Modelo representativo dos principais mecanismos de resposta ativados na presença de cobre.	83
Figura 37. Modelo representativo dos principais mecanismos de resposta ativados na presença de tetraciclina.....	84
Figura 38. Técnica do Cristal violeta.....	92
Figura 39. Técnica para quantificação do EPS.....	92
Figura 40. Detalhe do processo de transmissão de CVC para mudas saudáveis através das técnicas de encostia e garfagem.....	94
Figura 41. Vaso de Leonard.....	95
Figura 42. Plantas nos vasos de Leonard.....	95
Figura 43. Reação de derivatização de NPM com NAC.....	98
Figura 44. Quantificação da massa celular dos biofilmes após tratamento com NAC.....	100
Figura 45. Quantificação da massa celular planctônica.....	101
Figura 46. Curva padrão para quantificação de EPS (mg/L).	102
Figura 47. Quantificação de EPS no biofilme de <i>X. fastidiosa</i>	102
Figura 48. Número de células viáveis no biofilme de <i>X. fastidiosa</i>	103
Figura 49. Plantas antes do início do tratamento com o NAC	104
Figura 50. Plantas controle sem adição de NAC.....	105
Figura 51. Plantas submetidas ao tratamento com 120 mg de NAC.....	106
Figura 52. Plantas submetidas ao tratamento com 600 mg de NAC..	106
Figura 53. Plantas submetidas ao tratamento com 1500 mg de NAC.....	107
Figura 54. Curva padrão para a quantificação de células de <i>X. fastidiosa</i>	108
Figura 55. Número de células bacterianas quantificadas por qPCR nas amostras dos diferentes tratamentos do experimento 1.	108
Figura 56. Número de células bacterianas quantificadas por qPCR nas amostras dos diferentes tratamentos do experimento 2.	109
Figura 57. Diluição seriada do isolamento de <i>X. fastidiosa</i>	110
Figura 58. Cromatograma do produto de derivatização NAC-NPM (primeiro pico), após 1 hora a 60°C,	112
Figura 59. Cromatograma do produto de derivatização NAC-NPM (primeiro pico), após 6 horas a 60°C.....	112
Figura 60. Cromatograma do produto de derivatização NAC-NPM após 1 hora de parada da reação	113
Figura 61. Curva padrão de NAC.....	114
Figura 62. Cromatograma da curva padrão.....	114
Figura 63. Curva gerada através da área dos picos referentes ao NPM em cada uma das corridas.....	115
Figura 64. Cromatograma das amostras do experimento de degradação ambiental de NAC.....	117
Figura 65. Modelo proposto para explicar a adesão e agregação de <i>Xylella fastidiosa</i>	120
Figura 66. Modelo do modo de ação de NAC <i>in vivo</i>	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valor das Exportações Brasileiras de Citros e seus Derivados.....	5
Tabela 2. Número de lâminas e ensaios realizados.	29
Tabela 3. Genes escolhidos para testes com RT-qPCR e escolha do controle endógeno.....	32
Tabela 4. Genes escolhidos par validação dos experimentos com tetraciclina ou cobre.	33
Tabela 5. CDS induzidas com cobre que foram reanotadas.....	38
Tabela 6. CDS reprimidas com cobre que foram reanotadas	38
Tabela 7. CDS induzidas com tetraciclina que foram reanotadas.	44
Tabela 8. CDS reprimidas com tetraciclina que foram reanotadas.	45
Tabela 9. Pares de CDS propostas como codificantes de sistemas TA.	49
Tabela 10. Principais produtos gênicos contidos em cada um dos clusters identificados.	53
Tabela 11. Valores da Eficiência de amplificação dos <i>primers</i> utilizados nos experimentos.	55
Tabela 12. Valores de instabilidade calculados para cada uma dos genes candidatos a controle endógeno para os experimentos contendo cobre.	56
Tabela 13. Variação Intragrupo.	56
Tabela 14. Variação Intergrupo.	57
Tabela 15. Valores de estabilidade calculados para cada um dos genes candidatos a controle endógeno para os experimentos contendo tetraciclina.....	57
Tabela 16. Variação Intragrupo.	57
Tabela 17. Variação Intergrupo.	57
Tabela 18. Valores de <i>p</i> indicando a existência ou não de uma diferença estatística entre os valores de expressão de cada gene obtido para cada fase de formação do biofilme.	61
Tabela 19. Valores de <i>p</i> indicando a existência ou não de uma diferença estatística entre os valores de expressão obtida para cada fase de formação do biofilme para cada gene.	64
Tabela 20. Quadro resumo das análises realizadas em cada um dos experimentos realizados <i>in vivo</i>	96
Tabela 21. Número de UFC/mL em cada amostra do experimento 2.	110
Tabela 22. Precisão medida para 3 diferentes pontos da curva.....	115
Tabela 23 Exatidão medida para 3 diferentes pontos da curva.	116
Tabela 24. Quantificação de NAC nas amostras coletadas.....	116

INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira tem grande importância na esfera mundial, já que o Brasil ocupa a primeira posição na produção de citros. Os produtos da citricultura são amplamente explorados, como o suco de laranja concentrado, comercialização da fruta *in natura* e utilização dos subprodutos, gerando divisas para o país (www.fundecitrus.com.br). Além disso, o setor também é responsável por gerar um grande número de empregos diretos e indiretos. No entanto, tem enfrentado alguns problemas principalmente de ordem fitossanitária devido ao grande número de pragas e doenças, dentre elas a clorose variegada dos citros (CVC). As estimativas dos danos econômicos causados pela CVC são da ordem de 286 – 322 milhões de dólares anuais, na forma de replantio, poda de plantas infectadas e controle do vetor (FERNANDES, 2003).

A CVC é causada pela *X. fastidiosa*, uma bactéria Gram negativa, limitada ao xilema das plantas hospedeiras e ao lúmen do canal alimentar de insetos vetores (cigarrinhas), responsáveis pela transmissão da bactéria (HOPKINS, 1995). Possui uma ampla gama de hospedeiros, incluindo membros de pelo menos 28 famílias de plantas mono e dicotiledôneas. Além da CVC em citros, a *X. fastidiosa* está associada a doenças em culturas economicamente importantes como ameixa, uva e café (LIMA et al., 1998).

Devido à importância econômica da CVC, a *X. fastidiosa* foi o primeiro fitopatógeno a ter seu genoma completamente sequenciado, o que gerou um grande número de informações (SIMPSON et al., 2000). Após o sequenciamento, iniciaram-se os estudos pós-genômicos, com foco no entendimento do genoma funcional (<http://www.fapesp.br>).

Foi observado que o mecanismo de patogenicidade da bactéria difere do de outros fitopatógenos, uma vez que ela não apresenta genes que conferem especificidade planta-patógeno (*avr* e/ou *hrp*). A bactéria é injetada pelo inseto vetor diretamente nos vasos do xilema, nos quais se adere e coloniza. O processo todo leva à formação de um biofilme, que é considerado o principal mecanismo de patogenicidade da bactéria (De SOUZA et al., 2003; 2004, OSIRO et al., 2004).

A formação de biofilme confere várias vantagens adaptativas para as bactérias, entre elas, uma melhor proliferação celular decorrente de maior comunicação entre as células, melhoria na aquisição de nutrientes, acesso a diferentes nichos, e defesa contra fatores antagônicos como agentes oxidativos e antibióticos, o que, em geral, acaba contribuindo para um aumento da sobrevivência da colônia (LEITE et al., 2001).

Devido à contínua condição de estresse em que vive a bactéria *X. fastidiosa* no ambiente

do hospedeiro, seja no cibário do vetor ou no xilema da planta, que é um ambiente de forte turbulência e pressão, com escassez de nutrientes e competição, possivelmente essa bactéria desenvolveu um sistema eficiente de adaptação a essas condições. E, certamente a condição de crescimento em biofilme seria uma estratégia eficiente de sobrevivência, mas que resultaria no desenvolvimento dos sintomas da CVC.

Essas características permitem que as células em biofilme apresentem grande vantagem adaptativa e competitiva no hospedeiro. Lacava e colaboradores (2004), por exemplo, observaram que *X. fastidiosa*, quando causando sintoma na planta, apresenta alta competitividade frente aos endofíticos de citros.

Além disso, tem sido demonstrado, por exemplo, que células em biofilme são cerca de 500 vezes mais resistentes a compostos antimicrobianos que em crescimento planctônico (COSTERTON et al., 1995). Em trabalho recente realizado pelo nosso grupo de pesquisa (RODRIGUES et al., 2008) foi demonstrado que os biofilmes de *X. fastidiosa* foram mais resistentes aos compostos antimicrobianos testados, quando comparados à condição planctônica, independentemente do meio de cultura utilizado. As concentrações mínimas inibitórias (MIC) para as células planctônicas foram subinibitórias para células em biofilme, com 100% de viabilidade celular, como pode ser observado, por exemplo, para cobre e tetraciclina (Figura 1 e 2).

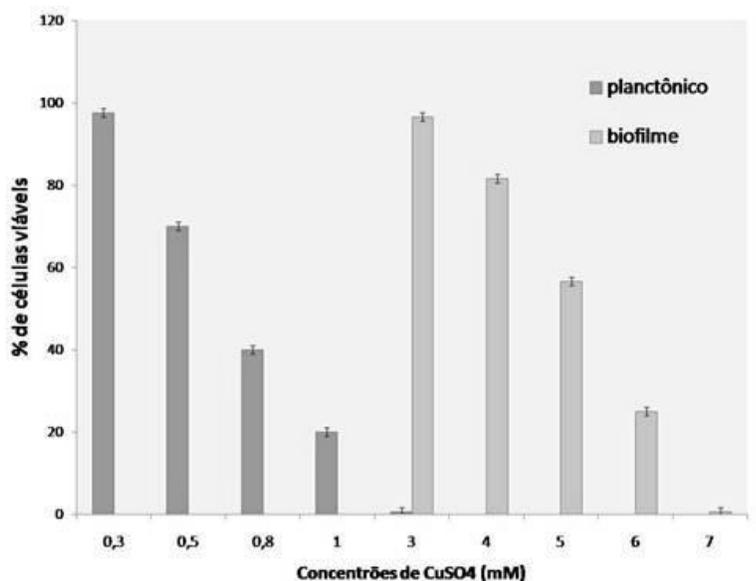


Figura 1. Concentrações de cobre e sua toxicidade para células planctônicas (cinza escuro) ou em biofilme (cinza claro). Baseado no trabalho de Rodrigues e colaboradores (2008)

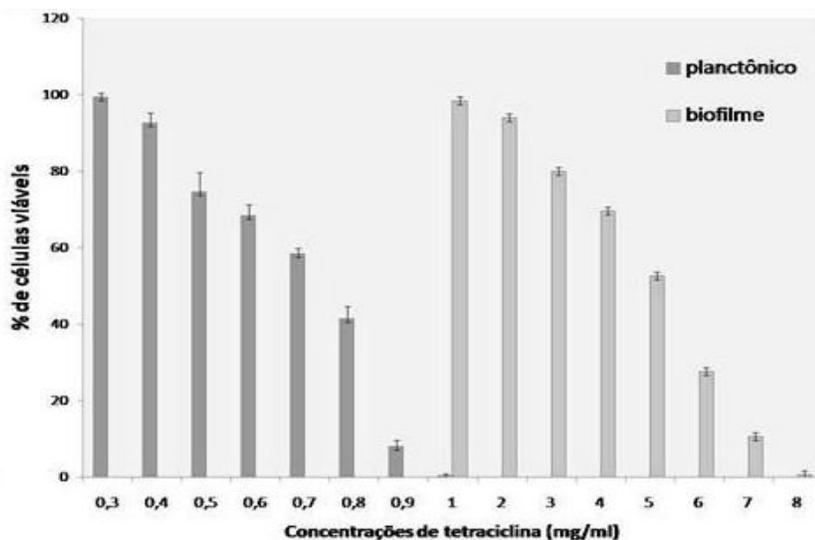


Figura 2. Concentrações de tetraciclina e sua toxicidade para células planctônicas (cinza escuro) ou em biofilme (cinza claro). Resultados de experimento realizado pelo nosso grupo de pesquisa (dados não publicados).

Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que a resistência do biofilme de *X. fastidiosa* estaria associada a um conjunto de diferentes mecanismos. Dentre eles a produção de EPS, expulsão dos metais para fora das células através de bombas de efluxo, e a provável ação dos genes *cuts*, no caso da resistência ao cobre (RODRIGUES et al., 2008). Assim, as análises de expressão gênica demonstraram que a resistência do biofilme de *X. fastidiosa* é um fenômeno complexo que não pode ser explicado por um único mecanismo, e sim por multifatores. O fato de doses inibitórias dos compostos antimicrobianos testados para células planctônicas não inibir o crescimento das células em biofilme de *X. fastidiosa*, levanta a hipótese que essa bactéria possa modular a expressão de genes específicos associados à resistência e adaptação a condições atípicas.

Alguns pesquisadores verificaram também que a adição de doses, mesmo subinibitórias, de diferentes classes de antibióticos era capaz de ativar ou inibir um grande número de promotores em *Salmonella typhimurium*. Dentre os promotores ativados estavam os envolvidos com a transcrição de genes de virulência, funções metabólicas e adaptativas (GOH et al., 2002). Em outro estudo da expressão global de genes em *Pseudomonas aeruginosa* submetida a concentrações subinibitórias de tobramicina, tetraciclina e norfloxacin, Linares e colaboradores (2006) verificaram que os três antibióticos testados induziram um aumento no biofilme e uma regulação positiva de genes associados à adesão, motilidade e citotoxicidade. Foi sugerido então que antibióticos não seriam apenas antimicrobianos, mas que em baixas concentrações poderiam funcionar como moléculas sinalizadoras, regulando a homeostase da

comunidade microbiana (LINARES et al., 2006).

Apesar da existência de vários estudos nesse sentido os mecanismos possivelmente envolvidos com a maior resistência do biofilme a agentes antimicrobianos ainda permanecem não muito bem entendidos e poucos são os estudos com bactérias fitopatógenas formadoras de biofilme.

Com o intuito de ampliar os conhecimentos a respeito dos possíveis mecanismos de resposta aos agentes antimicrobianos que poderiam ser ativados por *X. fastidiosa* na condição de biofilme, o presente trabalho realizou microarranjos de DNA para comparar os genes expressos em uma situação controle e quando foram adicionadas doses subinibitórias de um metal, no caso o cobre, e um antibiótico, a tetraciclina.

O entendimento dos mecanismos de resistência de *X. fastidiosa* em resposta às condições de estresse são essenciais uma vez que, compostos antimicrobianos de natureza química poderiam ser utilizados no manejo da CVC, contudo, assim como observado em outras bactérias (LINARES et al., 2006) em condições de estresse *X. fastidiosa* poderia induzir a formação do biofilme na presença de doses subinibitórias de agentes antimicrobianos e, como consequência, aumentar a severidade da doença. Além disso, quando as células estão em biofilme são necessárias altas doses dos compostos antimicrobianos, o que torna o controle economicamente inviável. Por este motivo, é de suma importância entender as estratégias de sobrevivência dessa bactéria visando um possível desequilíbrio desse sistema de resistência e adaptação.

Arelado a isso, em outra parte do presente trabalho, investigamos os efeitos de um aminoácido análogo da cisteína, o N-Acetil-L-Cisteína (NAC), que vem sendo utilizado na medicina como agente mucolítico. Os efeitos dessa substância na desestruturação de biofilmes formados tanto por bactérias Gram negativas como Gram positivas têm sido promissores, como evidenciado pelos estudos realizados por Zheng (1999), Olofsson (2003), Parry (1976) e Pérez-Giraldo (1997) e seus colaboradores. No entanto, os alvos dessas pesquisas sempre foram bacterias formadoras de biofilme patógenas de seres humanos ou, no caso do trabalho de Olofsson (2003), bactérias isoladas de reatores em fábricas de papel. O possível uso dessa substância para desestruturação do biofilme de um fitopatógeno é algo totalmente novo e, se comprovada sua eficiência, abriria uma real perspectiva para o manejo da CVC.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Importância econômica do agronegócio dos citros

Com um setor altamente organizado e competitivo, a citricultura no Brasil é uma das mais importantes atividades agroindustriais. O agronegócio citrícola tem contribuído nos sucessivos superávites comerciais no Brasil, gerando divisas e ao mesmo tempo empregos. Só no Estado de São Paulo, a atividade responde por aproximadamente 400.000 empregos diretos e indiretos, gerando 1,5 bilhões de dólares na exportação de suco concentrado congelado, suco não concentrado e subprodutos (<<http://www.abecitrus.com.br>>).

Foi a partir de 1960 que a citricultura brasileira, particularmente a paulista, voltou-se para a produção de matéria prima para a indústria de processamento de suco, não investindo muito na produção comercial de frutas *in natura*, uma vez que importantes mercados consumidores da fruta fresca, como os Estados Unidos, impunham inúmeras barreiras técnicas e fitossanitárias. Assim, o suco concentrado tornou-se o principal produto de exportação da laranja, como pode ser visualizado através da **tabela 1**. Na década de 90, o Brasil foi considerado o maior produtor mundial de laranja, posição que ocupa até hoje.

Tabela 1. Valor das Exportações Brasileiras de Citros e seus Derivados, em US\$ mil F.O.B. (1996 a 2000).

Produto	1996	1997	1998	1999	2000
Suco Concentrado¹	1.396.837	1.006.661	1.266.424	1.239.034	1.033.646
Fruta <i>in natura</i>	20.410	23.092	14.359	21.108	15.248
Farelo de polpa	134.649	110.615	18.980	60.548	38.308
Óleos essenciais	37.107	26.968	18.415	15.640	17.469
Total	1.589.003	1.167.336	1.318.178	1.336.330	1.104.671

¹Sucos concentrados de citros (laranja, tangerina, etc). Fonte: (<<http://www.abecitrus.com.br>>).

Alguns Estados brasileiros estão envolvidos na comercialização de laranja, mas sem dúvida o Estado de São Paulo ocupa a posição de maior produtor, sendo responsável por 84% da produção no país (**Figura 3**) (Ministério da Agricultura e do Desenvolvimento). O parque citrícola paulista (juntamente com o triângulo mineiro) contava com 188 milhões de árvores em produção e 27 milhões de árvores novas em 2003/2004, segundo o Instituto de Economia Agrícola (IEA).

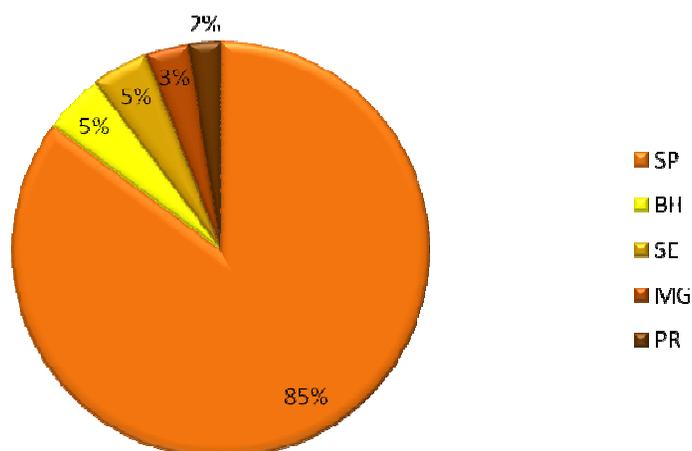


Figura 3. Produção de laranja pelos Estados brasileiros em 2005. SP- São Paulo, BH- Bahia, SE- Sergipe, MG- Minas Gerais e PR- Paraná.

A colheita de laranja ocorre durante todo o ano devido às diferentes variedades, que podem assim ser agrupadas como precoces, meia-estação e tardias (<<http://www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/Citros/Citros.htm>>). A laranja Pêra é o principal cultivar sendo responsável por 38% da produção, seguida das outras laranjas doce Valência, Natal e Hamlin, que correspondem a 17, 25 e 7% da produção paulista de laranja (<www.cepea.esalq.usp.br>).

Vários subprodutos com valor comercial também podem ser obtidos da citricultura, entre eles os óleos essenciais, limonenos, terpenos, líquidos aromáticos e farelo de polpa cítrica. Os subprodutos dos citros possuem diferentes aplicações no mercado interno e externo, como na fabricação de produtos químicos e solventes, aromas e fragrâncias, substâncias para aplicação em indústrias de tintas, cosméticos, complemento para ração animal, entre outros. (<<http://www.abecitrus.com.br>>).

Além disso, atualmente existe um grande incentivo para produção de biocombustível e nesse sentido, a laranja também apresenta um alto potencial, pois em sua casca se encontra um promissor combustível formado por uma mistura de óleos essenciais. Cerca de 90% desses óleos são constituídos por limoneno ($C_{10}H_{16}$), substância pertencente a classe dos hidrocarbonetos (composição de carbono e hidrogênio), que são inflamáveis (POOLA *et al.*, 1994).

Vislumbra-se, portanto, um enorme mercado para os subprodutos dos citros com perspectivas de agregação de valores ao produto primário e conseqüentemente melhor remuneração do produtor.

No entanto, mesmo sendo um dos principais exportadores de produtos cítricos, o Brasil ainda possui uma produtividade considerada muito baixa (80,4 Kg de frutas por árvore) quando comparada, por exemplo, com a Flórida com 240 Kg de frutas por árvore (AMARO et al., 2001). Essa baixa produtividade brasileira está associada à expansão simultânea de outros cultivares e à existência de pragas e doenças com significativo reflexo nos custos de produção. Um dos principais fatores bióticos limitante da produção dos citros é a doença clorose variegada dos citros (CVC) causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*.

Impacto da CVC na citricultura

A primeira observação de plantas de citros com sintomas da CVC no Brasil ocorreu em 1987 em Colina no centro oeste do Estado de São Paulo, região de Bebedouro. Logo depois foi observada com extrema severidade por Rossetti *et al* (1990) e confirmada por Leite Jr & Leite (1991) na região norte do Estado de São Paulo e no triângulo mineiro. A partir desses lugares, o patógeno se espalhou para outras regiões produtoras como Paraná (JACOMINO, 1993), Goiás (TUBELIS *et al*, 1993) e Sergipe (LARANJEIRA, 1997). A bactéria *X. fastidiosa* afeta todos os cultivares de laranja doce comerciais (Pêra, Hamlin, Natal, Rangpur lime, Trifoliata, Cleopatra), tangerinas (Senki, laranja doce caipira e outras), lima-ácida, tangores e tangelos (LARANJEIRA, 1996). No entanto, não foram observados sintomas nas tangerinas comerciais (Poncan, Cravo), Murcott tangor, limões (Siciliano, Eureka, Mandarin) e a lima ácida mexicana (Galego), mesmo quando as plantas encontravam-se em áreas de severa infestação (DONADIO, 1998).

Os dados de levantamento da CVC de 2005 para o Estado de São Paulo demonstram que aproximadamente 43% dos pomares apresentam sintomas da doença. Esse quadro é mais agravante nas regiões norte, noroeste e centro do Estado de São Paulo (**Figura 4**) (<www.fundecitrus.com.br>). Em levantamento recente (julho de 2009) realizado pelo Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) foi observado que nos últimos 5 anos houve uma queda da incidência da doença no parque Cítrico do Estado de São Paulo, no entanto, mesmo com essa diminuição, a CVC ainda atingiria cerca de 39% das plantas. Além disso, as estimativas dos danos econômicos causados são da ordem de 286 – 322 milhões de dólares anuais (FERNANDES, 2003), na forma de replantio, poda de plantas infectadas e controle do vetor. Quando os sintomas são severos e a planta tem até 2 anos de idade, é necessária a erradicação da mesma, o que pode significar uma perda entre US\$ 500 e US\$ 600 por planta, assim como um atraso na produção após replantio e desuniformidade do pomar, acarretando

em mais gastos (AMARO et al, 1997).

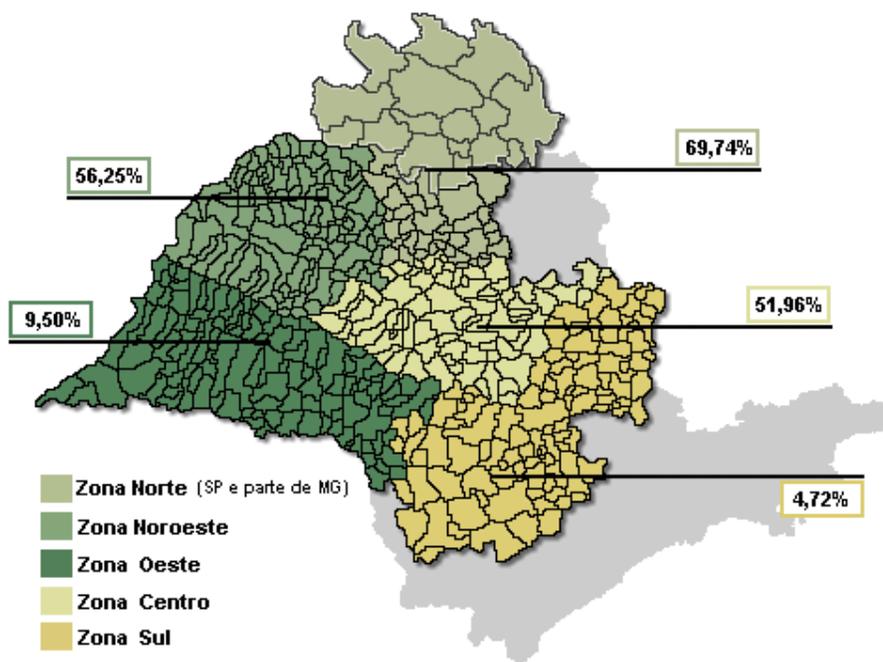


Figura 4. Zoneamento citrícola considerado no levantamento de CVC de 2005. Realizado pelo Fundecitrus meses antes da colheita das quatro principais variedades de laranja (Pêra Rio, Valência, Natal e Hamlin) no Estado de São Paulo e parte do Triângulo mineiro. Fonte: (<<http://www.fundecitrus.com.br>>).

Os sintomas da doença em citros envolvem o aparecimento de manchas cloróticas na parte dorsal das folhas, correspondendo a pontos marrons com aspecto de goma na superfície ventral (**Figura 5A**), ramos envassourados, superbrotação de gemas e folhas murchas nas horas mais quentes do dia, mesmo em condições de umidade. Com o avanço da doença, pode ser observada a desfolha dos ramos mais altos da planta que são os locais mais atacados pelas cigarrinhas, vetores da doença (**Figura 5C**). Em plantas mais afetadas, ocorre atrofia e diminuição da copa, morte dos ponteiros, encurtamento de internódios, e murcha dos ramos. Também ocorre uma redução drástica no tamanho dos frutos, que ficam endurecidos e com falta de potássio, o que torna a planta economicamente inviável, uma vez que a perda de peso dos mesmos pode chegar a 75%, prejudicando principalmente a obtenção do suco, que é o principal produto de exportação (**Figura 5B**). Além disso, ocorre um amarelamento precoce dos frutos e surgimento de manchas morrom-escuras, que prejudicam a venda da fruta “*in natura*” (LARANJEIRA, 1996).

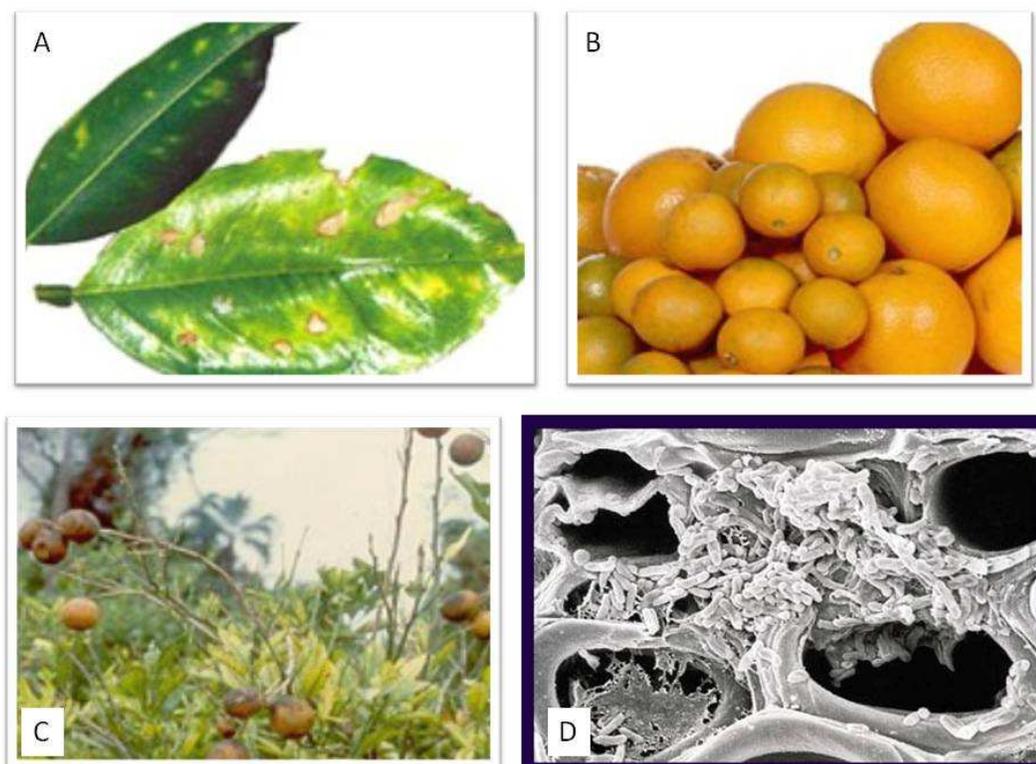


Figura 5. Principais sintomas da CVC. (A) Estágio avançado das lesões foliares com manchas cloróticas e pontos marrons. (B) Frutos saudáveis ao lado de frutos de tamanho reduzido devido à CVC. (C) Desfolha dos ramos mais altos da planta. (D) Células de *Xylella fastidiosa* 9a5c no interior de vasos de xilema de *Citrus sinensis*. Imagens retiradas de <http://www.fundecitrus.com.br> (A, B e C) e <http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/> (D).

Atualmente, a convivência com essa doença no sistema produtivo citrícola tem demandado um freqüente uso de inseticidas para controle dos vetores —as cigarrinhas— da bactéria que causa a CVC, o que, além de aumentar os custos de produção, tem impacto negativo no ecossistema local. Os gastos com poda, que visam a diminuição da fonte de inóculo da bactéria, a perda de árvores contaminadas e o prejuízo (diminuição da produção dos frutos) decorrente dos sintomas da CVC, têm tornado a atividade citrícola onerosa para os produtores que, em algumas regiões do estado de São Paulo, a substituíram por outras culturas, como a cana-de-açúcar.

Dada a importância econômica e social da citricultura principalmente para o Estado de São Paulo e para o agronegócio brasileiro e aos danos provocados pela CVC nos pomares, foi realizado um extensivo programa de pesquisa visando um maior entendimento da doença.

Características gerais da bactéria e transmissão

X. fastidiosa é uma bactéria Gram negativa não flagelada e não pigmentada, com a forma de bastonete (de 1 a 4 µm de comprimento e diâmetro entre 0,25 e 0,50 µm), limitada ao xilema de suas plantas hospedeiras (**Figura 5D**) (HOPKINS, 1995, PURCELL, 1996) e, como o próprio nome sugere, com crescimento lento (MATTOS-JUNIOR, 1995). Suas condições ótimas de crescimento são entre 26 e 28°C e pH entre 6,5 e 6,9.

Está classificada como pertencente ao Gênero *Xylella*, Filo Procteoobacteria, Ordem Lysobacterales e Família Lysobactriaceae, sendo, portanto, geneticamente relacionada ao grupo das *Xanthomonas* (WELLS, 1987).

A bactéria é transmitida de planta a planta por comprovadamente 11 espécies de cigarrinhas (Hemiptera, Cicadellidae e Cercopidae). Em citros, as espécies de vetores mais importantes são *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminales* e *Oncometopia faciales* (LOPES et al., 1996; ROBERTO et al., 1996).

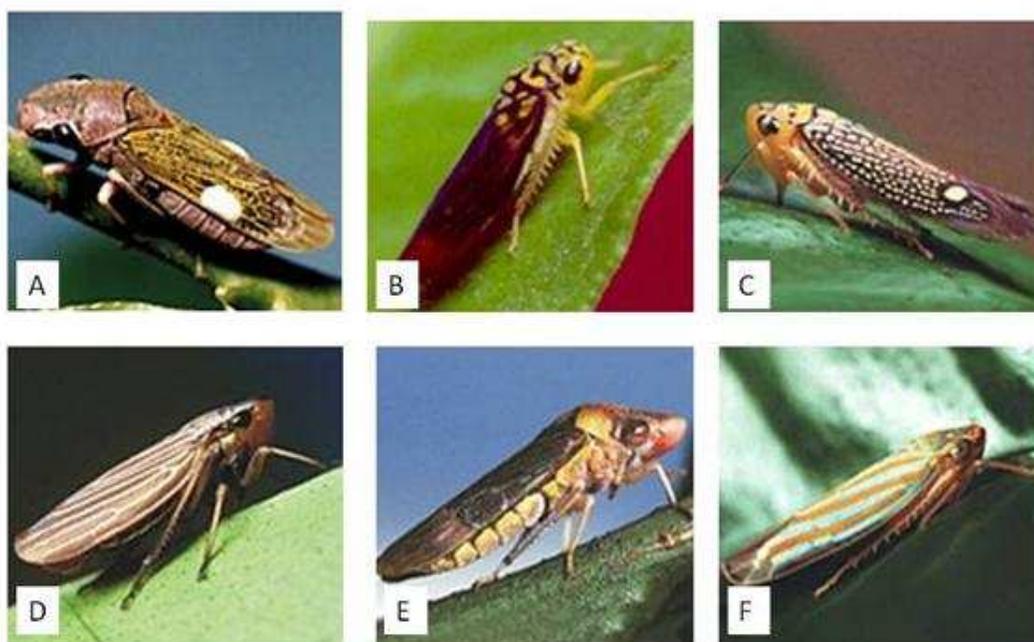


Figura 6. Algumas das espécies de cigarrinhas transmissoras da CVC. (A) *Oncometopia facialis* (B) *Dilobopterus costalimai* (C) *Parathona gratiosa* (D) *Sonesima grossa* (E) *Homalodisca ignorata* (F) *Ferrariana trivittata*. Fonte: <<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cvc.html>>.

As cigarrinhas (**Figura 6**) adquirem a bactéria ao se alimentarem no xilema de plantas contaminadas e podem abrigá-la no lúmen do canal alimentar por tempo indefinido, uma vez que *X. fastidiosa* consegue se multiplicar dentro do inseto vetor (PURCELL et al, 1979).

Purcell e colaboradores (1979) conseguiram visualizar, com o uso de microscopia eletrônica de varredura, agregados da bactéria sobre o forro cuticular de várias porções do trato digestivo anterior (cibário, pré-cibário e abertura do esôfago) de cigarrinhas (*Graphocephala atropunctata*). Alves (2003) também realizou vários estudos com microscopia eletrônica de varredura e identificou a bactéria no trato alimentar de várias cigarrinhas (**Figura 7**). Além disso, já foi constatado que insetos imaturos perdem a capacidade de transmitir a bactéria após a ecdise, o que é atribuído a troca da cutícula interna do estomadéu. Devido a esse fato e também porque estudos mostram que em várias espécies dos vetores os agregados bacterianos se encontram em posições similares no trato digestivo dos insetos, acredita-se que o inóculo de *X. fastidiosa* para a transmissão em plantas seja formado no pré-cibário (ALMEIDA et al, 2006). Estudos demonstram (PURCELL et al, 1979) que não existe a necessidade de um período de latência entre a aquisição da bactéria pelo vetor e a infecção de uma nova planta hospedeira.

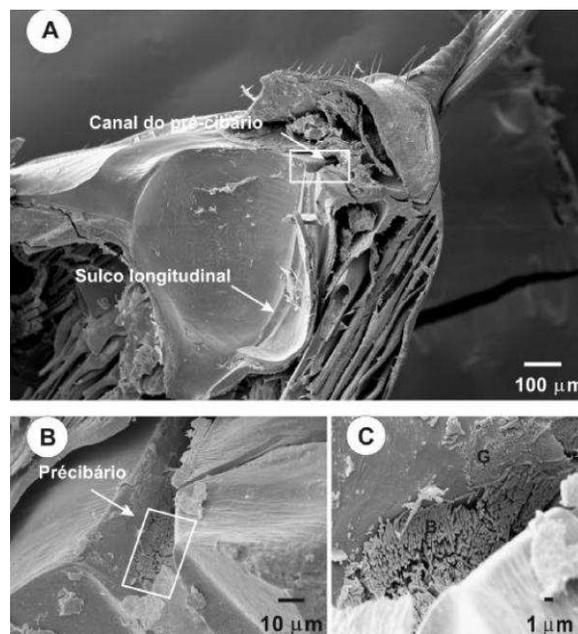


Figura 7. Eletromicrografia de varredura mostrando uma visão geral da câmara do cibário em *O. facialis* (A). Em (B) e em (C) é possível se observar em detalhes a região apontada pela seta em (A) e nota-se a presença de *X. fastidiosa* no canal do pré-cibário. B= células bacterianas, G= goma bacteriana. Foto retirada da tese de doutorado de Alves, 2003.

Essa associação vetor/bactéria aparentemente não confere nenhuma vantagem aos insetos, pelo contrário, pode ser prejudicial, uma vez que a colonização do pré-cibário pela bactéria poderia afetar o processo de alimentação. No entanto, para a bactéria essa associação seria interessante, já que ela possui uma diversificada gama de plantas hospedeiras, assim, se

associar a insetos polívoros, que visitam uma grande variedade de espécies de plantas, seria uma grande vantagem (MARUCCI et al, 2005).

A ampla gama de hospedeiros das diferentes estirpes de *X. fastidiosa* inclui cerca de 28 famílias de plantas mono e dicotiledôneas (HOPKINS, 1989), entre elas várias culturas economicamente importantes além dos citros, como de alfafa, pêssigo, amendoim, ameixa, café e uva, e também diversas plantas ornamentais, como carvalho, olmo, pecan, sicamore, vinca e ibisco (KITAJIMA et al., 1975; MIRCETICH et al., 1976; HEARON et al., 1980; ROSSETTI et al., 1990; LEU et al, 1993; PARADELA- FILHO et al., 1995; PURCELL et al, 1999; SANDERLIN et al, 2000).

A primeira doença descrita, causada pela bactéria, foi o mal de Pierce em videiras (**Figura 8**). A mesma estirpe da bactéria também é responsável pelo nanismo da alfafa e escaldadura da amendoeira. Outra estirpe da bactéria está associada a importante doença de “Phony” no pessegueiro e escaldadura da ameixeira japonesa, causando sérios danos a essa cultura no sul do Brasil, Argentina e Paraguai. (ALVES, 2003). No Brasil, outras estirpes da bactéria também são encontradas infectando café, no qual causam atrofia dos ramos do cafeeiro; em ameixeira, associada à escaldadura da folha e em diversas plantas daninhas como guanxuma, capim pé-de-galinha e braquiária, entre outras (LARANJEIRA et al, 2005). Porém, apesar da grande gama de hospedeiros, em grande parte deles os sintomas da doença não se manifestam (PURCELL, 1996; FEIL *et al.*, 2007).

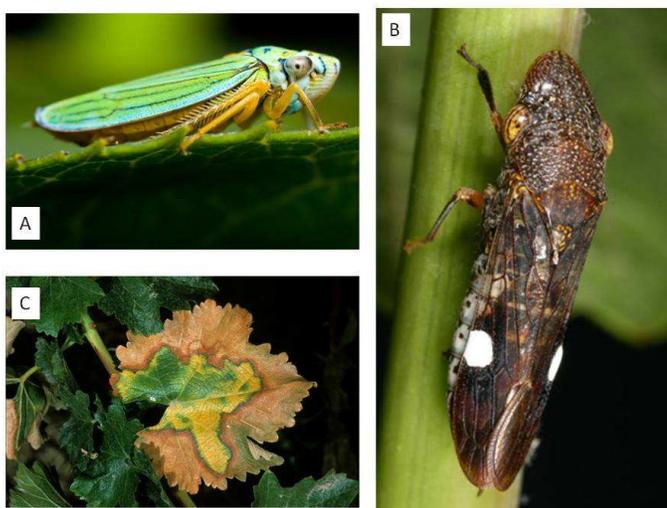


Figura 8. Em videiras, *X. fastidiosa* é responsável pela doença de Pierce. (A) *Graphocephala atropunctata* e (B) *Homalodisca vitripennis*, algumas das cigarrinhas responsáveis pela transmissão da doença de Pierce nas videiras dos Estados Unidos. (C) Sintomas na folha, com lesões cor palha. Imagens retiradas de <http://www.cnr.berkeley.edu/xylella/> (A e C), <http://ctap.inhs.uiuc.edu/takiya/taxahelp.asp?hc=830&key=Proconia&lng=En> (B).

Segundo Chatterjee *et al.* (2008), o desenvolvimento de sintomas, depende também da capacidade do patógeno de se espalhar pela planta hospedeira a partir do ponto de infecção. Assim, aparentemente, em plantas em que essa disseminação fosse mínima, a bactéria permaneceria como um endofítico não muito preocupante, mas essas plantas ainda poderiam constituir fonte de inóculo para a transmissão da bactéria para outras plantas saudáveis.

Alguns experimentos, em condições controladas, demonstram a possibilidade da existência de transmissão cruzada entre diferentes estirpes de *X. fastidiosa* e plantas hospedeiras. Inoculações mecânicas de *X. fastidiosa* isolada de citros seriam capazes de induzir sintomas de escaldadura de folhas em plantas de café. Sob condições de campo, no entanto, a transmissão cruzada ainda não foi confirmada, mas dada a similaridade do genoma das estirpes da bactéria e ocorrência de alguns vetores comuns, supõem-se que esta poderia realmente ocorrer (LI *et al.*, 2001).

Outra forma de transmissão da *X. fastidiosa* em plantas de citros seria por enxertia de borbulhas infectadas (JACOMINO *et al.*, 1993) ou por garfagem de ramos afetados. Também já foi demonstrada a presença da bactéria em sementes e frutos de laranja doce com sintomas de CVC, que assim poderia ser transmitida às plântulas originárias dessas sementes (LI *et al.*, 2003).

Seqüenciamento de *X. fastidiosa* e os estudos do genoma funcional

Dada a relevância da CVC para a citricultura no Brasil, a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) em parceria com o Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitros) realizou um consórcio que visava o seqüenciamento completo do genoma da estirpe 9a5c de *X. fastidiosa* isolada da laranja doce Valência, que foi concluído em 1999 (SIMPSON *et al.*, 2000). Esse projeto foi reconhecido mundialmente, já que se tratou do primeiro fitopatógeno a ter seu genoma inteiramente sequenciado.

Foi visto que o genoma dessa bactéria é composto de um cromossomo principal de 2.679.305 pares de base (pb) com um conteúdo de 52,7% de G+C (guanina e citosina), e dois plasmídeos menores, um com 51.158 pb, com 49,6% de G+C e outro com 1.285 pb contendo 55,6% (SIMPSON *et al.*, 2000). Além disso, foram identificados vários genes potencialmente envolvidos com a patogenicidade da bactéria, no entanto, a função destes foi atribuída por homologia com outros organismos, uma vez que, nenhum gene de *X. fastidiosa* havia sido funcionalmente caracterizado.

Posteriormente, foi elaborado o projeto *Genoma Funcional* no qual participam 21 laboratórios brasileiros cujo objetivo era o entendimento dos mecanismos de patogenicidade da bactéria e o estudo funcional dos genes identificados no sequenciamento (<<http://www.fapesp.br>>).

Com base na análise do genoma da bactéria foi aferido que seu mecanismo de patogenicidade deveria ser diferente do de outros fitopatógenos, uma vez que ela não apresenta os genes (*avr e/ou hrp*) que conferem especificidade planta-patógeno do sistema de secreção tipo III, clássico para fitopatógenos Gram negativos. No entanto, foram encontrados em seu genoma vários genes relacionados às adesinas, proteínas que participam do processo de adesão. Assim a formação de biofilme pela bactéria foi considerada o possível mecanismo de patogenicidade dessa bactéria (De SOUZA *et al.*, 2003, 2004; OSIRO *et al.*, 2004).

Biofilmes são comunidades de microrganismos, que se aderem às superfícies e cujas células geralmente estão cobertas por uma matriz de exopolímeros (NOBILE *et al.*, 2008). O biofilme confere várias vantagens para as colônias, entre elas, uma melhor proliferação celular decorrente de maior comunicação entre as células, melhoria na aquisição de nutrientes, acesso a diferentes nichos, e defesa contra fatores antagônicos como agentes oxidativos e antibióticos, o que, em geral, acaba contribuindo para um aumento da sobrevivência da colônia (LEITE *et al.*, 2001). Os exopolissacarídeos comumente produzidos, por exemplo, tornam as colônias cerca de 500 vezes mais resistentes a agentes antimicrobianos, segundo Costerton e colaboradores (1995). Assim, o biofilme consiste em uma estratégia de sobrevivência das bactérias (FEIL *et al.*, 2007).

A formação do biofilme em *X. fastidiosa* é composta por diferentes estágios, entre eles a iniciação, maturação, manutenção e dispersão (**Figura 9**). Sua formação se inicia com a aderência de uma camada de células a uma superfície seguida pelo desenvolvimento de camadas adicionais e produção de uma matriz extracelular, geralmente formada por exopolissacarídeos (EPS), que caracteriza e organiza o biofilme tridimensionalmente e seria codificado pelo operon *gumBCDEFHJKM* e genes relacionados com a produção de alginato (Simpson *et al.*, 2000). Em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* um operon relacionado é responsável pela produção da goma xantana que quando reduzida, em mutantes, também reduziu a virulência deles (KATZEN *et al.*, 1998). Como o operon de *X. fastidiosa* é similar ao de *X. campestris* pv. *campestris*, foi sugerido que o EPS produzido por *X. fastidiosa* também seria um fator de virulência importante para a bactéria. Souza e colaboradores (2006) comprovaram essa hipótese uma vez que, observaram uma diminuição da capacidade de formação de biofilme de mutantes dos genes *gumF* e *gumB* de *X. fastidiosa*. É proposto que o

processo inicial de formação do biofilme seria dependente da atração eletrostática entre proteínas de superfície, como as adesinas, e a superfície do hospedeiro. A manutenção dessa adesão seria realizada pela enzima metionina sulfóxido redutase (MsrA) (LEITE et al., 2002). Em experimentos realizados com uma estirpe virulenta de *X. fastidiosa* revelou a superexpressão do gene *msrA*, o que pode estar relacionado com a manutenção do estado adesivo das proteínas fimbriais e afimbriais na superfície do hospedeiro e também a uma resposta de defesa ao estresse oxidativo (De SOUZA et al., 2003).

Ao atingir um estágio de biofilme maduro é ativado um sistema de sinalização denominado “*quorum sensing*”. Ele envolve a interação entre moléculas de sinal difusível (DSF) com um sensor ou ativadores de transcrição, permitindo que a bactéria sincronize a expressão de certos genes com a sua densidade populacional (WILLIAMS et al, 2000). Essa sinalização permite que as bactérias regulem a expressão de genes específicos como os associados a fatores de virulência, resistência a compostos antimicrobianos, respostas de defesa do hospedeiro, condições de deficiência nutricional, produção de antibióticos e transferência de plasmídeos por conjugação (De KIEVIT, 1999; DAVEY, 2000; MOLIN, 2003). Esse tipo de comunicação química entre as bactérias já foi estudado em bactérias Gram positivas, que utilizariam pequenos sinais peptídicos (DUNNY et al, 1997) e em Gram negativas, cujo principal sinal estudado são as acyl-homoserina lactonas (PARSEK et al, 2000). Chatterjee e colaboradores (2007) observaram que essa comunicação seria essencial para a virulência *X. fastidiosa* e sua transmissão através dos insetos vetores, já que esses sinais codificados pelos genes *rpf* (*regulation of pathogenicity factors*) interferem na expressão de vários genes relacionados à formação do biofilme, entre eles *fimA* e *gumJ*.

Por fim, algumas bactérias podem se desalojar, como consequência de uma superpopulação, por exemplo, e colonizar outras superfícies (LEITE et al., 2001). Segundo Stoodley et al. (2001), o desalojamento de algumas células do biofilme pode ser dividido em dois tipos de processos, chamados pelos autores de processo de erosão e de mudança, baseados na frequência e magnitude com que as células se desgrudam do biofilme. O processo de erosão seria contínuo e envolveria pequenas massas de células do biofilme ou células solitárias, enquanto o de mudança seria rápido com massiva perda do biofilme. Além disso, *X. fastidiosa* é capaz de produzir exo-enzimas (endo-1,4- β -glucanases e celobiohidrolase) capazes de degradar a parede celular das células das plantas hospedeiras e *pit* membranas, o que facilita sua movimentação nos vasos do xilema

A formação de biofilme em *X. fastidiosa* se mostra, portanto, complexa, uma vez que, as células também podem alterar seu fenótipo durante o processo, ativando ou inibindo a transcrição de certos genes e até mesmo de operons (GILBERT *et al.*, 1997).

O sucesso da adesão é um fator chave para que ocorra a conseqüente colonização no ambiente do hospedeiro, pois o xilema é um ambiente de forte turbulência e pressão negativa (DE SOUZA, 2004; MENG *et al.*, 2005). Também para que a bactéria consiga se multiplicar, uma vez no trato alimentar dos insetos, é importante que ela seja capaz de realizar uma eficiente adesão e colonização da cutícula, pois o fluxo de seiva que passa pelo tubo alimentar enquanto o inseto se alimenta é muito alto, chegando a ser maior que 5 cm/s (MENG *et al.*, 2005). Estudos mostram que o mecanismo de adesão da bactéria no tubo alimentar do inseto deva ser parecido com aquele que ocorre no xilema (ALMEIDA *et al.*, 2006).

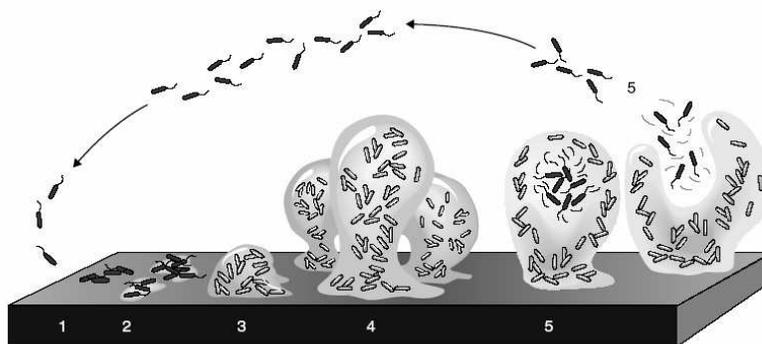


Figura 9. Modelo do processo de formação e maturação do biofilme por estágios. No primeiro nota-se a aproximação das células de bactérias à superfície de adesão, à qual se aderem, e passam a formar microcolônias (3) e produzir exopolissacarídeos (EPS) formando uma estrutura tridimensional do biofilme (4). Eventualmente células ou grupos delas podem se desalojar para colonizar outras superfícies (5).

Os sintomas da CVC são associados à adesão e multiplicação da bactéria nas paredes dos vasos condutores do xilema, no qual formam colônias que, quando suficientemente grandes, obstruem o xilema, ocasionando o bloqueio do transporte de água e nutrientes. Ocorre ainda diminuição na fotossíntese, possivelmente associada aos baixos valores de condutividade estomatal, que também poderiam estar relacionados à deficiência hídrica (MACHADO *et al.*, 1994, 2001). No entanto, não se sabe ao certo o quanto dos sintomas poderia ser associado à obstrução dos vasos causada pela bactéria ou pelas próprias plantas hospedeiras, uma vez que estas, em resposta a intensiva colonização pela bactéria também poderiam causar o bloqueio do transporte de seiva, através, por exemplo, da formação de tiloses. Apesar dessa incerteza, sabe-se que a bactéria desenvolve um papel fundamental para

o desencadeamento do processo (CHATTERJEE et al, 2008). Outros fatores como a absorção de nutrientes, produção de toxinas e compostos antimicrobianos, detoxificação e produção de enzimas capazes de degradar as paredes de comunicação entre os elementos dos vasos do xilema (*pit* membranas) também parecem contribuir para a patogenicidade (MACHADO *et al.*, 2001, NEWMAN et al, 2003, WARREN & KIRKPATRICK, 2009).

O papel das adesinas: adesão e movimentação sistêmica

Com base nas anotações do genoma de *X. fastidiosa*, muitos genes que codificam adesinas foram encontrados. Estes foram relacionadas à formação de agregados bacterianos e estariam sendo diferencialmente expressos durante o processo de formação do biofilme (**Figura 10**).

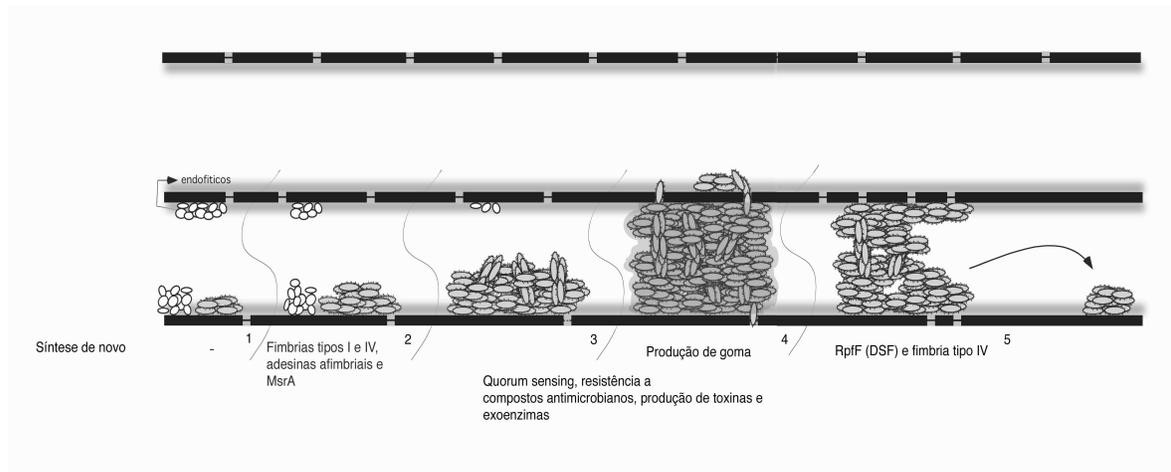


Figura 10. Modelo da colonização dos vasos da planta por *X. fastidiosa* proposto por De Souza e colaboradores (2006). As fímbrrias do tipo I, responsáveis pela adesão, seriam mais expressas no início de formação do biofilme e também durante as fases de proliferação celular. Além disso, outras adesinas afimbriais também estariam envolvidas no processo de adesão. Após atingir uma maior densidade celular (com 20 dias), algumas células iriam se desaderir do biofilme para colonizar novos ambientes, assim, as fímbrrias do tipo IV, responsáveis pela movimentação, seriam mais expressas nessa fase e nas iniciais. Quando o biofilme atinge sua maior densidade celular também seriam ativados sinais de *quorum-sensing*.

As adesinas são proteínas que podem ser fimbriais ou afimbriais. As primeiras englobam os pequenos e numerosos pili e as fímbrrias e as adesinas afimbriais são proteínas que formam projeções na membrana. As fimbriais, em *X. fastidiosa*, são representadas pelo operon fimbrial que envolve os genes *ecdD*, *fimA*, *fimC*, *fimD*, *fimE* e *fimF*. Fim A seria a maior subunidade e Fim F teria a função de ancorar a proteína, sendo então necessárias para a

montagem apropriada da estrutura fimbrial (FEIL *et al.*, 2006). *X. fastidiosa* também possui os pili tipo IV, aparentemente codificados por 26 genes e pelo operon *pil*, com um comprimento que varia de 1 a 6 μm , e um outro pili menor com 0,4 a 1 μm , o pili tipo I. (**Figura 11**). Aparentemente o desenvolvimento do biofilme seria dependente da presença do pili tipo I, o que também é verificado em *Escherichia coli*, enquanto o pili IV estaria relacionado principalmente a motilidade da bactéria. Esse papel do pili tipo IV foi bem caracterizado para *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Myxococcus xanthus*.

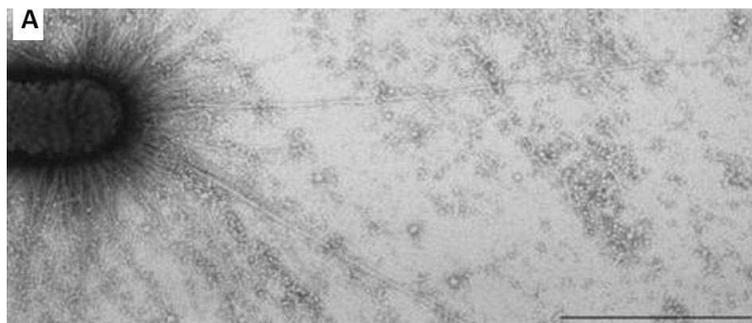


Figura 11. Micrografia eletrônica de *X. fastidiosa* mostrando uma abundância de pequenos pili tipo I e os longos pili tipo IV. Barra, 1 μm . Figura retirada do artigo de Meng *et al.* (2005).

Meng *et al.* (2005), em experimentos com uso de microscopia e câmaras de microfluidos, demonstraram que a motilidade de *X. fastidiosa* ocorre mesmo contra fluxo e associaram essa capacidade de locomoção com a ação dos pili tipo IV. Essa motilidade pode ser observada em plantas hospedeiras, nas quais a bactéria é frequentemente encontrada abaixo dos locais onde foram inoculadas na planta. De La Fuente *et al.* (2007) trabalharam com mutantes da estirpe Temecula-1 de *X. fastidiosa* e observaram que *fimA*⁻ (mutantes com apenas o pili tipo IV) quando submetidos a um fluxo de fluido controlado, se desgrudavam da superfície enquanto que *pilB*⁻ (mutantes com apenas o pili tipo I) quando submetidos às mesmas condições, raramente se desgrudavam, o que comprova o envolvimento do pili tipo I com o ancoramento das células.

Em *P. aeruginosa*, os pili tipo IV (**Figura 12**) são compostos por uma única subunidade protéica (PilA) arranjada em conformidade helicoidal com 5 unidades por volta, podendo ser glicosilada ou fosforilada em diferentes espécies. A montagem do pili ocorreria pela sua base, já que, sendo a α -hélice muito hidrofóbica e fina, o transporte de estruturas através dela seria comprometido. PilV, X e W provavelmente formariam a base da estrutura do pili, PilB se liga a nucleotídeos, PilD seria uma metilase pré pilin e PilQ uma proteína

multimérica de membrana externa pela qual o pili seria expulso e que se estabilizaria pela ação de PilP. Já PilN e O codificam proteínas com resíduos hidrofóbicos longos na parte N-terminal, que devem agir como domínios de ancoramento na membrana (MATTICK, 2002). A formação desse tipo de pili estaria relacionada ao ciclo celular uma vez que requer o gene *pilZ*, que se encontra transcricionalmente acoplado em *holB* que codifica uma DNA polimerase III, e poderia ser regulada em determinadas condições. Em *P. aeruginosa* e *M. xanthus* o sistema de duplo componente *pilS/R* está relacionado com a regulação da transcrição de *pilA*. Além disso, a mobilidade do pili depende de outros 3 genes (*pilG, H e I*).

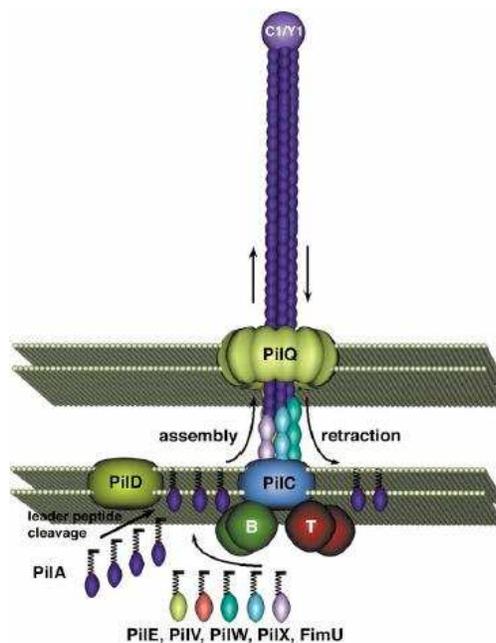


Figura 12. Esquema da estrutura de um pili tipo IV em *P. aeruginosa*. As subunidades monoméricas de PilA são direcionadas à PilD, que realiza a clivagem do peptídeo sinal dessas proteínas, que formariam então uma estrutura de conformidade helicoidal. PilW, X e U fazem parte da base do pili e PilQ é uma proteína multimérica de membrana pela qual o pili é expulso. Fonte: (MATTICK, 2002)

Esse tipo de mobilidade relacionada aos pili tipo IV seria do tipo *twitching motility*, que depende de uma retração do pili e é também importante na formação do biofilme, dependendo para tanto de um contato célula-célula. Em experimentos com microscopia verificou-se que o movimento de *P. aeruginosa* era impulsionado inicialmente pelo centro da colônia ou por vários grupos de células agregadas. Células individuais também apresentaram a *twitching motility*, porém com um movimento mais limitado. Os fatores ambientais que controlam a *twitching motility* ainda não são bem compreendidos, porém, evidências apontam que ela poderia ser influenciada pelo estresse nutricional, densidade celular e

desenvolvimento de microcolônias (MATTICK, 2002).

Já as adesinas afimbriais, são proteínas de membrana externa que contribuem para a ligação das células bacterianas às superfícies ou célula-célula, sendo codificadas pelos genes *xadA1* e *xadA2*, ainda então chamados de *uspA1* e *hsf* (De SOUZA *et al.*, 2003; 2005). O gene *xadA1* de *X. fastidiosa* apresenta homologia com o gene *uspA1* de *Moraxella catarrhalis*, que codifica uma proteína afimbrial muito bem caracterizada por Hoiczky *et al.* (2000). Já o gene *xadA2* de *X. fastidiosa* foi assim denominado por apresentar homologia com o gene *hsf* de *Haemophilus influenzae*, que codifica uma proteína de membrana de superfície celular (ST. GEME III *et al.*, 1996; HOICZYK *et al.*, 2000). A expressão desses genes é maior no início de formação do biofilme e no estágio intermediário, o que sugere o envolvimento de tais genes na formação da arquitetura do biofilme (De SOUZA *et al.*, 2003, 2005).

X. fastidiosa também apresenta várias hemaglutininas, como quatro homólogos a HecA de *Erwinia chrysanthemi*, que nesta é necessária para uma máxima adesão à superfície das plantas, agregação celular, morte celular e virulência em tabaco. Guilhabert e colaboradores (2005) verificaram que na estirpe Temecula-1 de *X. fastidiosa* as hemaglutininas estariam envolvidas com a adesão célula-célula, uma vez que mutantes apresentaram a formação de biofilmes em monocamadas. Além disso, esses autores propuseram a classificação das hemaglutininas como genes de antivirulência, uma vez que promoveriam a agregação celular atenuando a patogenicidade da bactéria, que teria sua capacidade de colonização limitada e assim, a quantidade de vasos obstruídos também seria menor.

Respostas dos biofilmes ao estresse causado por compostos antimicrobianos

A formação de um biofilme, além de proporcionar várias vantagens adaptativas para as bactérias, como uma melhor proliferação celular e melhoria na aquisição de nutrientes, também contribui para um aumento de resistência a diversos fatores de estresse, como compostos antimicrobianos (STEWART, 2002). Giuledoni e colaboradores (2007) definiram a resposta das bactérias a fatores de estresse como uma cascata de alterações na expressão gênica e atividade proteica com o propósito de sobrevivência em condições extremas e danosas a que são sensíveis e, como resultado, haveria a geração de células resistentes, eliminação do agente de estresse ou reparo da injúria causada. Vários estudos têm sido realizados no intuito de se entender os mecanismos de resistência que seriam ativados quando

as células se encontram nessas situações de estresse. Muitos deles, utilizando diferentes sistemas modelo para explicar como os mecanismos poderiam ser ativados, porque eles variam entre as espécies de bactérias e com o agente biocida utilizado e relacionando-os à resposta ao estresse causado.

Tem sido demonstrado, por exemplo, que células em biofilme podem ser cerca de 500 vezes mais resistentes a compostos antimicrobianos que quando em crescimento planctônico (COSTERTON et al., 1995). Alguns estudos com *P. aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* também mostram a resistência das células em biofilme: as doses para controle dessas bactérias são muito menores quando as células crescem na forma planctônica (BROOUN et al., 2000; TEITZEL, 2003; FUX et al., 2005). Essa maior resistência das células quando na condição de biofilme poderia ser associada à expressão diferencial de certos genes. De Souza e colaboradores (2004) verificaram através de microarranjos de DNA que um grande número de genes é induzido quando a bactéria *X. fastidiosa* era crescida em condições de biofilme em comparação com a forma de crescimento planctônica. A expressão de genes majoritariamente expressos em biofilme envolvidos com resistência a multidrogas (MDR), tais como, *mexE*, *czcA*, *mdoH*, *pbp2*, *acrAB*, *msbA* e *metI* (resistência a antibióticos, metais pesados e competição com endofíticos), sugere que as células nessa condição desenvolvam através de um síntese protéica *de novo*, um mecanismo de auto-proteção que as torne resistentes a uma ampla gama de agentes biocidas ou biostáticos. Esse fato também indica que o controle desse fitopatógeno seria mais difícil uma vez formado o biofilme.

Sugere-se também que a matriz de exopolissacarídeos poderia prevenir o acesso de compostos antimicrobianos. Stewart e colaboradores (2000) estudaram a dinâmica de penetração de peróxido de hidrogênio em biofilmes e observaram que biofilmes com camadas mais densas (com cerca de 7,6 UFC/cm²) representariam uma maior barreira à penetração desse composto quando comparados com biofilmes mais delgados (com cerca de 3,5 UFC/cm²) pois cada célula individual produz catalases, enzimas que neutralizam o peróxido de hidrogênio, e assim, quando em maior densidade celular, seriam capazes de destruir mais facilmente o composto. Esse fato foi comprovado quando os mesmos pesquisadores realizaram experimentos com mutantes de *P. aeruginosa* para o promotor (*katA*) da catalase, no qual, apesar das bactérias estarem crescendo em um biofilme denso, houve grande penetração de peróxido de hidrogênio devido à falta dessa enzima.

Shah e colaboradores (2006) evidenciaram o papel do fenótipo de células persistentes, que na presença de agentes bactericidas, nem crescem nem morrem, exibindo alta tolerância a multidrogas. Keren et al (2004) demonstraram que a expressão de genes das células

persistentes de *E. coli* em presença de ampicilina, estaria associada ao módulo toxina-antitoxina (TA), especificamente os genes *higAB* e aqueles que codificam proteínas que podem inibir funções celulares importantes como a tradução, e com isso conduzir à resistência.

Em outro trabalho, Goh e colaboradores (2002) verificaram que doses subinibitórias de diferentes classes de antibióticos ativaram ou inibiram um grande número de promotores em *S. typhimurium*, sendo que, dentre os ativados, estavam os envolvidos com a transcrição de genes de virulência, de funções metabólicas e adaptativas. Linares e colaboradores (2006) também verificaram a indução de certos genes relacionados à virulência quando o biofilme de *P. aeruginosa* foi submetido às concentrações subinibitórias de tobramicina, tetraciclina e norfloxacin. Houve um aumento do biofilme e regulação positiva de genes associados à adesão, motilidade e citotoxicidade, o que fez com que os autores sugerissem que antibióticos não seriam apenas antimicrobianos, mas que em baixas concentrações poderiam funcionar como moléculas sinalizadoras, regulando a homeostase da comunidade microbiana (LINARES et al., 2006).

Além disso, a maior resistência do biofilme poderia ser explicada pela existência de vários nichos dentro dele. Molin e colaboradores (2000) verificaram a existência de células com diferentes taxas de crescimento dentro do biofilme, isso por causa da existência de um microgradiente na concentração de substratos metabólicos e produtos chave. As bactérias posicionadas nessa zona de não crescimento teriam então maiores chances de sobrevivência (GILBERT et al, 1995) e seriam menos suscetíveis do que em um biofilme em que as bactérias crescessem uniformemente em uma taxa intermediária (XU et al, 2000). Essa heterogeneidade observada dentro do biofilme não é apenas observada para as taxas de crescimento celular, como também para disponibilidade de oxigênio, pH, disponibilidade de nutrientes, entre outros.

Assim, dentre os principais mecanismos que possivelmente estariam envolvidos na maior resistência de biofilmes a agentes de estresse destacam-se as barreiras de difusão físicas e químicas à penetração de compostos no biofilme, crescimento mais lento das colônias, ativação de respostas gerais ao estresse e emergência de um fenótipo específico, como as células persistentes (MAH et al, 2001).

Apesar do elevado número de estudos envolvendo a expressão de genes associados à resistência de células em biofilme aos compostos antimicrobianos, poucas são as informações sobre a expressão de genes envolvidos no biofilme de patógenos de plantas. Em trabalho recentemente desenvolvido pelo nosso grupo com o objetivo de avaliar a resistência de *X.*

fastidiosa em biofilme a antibióticos e metais quando comparado ao crescimento planctônico foi demonstrado que os biofilmes de *X. fastidiosa* foram mais resistentes aos compostos antimicrobianos testados do que as células em condição planctônica, independentemente do meio de cultura utilizado (RODRIGUES et al, 2008). Essas análises de expressão gênica demonstraram que a resistência do biofilme de *X. fastidiosa* é um fenômeno complexo que não pode ser explicado por um único mecanismo, e sim por multifatores que podem envolver diferentes mecanismos de resistência.

O fato de doses de compostos antimicrobianos que são inibitórias para células planctônicas não inibirem o crescimento das células em biofilme de *X. fastidiosa*, levanta a hipótese que essa bactéria possa modular a expressão de genes específicos associados à resistência e adaptação em condições atípicas, entre eles possivelmente alguns transportadores multidrogas. Vários pesquisadores (BROOUN et al., 2000; NIES et al., 2003; PAULSEN, 1997; ODERMATT et al., 1995) já mostraram que as bombas de efluxos das famílias do transporte-ABC, de resistência-nodulação e divisão celular (RND), “P-type-ATPase” e a facilitadora de difusão de cátions (CDF) estariam envolvidas com a resistência a metais em outros organismos.

Meidanis e colaboradores (2002) realizaram uma análise visando detectar todos os possíveis transportadores codificados pelo genoma de *X. fastidiosa* e identificaram 957 proteínas com no mínimo um putativo TMSs (segmentos transmembrana). Algumas dessas proteínas puderam ser classificadas de acordo com sua similaridade com transportadores presentes na classificação de Saier e Paulsen et al (2000). No genoma da *X. fastidiosa* foram reportados alguns genes potencialmente envolvidos com a resistência ao cobre, como os relacionados aos quatro sistemas de efluxo, transportadores ABC, da família RND e “P-type-ATPases”, e CDFs (sequências codificadoras) homólogas a *cutA1*, *cutA2* e *cutC* de *E. coli* (Rouch and Brown, 1989). Transportadores ABC localizam-se geralmente na membrana interna da célula e agiram juntamente com outras proteínas, como algumas localizadas no periplasma, que seriam responsáveis pela apresentação do substrato; e a proteína TolC, que se localiza na membrana externa e realiza o transporte do substrato do periplasma para o meio externo. Muitas dessas proteínas envolvidas nesse tipo de transporte são chamadas de “fatores acessórios”, que são essenciais no transporte, principalmente, de substratos proteicos (FATH et al, 1993). Essa família de transportadores está relacionada ao efluxo de compostos antimicrobianos em diversos organismos (PATTERY et al., 1999). Rodrigues e colaboradores (2008) acompanharam, em biofilme de *X. fastidiosa*, a expressão por RT-qPCR de vários genes pertencentes a várias famílias de transportadores relacionados à resistência ao cobre,

entre elas da família ABC, e verificaram que a maioria apresentou indução significativa para quase todas as doses de cobre utilizadas, independente do meio de cultura em que a bactéria havia sido crescida.

Medidas de controle para doenças decorrentes da formação do biofilme de bactérias patogênicas de humanos

Devido à grande resistência a compostos antimicrobianos das células em biofilmes, o controle desses patógenos nessa forma de crescimento é mais difícil. Compostos antimicrobianos de natureza química poderiam vir a ser utilizados no controle ou manejo da CVC, contudo, como já demonstrado, quando as células estão em biofilme são necessárias altas doses desses compostos (RODRIGUES et al, 2008), o que tornaria o controle economicamente inviável.

Em humanos, uma das formas de controle das bactérias que formam biofilmes é o desprendimento do biofilme aderido na superfície do hospedeiro. Para isso é utilizado um aminoácido, análogo de cisteína, o N-acetil-L-cisteína (NAC). O NAC é umas das menores moléculas utilizadas como medicamento, sendo utilizado principalmente para o tratamento de bronquites crônicas e doenças com obstrução crônica do trato pulmonar (PARRY *et al.*, 1976). O composto também tem sido utilizado na medicina para o tratamento de doenças congestivas e obstrutivas pulmonares associadas à hipersecreção da mucosa, como bronquite, fibrose cística e em intoxicações por paracetamol (TIROUVANZIAM et al, 2006; KEAYS et al, 1991). Nesses casos, o NAC atua como um agente mucolítico.

O NAC é uma molécula antioxidante que desfaz as pontes dissulfeto presentes tanto em muco como em biofilmes de bactérias devido à competição de ligação (VENTURA *et al.*, 1999). Além disso, a molécula foi intensivamente investigada na medicina militar, pois poderia ser um modulador de contraste radiográfico, agente indutor de nefrotoxicidade e também como agente protetor dos efeitos causados por radiações (SOCHMAN, 2002).

Foi demonstrado que o NAC reduz a adesão de *Streptococcus epidermidis*, *H. influenza* e *M. catarrhalis* em células epiteliais (ZHENG *et al.*, 1999) e em superfície abiótica (OLOFSSON *et al.*, 2003). Parry e colaboradores (1976) também demonstraram a eficiência do composto sobre biofilmes de *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* e *Staphylococcus aureus*, sendo essa eficiência dependente da quantidade de inóculo e dosagem do NAC. Pérez-Giraldo e colaboradores (1997) concluíram o mesmo em seu trabalho com *S. epidermidis*. Já Pinna e colaboradores (2004) encontraram esse efeito dose-

dependente do NAC, não só na inibição da formação do biofilme como também no biofilme já formado de *K. pneumoniae*, e observaram que o composto deixava o biofilme mais susceptível a antibióticos.

Esses trabalhos demonstram a ampla influência do NAC em biofilmes, tanto de bactérias patogênicas de humanos Gram positivas como Gram negativas. Contudo, nenhum estudo reporta a utilização de NAC para o controle do crescimento em biofilmes de fitopatógenos.

CAPÍTULO 1.

Mecanismos envolvidos com a sobrevivência de *Xylella fastidiosa* em condições de estresse

RESUMO

O principal mecanismo de patogenicidade de *Xylella fastidiosa*, bactéria causadora de várias doenças em culturas economicamente importantes, entre elas a clorose variegada dos citros (CVC), tem sido associado a uma eficiente colonização dos vasos do xilema das plantas hospedeiras e a formação de um biofilme. Esta confere um aumento de resistência a compostos antimicrobianos. Trabalhos já realizados mostraram que doses de antibióticos e metais que foram inibitórias (MIC) para células de *X. fastidiosa* em crescimento planctônico foram consideradas subinibitórias para células na condição de biofilme. Contudo, estudos sobre os mecanismos envolvidos na resistência do biofilme de *X. fastidiosa* a esses compostos antimicrobianos ainda são escassos. Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi analisar a expressão gênica global de *X. fastidiosa* em condições de biofilme quando submetida a doses subinibitórias, que foram MIC para células em condições planctônicas, de um metal (cobre) e um antibiótico (tetraciclina). Para isso foram realizados experimentos de microarranjos com biofilmes com 15 dias de crescimento submetidos às doses de 3 mM de CuSO_4 e 100 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina. Após a análise dos experimentos de microarranjos, no mínimo 10 genes diferencialmente expressos em cada experimento foram selecionados para análise da expressão por transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR). A expressão desses mesmos genes também foi analisada por RT-qPCR nas diferentes fases de formação do biofilme de *X. fastidiosa*. De modo geral foi observada uma modulação negativa de genes associados ao metabolismo celular e energético, síntese proteica, divisão celular e motilidade (pili tipo IV), mas, uma indução de genes relacionados a fagos e bombas de efluxo. Com a adição da dose subinibitória de cobre houve também um aumento da expressão de genes relacionados com a adesão e produção de toxinas, que estariam envolvidos com o desencadeamento dos sintomas em plantas e, portanto, virulência da bactéria. Com a dose subinibitória de tetraciclina, por outro lado, foi observada a modulação negativa de genes relacionados com a virulência, porém a indução de uma possível resposta SOS da bactéria que envolveria os módulos toxina- antitoxina (TA) e a morte celular programada. Esses experimentos mostram que diferentes mecanismos

regulatórios estão envolvidos com a resposta de resistência no biofilme de *X. fastidiosa* e que são ativados de forma diferente dependendo do agente antimicrobiano utilizado.

1. OBJETIVO

1.1 Objetivo Geral

Analisar a modulação da expressão gênica global no biofilme de *X. fastidiosa*, quando submetido a doses subinibitórias de um antibiótico (tetraciclina) e de um metal (cobre).

1.2 Objetivos Específicos

- Realizar ensaios de microarranjos de DNA de células em biofilme de *X. fastidiosa* submetidas a concentrações subinibitórias de tetraciclina e cobre.
- Validação dos experimentos de microarranjos por RT-qPCR.
- Análise da expressão de alguns genes nas diferentes fases de formação do biofilme por RT-qPCR.

2. MATERIAL E METODO

2.1 Estirpe de *X. fastidiosa*

A estirpe de *X. fastidiosa* utilizada em todos os experimentos foi a 9a5c, re-isolada em meio PW (DAVIS et al., 1981) de plantas de laranja 'Pêra' com sintomas de CVC e mantidas sob condições de telado.

2.2 Obtenção de células em biofilme resistentes a concentrações de compostos antimicrobianos que foram MIC para condição planctônica.

Para a obtenção de células em biofilme resistentes às concentrações de compostos antimicrobianos, biofilmes maduros foram obtidos seguindo os procedimentos descritos por De Souza e seus colaboradores (2004). Após 14 dias sob agitação de 130 rpm a 29°C em agitador, as doses de 100 µg/mL de tetraciclina e 3 mM de CuSO₄ foram adicionadas. Essas doses dos compostos antimicrobianos foram letais para células em condição planctônica, mas

subinibitórias para células em biofilme e foram determinadas em experimentos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa. Os dados obtidos para cobre já foram publicados por Rodrigues e colaboradores (2008). Um controle sem adição dos compostos antimicrobianos também foi utilizado para comparação da expressão diferencial. Após 24 horas, os biofilmes da condição controle e com a adição dos compostos antimicrobianos foram coletados, lavados com água tratada com DEPC e submetidos à extração do RNA total. Foram efetuadas três repetições biológicas para cada tratamento.

2.3 Extração de RNA e síntese de cDNA.

Os biofilmes dos experimentos controle e os com a adição dos agentes antimicrobianos foram submetidos ao processo de extração de RNA total pela metodologia proposta por Rhodius (2000) seguido por limpeza e tratamento das amostras utilizando o kit de extração da Qiagen (RNeasy Mini Kit Qiagen) e DNaseI com o sistema de coluna da Qiagen (DNase Qiagen e RDD Buffer).

A integridade do RNA extraído foi verificada por corrida eletroforética em gel desnaturante e medida em espectrofotômetro dos padrões $A_{260/280}$ e $A_{260/230}$. O gel desnaturante foi elaborado com o tampão FA 1X (MOPS, acetato de sódio e EDTA, pH 7), 1,2% de agarose, formaldeído e corado com brometo de etídeo. As amostras de RNA misturadas com 1:4 vv (volume: volume) do tampão RNA loading —16 μ L de solução de azul de bromofenol, 720 μ L de formaldeído, 2 mL de glicerol, 3,08 mL de formamida e água livre de nuclease (DEPC) para completar o volume de 10 mL— e incubadas a 65°C por 5 minutos. Em seguida foram resfriadas em gelo (choque térmico) e aplicadas no gel desnaturante.

No experimento de microarranjos, a síntese de cDNA foi realizada pela empresa NimbleGen (<www.nimblegen.com>), nesse caso foram enviados 30 μ g de RNA total (exigência da empresa) de cada uma das 3 réplicas biológicas para os experimentos. Para as análises de RT-qPCR o cDNA foi sintetizado a partir de 1 μ g de RNA total, utilizando o kit RevertAid (Fermentas) e seguidos os procedimentos do fabricante. O cDNA obtido foi diluído com água DEPC na proporção 1:3 e armazenado em freezer -80°C até o uso.

2.4 Microarranjos de DNA (Microarray).

Os experimentos de microarranjos (**Figura 13**) de DNA foram realizados pela empresa NimbleGen. As lâminas de microarranjos de DNA possuem uma cobertura de 100%

do genoma da bactéria, contendo as 2.832 CDS anotadas, com uma densidade de 192.000 *spots*. Foram utilizadas 13 sondas por CDS alvo e cada CDS (*spot*) repetida 5 vezes em cada lâmina. Diversas sondas controles também foram utilizadas para posterior utilização no processo de normalização dos dados. A normalização dos dados foi realizada pela empresa com a utilização do programa NimbleScan que se baseia no método “*quantile*” que foi descrito por Bolstad e seus colaboradores (2003). As análises estatísticas dos dados normalizados fornecidos pela empresa foram realizadas utilizando-se o programa ArrayStar (<<http://www.dnastar.com/t-products-arraystar.aspx>>). Através do programa foi realizado o cálculo do “*fold change*” do nível de expressão dos genes pela média da razão da intensidade de fluorescência de cada condição, e da significância da diferença de expressão pelo teste T-Student (95% de confiabilidade) corrigido posteriormente pelo teste de FDR (*false discovery rate*). Foi utilizado um limite de corte (*cutoff*) de 2,0 *fold change*. Para análise e menção das CDS foi adotado o ID proposto durante a primeira anotação do genoma realizada por Simpson e colaboradores (2000). Os genes diferencialmente expressos em comum com a adição de cobre e tetraciclina foram analisados através de gráficos de Venn e os clusters (clusterização hierárquica e *K-means*) foram gerados pelo programa ArrayStar.

Tabela 2. Número de lâminas e ensaios realizados.

Ensaio	Repetições biológicas	No. de lâminas
Biofilme de <i>X. fastidiosa</i> com 100 µg/mL de tetraciclina	3	3
Biofilme de <i>X. fastidiosa</i> com 3 mM de CuSO ₄	3	3
Controle (Biofilme sem composto antimicrobiano)	3	3
TOTAL		9

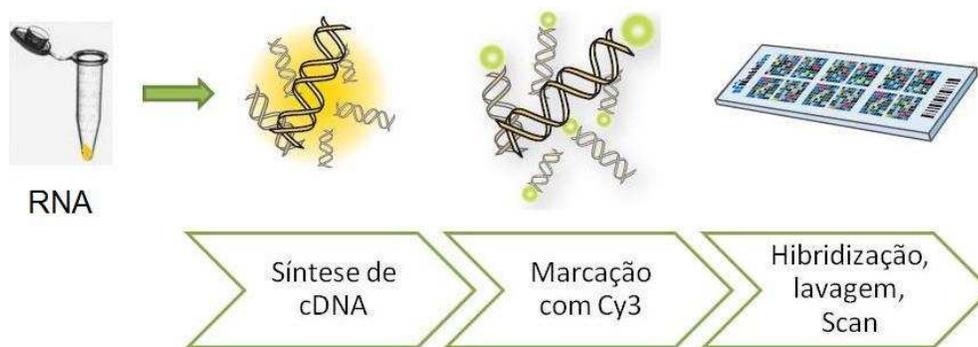


Figura 13. Esquema mostrando as etapas, que foram realizadas pela empresa NimbleGen, de um experimento de microarranjo. A partir do RNA recebido a empresa realiza a síntese de cDNA, que é então marcado com uma molécula fluorófora (Cy3). Posteriormente é realizada a hibridização do cDNA marcado com as sondas imobilizadas em uma lâmina e a determinação da intensidade de fluorescência para cada ponto. Esse mesmo procedimento é realizado para a condição controle e cada um dos demais tratamentos. Os dados são então analisados utilizando-se ferramentas de bioinformática que permitirão o cálculo da razão da intensidade dos sinais fluorescentes, que representam a expressão dos genes nas amostras.

2.5 Análise e comparação de sequências de DNA e proteínas

Para a pesquisa de similaridade entre as sequências de DNA ou proteínas foi utilizado o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al, 1990; ALTSCHUL et al, 1997) na base de dados pública GenBank do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e no *Xylella fastidiosa* Genome Project (<<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>>) (<<http://www.xylella.lncc.br/>>) e para as análises de domínios proteicos foi utilizado o Pfam (<<http://pfam.sanger.ac.uk/>>).

2.6 RT-qPCR (Transcrição Reversa seguida por Reação da Polimerase em Cadeia em Tempo Real)

A técnica de RT-qPCR foi utilizada tanto para a validação dos experimentos de microarranjos como para a análise de expressão destes mesmos genes em diferentes fases de formação do biofilme de *X. fastidiosa*.

2.6.1 Desenho dos *primers*, análise da eficiência de amplificação e especificidade

Todos os *primers* foram desenhados utilizando o programa 'PrimerExpress' (Applied Biosystems) utilizando as sequências de nucleotídeos de cada CDS e os seguintes padrões: conteúdo de GC de 30-80%, tamanho do *primer* até 21 pares de base, temperatura de anelamento de 59 a 60°C e tamanho do *amplicon* de 100 a 150 pares de base. Os *primers* foram submetidos às análises de eficiência e de especificidade. Para a análise da especificidade foram realizadas reações para cada par de *primer* em PCR convencional com a temperatura de anelamento de 60°C. Os produtos dessas reações foram analisados por corrida eletroforética em gel de agarose 1%, purificados e seqüenciados em modo direto com o seqüenciador automático ABI 3730 para a confirmação da amplificação correta do gene que estava sendo avaliado. A eficiência de amplificação dos *primers* foi calculada através da diluição seriada (no mínimo 5) de uma dada amostra de cDNA e valor da inclinação da reta (*slope*) utilizado na fórmula $E = 10^{(-1/slope)} - 1$. Foram utilizados os *primers* com valores de eficiência entre 0,9 e 1.

2.6.2 Condições gerais de uso da técnica

A quantificação relativa foi feita utilizando o ABI PRISM 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems) e com a utilização do sistema SYBR Green (PCR Master Mix- Applied Biosystems). As reações foram realizadas em triplicatas utilizando sempre um controle sem cDNA para detectar possíveis contaminações. Cada reação foi composta de 2 µL de cDNA (a concentração foi previamente padronizada), 1 µM de cada *primer* (direto e reverso) e 12,5 µL de "SYBR green PCR master mix" (Applied Biosystems), o volume final foi ajustado para 25 µL com água. As reações foram incubadas a 50°C por 2 minutos, 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. As amplificações foram checadas no ABI PRISM 7500 e as concentrações relativas calculadas através do método $\Delta\Delta Ct$, descrito a seguir. Após amplificação as reações foram submetidas à curva de dissociação, visando detectar qualquer possível contaminação no ensaio.

2.6.3. Experimentos para escolha do controle endógeno

Como controles endógenos foram testados alguns genes que não tiveram sua expressão alterada nos experimentos de microarranjos de DNA nas condições apresentadas na **tabela 3** e foram considerados genes *housekeeping*, segundo Scally e colaboradores (2005). Realizou-se uma quantificação do nível de expressão de cada gene nas diferentes condições a serem analisadas posteriormente. Os valores de Ct (definido como o primeiro ciclo de amplificação em que a fluorescência emitida do produto de PCR é detectada acima do ‘*threshold*’) obtidos foram transformados em valores chamados de *quantile* de acordo com a fórmula $Q = E^{-\Delta Ct}$, na qual Q= valor de quantile, E= eficiência de cada *primer* e $-\Delta Ct$ = maior valor do Ct encontrado para cada gene – Ct de cada amostra. Esses valores de *quantile* obtidos foram posteriormente analisados através dos programas GeNorm e NormFinder, disponíveis publicamente.

Tabela 3. Genes escolhidos para testes com RT-qPCR e escolha do controle endógeno para os experimentos de validação dos resultados dos microarranjos.

ID do gene	Produto gênico	<i>Fold change</i> -CuSO4*	<i>Fold change</i> -tetraciclina*	Primers
XF2421	30S ribosomal protein S20	1,061	1,149	F: TTGTGCGTAATGAACGGAACAC R: TCGGCACCAGCGATATCTTT
XF1353	topoisomerase IV subunit	1,146	-1,188	F: TGATGGCACAACCGTTCTCA R: ACTCGGTGTAGCGCATTGCT
XF0204	DNA polymerase III, alpha chain	1,139	1,144	F: GCACAACGCTGCAATATCGA R: CGACTGTTTGC GGATCCAA
XF2233	DnaJ protein	-1,065	-1,357	F: GCTCCGTGCACAAGGGTATC R: CGCATTGCCAAACACCTCTT
XF0656	glutamate symport protein	-1,318	-1,309	F: GCTTCTGCTGGCACATGGTT R: CATCGCAGCAAAGCTGGAA

*Valores de *fold change* apresentados em relação ao experimento controle. Valores positivos significam maior expressão na situação teste (adição de cobre ou tetraciclina) e negativos no experimento controle.

O gene escolhido como um bom controle endógeno foi posteriormente utilizado para normalizar todas as amostras das possíveis diferenças de concentrações de cDNA. Para normalização dos dados obtidos pelo RT-qPCR foi utilizada a seguinte equação: $\Delta Ct = Ct$ (gene alvo) – Ct (controle endógeno). O aumento dos níveis de expressão do gene alvo para cada condição foi calculado através da equação: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (amostra) - ΔCt (calibrador). O

calibrador é o valor obtido para uma amostra específica, como por exemplo, o controle sem a adição dos compostos antimicrobianos.

2.7. Validação dos experimentos de microarranjos

Para a validação dos experimentos de microarranjos, os biofilmes foram crescidos nas mesmas condições descritas anteriormente. Foram escolhidos pelo menos 10 genes diferencialmente expressos em cada experimento (com cobre ou com tetraciclina) que podem ser visualizados na **tabela 4**.

Tabela 4. Genes escolhidos para validação dos experimentos com tetraciclina ou cobre.

ID do gene	Nome do gene **	Fold Change- cobre *	Fold Change-tetraciclina *
XF0132	<i>copA</i>	0,4009	0,2105
XF0889	<i>pspA</i>	5,352	0,363
XF0372	<i>pilP</i>	0,2829	0,1615
XF1633	<i>pilT</i>	-	0,2195
XF2490	(toxin of the MqsR-MqsA toxin-antitoxin system and biofilm/motility regulator)	-	3,969
XF2779	<i>pda</i>	-	2,606
XF0363	<i>ompA</i>	-	0,1481
XF1490	<i>marR</i>	-	3,232
XF1721	<i>lysR</i>	2,392	-
XF1792	<i>pilA</i>	-	2,779
XF2593	(Sistema de duplo componente)- <i>phoB</i>	0,3298	-
XF1077	(Transporte ABC)- <i>ldlD</i>	-	3,087
XF1350	(RNA 70)- <i>rpoD</i>	-	0,4892
XF1408	(RNA 54)- <i>rpoN</i>	0,4344	-
XF1341	<i>cutC</i>	2,281	-
XF2586	<i>tolC</i>	0,2985	0,2053
XF1516	<i>xadA1</i>	0,1958	0,1205
XF1529	<i>xadA2</i>	0,4679	0,2148
XF2546	<i>pilS</i>	-	2,985

*Fold change calculado com base no método $\Delta\Delta Ct$. Valores abaixo de 1,0 indicam repressão do gene em relação ao controle e valores acima de 1,0, genes induzidos.

** para alguns genes o produto gênico de determinado ID encontra-se entre parênteses.

2.8 Análise da expressão de alguns genes diferencialmente expressos com 15 dias nas diferentes etapas de formação do biofilme de *X. fastidiosa*.

Os mesmos genes diferencialmente expressos escolhidos para a validação por RT-qPCR dos experimentos de microarranjos também foram submetidos a uma análise de expressão por RT-qPCR nas diferentes fases de formação do biofilme da bactéria. Essas fases já foram caracterizadas por De Souza e colaboradores (2005) e compreendem 3, 5, 10, 15, 20 e 30 dias de formação do biofilme. Assim, os biofilmes foram crescidos por esses tempos e os compostos antimicrobianos (100 µg/mL de tetraciclina ou 3 mM de CuSO₄) adicionados. Procedeu-se a extração de RNA total e síntese de cDNA como descrito previamente, assim como a análise de expressão por RT-qPCR. Após o cálculo da expressão relativa de cada gene para as diferentes fases de formação do biofilme, foi aplicado o teste estatístico ANOVA para averiguação de diferenças intragrupo e o teste *post hoc* de Tukey-Kramer's, ambos com significância de 95%. Como foram realizados múltiplos testes, para que o valor de significância continuasse 95% ($\alpha < 0,005$) os valores de *p* foram corrigidos através do teste de Šidàk —calculado através da fórmula $1-(1-\text{valor de } p \text{ sem ajuste})^k$, na qual ^k é o número de comparações na família. Todos os gráficos e valores estatísticos foram gerados através do *software* Genex (<<http://www.multid.se/>>).

RESULTADOS

3.1. Extração de RNA e síntese de cDNA

Foram testados os métodos de extração de RNA total com trizol, utilizando o kit de extração da Qiagen (RNeasy Mini Kit Qiagen) e a metodologia descrita por Rhodius (2000). A **figura 14** mostra a comparação do padrão eletroforético de bandas referentes ao RNA em gel desnaturante (agarose 1%) para os diferentes métodos de extração de RNA.

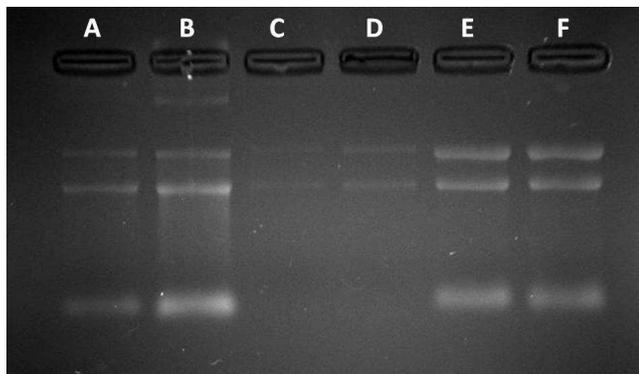


Figura 14. Extração de RNA de biofilmes de *X. fastidiosa*. A e B são provenientes do método de extração com Trizol, C e D, da concentração de várias amostras em um mesma coluna do kit de extração da Qiagen e E e F, do método descrito Rhodius (2000). A, C e E são provenientes de biofilmes controle e B, D e F de biofilmes submetidos a 3 mM de CuSO_4 .

A metodologia proposta por Rhodius apresentou uma grande eficiência de extração de RNA total para *X. fastidiosa* e foi adotada nesse projeto. No entanto as amostras apresentavam grande quantidade de DNA, que pode ser visualizado na **figura 15**. As amostras foram tratadas com DNase utilizando o sistema de coluna da Qiagen (DNase Qiagen e RDD Buffer) e em seguida submetidas a nova digestão com ‘DNaseI RNase free’ (Qiagen) (**Figura 15**).

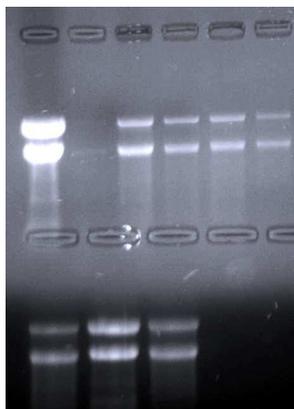


Figura 15. Gel desnaturante mostrando o padrão eletroforético de bandas das amostras de RNA extraídas segundo a metodologia de Rhodius (2000) e tratadas com ‘DNaseI RNase free’ (Qiagen).

A absorbância das amostras foram medidas em espectrofotômetro e todas as razões $A_{260/280}$ e $A_{260/230}$ encontraram-se entre 1,8 e 2,0, que é a faixa de trabalho recomendada para que a qualidade do RNA (considerando-se a não contaminação com proteínas ou compostos utilizados no próprio processo de extração, como os fenólicos) seja boa, quando resuspendido em água livre de nucleases (pH entre 6 e 7). A síntese de cDNA foi realizada com 1 μg do RNA total extraído de cada amostra.

3.2. Microarranjos de DNA (Microarray)

3.2.1 Análise da expressão gênica global de *Xylella fastidiosa*, em biofilme, submetida às doses subinibitória de cobre e tetraciclina

3.2.1.1. Cultivo com 3mM de CuSO₄

Com a adição de 3 mM de cobre, 373 (13,17%) CDS foram diferencialmente expressas, sendo que 223 CDS (7,87%) foram induzidas e 150 CDS (5,29%) reprimidas (**Figura 16**).

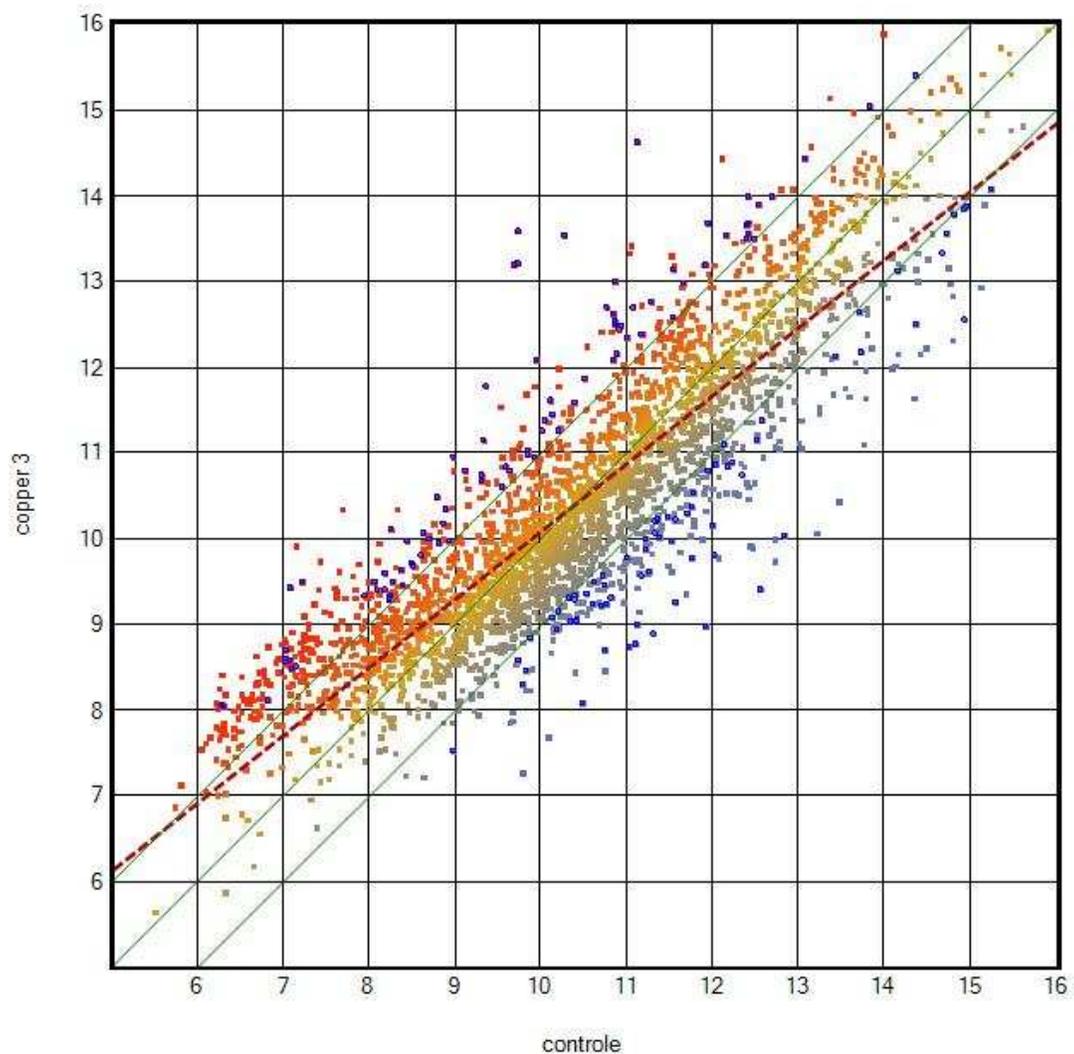


Figura 16. Scatter Plot das CDS analisadas. Em azul estão marcados as CDS diferencialmente expressas com *fold change* igual ou maior que 2.0.

As CDS diferencialmente expressas foram agrupadas de acordo com suas categorias funcionais baseadas na anotação reportada por Simpson et al. (2000) (<<http://www.lbi.ic.unicamp.br/xf/>>) (**Figura 17**).

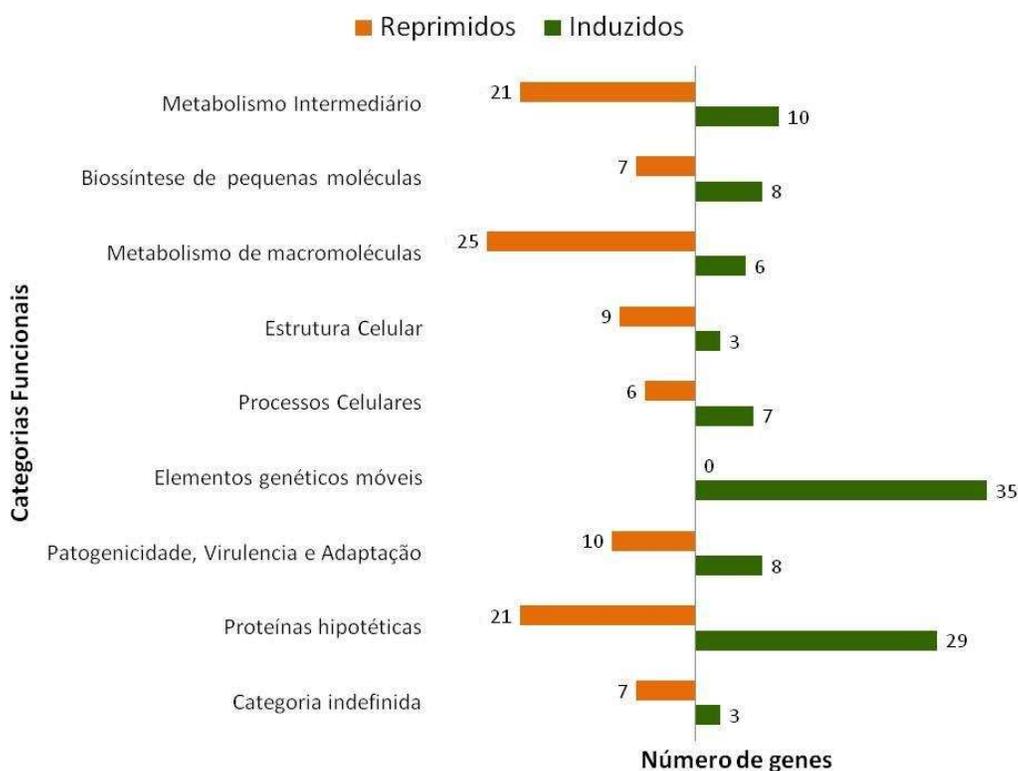


Figura 17. CDS diferencialmente expressas agrupadas nas categorias funcionais após reanotação.

As CDS diferencialmente expressas podem ser visualizadas nas **tabelas S1 e S2** em **ANEXO**. Nessas tabelas não estão incluídas as CDS classificadas como codificantes para proteínas hipotéticas (categoria VIII B), essas podem ser encontradas no web site http://www.centrodecitricultura.br/microarray_xf.

Dentre as CDS diferencialmente expressas, 197 CDS (6,96%) foram classificadas como proteínas hipotéticas ou proteínas hipotéticas conservadas. Dentre as CDS induzidas 141 (63,23%) foram assim classificadas e dentre as reprimidas 56 (37,33%). Esse grande número de proteínas hipotéticas já era esperado uma vez que cerca de 50% do genoma de *X. fastidiosa* foi anotado inicialmente como codificante para proteínas hipotéticas. Esses genes foram analisados por BlastP e Pfam, para se averiguar a possível similaridade com outras sequências depositadas em bancos públicos. Apesar da reanotação do genoma de *X. fastidiosa* ser recente novas sequências são adicionadas com frequências à esses bancos, assim uma busca em seus dados poderia revelar novas funções putativas para CDS até então consideradas

proteínas hipotéticas. Após essa análise, 3 genes das CDS para proteínas hipotéticas e que foram induzidas, puderam ser reanotadas (**Tabela 5**), assim como 7 CDS dentre os reprimidos (**Tabela 6**).

Tabela 5. CDS induzidas com cobre que foram reanotadas.

ID gênico	e- value	Identidade	Score	Organismo	Produto gênico
XF0178	5e-144	252/257 (98%)	514 bits (1323)	<i>Xylella fastidiosa</i> Ann-1	outer membrane protein
XF1720	1e-36	73/94 (77%)	155 bits (392)	<i>Bordetella petrii</i> DSM 12804	transcriptional regulator
XF1753	0.0	500/615 (81%)	982 bits (2538)	<i>Acidovorax</i> sp. JS42	relaxase

Tabela 6. CDS reprimidas com cobre que foram reanotadas

ID gênico	E- value	Identidade	Score	Organismo	Produto gênico
XF0654	8e-164	276/288 (95%)	505 bits (1300)	<i>Xylella fastidiosa</i> Dixon	NPL/P60
XF1384	7e-141	248/501 (49%)	504 bits (1299)	<i>Burkholderia dolosa</i> AVO 158	PhoPQ-activated pathogenicity- related protein
XF2151	1e-147	261/425 (61%)	527 bits (1357)	<i>Xylella fastidiosa</i> M23	Putative secreted lipase
XF0357	0.0	368/387 (95%)	764 bits (1974)	<i>Xylella fastidiosa</i> M23	Putative secreted lipase
XF0358	0.0	365/385 (94%)	757 bits (1955)	<i>Xylella fastidiosa</i> M23	Putative secreted lipase
XF0462	2e-17	45/68 (66%)	90.9 bits (224)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Transcriptional regulator, XRE family
XF0264	1e-25	87/102 (85%)	119 bits (297)	<i>Xylella fastidiosa</i> Dixon	Colicin V precursor

Para o melhor entendimento de quais CDS foram diferencialmente expressas, estas serão apresentadas e discutidas dentro de tópicos, sendo eles: biossíntese proteica e metabolismo celular, reguladores transcricionais, metabolismo do ferro, homeostase do cobre, bombas de efluxo e transporte, virulência e patogenicidade, elementos genéticos móveis e morte celular programada.

Biossíntese proteica e metabolismo celular

Com a dose subinibitória de 3 mM de CuSO₄ as CDS de proteínas ribossomais das subunidade 30, 50 e 16S (XF0110, XF0434, XF0740, XF1167, XF1168, XF1169, XF1177, XF1536, XF1537, XF2560, XF2634), síntese de tRNA como o gene *trm* (XF0109) e o gene

cca (XF1362), assim como relacionadas aos fatores de alongação como Tu e que se ligam a GTP catalizando etapas do processo da síntese proteica (XF1213, XF2628 e XF2640) foram reprimidas, indicando uma possível diminuição geral da síntese proteica pelas células. O metabolismo energético também parece ter sido reduzido uma vez que foram encontrados genes relacionados às subunidades da NADH-ubiquinona oxireductase (*nuoA*, *nuoB*, *nuoC*, *nuoD*, *nuoE* e *nuoJ*), que participam do ciclo do ácido cítrico (*vojH*, *sdhC*, *sdhB*, *mdh*, *mdhD*, *sucB*), da glicólise (*pfkA*) e o gene *cyoB*, que faz parte do transporte de elétrons e codifica uma subunidade da citocromo O oxidase sendo modulados negativamente. Entretanto, 3 CDS (XF2459, XF2460, XF2463) relacionadas diretamente à biossíntese da citocromo C oxidase e outras 3 (XF2455, XF2456, XF2457), codificantes do operon de transportadores tipo ABC também envolvidos com essa síntese foram induzidas.

Relacionado ao metabolismo de DNA, as CDS codificantes das subunidades chi e épsilon da DNA polimerase III (XF0136 e XF2157) foram reprimidas, indicando mais uma vez uma diminuição do metabolismo celular quando na presença da dose subinibitória de cobre. Também encontramos a indução do sistema de enzimas de restrição tipo I, que estariam envolvidas na quebra de sequências de DNA.

Ainda atrelado à diminuição do metabolismo e síntese proteica a divisão celular também se encontra reprimida, já que uma CDS de uma proteína putativa de segregação e condensação (XF2452), fator de especificidade topológica da divisão (XF1320) e relacionada à partição do cromossomo (XF2281) foram reprimidas.

Também foi observada a repressão de CDS das chaperonas *GroEL* e *GroES* (XF0615 e XF0616) caracteristicamente envolvidas com a resposta ao estresse térmico (*heat shock*).

Reguladores transcricionais

Uma CDS do fator sigma 54 (XF1418) e um sistema de regulação de duplo componente relacionado ao fosfato (XF2593) foram reprimidos. Mas também encontramos várias CDS de reguladores de transcrição, principalmente pertencentes à família LysR (XF1719, XF1721, XF1752, XF1768) sendo induzidas.

Metabolismo de ferro

Todas as CDS (XF0550, XF2237, XF2003, XF0506) putativamente relacionadas à aquisição de ferro (*tonB*) foram reprimidas assim como um regulador de transcrição da família Fur (XF0821).

Homeostase do cobre

Relacionado diretamente a homeostase do cobre na célula, apenas a CDS do gene *cutC* (XF1341) foi induzida e a CDS (XF0132), do gene *copA*, que em outros organismos também encontra-se relacionado a homeostase do cobre, foi reprimida.

Bombas de efluxo e transporte

Duas CDS relacionadas ao transporte foram reprimidas, entre elas uma do sistema de transporte de fosfato (XF2142) e outra do transporte do complexo Mg^{++} / citrato (XF0320). Intrigantemente, uma CDS também envolvida com o transporte de magnésio foi induzida (XF0900), assim como uma codificante para um canal de potássio (XF1426), prótons antiporter de drogas da família MFS (*Major Facilitator Superfamily*, envolvida com o efluxo de várias substâncias, entre elas algumas drogas como a metilenomicina A (XF1765) e uma CDS (XF1729) para fenilacetaldeído desidrogenase, que poderia estar relacionado à degradação de compostos aromáticos tóxicos. A CDS referente à porina O (XF0321) também foi induzida. A CDS (XF2318) da proteína de membrana externa TolC, foi reprimida, assim como transportadores de efluxo multidrogas (XF2093, XF2094), que estariam envolvidos com a resistência à acriflavina (*acrA* e *acrB*).

Virulência e patogenicidade

Com relação à virulência e patogenicidade, 3 CDS (XF0889, XF2196, XF2775) de hemaglutininas filamentosas envolvidas com a adesão foram induzidas, assim como duas relacionadas às proteínas de secreção de hemolisina (XF2398 e XF2550) e de virulência (XF2121, XF1588, XF1384). As CDS relacionadas às fímbrias do tipo IV (XF0354, XF0355, XF2537, XF2539, XF0460, XF1509) foram reprimidas. Duas outras CDS (XF1516, XF1529) ligadas às adesinas afimbriais *XadA1* e *XadA2* também foram reprimidas. Envolvida com a produção da goma fastidiana, a CDS (XF0259) foi reprimida assim como outra relacionada à síntese de lipopolissacarídeos (XF2434).

Elementos genéticos móveis

Contrastando com a repressão de 6 CDS de proteínas de fagos e profagos, 45 CDS também relacionadas a eles foram induzidas, dentre as quais encontram-se algumas integrases, proteínas de montagem do capsídeo e DNA polimerases. Também foi encontrada uma CDS para uma putativa transposase (XF1850) sendo superexpressa. Além disso, 2 CDS associadas a competência da célula e conjugação (XF0063 e XFa0065) foram induzidas.

Morte celular programada

Uma CDS (XF2081), que codificaria a toxina (RelB) do módulo toxina-antitoxina similar ao encontrado em *E. coli*, foi induzida. Esse sistema estaria envolvido com a morte celular programada das células e será discutido com mais detalhes em um tópico adiante. O módulo sempre envolve 2 genes, no mesmo operon, uma antitoxina e a toxina, sendo expressas juntas. A antitoxina pode também ser degradada logo após sua síntese.

3.2.1.2. Cultivo com 100 µg/ mL de tetraciclina

Com a adição de 100 µg/mL de tetraciclina, 899 (31,74%) CDS foram diferencialmente expressas, sendo que 449 (15,85%) das CDS foram reprimidas e 450 (15,89%) foram induzidas (**Figura 18**).

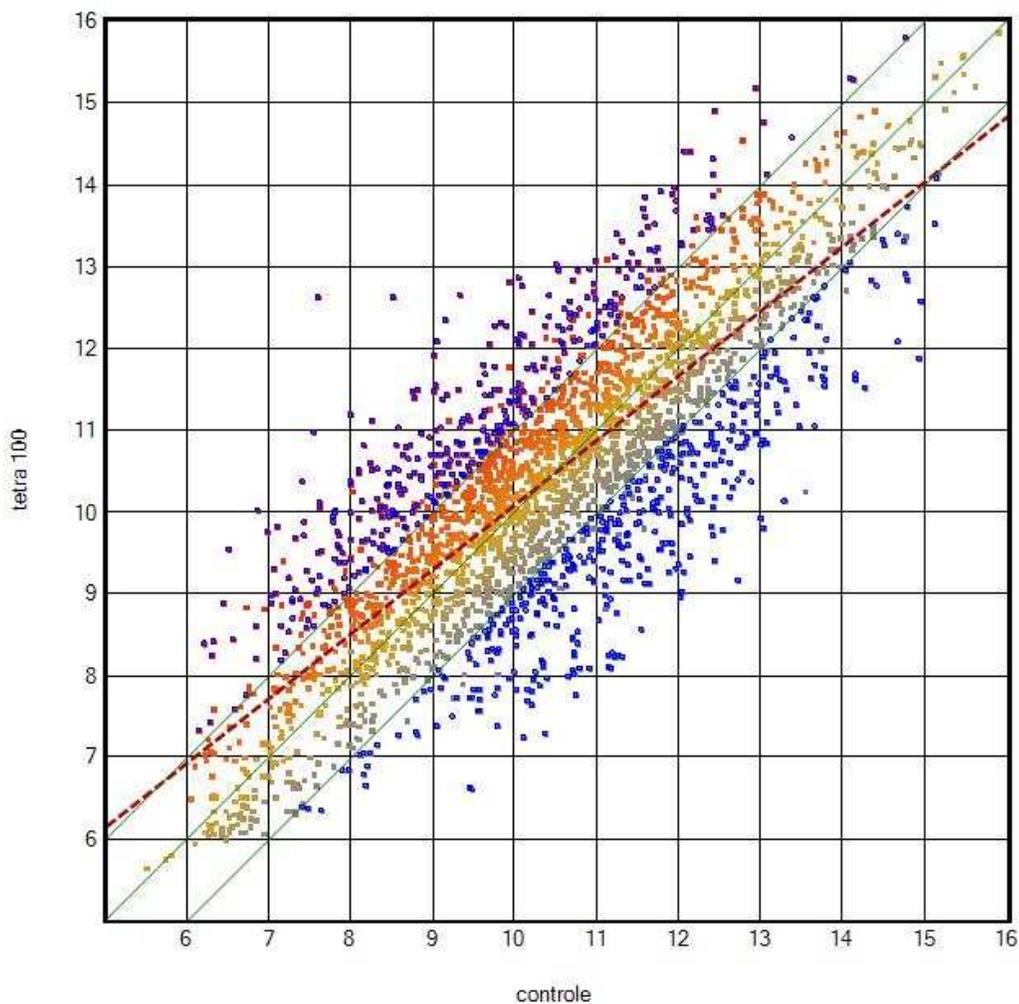


Figura 18. *Scatter Plot* das CDS analisadas. Em azul estão marcadas as CDS diferencialmente expressas com *fold change* igual ou maior que 2.0.

As CDS diferencialmente expressas foram agrupadas de acordo com suas categorias funcionais adotadas por Simpson et al. (2000) (<<http://www.lbi.ic.unicamp.br/xf/>>) (**Figura 19**).

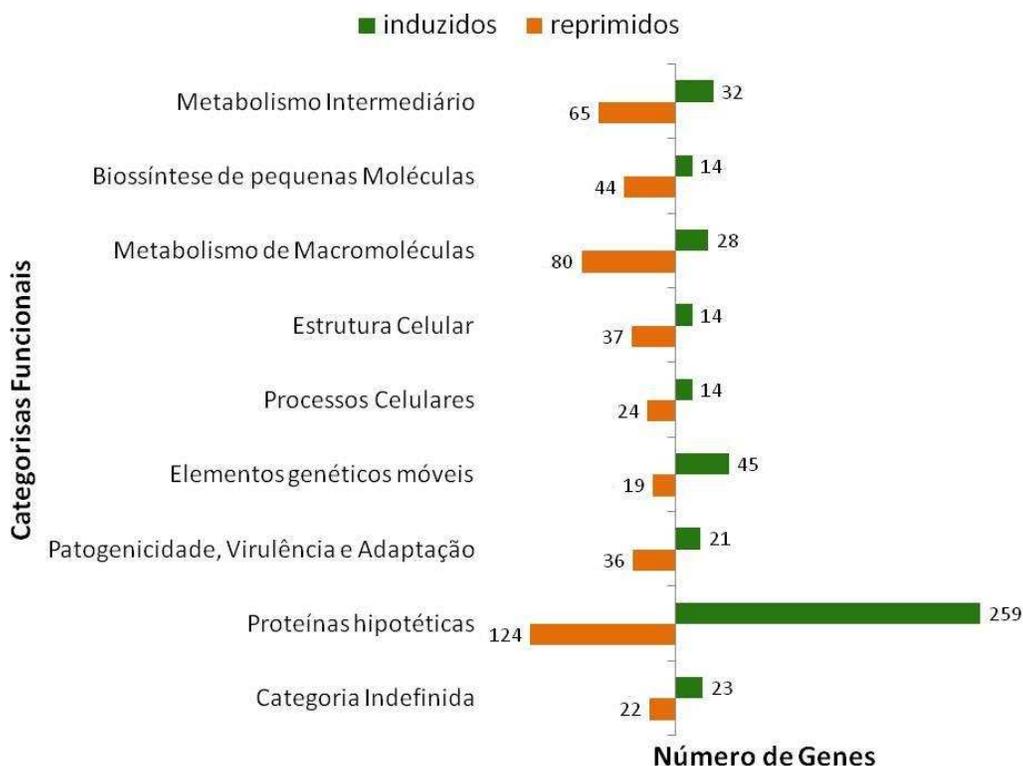


Figura 19. Genes diferencialmente expressos agrupados nas categorias funcionais após reanotação.

As CDS diferencialmente expressas podem ser visualizadas nas **tabelas S3 e S4** em **ANEXO**. Nessas tabelas não estão incluídas as CDS classificadas como codificantes para proteínas hipotéticas (categoria VIIB), estas podem ser encontradas no web site http://www.centrodecitricultura.br/microarray_xf.

Dentre as CDS diferencialmente expressas, 538 (59,84%) foram classificadas como codificantes de genes para proteínas hipotéticas ou proteínas hipotéticas conservadas. Dentre elas 347 CDS (77,11%) foram induzidas e 191 (42,54%) reprimidas. Essas CDS foram analisadas por BlastP e Pfam, para, assim como nos experimentos de microarranjos com cobre, averiguar a possível similaridade com outras sequências depositadas em bancos públicos. Após essa análise, 29 das CDS para proteínas hipotéticas e que foram induzidas, puderam ser renotadas (**Tabela 7**), assim como 15 dentre as reprimidas (**Tabela 8**) (**Figura 19**).

Tabela 7. CDS induzidas com tetraciclina que foram reanotadas.

ID gênico	e- value	Identidade	Score	Organismo	Produto gênico
XF0199	7e-128	232/235 (98%)	460 bits (1183)	<i>Xylella fastidiosa</i> Dixon	Protein of unknown function DUF502
XF0214	1e-89	166/237 (70%)	333 bits (854)	<i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> str. ICPB 10535	phosphatase
XF0449	1e-45	73/95 (76%)	159 bits (402)	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae PXO99A</i>	transmembrane signal peptide protein
XF0472	0.0	379/432 (87%)	690 bits (1780)	<i>Stenotrophomonas</i> sp. SKA14	decarboxylase family protein
XF0811	5e-101	183/276 (66%)	371 bits (952)	<i>Xanthomonas</i> <i>campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. <i>B100</i>	spermidine synthase-like enzyme
XF1230	5e-88	160/160 (100%)	326 bits (836)	<i>Xylella fastidiosa</i> Dixon	Sensor with GAF domain
XF1494	3e-157	276/281 (98%)	558 bits (1437)	<i>Xylella fastidiosa</i> Dixon	TPR repeat-containing protein
XF1597	2e-35	72/98 (73%)	151 bits (382)	<i>Candidatus</i> <i>Hamiltonella defensa</i> 5AT (<i>Acyrtosiphon</i> <i>pisum</i>)	addiction module
XF1754	1e-24	59/117 (50%)	117 bits (292)	<i>Methylibium</i> <i>petroleiphilum PMI</i>	phage integrase family protein
XF1755	1e-111	200/210 (95%)	405 bits (1042)	<i>Comamonas</i> <i>testosteroni KF-1</i>	RES domain-containing protein
XF2037	2e-11	92/360 (25%)	75.1 bits (183)	<i>Mycobacterium</i> <i>tuberculosis</i> KZN 605	8-amino-7- oxononanoate synthase bioF2
XF2490	1e-26	60/99 (60%)	122 bits (307)	<i>Escherichia coli</i>	toxin of the MqsR- MqsA toxin-antitoxin system and biofilm/motility regulator
XFa0055	4e-43	105/294 (35%)	179 bits (453)	<i>Methylibium</i> <i>petroleiphilum PMI</i>	type I restriction- modification system methyltransferase subunit-like protein
XFa0045	1e-33	66/106 (62%)	145 bits (366)	<i>Candidatus</i> <i>Hamiltonella defensa</i> 5AT (<i>Acyrtosiphon</i> <i>pisum</i>)	addiction module toxin
XF0113	3e-05	34/54 (62%)	51.6 bits (122)	<i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> str. <i>ICPB 11122</i>	PII uridylyl-transferase
XF0301	1e-44	91/97 (93%)	182 bits (462)	<i>Xylella fastidiosa</i> Dixon	acriflavin resistance protein
XF0540	2e-14	39/58 (67%)	81.6 bits (200)	<i>Xylella fastidiosa</i> <i>Temecula1</i>	phage-related lysozyme
XF0917	5e-07	32/65 (49%)	57.4 bits (137)	<i>Xylella fastidiosa</i> Ann- <i>I</i>	transferase hexapeptide repeat
XF1489	9e-49	96/198 (48%)	196 bits (499)	<i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia R551-3</i>	putative thioredoxin
XF1814	0.0	392/610 (64%)	775 bits (2002)	<i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i> <i>K279a</i>	putative transmembrane protein
XF1846	1e-13	37/49 (75%)	79.3 bits	<i>Acidovorax</i> sp. <i>JS42</i>	DNA topoisomerase III

			(194)		
XF1928	3e-18	49/63 (77%)	94.4 bits (233)	<i>Burkholderia sp. H160</i>	two component transcriptional regulator, winged helix family
XF2190	1e-28	61/70 (87%)	129 bits (323)	<i>Xylella fastidiosa Ann-1</i>	Protein of unknown function DUF596
XF2277	0.0	872/903 (96%)	1806 bits (4679)	<i>Xylella fastidiosa Dixon</i>	Caspase-1, p20:Polysaccharide deacetylase
XF2390	1e-31	64/99 (64%)	139 bits (349)	<i>Ralstonia solanacearum UW551</i>	Oxidoreductase
XF2611	4e-54	106/108 (98%)	213 bits (543)	<i>Xylella fastidiosa Temecula1</i>	response regulator
XF2662	7e-11	41/84 (48%)	70.1 bits (170)	<i>Bacillus cereus AH676</i>	Pentapeptide repeat protein
XF2773	8e-92	187/255 (73%)	340 bits (872)	<i>Xylella fastidiosa Ann-1</i>	hemagglutinin-like secreted protein
XFa0024	1e-32	67/86 (77%)	142 bits (357)	<i>Candidatus Accumulibacter phosphatis clade IIA str. UW-1</i>	Protein of unknown function DUF1778

Tabela 8. CDS reprimidas com tetraciclina que foram reanotadas.

ID gênico	e- value	Identidade	Score	Organismo	Produto gênico
XF0461	1e-41	86/149 (57%)	173 bits (438)	<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	transcriptional regulator, XRE family
XF1552	0.0	410/422 (97%)	824 bits (2128)	<i>Xylella fastidiosa Ann-1</i>	Transcription factor jumonji, jmjC
XF1895	2e-152	262/271 (96%)	541 bits (1395)	<i>Xylella fastidiosa Dixon</i>	TPR repeat
XF1607	4e-36	76/78 (97%)	154 bits (388)	<i>Xylella fastidiosa Dixon</i>	SlyX
XF0761	6e-99	174/271 (64%)	364 bits (935)	<i>Xanthomonas oryzae pv. oryzae PXO99A</i>	lipoprotein, putative
XF0554	1e-33	74/121 (61%)	145 bits (367)	<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	protein of unknown function UPF0102
XF0565	2e-169	294/301 (97%)	598 bits (1542)	<i>Xylella fastidiosa Ann-1</i>	Protein of unknown function DUF500
XF0757	2e-143	307/468 (65%)	513 bits (1320)	<i>Xanthomonas oryzae pv. oryzae PXO99A</i>	YjeF family protein
XF2041	7e-55	103/232 (44%)	217 bits (553)	<i>Shewanella denitrificans OS217</i>	TENA/THI4 protein
XF0417	2e-46	92/101 (91%)	188 bits (478)	<i>Xylella fastidiosa Dixon</i>	Sulfate transporter/antisigma-factor antagonist STAS
XF1571	0.0	427/462 (92%)	877 bits (2266)	<i>Xylella fastidiosa Ann-1</i>	Phage-related protein HI1409
XF1252	0.0	1615/1641 (98%)	3268 bits (8473)	<i>Xylella fastidiosa Dixon</i>	N-terminal Alpha-2-macroglobulin,
XF1434	4e-35	83/272 (30%)	97.4 bits (241)	<i>Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis NCPPB 382</i>	putative extracellular serine protease
XF1036	0.0	990/1008 (98%)	2053 bits (5319)	<i>Xylella fastidiosa Dixon</i>	TonB-dependent receptor
XF1836	7e-21	71/167 (42%)	103 bits	<i>Stenotrophomonas</i>	putative transmembrane

			(258)	<i>maltophilia</i> <i>K279a</i>	protein
--	--	--	-------	------------------------------------	---------

Assim, como realizado para os experimentos com cobre, para melhor entendimento dos resultados obtidos com tetraciclina, as CDS diferencialmente expressas serão apresentadas e discutidas dentro dos mesmos tópicos já propostos anteriormente (biossíntese proteica e metabolismo celular, reguladores transcricionais, metabolismo do ferro, homeostase do cobre, bombas de efluxo e transporte, virulência e patogenicidade, elementos genéticos móveis e morte celular programada).

Biossíntese proteica e metabolismo celular

Com a dose subinibitória de 100 µg/mL de tetraciclina, 22 CDS de proteínas ribossomais das subunidades 30S e 50S foram reprimidas assim como algumas de RNAs transportadores (XF0428, XF0549, XF0822, XF0927, XF1338, XF1856, XF1959, XF1960, XF2418) e as subunidades alpha e beta da RNA polimerase (XF1176, XF2632). Além disso, também foi observada a modulação negativa de várias CDS para fatores de alongação, como o P (XF2203, XF2473), G (XF2629) entre outros (XF2243, XF2247, XF1213). A repressão dessas CDS pode indicar uma diminuição da síntese proteica geral, como também ocorrido com a adição da dose subinibitória de cobre.

Assim como encontrado para esse agente antimicrobiano, o metabolismo energético também parece ter sido reduzido na presença de tetraciclina, uma vez que foram encontradas CDS relacionadas às subunidades da NADH-ubiquinona oxireductase (XF0308, XF0310, XF0311), da glicólise (XF0274, XF0823, XF0826, XF1291) e relacionadas à biogênese do citocromo O oxidase (XFXF1387, XF1388, XF1389, XF2461), ciclo do ácido cítrico e interconversão de ATP (ATPs sintases) sendo reprimidas.

Relacionado ao metabolismo de macromoléculas, contrastando com os resultados encontrados para cobre, o sistema de restrição tipo I foi reprimido (XF2725).

A divisão celular também diminuiu já que CDS para proteínas de divisão celular, partição do cromossomo e determinação do septo foram reprimidas.

As CDS das chaperonas envolvidas com a resposta ao estresse térmico (*heat shock*) *GroEL* e *GroES* (XF0615 e XF0616) também foram moduladas negativamente.

Reguladores transcricionais

Várias CDS relacionadas a reguladores transcricionais foram induzidas entre elas algumas de genes envolvidos com a repressão do operon triptofano (XF1920), regulador do

metabolismo de nitrogênio (XF1843), da família MarR, do gene *korC* (XF2062) e *pilS* (XF2546), provavelmente envolvido com a regulação de genes codificantes de fímbrias; e algumas CDS cujos sistemas de regulação ainda não foram relacionados com nenhuma via ou gene (XF0323, XF2359). Foram encontradas as CDS relacionadas ao metabolismo de fosfato (XF2145), uma da família LysR (XF1752) e a RNA polimerase sigma 70 (XF1350) sendo reprimidas.

Metabolismo de ferro

A CDS XF0599, que codifica um receptor de sideróforos (Piu) foi induzida, porém 2 outras CDS de genes de receptores dependentes de TonB (XF0550, XF2237) e uma CDS (XF0395) que codifica uma bacterioferritina foram reprimidas.

Bombas de efluxo e transporte

Algumas CDS de genes de sistemas de transporte foram moduladas negativamente, sendo eles associados ao transporte de fosfato (XF2141, XF2144), sulfato (XF1345, XF1346), magnésio (XF1400), complexo Mg⁺⁺/citrato (XF0320), sistema CopA/B (XF0132, XF0133), resistência a acriflavina (XF2093, XF2095), transporte de biopolímeros (XF0010, XF0011) e um gene associado a tolerância ao tolueno (XF0418). Ainda, a CDS (XF2586) da proteína de membrana externa TolC foi reprimida.

Apesar da repressão desses sistemas de transporte várias CDS foram induzidas. Uma delas de um sistema Na⁺:H⁺ antiporte (XF2019), outra de expulsão de Na⁺ via ABC transporte (XF2328), transportadores ABC para lipoproteínas (XF1077) e lipídeos (XF2582), uma permesase para exportação (XF2567), transporte de açúcares (XF0268), para efluxo multidrogas (XF2686) e uma permease de drogas e transporte de metabólitos (XF0250). Também foi induzida uma CDS (XF2780) que codifica o gene *oxaA* de uma proteína de membrana interna.

Virulência e patogenicidade

Várias CDS relacionadas à formação de pilis e motilidade foram diferencialmente expressas. Algumas como XF0966, XF0030 e o operon XF0473- XF0477 foram induzidas. Elas estariam envolvidas com os genes *fimT*, *pilW*, *fimT*, *pilV*, *pilW*, *pilX* e *pilY*, respectivamente. As CDS XF0077 e XF1791 que codificariam para os genes *fimA/pilA* também foram induzidas. No entanto, apesar da indução dessas CDS outras também envolvidas na formação da estrutura do pili foram reprimidas, como XF0369, XF0372,

XF0373, XF0033, XF0083, XF2538, XF2539 e XF2541, que codificariam os genes *pilM*, *pilP*, *pilQ*, *pilE*, *fimA* e *pilC*, *pilA* e *pilB*, assim como as CDS XF1632 e XF1633 responsáveis pela retração e movimentação do pili. Quanto às adesinas afimbriais, as CDS XF1516 (*xadA1*), XF1529 (*xadA2*) e XF1981 foram reprimidas. A CDS codificante da porina OmpA (XF0363) também foi modulada negativamente. Também encontramos a CDS XF0889 codificante de uma hemaglutinina sendo reprimida, mas outra CDS (XF2773) de hemaglutinina induzida. Assim, de modo geral a adesão e movimentação do biofilme parecem ser moduladas negativamente.

Ainda relacionado à virulência e patogenicidade encontramos uma CDS de uma proteína que se liga a penicilina sendo induzida (XF1614) assim como uma hemolisina (XF0175). Porém outra CDS de hemolisina (XF2407) foi reprimida. Além disso, as CDS XF1109 e XF1384, que estariam relacionadas a reguladores de patogenicidade foram também reprimidas, assim como um precursor da colicina V (XF0264). Não foram encontradas CDS de proteínas associadas às toxinas sendo induzidas, como nos experimentos com cobre.

Elementos genéticos móveis

30 CDS relacionadas a fagos e profagos foram induzidas, além de uma CDS de uma transposase (XF2003), de uma integrase (XF1754), uma proteína de estabilização de plasmídeo (XF2074) e sistema de manutenção plasmidial (XF1709). Entretanto 53 CDS também relacionadas a fagos e profagos foram reprimidas.

Como ocorrido com cobre, 2 CDS (XF0063, XF0086) relacionadas à competência da célula para realização de conjugação e para proteínas de transferência de material genético por conjugação (XF2033, XF2045, XF2050, XF2052, XF2054, XF2055, XF2056, XF2058, XFa0015, XFa0041, XFa0043) foram induzidas.

Morte celular programada

Duas CDS (XF0534, XFa0001) relacionadas à regulação gênica, por apresentarem domínios HTX (*helix turn helix*) de ligação ao DNA, possuem alguma similaridade com o gene *hipB*, recentemente descrito como participante do sistema de morte celular programada em bactérias. Outras CDS (XF2080 e XF2081, *relE/B* e a CDS XFa0045) que estariam relacionadas com a morte celular programada foram induzidas, elas fazem, provavelmente, parte do sistema de toxina-antitoxina (TA), descrito em um tópico mais adiante do trabalho. Já a CDS XF2490 que foi reanotada nesse trabalho com base em semelhança com uma sequência de *E. coli*, poderia estar relacionada à comunicação celular atuando como um

regulador de motilidade celular ou como parte do sistema de toxina-antitoxina MqsR/A, já que a anotação do gene similar em *E. coli*, aponta essas duas possibilidades.

Como o sistema TA relacionado à morte celular programada é composto sempre por dois módulos (a toxina e a antitoxina), foi realizada uma busca dentre as CDS anotadas no genoma de *X. fastidiosa* logo após, ou antes, das CDS encontradas sendo diferencialmente expressas em nossos experimentos e que acreditávamos codificarem módulos TA. Observamos que para a CDS XF1597, por exemplo, sua antecedente (XF1596), que se encontra na mesma fita e que foi reanotada como um regulador transcricional predito, poderia ser o par pertencente ao sistema TA, já que também possui um domínio típico presente nos componentes desse módulo o HTX (*helix turn helix*). A mesma busca foi realizada para as outras CDS e o resultado pode ser visualizado na **tabela 9** a seguir. Para todas as CDS que acreditávamos codificar para sistemas TA foi possível encontrar o respectivo par do conjunto, assim reforçando a hipótese de que seriam parte desse sistema. Além do provável módulo TA XFa0045/ XFa0046 localizado no plasmídeo da bactéria também encontramos a CDS XFa0027 sendo induzida na presença de tetraciclina. Ao realizarmos uma análise por BlastP, encontramos que essa CDS, anotada como codificante do gene *pemK* de manutenção do plasmídeo, codificaria para uma antitoxina (*MazF*). No entanto, ao analisarmos a CDS XFa0026, que poderia codificar a toxina do sistema esta codifica para uma proteína hipotética e nenhum domínio foi encontrado que a caracterizasse como parte desse sistema.

Tabela 9. Pares de CDS propostas como codificantes de sistemas TA após análise por Blast e verificação de domínios proteicos.

Pares de CDS
XF0433- XF0434
XF1596- XF1597
XF2490- XF2491
XF2080-XF2081
XFa0045- XFa0046

3.2.2. Comparação dos dados de microarranjos com adição de cobre com os de tetraciclina

Com o intuito de se encontrar um padrão de respostas específico ao cobre e/ou a tetraciclina, as CDS comumente induzidas e reprimidas em ambos os experimentos foram identificadas através de análise de gráficos de Venn (Figura 20 e 21).

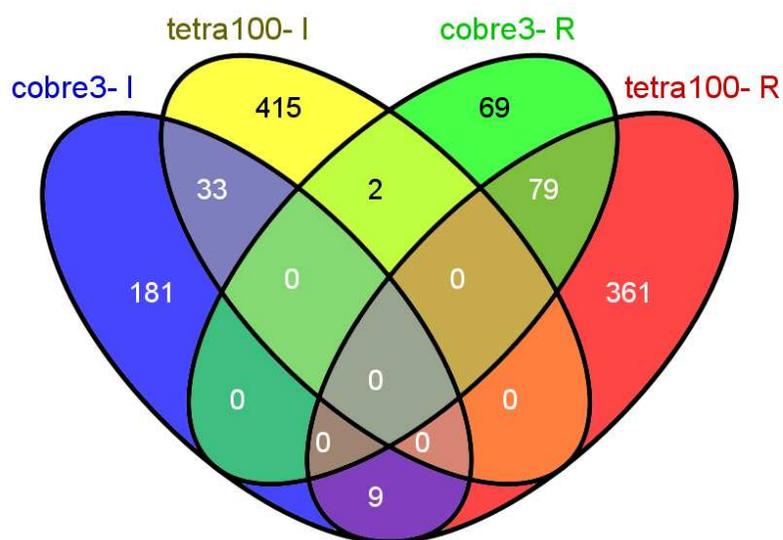


Figura 20. Gráfico de Venn representando as CDS comumente induzidas ou reprimidas com experimentos com cobre e tetraciclina. Cobre3- I- CDS induzidas com 3 mM de cobre, cobre3- R- CDS reprimidas com 3mM de cobre, tetra100- I- CDS induzidas com 100 µg/mL de tetraciclina, tetra100- R- CDS reprimidas com 100 µg/mL de tetraciclina.

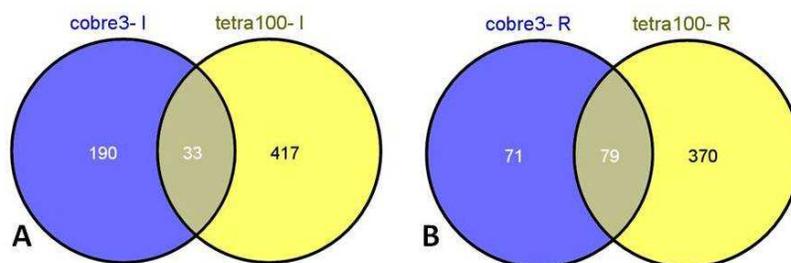


Figura 21. Gráficos de Venn. Em A estão representadas as CDS induzidas em comum nos tratamentos com cobre e com tetraciclina. Em B estão representadas as CDS reprimidas em comum entre os tratamentos com cobre e tetraciclina. Cobre3- I- CDS induzidas com 3 mM de cobre, cobre3- R- CDS reprimidas com 3mM de cobre, tetra100- I- CDS induzidas com 100 µg/mL de tetraciclina, tetra100- R- CDS reprimidas com 100 µg/mL de tetraciclina.

É possível observar que 33 e 79 CDS foram induzidas e reprimidas, respectivamente, em ambos os tratamentos. Um total de 190 CDS só foram induzidas na presença de cobre e

417 apenas com tetraciclina. Foram verificadas 71 CDS reprimidas apenas no experimento com cobre e 370 apenas com tetraciclina. As tabelas com as CDS reprimidas e induzidas em comum aos tratamentos podem ser encontradas no material suplementar disponível online no website http://www.centrodecitricultura.br/microarray_xf. Além disso, como observado na **figura 20**, um total de 9 CDS foram induzidas com 3 mM de cobre porém reprimidas com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tetraciclina e 2 CDS que foram induzidas com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tetraciclina foram reprimidas quando adicionado 3 mM de cobre.

As CDS diferencialmente expressas em comum aos tratamentos com cobre e com tetraciclina foram agrupadas através da clusterização hierárquica com base na distância euclidiana para que pudéssemos identificar padrões na expressão gênica. O resultado pode ser visualizado pelo *heat map* na **figura 22**.

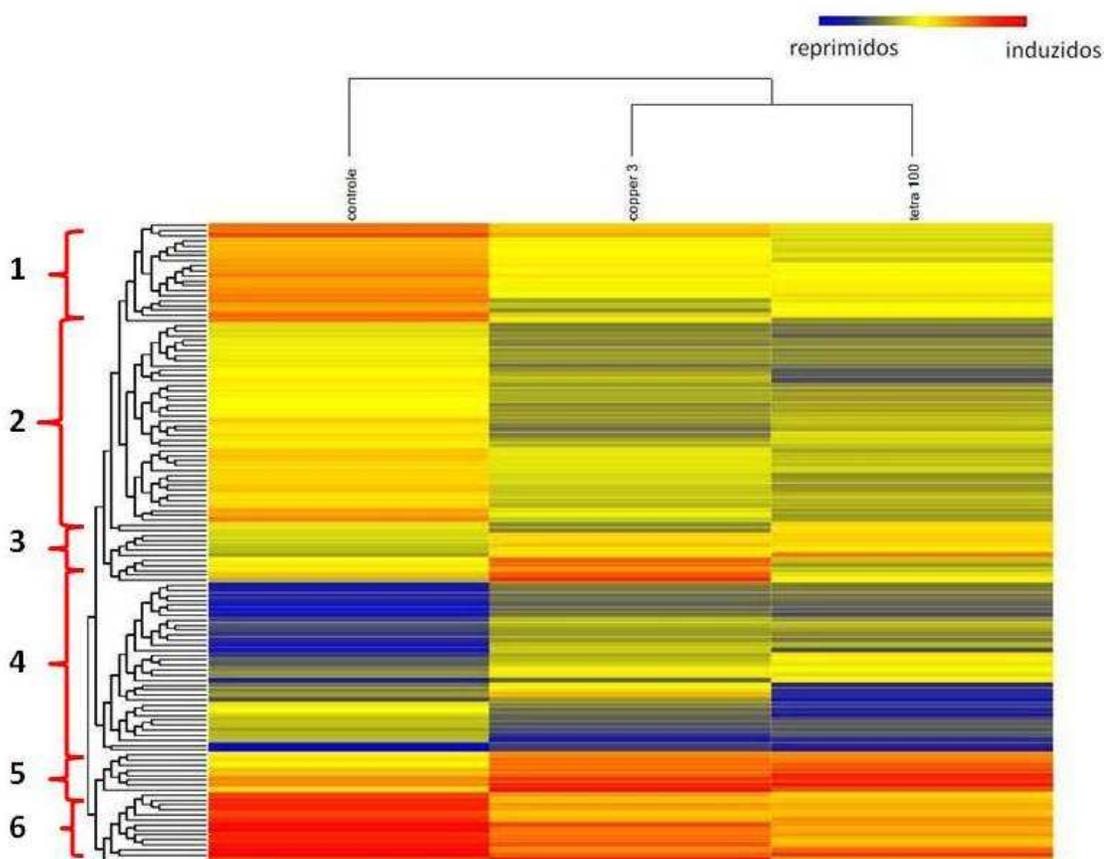


Figura 22. Clusterização Hierárquica. As cores mais próximas do vermelho indicam CDS cuja expressão foi modulada positivamente e cores próximas do azul, negativamente. No quadro é possível a visualização do padrão de expressão dos genes no controle, com 3 mM de cobre e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tetraciclina, respectivamente. Clusterização baseada na distância euclidiana e o método utilizado foi *single linkage*. Funções representativas associadas a cada clade: 1- síntese de nucleotídeos e metabolismo energético; 2- transporte e fímbrias; 3- síntese de aminoácidos; 4- reguladores transcricionais e proteínas hipotéticas; 5- toxinas; 6- co-chaperonas e proteínas ribossomais.

As mesmas CDS foram então submetidas à clusterização pelo *K-means*, na qual o número de clusters gerado é pré-determinado pelo usuário. Após análise do componente principal (PCA), foram elaborados 12 clusters (**Figura 23**) (**Tabela 10**). A maioria dos clusters gerados apresenta grande quantidade de genes codificantes para proteínas hipotéticas, apenas para os clusters 6, 9 e 11 foi possível a identificação de produtos gênicos não hipotéticos. Através da clusterização pelo método de *K-means* foi possível identificar 4 padrões de expressão das CDS, que podem ser visualizados através das diferentes cores ao redor os clusters formados (**Figura 23**). Assim, foi possível identificar os seguintes grupos:

- Um deles com genes induzidos, em relação ao controle, tanto quando adicionado o cobre, como tetraciclina (vermelho);
- Um grupo que aumenta a expressão quando adicionado o cobre, mas é reprimido com tetraciclina (roxo);
- Um grupo de genes reprimidos tanto com cobre como com tetra (laranja);
- E outro com genes que foram reprimidos em ambos os tratamentos com cobre e tetraciclina (azul).

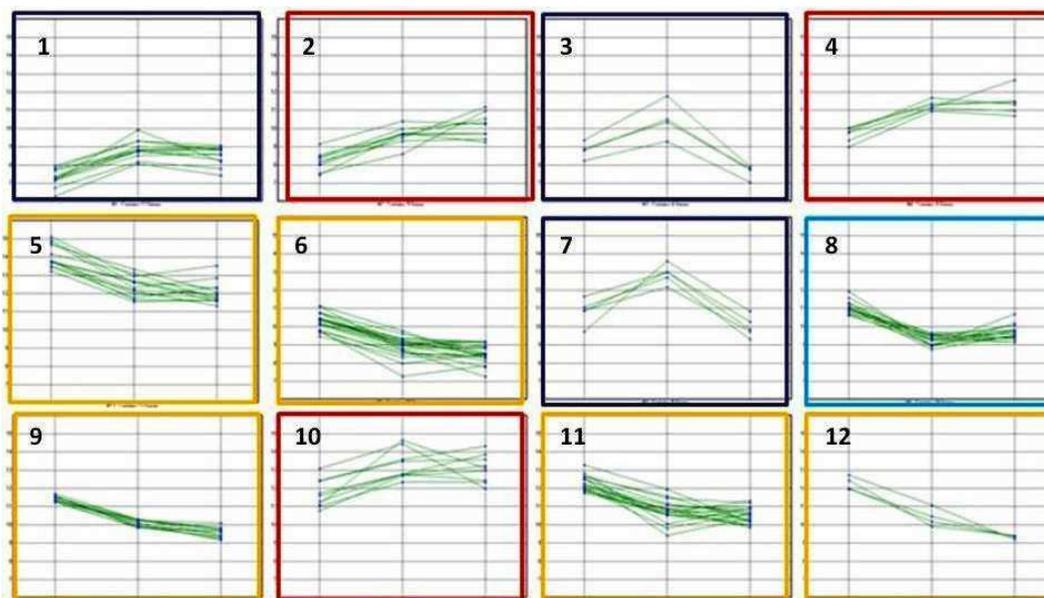


Figura 23. Clusterização pelo algoritmo do *K-means*.

Tabela 10. Principais produtos gênicos contidos em cada um dos clusters identificados.

Cluster	Principais produtos gênicos encontrados
1	Proteínas hipotéticas
2	Proteínas hipotéticas, um regulador transcricional e uma integrase
3	Proteínas hipotéticas, um regulador da família LysR e uma hemaglutinina
4	proteínas hipotéticas e módulo TA
5	Chaperonas, proteínas ribossomais, proteínas de membrana
6	Proteína de resistência ao cobre, DNA polimerase, proteínas hipotéticas e relacionadas ao metabolismo primário, pili
7	Proteínas hipotéticas, uma lipoproteína envolvida com membranas celulares
8	Proteínas hipotéticas e relacionadas ao transporte
9	Proteínas de membrana, pili, rinonuclease
10	Proteínas hipotéticas e fator de alongação P
11	Proteínas hipotéticas e relacionadas ao metabolismo primário, síntese de ATP, e metabolismo de ferro
12	Pili, zinco protease

Esss tipo de análise de dados, através de clusterizações, é interessante, uma vez que conferem uma grande indicativa de que genes que apresentam um mesmo padrão de expressão poderiam estar relacionados, sendo regulados por uma mesma molécula, participando de uma mesma cascata de reações ou fazendo parte de diferentes mecanismos mas que são ativados em uma mesma situação.

3.3. RT-qPCR (Transcrição reversa procedida por reação em cadeia da polimerase em tempo real)

3.3.1. Eficiência de amplificação e especificidade dos *primers*

Para o teste de especificidade, após corrida em PCR convencional, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% (**Figuras 24 e 25**) para visualização do padrão de bandas.

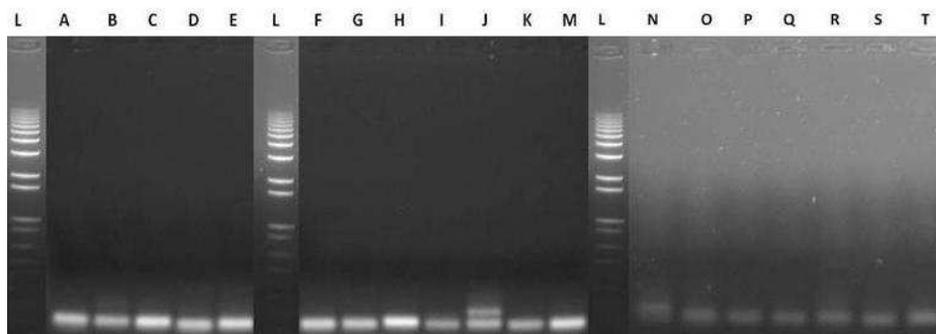


Figura 24. Gel de agarose 1% das amostras após corrida em PCR convencional. L- ladder 1kb (Invitrogen), A- XF0204, B- XF2233, C- XF2421, D- XF1353, E- XF2490, F- XF1633, G- XF2593, H- XF1792, I- XF0372, J- XF0889, K- XFXF1350, M- XF1408, N- XF1341, O- XF0103, P- XF1077, Q- XF0363, R- XF2779, S- XF1721, T- XF1490.

Para os genes em que foram observados *amplicons* inespecíficos, novos *primers* foram desenhados e submetidos aos mesmos testes de especificidade e eficiência de amplificação. Para o gene XF0889 (**Figura 24, 1-J**) houve amplificação inespecífica, fato que pode ser explicado já que o gene codifica para uma hemaglutinina (*pspA*) que tem alta similaridade com outras hemaglutininas codificadas por outros genes (XF2196 e XF2775) presentes no genoma da bactéria. Assim, as seqüências de nucleotídeos desses genes foram alinhadas pelo programa ClustralW (BioEdit) e os *primers* redesenhados para o local da seqüência que não apresentava similaridade com os outros genes (*primer foward* começando no nucleotídeo 9347 e o reverso no 9456). A banda com o tamanho específico esperado pode ser visualizada na **figura 25 (W)** e o produto gênico foi confirmado por Blast.

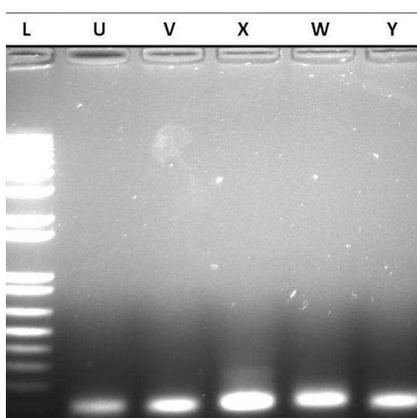


Figura 25. Gel de agarose 1% das amostras após corrida em PCR convencional. L- ladder 1kb (Invitrogen), U- XF2586, V- XF1516, X- XF1529, W- XF0889, Y- XF2546.

As bandas específicas esperadas para cada *primer* foram purificadas e o seqüenciamento das mesmas, realizado. Após o BlastN, todos os produtos de amplificação foram condizentes com o esperado de cada gene (dados não mostrados).

A eficiência de amplificação de cada *primer* foi calculada, após corrida em RT-qPCR para cada par de *primers* e pode ser visualizada na **tabela 11**. Todos os *primers* apresentaram eficiências de amplificação similares e próximas de 1,0 (100%).

Tabela 11. Valores da eficiência de amplificação dos *primers* utilizados nos experimentos.

ID do gene	R²	slope	Eficiência de amplificação
XF2421	0,9923	-3,6706	0,8725
XF1353	0,9855	-3,3178	1,0017
XF0204	0,9858	-3,3872	0,9734
XF0656	0,997	-3,5187	0,9239
XF1721	0,9951	-2,9789	1,166
XF1792	0,9981	-3,0191	1,1439
XF2593	0,9973	-2,9242	1,1563
XF1077	0,9989	-3,3033	1,007
XF1350	0,9976	-3,2375	1,0364
XF1408	0,9966	-3,3484	0,9890
XF0132	0,9725	-3,4079	0,9653
XF0889	0,9978	-3,4877	0,9351
XF0372	0,9954	-3,1878	1,0591
XF1633	0,9870	-3,2998	1,0093
XF2490	0,9856	-3,1757	1,064
XF2779	0,9753	-3,6204	0,8889
XF0363	0,9886	-3,2830	1,0165
XF1490	0,9955	-3,2949	1,0114
XF2586	0,9600	-3,8792	0,8104
XF1516	0,9909	-3,2074	1,0501
XF1529	0,9735	-3,5451	0,9146
XF2546	0,9778	-3,3223	0,9998

3.3.2. Experimentos para escolha do controle endógeno

Após a quantificação absoluta, através do RT-qPCR, para cada uma das amostras das condições a serem analisadas (controle com 3, 5, 10, 15, 20 e 30 dias, cobre com 3, 5, 10, 15, 20 e 30 dias e tetraciclina com 3, 5, 10, 15, 20 e 30 dias de formação de biofilme) com os *primers* específicos para cada gene candidato a um possível controle endógeno, os valores do *Ct* foram transformados em valores de *quantile* como descrito no material e métodos. Após análise nos programas NormFinder e GeNorm, ambos indicaram a CDS XF1353 como a melhor para um possível controle endógeno, tanto na presença de cobre quanto de tetraciclina, e a melhor combinação de 2 controles endógenos foram as CDS XF1353 e XF0656. Nas **tabelas 12 e 15** podem ser visualizados os valores de instabilidade (variabilidade) calculados pelo programa NormFinder para cada gene, para cobre e tetraciclina, respectivamente. Já as **tabelas 13 e 16** apresentam os valores de variação intragrupo e as **14 e 17**, os de variação intergrupo. A variação intragrupo é aquela obtida comparando-se o valor de instabilidade para cada situação testada (3, 5, 10, 15, 20 e 30 dias) dentro de cada grupo (controle e tratamento). Já a variação intergrupo é aquela obtida após a comparação entre os grupos (controle e tratamento). Quanto menor o valor de instabilidade, melhor o controle endógeno, pois mais estável é sua expressão nas diferentes condições testadas.

Tabela 12. Valores de instabilidade calculados para cada uma dos genes candidatos a controle endógeno para os experimentos com cobre. Os valores foram calculados pelo programa NormFinder.

ID do Gene	Valor de Instabilidade
XF2421	0,130
XF1353	0,034
XF0656	0,047
XF0204	0,117

Tabela 13. Variação Intragrupo.

ID do Gene/ Grupo	1*	2*
XF2421	0,028	0,028
XF1353	0,000	0,003
XF0656	0,001	0,008
XF0204	0,017	0,047

*O grupo 1 compreende todos os dias do experimento controle e o grupo 2 do experimento com cobre.

Tabela 14. Variação Intergrupo.

ID do Gene/ Grupo	1*	2*
XF2421	-0,088	0,088
XF1353	0,014	-0,014
XF0656	0,015	-0,015
XF0204	0,059	-0,059

*O grupo 1 compreende todos os dias do experimento controle e o grupo 2 do experimento com cobre

Tabela 15. Valores de estabilidade calculados para cada um dos genes candidatos a controle endógeno para os experimentos com tetraciclina. Os valores foram calculados pelo programa NormFinder.

ID do Gene	Valor de Instabilidade
XF2421	0,119
XF1353	0,031
XF0656	0,036
XF0204	0,084

Tabela 16. Variação Intragrupo.

ID do Gene/ Grupo	1*	2*
XF2421	0,031	0,010
XF1353	0,000	0,001
XF0656	0,001	0,007
XF0204	0,002	0,004

*O grupo 1 compreende todos os dias do experimento controle e o grupo 2 do experimento com tetraciclina.

Tabela 17. Variação Intergrupo.

ID do Gene/ Grupo	1*	2*
XF2421	0,075	-0,075
XF1353	-0,021	0,021
XF0656	0,005	-0,005
XF0204	-0,059	0,059

*O grupo 1 compreende todos os dias do experimento controle e o grupo 2 do experimento com tetraciclina

3.4. Validação dos experimentos de microarranjos

Para avaliação da expressão diferencial observada nos experimentos de microarranjos, alguns genes foram selecionados para análise por RT-qPCR. Os valores de *fold change*, obtidos por RT-qPCR e pelos experimentos de microarranjos, dos genes escolhidos com a adição de cobre ou tetraciclina estão representados nas **figuras 26 e 27**, respectivamente. Nos experimentos com cobre, 100% dos genes avaliados (11) por RT-qPCR apresentaram um *fold change* similar ao obtido através dos experimentos de microarranjos. Nos experimentos com tetraciclina essa porcentagem foi de 86,66% (ou seja, 13 de um total de 15 genes analisados),

isso porque, o gene *pilS* de acordo com o RT-qPCR não sofreu nenhuma modulação, mas nos experimentos de microarranjos teria sido induzido e o gene *pilP* que teria sido reprimido de acordo com os experimentos de microarranjos foi induzido pelos RT-qPCR.

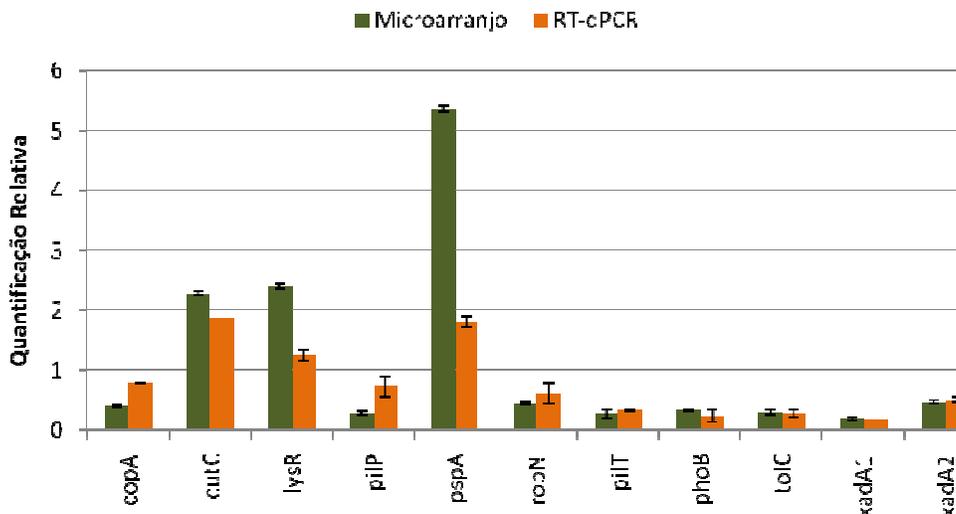


Figura 26. Validação dos experimentos com adição de cobre. A barra de erro indica o desvio padrão médio. Média de 2 e 3 repetições biológicas para os experimentos com RT-qPCR e microarranjos, respectivamente. Valores de quantificação relativa inferiores a 1,0 indicam repressão gênica, iguais a 1,0, que o nível de expressão é o mesmo nos experimentos controle ou com cobre e, maiores que 1,0, que o gene sofreu modulação positiva.

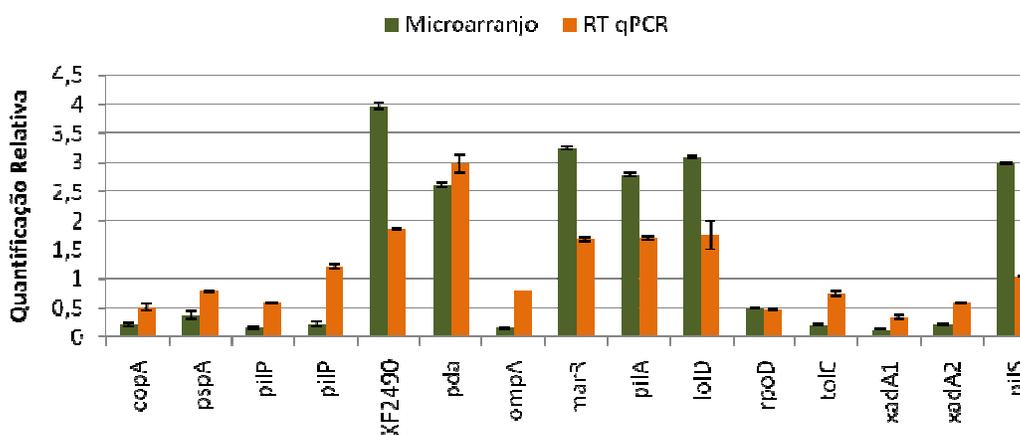


Figura 27. Validação dos experimentos com adição de tetraciclina. A barra de erro indica o desvio padrão. Média de 2 e 3 repetições biológicas para os experimentos com RT-qPCR e microarranjos, respectivamente. Valores de quantificação relativa inferiores a 1,0 indicam repressão gênica, iguais a 1,0, que o nível de expressão é o mesmo nos experimentos controle ou com tetraciclina e, maiores que 1,0, que o gene sofreu modulação positiva.

3.5. Análise da expressão de alguns genes diferencialmente expressos nas diferentes etapas de formação do biofilme de *X. fastidiosa*.

A expressão dos genes diferencialmente expressos escolhidos para a validação dos experimentos de microarranjos também foi analisada durante as diferentes fases de formação do biofilme, com 3, 5, 10, 15, 20 e 30 dias com o intuito de averiguar se o mecanismo de resposta da bactéria possivelmente seria o mesmo independentemente da densidade celular (estágio de formação do biofilme) ou se ocorresse uma modulação diferencial dos genes testados.

3.5.1. Cultivo com 3 mM de CuSO₄

Na **figura 28** estão representados os valores de expressão relativa de cada gene nas diferentes fases de formação do biofilme. Os valores de expressão relativa obtidos para cada gene nas diferentes fases de formação do biofilme foram submetidos ao teste estatístico ANOVA, cujos valores de *p* gerados podem ser visualizados na **tabela 18**. Como esse teste apenas fornece a informação de se a diferença entre as médias dos grupos testados é diferente ou não, foi realizado um teste *post hoc* (Tukey-Kramer's) que possibilita a comparação das médias dentro de cada grupo, no caso, foi possível realizar todas as comparações entre os valores da média da expressão relativa em cada fase de formação do biofilme dentro de cada gene (grupo). Como foram realizados múltiplos testes, para que o valor de significância continuasse em 0,05, foi sugerido, através da correção pelo teste de Šidàk, *p* de 0,004652 para ser utilizado com *threshold*. Essas comparações estatísticas entre a expressão relativa nas diferentes fases de formação do biofilme e, para cada gene, podem ser visualizadas no material suplementar disponível no website http://www.centrodecitricultura.br/microarray_xf.

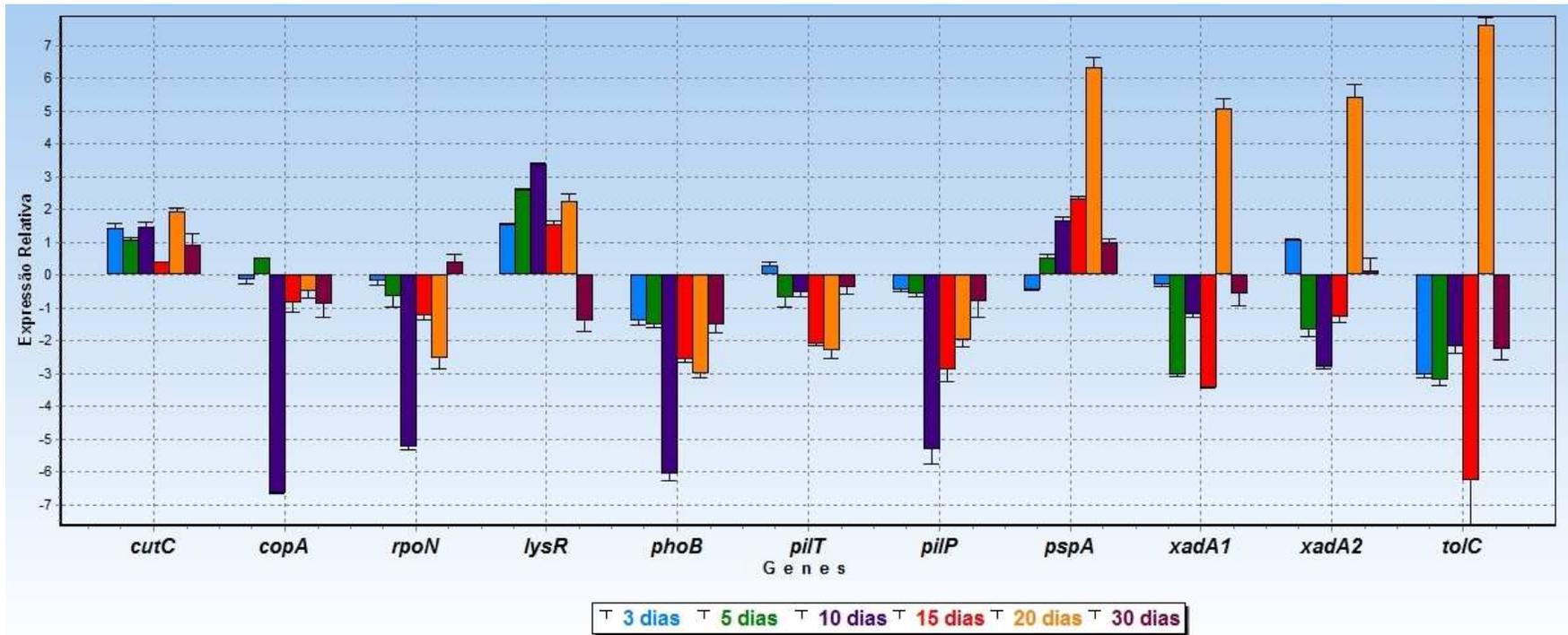


Figura 28. Expressão relativa de cada gene durante as diferentes fases de formação do biofilme analisadas após a adição de cobre. Genes representados: *cutC*, *copA*, *rpoN*, *lysR*, *phoB*, *pilT*, *pilP*, *pspA*, *xadA1*, *xadA2* e *tolC*, nos diferentes tempos de formação do biofilme: 3 dias (azul), 5 dias (verde), 10 dias (roxo), 15 dias (vermelho), 20 dias (laranja) e 30 dias (vinho). As barras de erro indicam o desvio padrão. Média de duas repetições biológicas.

Tabela 18. Valores de p indicando a existência ou não de uma diferença estatística entre os valores de expressão de cada gene obtido para cada fase de formação do biofilme.

gene	p -value
<i>copA</i>	3,80E-07
<i>pilP</i>	2,51E-05
<i>pilT</i>	3,02E-05
<i>phoB</i>	3,80E-07
<i>lysR</i>	1,85E-06
<i>rpoN</i>	1,81E-06
<i>tolC</i>	5,51E-06
<i>pspA</i>	1,20E-07
<i>xadA2</i>	5,80E-07
<i>xadA1</i>	1,40E-07
<i>cutC</i>	0,001835

É possível averiguar que dentre todos os genes testados houve uma diferença estatisticamente significativa de expressão entre pelo menos algumas das diferentes fases de formação do biofilme.

Já a **figura 29** mostra a mediana (traço descontínuo que corta as barras) dos valores de *fold change* das diferentes fases de formação do biofilme, para cada gene. As barras de erro indicam o maior e o menor valor de *fold change* calculado para cada gene, assim, barras maiores indicam uma maior variação de *fold change* do gene em questão durante as diferentes fases de formação do biofilme. Os genes *lysR*, *tolC*, *pspA*, *xadA1* e *xadA2* foram os que apresentaram maior variação de expressão entre as fases de formação do biofilme.

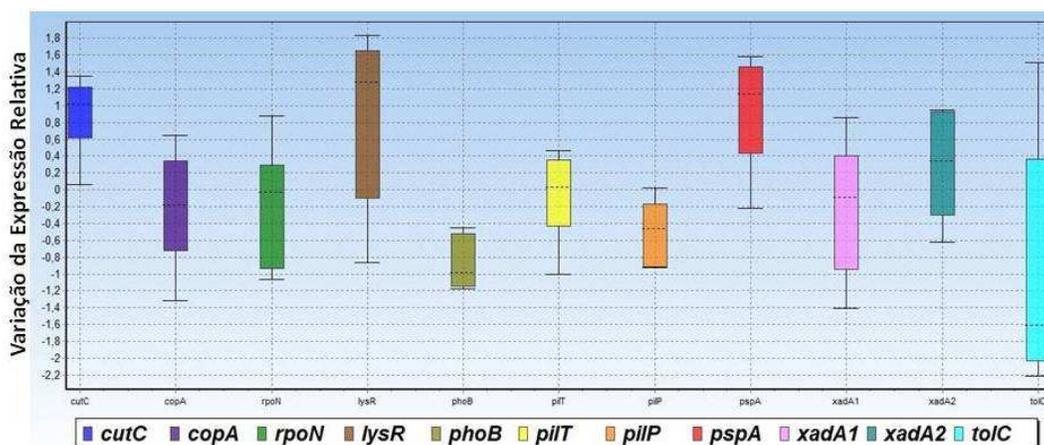


Figura 29. Mediana dos valores de *fold change* das diferentes fases de formação do biofilme, para cada gene. Genes representados: *cutC*, *copA*, *rpoN*, *lysR*, *phoB*, *pilT*, *pilP*, *pspA*, *xadA1*, *xadA2* e *tolC*. As barras de erro indicam o maior e o menor valor de *fold change* apresentado por cada gene. As linhas pontilhadas representam a mediana desses valores.

De acordo com o padrão de *fold change* apresentado por cada gene nas diferentes fases (Figura 28), também foi possível a elaboração de um *heat map*, que representa esses valores em uma escala de variação de cores, na qual o vermelho indica indução e o verde, repressão (Figura 30). Através desse *heat map* foi realizado um agrupamento das diferentes fases de formação do biofilme no qual se considera a semelhança entre o padrão de expressão dos genes analisados.

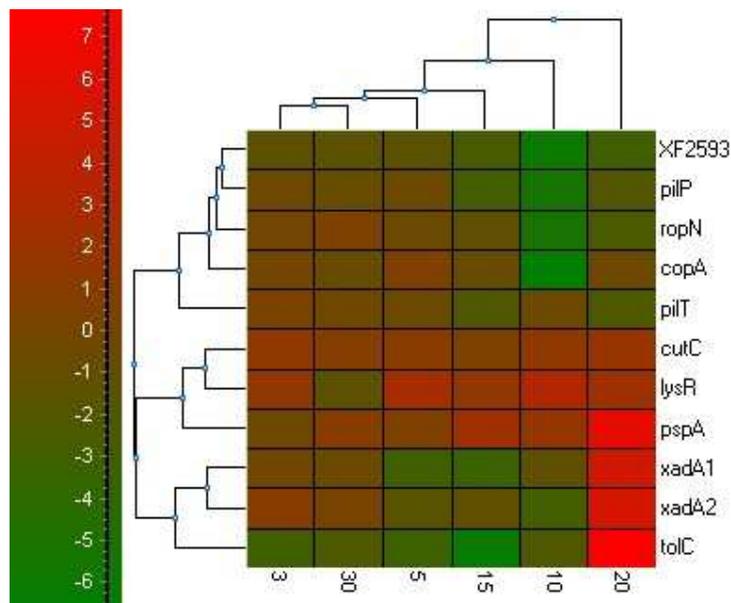


Figura 30. *Heat Map* mostrando o padrão de expressão dos genes analisados em cada fase de formação do biofilme.

3.5.2. Cultivo com 100 µg/ mL de tetraciclina

A figura 31 ilustra os valores de expressão relativa de cada gene nas diferentes fases de formação do biofilme após a adição de tetraciclina. Assim como para cobre, os valores de diferença de expressão após a adição de tetraciclina foram então submetidos ao teste estatístico ANOVA (Tabela 19). Também foi realizado o teste *post hoc* de Tukey-Kramer's para realização de comparações estatísticas dentro de cada gene, entre cada uma das fases de formação do biofilme. O valor de *p* sugerido para ser utilizado como *threshold*, através da correção por Šidàk, foi de 0,003201. Essas comparações estatísticas podem ser visualizadas no material suplementar disponível no website http://www.centrodecitricultura.br/microarray_xf.



Figura 31. Expressão relativa de cada gene durante as diferentes fases de formação do biofilme analisadas após a adição de tetraciclina. Genes representados: *pilA*, *pilP*, *pilT*, *pilS*, *xadA1*, *xadA2*, *pspA*, *ompA*, *XF2490*, *lolD*, *tolC*, *cutC*, *copA*, *marR*, *pda* e *rpoD* nos diferentes tempos de formação do biofilme: 3 dias (azul), 5 dias (verde), 10 dias (roxo), 15 dias (vermelho), 20 dias (laranja) e 30 dias (vinho). As barras de erro indicam o desvio padrão. Média de duas repetições biológicas.

Tabela 19. Valores de p indicando a existência ou não de uma diferença estatística entre os valores de expressão obtida para cada fase de formação do biofilme para cada gene.

gene	p -value
<i>copA</i>	0,008923
<i>pilP</i>	1,24E-05
<i>pilT</i>	0,000169
<i>XF2490</i>	5,00E-08
<i>pda</i>	3,00E-08
<i>ompA</i>	0,000137
<i>marR</i>	0,042832
<i>pilA</i>	0,000197
<i>lolD</i>	0,003994
<i>rpoD</i>	0,000448
<i>tolC</i>	0,001442
<i>pspA</i>	8,00E-08
<i>xadA2</i>	1,73E-05
<i>xadA1</i>	5,01E-06
<i>pilS</i>	2,66E-05
<i>cutC</i>	3,60E-07

É possível observar que para os genes *copA*, *marR* e ao relacionado com o transporte ABC (*lolD*) independente da fase de formação do biofilme o padrão de expressão relativa foi o mesmo.

Na **figura 32** estão representadas as medianas dos valores de *fold change*, de cada gene, calculados para cada fase de formação do biofilme. Assim, barras maiores (por exemplo para o gene *pda*) indicam que houve uma maior variação na expressão do gene durante os diferentes tempos de análise e barras menores (como para *copA*), um nível de expressão mais constante.

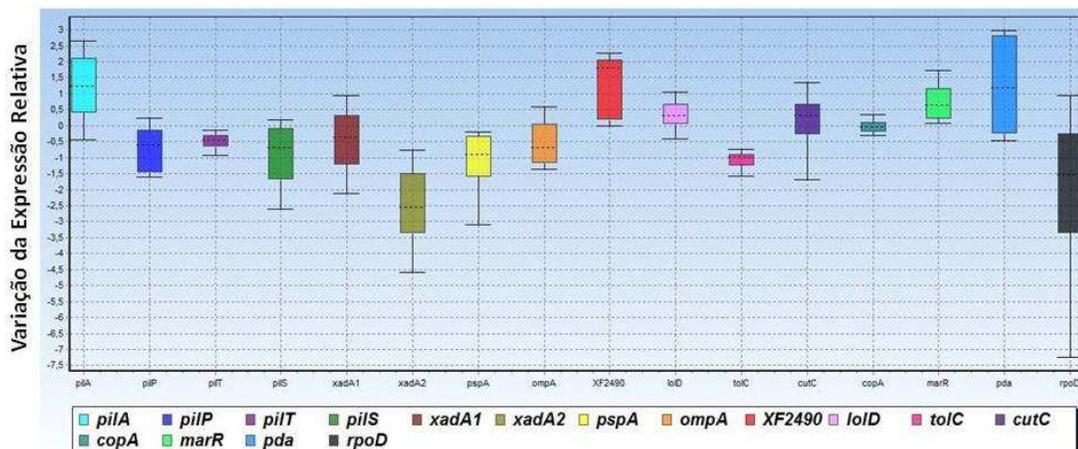


Figura 32. Mediana dos valores de *fold change* das diferentes fases de formação do biofilme, para cada gene. Genes representados: *pilA*, *pilP*, *pilT*, *pilS*, *xadA1*, *xadA2*, *pspA*, *ompA*, *XF2490*, *lolD*, *tolC*, *cutC*, *copA*, *marR*, *pda* e *rpoD*. As barras de erro indicam o maior e o menor valor de *fold change* apresentado por cada gene. As linhas pontilhadas representam a mediana desses valores.

Assim como para o experimento com adição de cobre, para o de tetraciclina também foi elaborado um *heat map* (**Figura 33**), em que o vermelho indica indução e o verde, repressão.

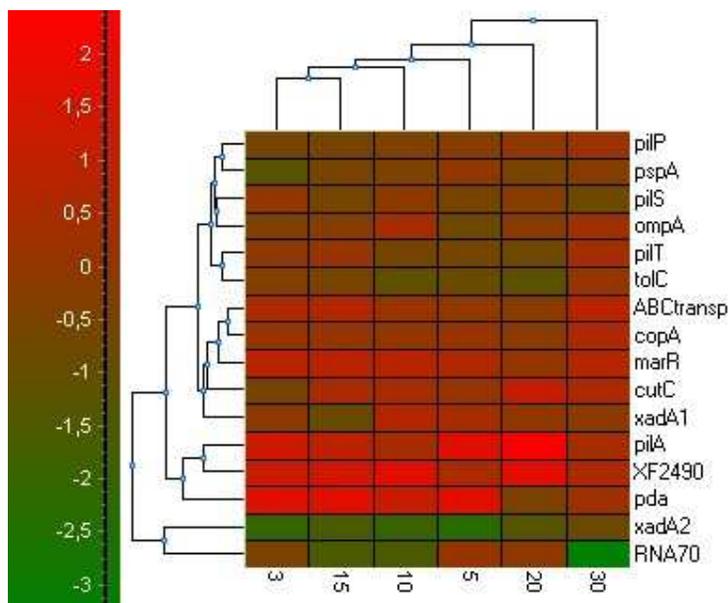


Figura 33. *Heat Map* mostrando o padrão de expressão dos genes analisados em cada fase de formação do biofilme.

4. DISCUSSÕES

4.1. Análise dos microarranjos com adição de cobre ou tetraciclina

Biossíntese proteica e metabolismo celular

De modo geral em ambos os experimentos de microarranjos, as doses subinibitórias de compostos antimicrobianos causaram uma regulação negativa de um conjunto considerável de CDS de genes pertencentes às categorias funcionais relacionadas à divisão celular, metabolismo de proteínas, de DNA e energético. Resultado semelhante foi encontrado por Koide e colaboradores (2006a) que estudaram a resposta de *X. fastidiosa* ao calor (*heat shock*) e encontraram vários genes relacionados à essas categorias sendo reprimidos, o que corrobora que a repressão de tais genes poderia ser característica de uma resposta ao estresse de forma geral. Mah e colaboradores (2001) propuseram que quando deparadas às condições de estresse uma estratégia das bactérias seria diminuir seu metabolismo e divisão celular. Evans e colaboradores (1991) examinaram a taxa de crescimento de *P. aeruginosa*, *E. coli* e *Staphylococcus epidermidis*, em condições de biofilme e planctônica e observaram que a sensibilidade à tobramicina e ciprofloxacina das células foi maior com o aumento da taxa de crescimento. Quando *P. aeruginosa* encontrava-se em uma taxa de crescimento mais baixa, a resistência à ciprofloxacina das células em biofilme e planctônicas foi igual, porém quando a taxa de crescimento era maior, as células planctônicas foram mais suscetíveis que as células em biofilme. Esses mesmos pesquisadores também trabalharam com *Burkholderia cepacia* e observaram que a resistência dessa bactéria foi maior quando ela se encontrava na fase estacionária, que é quando a população já atingiu uma densidade celular máxima e a taxa de crescimento é menor. Além disso, quando compararam a resistência dessa bactéria em biofilme com as células planctônicas averiguaram que o biofilme era cerca de quinze vezes mais resistente.

Muito se tem discutido sobre essa estratégia de redução do metabolismo e atividade celular como forma de obtenção de uma maior resistência aos compostos antimicrobianos. Um argumento para explicar o porquê dessa estratégia de resistência das bactérias, seria que como a maioria dos agentes antimicrobianos tem como alvo a inibição da síntese de alguma macromolécula, se essa fosse diminuída ou até mesmo parada, o agente não surtiria tanto efeito. Stewart (2000), por exemplo, afirma que antibióticos da classe das penicilinas apenas seriam eficientes em bactérias que estivessem em fase de crescimento, uma vez que interferem na síntese de parede celular. Assim, se a bactéria não cresce nem se divide e, portanto não sintetiza nova parede celular, a influência das penicilinas seria menor.

Nos experimentos com o antibiótico tetraciclina, essa resposta da célula poderia ser eficaz para a resistência ao composto, uma vez que, como o antibiótico atua prevenindo a síntese proteica, um menor efeito tóxico deste seria esperado se o metabolismo celular fosse menor. As tetraciclinas previnem a ligação do aminoacil-tRNA ao receptor ribossomal do sítio A. Atravessam a membrana externa das Gram negativas através dos canais porinas OmpF e OmpC, ligadas a um cátion positivo, geralmente o magnésio. Esse complexo antibiótico-metal catiônico seria atraído pelo potencial de Donnan através da membrana externa e acumular-se-ia no periplasma, no qual poderia haver a dissociação do complexo. A tetraciclina então, sem carga, seria capaz de se difundir para o citoplasma através de certas regiões da bicamada lipídica interna com gasto de ATP e dirigida pelo componente de força próton motiva. Uma vez no citoplasma as moléculas de tetraciclina têm a tendência de se tornarem queladas, já que o pH interno e a concentração de íons metais divalentes dentro da célula é maior. A tetraciclina se associa então aos ribossomos, associação essa que pode ser reversível (CHOPRA et al, 2001). Assim, com a diminuição do metabolismo celular e, portanto, diminuição também da síntese proteica, a ação das tetraciclinas na célula poderia ser menor, já que seu alvo é a síntese proteica.

Em relação à divisão celular, Chen e colaboradores (2005) estudaram *B. pseudomallei* sob efeito de antibióticos e observaram uma filamentação da bactéria, que não se dividia pela não formação do septo, modificando assim sua forma. Esses autores verificaram que isto poderia ocorrer, pois quando utilizavam antibióticos, como as fluoroquinolonas, estas se ligariam às proteínas ligadoras de penicilina que seriam requeridas para a síntese do septo durante a divisão celular. Com tetraciclina o mesmo poderia estar ocorrendo, já que verificamos uma indução de uma proteína que se liga à penicilina.

Já durante a exposição ao cobre, os mecanismos envolvidos na toxicidade do metal são diferentes. Seu modo de ação é através da ligação aos grupos thiois livres que interferem na estrutura e função de proteínas ou pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) através de auto-oxidação ou das reações de Fenton. A geração de ROS ocorre devido à produção intracelular de peróxido de hidrogênio através da oxidação do NADPH e subsequente ativação da enzima superóxido desmutase. Esse peróxido de hidrogênio pode interagir com o cobre e produzir ROS que causam danos no DNA e permeabilidade de membranas (TEITZEL et al, 2006). Assim, a diminuição do metabolismo e divisão celular, com conseqüente diminuição da síntese proteica também

diminuiria o poder de ação do cobre na desestruturação de estruturas protéicas e evitaria maiores danos ao DNA.

Além disso, com a adição de ambos os agentes antimicrobianos, houve a modulação negativa de XF0615 e XF0616, que codificam respectivamente as chaperoninas 60 kDa GroEL e a co-chaperonina 10kDa GroES, caracteristicamente induzidas como resposta ao estresse ao calor (KOIDE et al, 2006a). Elas promovem o dobramento adequado de proteínas e, no caso do choque térmico, situação na qual há um acúmulo de proteínas desenoveladas, teriam uma grande atuação. Porém, fontes de estresse diferente poderiam modular a expressão dessas chaperonas de outra forma, já que sua maior atuação direta poderia não interferir no reparo dos alvos de ação dos agentes de estresse. Koide e colaboradores (2006a) encontraram essas chaperonas sendo induzidas com o estresse térmico, mas não com o salino e osmótico (KOIDE et al, 2006b).

Outro fato interessante foi a repressão de vários fatores de alongação (EF) com a adição de tetraciclina e cobre. Essas proteínas estão intimamente envolvidas com a fidelidade e velocidade com que a tradução proteica ocorre. Estudos mostram, no entanto, que mesmo com a ausência dos EF a tradução proteica ocorreria, mas com uma velocidade bem menor (CZWORKOWSKI et al, 1994). Assim a repressão desses genes estaria relacionada com o fato do metabolismo e síntese proteica da célula, em geral, encontrarem-se reprimidos. No entanto, com a adição de tetraciclina foi observada a repressão de um número maior de genes relacionados aos fatores de alongação, do que com a adição de cobre, o que poderia estar diretamente relacionado com o modo de ação do antibiótico. Os EF do tipo Tu formam um complexo com os aminoacil-tRNA e GTP, direcionando o RNA para o sítio A de ligação ao ribossomo. O reconhecimento específico códon-anticódon induz uma modificação conformacional no ribossomo, estabilizando sua ligação ao aminoacil-tRNA e acelerando a reação. O EF-G cataliza então a translocação e a peptidil transferase se move do sítio A do ribossomo para o P. O papel de EF-P também seria na estimulação da atividade das peptidil transferases. Quando o ribossomo encontra-se no sítio E, o EF-G ligado a GTP cliva-o em GDP e se dissocia do ribossomo antes que o próximo aminoacil-tRNA seja incorporado (CZWORKOWSKI et al, 1994). Assim, com a adição de tetraciclina, que se liga justamente perto do sítio A do ribossomo, quando o complexo ternário (aminoacil-tRNA e EF-Tu) começa a decodificação do códon e o anticódon faz um *loop* para se encaixar no sítio, a acomodação é prevenida pela presença do antibiótico. No entanto,

apesar de não haver a acomodação do aminoacil-tRNA no ribossomo, a hidrólise do GTP ligado ao EF-Tu ocorreria do mesmo modo e, segundo Brodersen e colaboradores (2000) geraria assim um ciclo não produtivo. Desse modo a repressão de fatores de alongação, principalmente dos que se ligam a GTP, seria uma forma de evitar um gasto desnecessário de energia. Outro fato interessante é que um dos meios de resistência de várias bactérias à tetraciclina seria pela expressão dos genes *tet*, dos quais alguns estão relacionados com o efluxo da droga e outros com a expressão de proteínas de proteção ribossomal (RPP). As RPP possuem uma estrutura muito parecida com EF-G e EF-Tu e também dependem da hidrólise de GTP. Segundo Davey & O'Toole (2000) as RPP poderiam por competição por ligante se ligar ao ribossomo causando uma alteração na conformação do mesmo, que previniria a ligação da tetraciclina. Já Connel e colaboradores (2003) discutem que Tet(O), uma RPP, se ligaria ao ribossomo já “bloqueado” pela tetraciclina e desalojaria o antibiótico possibilitando ao ribossomo retornar ao ciclo de alongação. No genoma de *X. fastidiosa* tais genes ainda não foram identificados, porém a bactéria possui um regulador transcricional (XF2715, *tetR*) que em outros organismos está relacionado com a modulação de genes na presença de tetraciclina. Em nossos experimentos, no entanto, esse gene não foi identificado entre os diferencialmente expressos na presença de tetraciclina, o que pode ser devido ao uso de uma dose subinibitória do antibiótico.

Reguladores transcricionais

Em bactérias, alterações na expressão gênica são geralmente controladas ao nível transcricional (BOOR, 2006), e esse controle da transcrição permite a regulação sincronizada de genes múltiplos que codificam produtos com atividades interdependentes (LENINGHER et al, 2007). Um dos tipos de regulação de transcrição pode ocorrer através da expressão de fatores de especificidade, como os fatores sigma, que medeiam o reconhecimento e a ligação aos promotores pela RNA polymerase. Esses fatores estão classificados em famílias, entre elas a $\sigma 70$ e $\sigma 54$. Os $\sigma 54$ são frequentemente referidos como σN e regulam o metabolismo de nitrogênio e vários outros processos metabólicos. Já os $\sigma 70$ estão divididos em 4 grupos, sendo o primeiro deles referido como fatores *housekeeping* uma vez que seriam importantes para o metabolismo e crescimento da bactéria. Outros como o σS (*rpoS*) são importantes para a expressão de genes associados à virulência (BOOR, 2006) e às respostas ao estresse em geral (GIULIDORI et al, 2007). Intrigantemente, com a adição da dose subinibitória de

cobre o $\sigma 54$ (*rpoN*) foi reprimido e com tetraciclina houve a repressão do $\sigma 70$ (*rpoD*), o que estaria relacionado aos genes regulados por esses fatores nas diferentes condições de estresse. Possíveis alvos de regulação do $\sigma 54$ (*rpoN*), além da regulação de procesos relacionados ao metabolismo de nitrogênio, seriam a produção de glutamina sintase; a proteína Tol, relacionada à resistência ao tolueno; além de hidrogenases e, em *P. aeruginosa*, a produção de pilis (Kustu e colaboradores, 1989). Nos experimentos com cobre, genes relacionados aos pilis foram reprimidos assim isso poderia ser um indicativo de que em *X. fastidiosa* a expressão dessas estruturas também é regulada pelo fator $\sigma 54$. Já a diferença de expressão do $\sigma 70$ na presença de tetraciclina estaria relacionada com a grande repressão de genes ligados à divisão celular, exportação de proteínas, replicação de DNA e síntese de RNA. Na presença de cobre, genes relacionados a essas funções também foram modulados negativamente, no entanto essa repressão foi muito mais acentuada na presença de tetraciclina com um maior número de genes sendo diferencialmente expressos. Também com cobre esses genes devem estar sendo regulados pelo $\sigma 70$, no entanto a não detecção nos experimentos de microarranjos de uma diferença na expressão em comparação com o controle pode ser devida aos parâmetros de *fold change* e estatística utilizados. Além disso, Jishage e colaboradores (1996) enfatizam em seu estudo de quantificação dos fatores sigma em células de *E. coli* durante diferentes fases de crescimento e algumas situações de estresse, que a ação dos RNAP (os fatores transcricionais que modulam o recrutamento da RNA polimerase ao promotor do gene) é essencial para que a transcrição gênica ocorra. Assim, os autores discutem que mesmo que a expressão de um fator sigma não seja diferente e o nível proteico deles continue o mesmo em diferentes situações, isso não significa que eles estejam desempenhando suas funções da mesma maneira e com a mesma eficiência, já que dependeriam por exemplo dos RNAP.

Além disso, com a adição de cobre verificamos a indução de 2 reguladores transcricionais pertencentes à família LysR, que é composta por cerca de 50 reguladores autoregulados distribuídos amplamente entre os diferentes gêneros de procariotos (SCHELL, 1993). Essa ampla distribuição da família de reguladores entre genomas tão divergentes poderia indicar que eles estariam ligados com a regulação de diversas funções (MADDOCKS et al, 2008). Alguns estudos explicam essa grande divergência da família entre as protobactérias como decorrente do fenômeno de transferência gênica horizontal (PAOLI et al, 2009). Um domínio característico da família é o *Helix-Turn-Helix DNA binding*, de ligação ao DNA que poderia estar presente tanto na região N-

terminal, quando se tratasse de um repressor, quanto na região C-terminal, quando ativadores transcricionais (STORZ et al, 1992).

Em nossos experimentos foi intrigante o fato de que com a adição de tetraciclina fatores de transcrição dessa família não foram induzidos. A indução apenas na presença de cobre sugere que esses reguladores estariam envolvidos com alguns dos genes que foram diferencialmente expressos apenas com o cobre.

Com tetraciclina encontramos também a indução de um regulador de transcrição da família MarR, este possivelmente envolvido com a indução de genes relacionados à resposta a antibióticos. Em *P. aeruginosa*, MexR, pertencente à família MarR, é um repressor do operon *mexAB-oprM* que codifica um sistema de efluxo multidrogas (FIORENTINO et al, 2007). Essa mesma família seria responsável por uma resposta geral ao estresse e estaria envolvida em uma rede de expressão bastante complexa, contribuindo também, por exemplo, para a tolerância ao etanol em células engenheiradas de *E. coli* e detoxificação de compostos aromáticos em *Sulfolobus solfataricus* (FIORENTINO et al, 2007). Além disso, Chopra e Roberts (2001) mostraram que em *E. coli*, MarR controla negativamente a expressão do operon *mar*, possivelmente envolvido com a resistência da bactéria a tetraciclina. Os mesmo autores observaram que quando adicionavam tetraciclina havia a indução de *marA*, repressão de *ompF* (uma porina) e aumento de *acrAB* (participariam de um canal para efluxo da droga) evitando assim o acúmulo da droga dentro da célula.

No presente trabalho, apesar da repressão da CDS do gene *marR*, foi observada a repressão das CDS XF2093 e XF2094 que codificam para os genes *acrAB*. No entanto, pudemos observar a repressão de uma porina (*OmpA*). Assim, apesar da repressão de uma CDF de porina, em *X. fastidiosa* a atuação de *marR* deve ser de uma maneira diferente de como ocorre em *E. coli*. Esse gene poderia estar relacionado à indução de outros sistemas de efluxos de drogas, como os da família MSF, que foram induzidos nesse trabalho. Porém são necessários estudos para elucidar essa possibilidade.

Metabolismo de ferro

Vários genes relacionados ao metabolismo de ferro foram reprimidos na presença de cobre, inclusive um regulador transcricional da família Fur. Este poderia regular positiva ou negativamente vários genes, entre eles alguns relacionados à biossíntese e transporte de sideróforos, proteínas citoplasmáticas envolvidas no metabolismo de ferro, resposta ao estresse oxidativo, fatores de virulência, como

colicinas e hemolisinas (HANTKE, 2001). Segundo Teitzel e colaboradores (2006) vários metais pesados, inclusive o cobre, poderiam interagir com Fur e influenciar na sua ligação às sequências alvo do DNA. Os mesmos autores também hipotetizaram que as espécies de oxigênio livres (ROS) geradas, por exemplo, após a reação de peróxido de hidrogênio com cobre, poderiam oxidar a ligação entre Fur e Fe^{2+} , liberando o ferro do Fur e assim aliviar a repressão de certos genes, que seria realizada por Fur. Esses autores, trabalhando com *P. aeruginosa* encontraram vários genes sendo induzidos quando a bactéria era crescida na presença de cobre. As CDS dos genes que foram reprimidos no presente trabalho codificam TonB, que seria uma proteína que compõem o sistema de captação de sideróforos- Fe^{3+} . Os sideróforos são quelantes de baixo peso molecular com alta afinidade por Fe^{3+} . Zaine e colaboradores (2008) estudaram a resposta de *X. fastidiosa* ao ferro e particularmente o papel do regulador de transcrição Fur e possíveis Fur *box* nas regiões de promotores do genoma da bactéria e encontraram que as CDS (XF0559 e XF0009) putativas para genes da proteína TonB teriam sua transcrição controlada pelo Fur. Assim, hipotetizamos que em nossos experimentos, o cobre estaria através da formação de ROS ou ligação à Fur influenciando na regulação de genes controlados por Fur, como aqueles codificantes para as proteínas TonB e que foram induzidos.

Intrigantemente, nos experimentos com tetraciclina, também foi observada a indução de CDS de genes relacionados à proteína TonB, o que poderia ser decorrente de um efeito secundário desencadeado pelo antibiótico. Segundo Zaine e colaboradores (2008), a percepção da disponibilidade de ferro parece ser importante na ativação de processos associados à translocação da bactéria através dos vasos do xilema e competição com bactérias endofíticas.

Homeostase de cobre

Relacionado à homeostase de cobre, além da repressão das CDS dos genes *cop*, foi observada, nos experimentos com esse metal, a indução do gene *cutC*. O gene *copA* pertence à família “P-type-ATPase”, que é a mais comum entre os mecanismos de bombas de efluxo de íons de metal (MEIDANIS et al, 2002). Em *X. fastidiosa* foram identificados os genes anotados como *copA* e *copB*. Rodrigues e colaboradores (2008) encontraram esses genes induzidos em *X. fastidiosa* com a dose de 5 mM de $CuSO_4$ e propuseram que, como em alguns outros organismos, eles poderiam ser regulados positivamente na presença de cobre. Em nossos experimentos, a repressão de tais genes

pode estar relacionada ao fato de que a dose de cobre utilizada foi subinibitória, assim outros mecanismos de efluxo poderiam ser primeiramente ativados, como o gene *cutC*. Este é um dos 3 genes (*cutC*, *cutA1*, *cutA2*) que foram encontrados no genoma de *X. fastidiosa*, similares a genes da família *cut* de *E. coli* e, segundo Rodrigues et al. (2007), são induzidos no biofilme de *X. fastidiosa* na presença de cobre e estariam envolvidos na difusão de cátions por diferenças de concentrações de gradientes, mas são poucos os conhecimentos sobre o mecanismo de ação desse sistema.

Bombas de efluxo e transporte

Vários genes relacionados ao transporte ABC foram induzidos e alguns reprimidos, tanto nas condições com cobre quanto com tetraciclina. Talvez para as doses dos compostos antimicrobianos utilizados neste trabalho esse mecanismo de transporte tenha sido responsável pelo efluxo dos compostos antimicrobianos, como também verificado por Davidson e colaboradores (2008).

A repressão de alguns componentes de transportadores ABC também foi observada por Zaine e colaboradores (2007) em experimentos de microarranjos de *X. fastidiosa* em biofilme submetida ao crescimento na presença de ferro. A repressão de alguns genes e indução de outros pode ser explicada pelo fato de que os transportadores ABC participam de vários processos celulares, realizando tanto a importação quanto a exportação de moléculas, mas nenhum sistema conhecido realizaria ambas as funções (MEIDANIS et al., 2002). As bactérias usam os transportadores ABC tanto para importar substâncias, cuja função principal é de fornecer nutrientes essenciais a elas, quanto para exportar substâncias nocivas e toxinas, necessitando nesse caso do auxílio da proteína de membrana externa TolC.

No entanto, foi observada, no presente trabalho, a repressão, em ambos os experimentos, do gene *tolC*. A repressão desse gene é um fato interessante já que a proteína por ele codificada exerceria uma função essencial na expulsão de substratos para fora da célula. No entanto, essa proteína também participa do transporte de vários substratos não relacionados a agentes antimicrobianos. Assim, a repressão da CDS desse gene pode ser devido ao fato de que várias funções relacionadas ao metabolismo, e que poderiam depender da participação de *tolC*, foram reprimidas. Além disso, a repressão de uma CDS significa que existem menos cópias de seu RNA nas células submetidas ao tratamento do que nas células controle, e não que a produção da proteína

parou. Assim, apesar da repressão da CDS codificante de *tolC*, a proteína referente ainda poderia estar desempenhando algumas de suas funções.

Além disso, alguns dos transportadores ABC que realizam a secreção de substratos não proteicos não necessitam de fatores acessórios nem de membrana externa, como TolC (FATH et al, 1993). Os transportadores ABC realizariam a excreção para o periplasma e do periplasma esses substratos são secretados para o meio extracelular atravessando a membrana externa através de canais porinas, como a porina A ou O cujas CDS (XF0343 e XF0975) foram, no entanto, reprimidas na presença de tetraciclina. Já a CDS XF0321, que também codifica uma porina, foi induzida com cobre.

Para explicar o fato da repressão e indução de vários genes da família ABC e modulação negativa de *tolC*, verificamos se esses transportadores poderiam estar envolvidos no efluxo dos antimicrobianos e para isso averiguamos os domínios de cada um dos genes diferencialmente expressos relacionados com a família ABC.

Encontramos que 3 dos genes induzidos com tetraciclina estão envolvidos com o transporte de lipídeos e lipoproteínas, não necessitando assim de TolC, já que o principal destino dessas moléculas é a composição de membranas celulares. Já as CDS dos genes relacionados ao transporte ABC reprimidos com tetraciclina estão relacionadas com o transporte de sulfato (XF1345, XF1346), importação de fosfato (XF2141, XF2144) e de montagem FeS (XF1474, XF1476), mais uma vez evidenciando que TolC não participaria desses processos. Com a adição de cobre os genes da família de transportadores ABC induzidos foram aqueles relacionados com a biogênese do citocromo c, também não necessitando também de TolC (RICHARD-FOGAL et al, 2008). Portanto, foi possível averiguar que nenhum dos genes pertencentes à família de transportadores ABC que foram diferencialmente expressos no presente trabalho apresentaram similaridade com aqueles relacionados com o efluxo dos agentes antimicrobianos, assim outro sistema poderia ser responsável pela expulsão dessas substâncias para fora da célula, como os da família MFS (*Major Facilitator Superfamily*) com cobre ou MDR (*Multidrug resistance*) com tetraciclina. Ou ainda, por se tratar de genes cuja função foi dada por similaridade com outros organismos, alguns dos transportadores ABC poderiam estar atuando na expulsão dessas substâncias para fora da célula, porém essa hipótese precisaria ser futuramente investigada.

Verificamos como hipotetizado acima a indução de transportadores da família MFS (XF1749, XF1765) quando o cobre foi adicionado. Essa família é responsável

pelo transporte citoplasmático ou na membrana interna de vários substratos, entre eles algumas drogas, conferindo assim resistência aos antibióticos, por exemplo. Assim, com a adição de cobre essa família participaria do efluxo dessa substância.

Na presença de tetraciclina alguns outros transportadores foram induzidos, como um sistema de resistência multidrogas (XF2686), que atuaria na detoxificação das células. Whiteley e colaboradores (2001) também verificaram a possível contribuição dos efluxos multidrogas para o aumento da resistência quando observaram a indução desses genes em um experimento de microarranjos com *P. aeruginosa* desafiada com tobramicina. Fux e colaboradores (2005) também ressaltam o papel de bombas de efluxo no aumento da resistência dos biofilmes aos vários compostos antimicrobianos.

Uma permease de drogas também induzida com tetraciclina e poderia ter um papel semelhante. Já os transportadores de expulsão de sódio talvez pudessem atuar não apenas na exportação desse substrato como outros, por exemplo, antibióticos. O mesmo poderia ser válido para a CDS (XF0406) que foi induzida e possui um domínio de TerC, já descrito como relacionado a efluxo de drogas.

Além disso, a repressão de uma CDS relacionada ao transporte do complexo Mg^{++} /citrato poderia ser decorrente do fato de que, como explicado anteriormente, a tetraciclina pode entrar na célula via porinas e ligada ao magnésio. Assim, a repressão dessa CDS poderia ser um mecanismo de resposta com o intuito de evitar a entrada da substância tóxica na célula.

Virulência e Patogenicidade

Com a adição das diferentes doses de cobre, hemaglutininas foram induzidas. Segundo Guilhabert et al (2005) que estudaram mutantes para várias hemaglutininas, o papel dessas proteínas seria na adesão célula- célula, que é fundamental em um estágio de biofilme maduro. Os autores observaram o comportamento dos mutantes, tanto na planta como *in vitro* e constataram que o biofilme passou a se organizar em uma monocamada, mas que esta já seria suficiente para causar o entupimento dos vasos. Além disso, o espalhamento da bactéria pelos vasos de xilema da planta foi maior nos mutantes para as hemaglutininas quando comparado com o controle. Assim, a indução de vários genes relacionados às hemaglutininas poderia ser uma forma de aumentar a estrutura tridimensional do biofilme e assim promover uma barreira ao agente antimicrobiano.

Genes relacionados às fímbrias foram reprimidos com cobre. As fímbrias relacionadas codificam pilis do tipo IV, que são estruturas ancoradas na membrana externa da célula e que estão relacionados à motilidade (MENG et al, 2005). A repressão desses genes condiz, com o fato de que hemaglutininas foram induzidas, assim diminuindo a motilidade da célula e aumentando sua adesão célula- célula e biofilme (ver **Figura 36**).

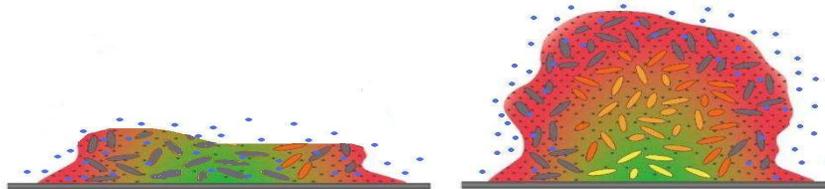


Figura 34. Modelo sobre o possível efeito da indução de hemaglutininas: aumento da estrutura tridimensional do biofilme que dificultaria a penetração do composto antimicrobiano(azul).

Alguns estudos mostram que o aumento da barreira física pode retardar a difusão do composto microbiano no biofilme (BROOUN et al, 2000), porém não evita que as células morram, assim outros mecanismos de resistência devem também ser ativados juntamente com genes relacionados à formação do biofilme.

Já com tetraciclina, relacionado com as fímbrias tipo IV encontramos basicamente um operon sendo induzido e dois sendo reprimidos, o que evidencia que eles devem ser regulados de diferentes maneiras. Além disso, uma CDS de uma hemaglutinina foi reprimida assim como um pili do tipo I (XF0077), responsáveis pela adesão entre as células. Entretanto, uma CDS de um pili tipo I (XF0083) foi induzida. Intrigantemente nos experimentos com a dose subinibitória de tetraciclina o gene *pilS* foi induzido, este supostamente participaria de um sistema de regulação de duplo componente ainda não muito bem compreendido. Em *Myxococcus xanthus* foi visto que a transcrição de *pilA*, seria dependente de *pilR*, porém *pilS* comportar-se-ia um regulador negativo (MATTICK, 2002). Pelos presentes resultados a hipótese de regulação negativa de *pilA* poderia ser válida para *X. fastidiosa*. Assim, *pilS* provavelmente esta envolvido com a regulação de alguns genes/operons relacionados às fímbrias tipo IV. No entanto, mais estudos de interação protéica e regulação ainda são necessários para que o alvo exato desse regulador seja definido. De modo geral, apesar da regulação positiva de um operon relacionado às fímbrias tipo IV, como 2 CDS

codificantes de genes de proteínas envolvidas com a retração do pili foram reprimidas, é possível que a movimentação celular tenha sido também modulada negativamente.

Chen e colaboradores (2005) ao estudarem o efeito de alguns antibióticos, como as fluoroquinolonas, em *B. pseudomallei* também observaram uma diminuição da motilidade celular. Os autores associaram a não motilidade das células à supressão do metabolismo energético das células e intrigantemente essas células apresentaram uma resistência ao antibiótico. Esses resultados estão de acordo com o ocorrido nos nossos experimentos e é interessante que os autores também discutem que, com a menor movimentação, a bactéria se tornaria menos virulenta. Horri e colaboradores (2003) observaram uma diminuição da expressão de fatores de virulência de *P. aeruginosa*, como a diminuição da formação do biofilme e flagelo, através da repressão do gene para a flagelina. Também poderíamos especular algo semelhante para *X. fastidiosa*, uma vez que o aparecimento dos sintomas das doenças por ela causadas seria dependentes principalmente do espalhamento da bactéria pelos vasos das plantas e pela formação do biofilme. Com a adição de tetraciclina aparentemente, então, ocorreria uma diminuição da virulência, já que várias CDS relacionadas aos pili tipo IV foram reprimidas assim como toxinas e fatores de patogenicidade. Uma das CDS (XF1384), que foi reanotada como codificante de um gene para uma proteína relacionada ao fator de patogenicidade *phoPQ*, estaria também envolvida com essa diminuição de virulência. Em *P. aeruginosa* esse sistema é essencial para a virulência e resistência a peptídeos catiônicos antimicrobianos, regulando funções como a *twitching motility*, formação de biofilme e rápida adesão em superfícies (GOODERHAM, 2009).

Já com cobre é mais difícil afirmar que a virulência da bactéria teria sido diminuída, pois apesar da movimentação das células possivelmente ser menor, a formação de um biofilme com uma estrutura tridimensional foi provavelmente induzida através da superexpressão de hemaglutininas e, além disso, observamos a indução de várias CDS de toxinas, cujo papel na virulência ainda não é bem definido.

Elementos genéticos Móveis

Vários genes relacionados com as funções de fagos e profagos foram induzidos. A presença de elementos horizontalmente adquiridos (profagos, plasmídeos, e ilhas genômicas) é comum no genoma de *X. fastidiosa*, correspondendo a cerca de 18%. Porém a indução de tais genes poderia ser consequência do estado de estresse em que a bactéria se encontra, já que resultado semelhante foi verificado por Koide et al. (2006)

quando a bactéria foi submetida a estresse térmico. Nunes e colaboradores (2003) comparam a expressão gênica de *X. fastidiosa* em dois meios de cultura diferentes (PW e XDM2) e propuseram que a expressão gênica de tais elementos móveis poderia ser controlada por condições de crescimento e por estímulos ambientais, tendo uma grande importância no entendimento de processos que medeiam a patogenicidade e adaptação ambiental de microorganismos. Assim a indução de tais elementos, consequência do estresse ao qual a bactéria foi submetida, poderia estar também relacionada com a adaptação da bactéria, uma vez que em longo prazo seria benéfica por aumentar a variabilidade genética da população. Varini e colaboradores (2008) por exemplo, estudaram *X. fastidiosa* submetida ao estresse térmico e segundo esses autores, sob estresse, regiões de profagos são comumente induzidas e devem levar a entrada da célula no ciclo lítico e em último momento a produção de partículas virais, o que poderia estar relacionado com o desenvolvimento da doença na planta, além disso, os autores analisaram 250 pb *up-stream* dos genes relacionados aos profagos que eles encontraram sendo induzidos e como resultado, verificaram que muitos apresentavam polimorfismos de um nucleotídeo, deleções ou inserções. Isso mostrou uma variação na região promotora dos vários genes, que então poderiam apresentar padrões de expressão diferentes, o que também sugere que tais genes estariam sob um intenso mecanismo de recombinação assim como ocorre nos fagos e que seria responsável pelo mosaico genético na arquitetura dessas regiões. Isso sugere que a longo prazo essas regiões podem ser responsáveis por conferir uma variabilidade genética à população. Além disso, observamos em ambos os experimentos, a indução de CDS relacionadas ao preparo da célula para realizar conjugação. A conjugação ajudaria na troca de elementos genéticos móveis e também proporcionaria um aumento na variabilidade genética. Segundo Maiques e colaboradores (2006) as células quando na presença de antibióticos poderiam ativar uma resposta SOS que incluiria a replicação e aumento da frequência de transferência horizontal de ilhas de patogenicidade que codifiquem fatores de virulência, por exemplo.

Morte celular programada

Tanto com cobre como com tetraciclina observamos a expressão de CDS relacionadas putativamente às proteínas do sistema Toxina/ Anti-Toxina (TA). No entanto, após realizarmos uma análise de expressão de 3 réplicas biológicas por RT-qPCR das CDS XFa0046 e XF2081 após a adição de cobre e tetraciclina e com as

mesmas condições de crescimento utilizadas para elaboração dos experimentos de microarranjos, a expressão de ambas as CDS, na presença de cobre, sofreu uma modulação negativa (dados não mostrados). Assim, apenas com a adição de tetraciclina parece haver a indução de tais sistemas. Além disso, com tetraciclina também foram encontradas outras CDS que poderiam estar relacionadas ao sistema, como XFa0001, XF0534, XF1597 e XFa0045. O sistema consiste em um par de genes que codifica dois componentes: uma toxina estável e uma antitoxina instável que interfere na ação letal da toxina. É de importância fundamental no estudo da ocorrência de células persistentes e mecanismo de morte celular programada.

Na população bacteriana que produz células persistentes, na presença de agentes bactericidas, as células nem crescem nem morrem e exibem tolerância a multidrogas (MDT), porém esse mecanismo de MDT e a natureza das células persistentes ainda permanecem desconhecidos. Van Melderen e colaboradores (2009) apresentam um modelo pelo qual os sistemas TA estariam sendo superexpressos em células persistentes. Karen et al (2004) demonstraram que a expressão de genes das células persistentes de *E. coli* em presença de ampicilina, foi associada ao módulo TA, especificamente os genes *higAB*, e outros que codificam proteínas que podem inibir funções celulares importantes como a tradução, e com isso conduzir a MDT. Em nossos experimentos com tetraciclina resultados semelhantes foram obtidos, o que nos leva à reflexão sobre o papel dos módulos TA e o fenótipo mais resistente de um biofilme quando comparado com células em crescimento planctônico.

Recentemente, Shah et al (2006) utilizaram microarranjos de DNA para investigar os genes diferencialmente expressos entre as células na fase exponencial, estacionária e persistente. Genes que codificam para proteínas envolvidas no módulo TA foram expressos exclusivamente nas células persistentes e estas parecem contribuir para esta condição fisiológica celular.

Além disso, a presença desses módulos e sua função encontram-se altamente conservados em diferentes espécies bacterianas. A conservação desses módulos seria devido a uma transferência gênica horizontal e sugere a importância deles na evolução de tais organismos.

É também intrigante o fato de que os dois componentes do módulo TA, tanto a toxina quanto a antitoxina, encontram-se sobre regulação do mesmo promotor, na maioria dos casos. Assim, a indução da produção da toxina automaticamente induziria a produção da antitoxina, que então poderia ser degradada quando o intuito fosse a morte

celular programada (Engelberg-Kulka, 2006). Com esse tipo de modelo, a bactéria se mataria, assim, para compreendê-lo em seres unicelulares, precisaríamos talvez considerar que bactérias em biofilme compartilham características com seres multicelulares. Ao formar um biofilme, as bactérias se comportariam como um grande organismo, já que em matéria de código genético (que seria o fator que de fato mede o sucesso evolutivo) elas seriam iguais; e, considerando esse ponto de vista, a morte celular programada de parte das células teria algum sentido na continuidade e sobrevivência de outras, as então persistentes (**Figura 35**).

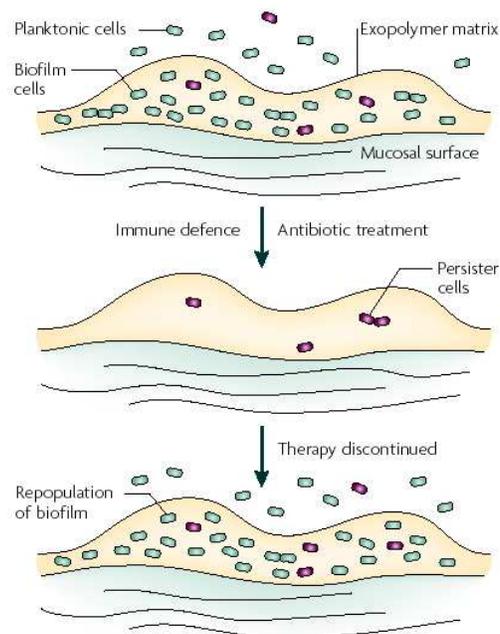


Figura 35. Resistência das células em biofilme aos compostos antimicrobianos. A figura mostra o modelo da resistência do biofilme à morte baseado na sobrevivência das células persistentes. O tratamento inicial com o antibiótico mata as células normais (em verde) em ambas as populações, planctônica e biofilme. O sistema de defesa do hospedeiro mata as células plânctônicas persistentes (em roxo), mas as células persistentes do biofilme (em roxo) são protegidas da defesa do hospedeiro pela matriz de exopolissacarídeos. Após a concentração do composto antimicrobiano ser reduzida, as células persistentes reativam o metabolismo e tornam-se aptas para re-popular o biofilme. (figura retirada do artigo de Lewis 2007)

Engelberg-Kulka e colaboradores (2006), que foram uns dos primeiros autores a descrever um módulo TA, discutem que a expressão de tais genes seria um mecanismo de defesa eficiente, por exemplo, contra o espalhamento de bacteriófagos em uma população. Se a célula morre antes que os fagos realizem a sua lise e se espalhem, sua morte “programada” ajudaria na preservação das outras células. Além disso, no caso de

danos ao DNA, por exemplo, a morte da célula danificada evitaria que erros se propagassem, assim preservando a identidade do genoma da espécie. Já em uma condição de estresse nutricional a morte de algumas células ajudaria na maior disponibilidade de nutrientes para as restantes. Em termos mais abrangentes, a morte celular programada poderia ser definida como os mecanismos genéticos ativados para eliminar células em excesso ou com algum dano, com o objetivo de preservar as outras células do organismo (eucariotos) ou parte da população (procarioto). No entanto, também poderíamos propor outro modo de ação dos módulos TA, que não necessariamente excluí o primeiro apresentado. A toxina seria produzida não para matar a própria célula que a produzisse, mas outras. Um biofilme geralmente é formado por mais de uma espécie de bactérias, assim seria vantajoso, em uma situação de estresse, para cada uma delas que eliminassem as concorrentes (competidoras). Uma maneira encontrada poderia ser a produção de toxinas e liberação delas para o meio, mas como essas toxinas geralmente estão relacionadas com a lise de membranas celulares, como produzir uma toxina sem ela seja tóxica também para a célula que a produz? A solução encontrada poderia ser a produção concomitante de uma antitoxina que evitaria que a toxina tivesse um efeito dentro da própria célula que a produziu antes de ser transportada para o meio extracelular. Mas, como citado anteriormente a indução da morte da própria célula também não pode ser descartada, uma vez que as bactérias possuem várias proteases capazes de degradar a antitoxina e assim permitir a ação da toxina. O proposto seria que os módulos TA poderiam ser induzidos tanto com o intuito de realizar a morte da própria célula que os produz quanto de outras células.

Talvez após ativados vários mecanismos de resposta sem efeito, uma saída seria a ativação de um sistema de resposta SOS (Maiques et al, 2007), que asseguraria a continuidade da espécie. Alguns autores, como Lewis (2007) propõem a complementariedade das duas estratégias de auto-proteção contra agentes antimicrobianos: o mecanismo de efluxo de multidrogas e se este falhar na proteção das células, a tolerância a multidrogas das células persistentes poderia preservar a população.

Em nossos experimentos foi possível observar que ambos os mecanismos poderiam ser ativados, a indução de sistemas de efluxo (como o de resistência multidrogas), mas também a expressão de genes relacionados ao módulo TA. Kim e colaboradores (2009) propõem que os módulos TA poderiam também influenciar na formação do biofilme, através da repressão de genes relacionados às fímbrias, indução

do ciclo lítico de profagos e proteases que degradariam a antitoxina. Esses mecanismos, juntos, promoveriam a dispersão do biofilme. É interessante lembrarmos que nos experimentos apresentados no presente trabalho, vários genes relacionados à profagos foram induzidos, assim como repressão das fímbrias tipo IV.

Visão geral da resposta de resistência de *X. fastidiosa* para cada um dos compostos utilizados

Resumidamente, após as análises do possível papel dos genes diferencialmente expressos e seu comportamento quando adicionadas as doses subinibitórias de tetraciclina ou cobre, é possível sugerir que, apesar das duas doses serem subinibitórias, a do antibiótico provocou um estresse maior na célula. Algumas estratégias de defesa parecem ser comuns a ambos os agentes antimicrobianos: diminuição do metabolismo de DNA e energético, síntese proteica, motilidade e divisão celular e ativação de mecanismos que deixem a célula competente para realizar a conjugação, de elementos genéticos móveis e bombas de efluxo. Com cobre, a estratégia de resistência também envolveria um aumento do biofilme e sua estrutura tridimensional, e maior produção de toxinas. Com tetraciclina, as células se tornariam menos patogênicas, já que além da modulação negativa da movimentação, também ocorreu a repressão de fatores de patogenicidade. A estratégia principal estaria então relacionada com a ativação de sistemas SOS de resposta, que ativariam a morte celular programada (**Figura 37**). Com base nos resultados obtidos foram elaborados dois modelos hipotéticos para explicar quais os mecanismos genéticos que poderiam explicar a resistência do biofilme de *X. fastidiosa* às doses subinibitórias de cobre (**Figura 36**) e tetraciclina. (**Figura 37**).

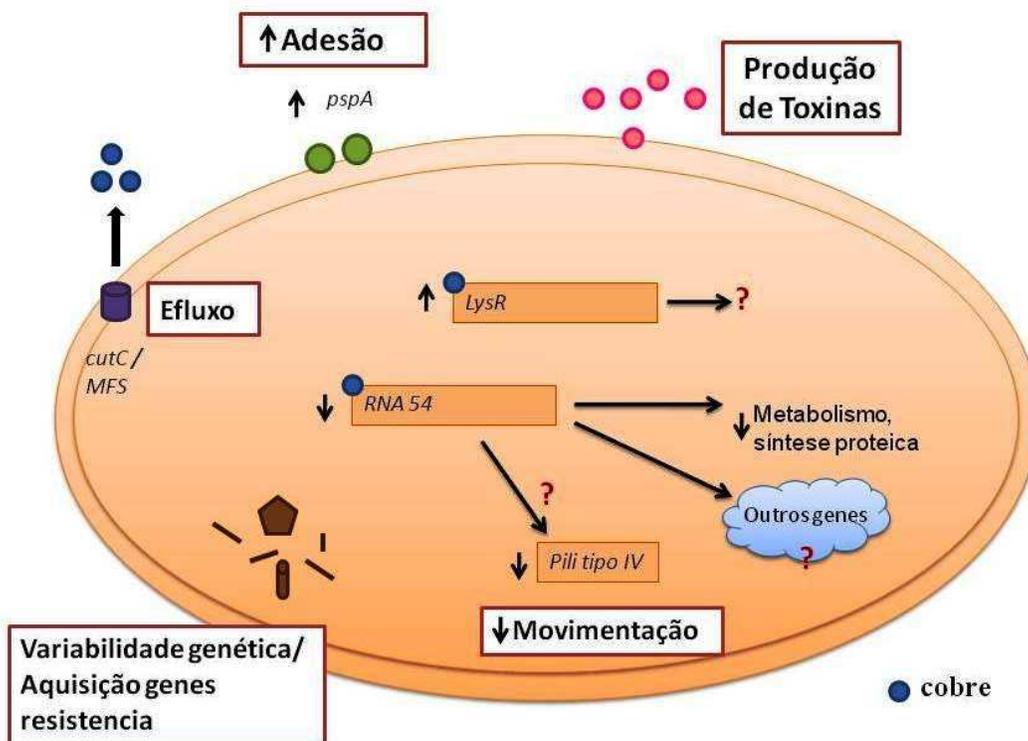


Figura 36. Modelo representativo dos principais mecanismos de resposta ativados na presença de cobre: bomba de efluxo (indução do gene *cutC* e da família MFS); possível aumento da variabilidade genética e aquisição de genes de resistência (através da indução de genes relacionados à conjugação e elementos genéticos móveis); maior adesão entre as células (indução do gene *pspA*) e diminuição da movimentação (repressão de adesinas relacionadas à formação do pili tipo IV) que proporcionariam um aumento da estrutura do biofilme; produção de toxinas, indução de vários reguladores transcricionais da família LysR, cuja maioria dos alvos de ação ainda permanessem desconhecidos em *X. fastidiosa*; e repressão do regulador transcricional sigma 54 possivelmente relacionado com a regulação de genes envolvidos com o metabolismo celular e com a formação de pilis.

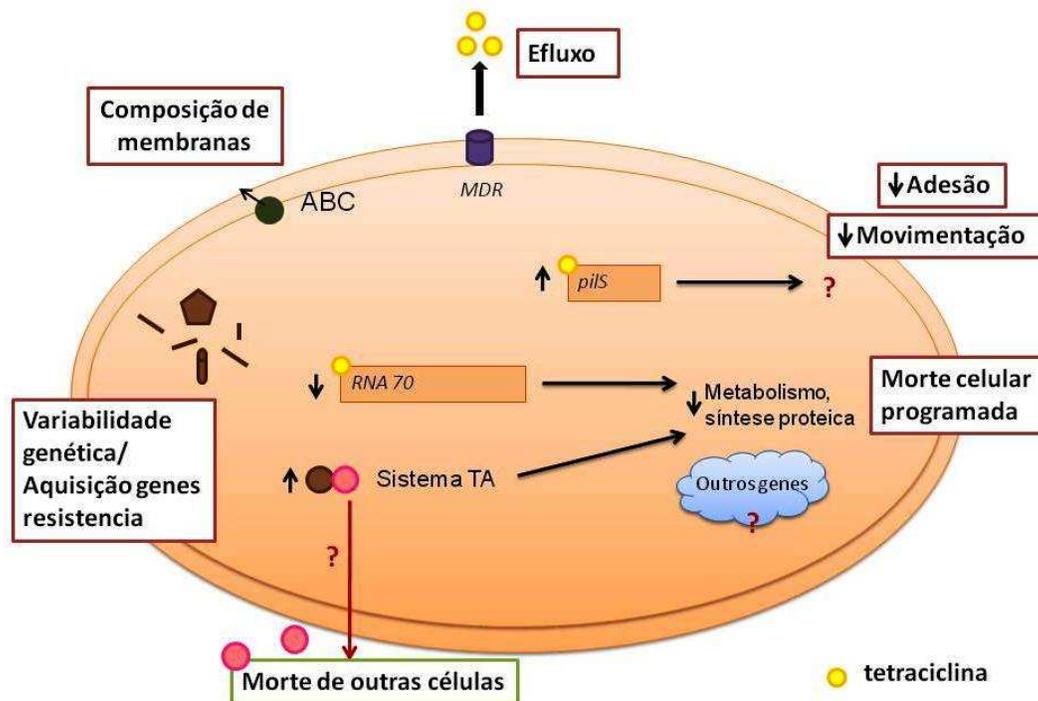


Figura 37. Modelo representativo dos principais mecanismos de resposta ativados na presença de tetraciclina: ativação de bombas de resistência multidrogas (MDR); possível aumento da variabilidade genética e aquisição de genes de resistência (através da indução da conjugação e elementos genéticos móveis); indução do gene *pilS* que seria um repressor do gene *pilA*, que foi reprimido assim como vários outros pili do tipo IV, diminuindo a movimentação celular; indução de genes relacionados ao transporte ABC e síntese de lipoproteínas de membranas; repressão do regulador transcricional sigma 70, que influenciaria na expressão de genes relacionados ao metabolismo celular; e indução de um sistema SOS relacionado com a morte celular programada.

Outro fato interessante é que quando adicionada a dose subinibitória de cobre o número de CDS diferencialmente expressas foi bem menor do que no caso da tetraciclina. Esse fato pode ser devido à maior frequência de exposição da bactéria ao cobre do que a tetraciclina, uma vez que o metal é muito utilizado diretamente na agricultura. Assim, de algum modo a bactéria teria evolutivamente se adaptado à presença de metal no ambiente.

A utilização de cobre na agricultura é muito comum, o metal é utilizado como agente antimicrobiano na forma de sulfato de cobre ou oxiclórico de cobre, principalmente no combate a fungos como *Fusarium*, *Penicillium*, *Gliocladium*, *Aspergillus* e *Alternaria* e bactérias como a *Xanthomonas* (responsável por doenças como o cancro cítrico) (KOLLER et al, 2006). Alva e Chen (1995) quantificaram o metal em diferentes tecidos da tangerina Cleopatra e citrumelo Swingle, já que o uso de

cobre em culturas de citros é histórico e comum, e verificaram que a maior concentração do metal estava nas raízes, mas ele também foi encontrado nas partes aéreas, o que demonstra que o contato da bactéria com o metal seria possível. Já a tetraciclina não é utilizada para aplicação em cultivares, mas poderia ser encontrada no meio ambiente já que é bastante utilizada em rações em dosagens subterapêuticas com função de promotor de crescimento. Como o seu uso não é diretamente na agricultura o contato de bactérias fitopatógenas, principalmente a *X. fastidiosa* que é restrita ao xilema, seria mais incomum.

4.2. Validação dos experimentos com doses subinibitórias de cobre e tetraciclina

A técnica de microarranjos é muito utilizada devido a sua grande capacidade de análise (em larga escala) da expressão gênica, no entanto os dados obtidos podem variar conforme a plataforma e procedimentos utilizados. Assim, o RT-qPCR é utilizado como uma ferramenta de validação dos resultados obtidos pela técnica dos microarranjos.

Em nossos experimentos com cobre 100% dos genes analisados apresentaram modulação da expressão similar em ambas as técnicas e com tetraciclina essa porcentagem foi de 86,66%. Pesquisa na literatura revela que a correlação entre os dados de RT-qPCR e microarranjos têm variado entre 0,48 e 0,97 (MOREY et al, 2006).

Um dos motivos, citado por Morey e colaboradores (2006), da discrepância entre os dados é a qualidade do RNA. A presença de sais e outros componentes afetam diretamente a ação da transcriptase reversa. Para garantir a qualidade das amostras, em nossos experimentos todas as amostras de RNA foram purificadas com um kit específico e tratadas com DNase para eliminação de contaminantes de DNA, e cuidadosamente analisadas em gel desnaturante para verificar o grau de degradação do RNA, assim como submetidas à análise por espectrofotômetro.

Outro fator que influencia na equivalência entre os dados obtidos por microarranjos ou por RT-qPCR é que ambas as técnicas estão sujeitas a diferentes fontes de erro. No microarranjo, referente à incorporação dos fluoróforos e a hibridizações não específicas às sondas, por exemplo. Já no RT-qPCR, podemos citar erros no exponencial de amplificação, formação de dímeros entre os *primers* entre outros. O próprio método de normalização também é diferente para os experimentos de microarranjos e RT-qPCR, já

que o primeiro requer uma normalização global dos dados enquanto o segundo considera um ou mais genes de referência, baseados nos quais a expressão de todos os outros é calibrada. O aumento da distância entre o local de desenho dos *primers* e o das sondas para um gene também poderia aumentar a discrepância entre os resultados das técnicas.

Além disso, a correlação entre os resultados obtidos pelas duas técnicas seria menor para genes com diferenças de expressão menores que *2 fold change*. Beckman et al (2004) também encontraram que *spots* com menores intensidades, ou seja, aqueles em que a intensidade de fluorescência é menor do que a máxima do controle negativo, teriam menor correlação com os dados de RT-qPCR do que aqueles com alta intensidade de fluorescência, que seriam aqueles com uma intensidade maior que a maior intensidade captada para o controle negativo.

Assim, podemos considerar que existe uma boa equivalência entre os dados dos genes analisados por microarranjos e por RT-qPCR, mesmo que com tetraciclina 3 dos 15 genes analisados tenham apresentado uma modulação de expressão diferente de acordo com a técnica utilizada. A validação de uma plataforma de microarranjos é importante, pois confere credibilidade aos dados obtidos e permite assim que sejam feitas aferições de forma geral sobre o comportamento dos genes. Também conseguimos constatar a qualidade do chip elaborado pela empresa NimbleGen.

4.3. Análise da expressão de alguns genes diferencialmente expressos com 15 dias nas diferentes fases de formação do biofilme de *X. fastidiosa*.

Com o intuito de verificar se a expressão de alguns genes diferencialmente expressos nos experimentos de microarranjos seria modulada nas fases de formações do biofilme, a expressão deles foi analisada por RT-qPCR. A expressão de alguns dos genes analisados foi similar independente do tempo de formação do biofilme. No entanto para outros genes, a fase em que o biofilme se encontrava foi importante para sua modulação diferencial. Após a adição de cobre a um biofilme com 20 dias de formação, houve uma maior indução dos genes relacionados à adesão (*pspA*, *xadA1* e *xadA2*) e do transportador de membrana externa *tolC*. Com esse tempo de formação o biofilme possui sua maior densidade celular por isso talvez seu modo de resposta ao estresse seja mais distinto das outras fases. Com a adição de tetraciclina, também foi observada uma modulação diferencial na expressão gênica de alguns genes quando o

biofilme estava com 20 dias de formação. Foi observada uma maior indução do $\sigma 70$ (*rpoD*), o que é intrigante, já que em todas as outras fases de formação do biofilme e principalmente com 30 dias, esse gene foi reprimido. Como o $\sigma 70$ realiza a regulação de genes envolvidos com as funções básicas da célula, aparentemente com 20 dias, as células não diminuiriam tanto seu metabolismo e síntese proteica, o que poderia ser em decorrência da já ativação de outros mecanismos de defesa, como a indução das adesinas e bombas de efluxo. Decorrente disso, hipotetiza-se que com 20 dias, a resistência do biofilme às doses subinibitórias de antimicrobianos poderia ser maior.

Além disso, também foi possível observar uma diferença estatisticamente significativa de expressão de outros genes testados com tetraciclina nas diferentes fases de formação do biofilme, como para a CDS XF2490, putativamente codificante para um sistema TA. Sua indução na presença de tetraciclina foi menor com 30 dias. Essa é a fase de formação do biofilme em que as células naturalmente se desalojariam para colonizar outros ambientes. Se, segundo Kim e colaboradores (2009) os módulos TA tivessem um papel na dispersão do biofilme, seria de se esperar que, em uma fase em que a dispersão já ocorreria em maior taxa que o módulo fosse menos induzido que em fases em que a adesão entre as células é maior, como ocorre com 15-20 dias em *Xylella fastidiosa*. Também com a adição de tetraciclina, com 30 dias o gene *pilS* foi mais reprimido que com os outros tempos assim como o gene *pilA*, o que reforça nossa hipótese de que o mecanismo de regulação negativa de *pilA* por *pilS* em *X. fastidiosa* seria semelhante ao descrito por Mattick (2002) em *P. aeruginosa*.

Em adição, os *heat maps* gerados a partir da análise pontual dos genes escolhidos, mostram que nos tempos de 3 e 30 dias os padrões de expressão da bactéria seriam mais diferentes das outras fases do que outros tempos. Os tempos de 5, 10 e 15 dias compartilhariam algumas características nos padrões de expressão, mas a fase de 20 dias apresenta comportamento bem diferente das demais, provavelmente porque essa é a fase de maior densidade celular.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É possível concluir que a resposta de *X. fastidiosa* aos compostos antimicrobianos, apesar de complexa, deva incluir a diminuição de seu metabolismo celular e energético, síntese proteica e divisão celular. Além disso, dependendo da dose e do agente antimicrobiano utilizado o mecanismo de defesa ativado é diferente. A

exposição às doses subinibitórias dos agentes antimicrobianos deve ser, assim como para bactérias patogênicas humanas, controlada já que, dependendo do composto, ao invés de matar, este poderia induzir um aumento da expressão de genes relacionados à virulência da bactéria, que conseqüentemente aumentariam a severidade da doença, como hipotetizado nos experimentos com cobre. Nos experimentos com tetraciclina não foi observada a indução de genes relacionados à formação do biofilme e toxinas como com cobre, mas sua repressão. No entanto, houve a indução de um sistema TA que acreditamos estar relacionado com um tipo de resposta SOS da bactéria e que levaria à formação de células persistentes. Estas são células que asseguram a sobrevivência da população mesmo após a exposição aos agentes tóxicos e provavelmente seriam células em um estado dormente (sem crescimento) (KEREN et al, 2004). Nossos estudos de expressão global de *X. fastidiosa* suportam essa possibilidade das células persistentes serem dormentes uma vez que entre os genes reprimidos foram encontrados vários relacionados ao metabolismo e síntese proteica. Além disso, a identificação de possíveis módulos TA no genoma de *X. fastidiosa* é uma importante informação para o melhor entendimento da tolerância e resistência de biofilmes à agentes antimicrobianos.

Com o presente estudo foi possível se identificar as respostas de *X. fastidiosa* aos agentes antimicrobianos que provavelmente estariam relacionadas a maior resistência das células em biofilme. Com isso seria possível o desenvolvimento de novas estratégias de controle da bactéria que visem o desequilíbrio em algumas dessas respostas.

CAPÍTULO 2

Efeito de N-Acetil-L-Cisteína no biofilme de *Xylella fastidiosa*

RESUMO

Após extensivo programa que resultou no sequenciamento do genoma da bactéria *Xylella fastidiosa*, vários estudos funcionais têm sido realizados, o que permitiu associar seu mecanismo de patogenicidade com uma eficiente adesão e colonização do xilema, culminando na formação de um biofilme. Este confere várias vantagens adaptativas aos organismos como uma maior resistência a agentes antimicrobianos, que torna o controle mais difícil que o de bactérias planctônicas por requerir altas doses dos agentes. Muitas bactérias patogênicas de humanos também formam biofilmes, como as entéricas, outras relacionadas a doenças do trato respiratório, fibrose cística, e até mesmo envolvidas com a formação da cárie dentária. . Uma forma de controle dessas bactérias seria impedir a formação do biofilme, uma vez que este se mostra essencial para a proliferação dos patógenos e assim manifestação das doenças. Para isso tem sido utilizado, na medicina, um análogo da cisteína, o N-acetil-L-cisteína (NAC). Esta é uma molécula antioxidante que atuaria desfazendo as pontes dissulfeto formadas entre as adesinas, presentes na superfície das células bacterianas, e a superfície colonizada, devido à competição de uso. Apesar dessa substância ser amplamente utilizada no combate a bactérias patogênicas de seres humanos nenhum estudo havia sido feito com fitopatógenos formadores de biofilme. Assim, o objetivo desse trabalho foi verificar a influência de diferentes doses de NAC no biofilme de *X. fastidiosa* cultivada *in vitro* e em plantas de laranja Pêra com sintomas da clorose variegada dos citros (CVC). Com os experimentos *in vitro* foi possível observar que independente da dose de NAC utilizada (1,0, 2,0 ou 6,0 mg/mL) o composto inibiu a formação de biofilme e foi tóxico para as células, já que houve grande diminuição da massa celular e quantidade de células vivas, em comparação com o controle sem adição da substância. Os experimentos *in vivo* também evidenciaram a ação da substância nas células de *X. fastidiosa*, proporcionando grande redução de sintomas nas plantas tratadas. Assim, o trabalho foi inovador, por se tratar do primeiro experimentos envolvendo o uso de NAC em fitopatógenos e abre real perspectivas para o controle da bactéria e manejo da CVC.

1 OBJETIVO

1.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito de N-Acetil-L-Cisteína (NAC) no biofilme de *X. fastidiosa* em condições de crescimento *in vitro* e efeito na sintomatologia da CVC.

1.2. Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos biológicos de N-Acetil-L-Cisteína no biofilme de *X. fastidiosa* crescido em condições *in vitro* através dos experimentos de quantificação da massa celular, exopolissacarídeos e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) após diluição seriada.
- Avaliar os efeitos biológicos de N-Acetil-L-Cisteína em plantas de laranja Pêra com sintomas da CVC por RT-qPCR, isolamento de células e visualmente

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Estirpe de *X. fastidiosa*

A estirpe de *X. fastidiosa* utilizada foi a 9a5c, re-isolada em meio PW (Davis et al., 1981) de plantas de laranja 'Pêra' com sintomas de CVC mantidas sob condições de telado.

2.2. Obtenção de biofilme para os ensaios com NAC.

Um inóculo da bactéria foi feito utilizando células recém isoladas da planta hospedeira (isolada inicialmente em meio PW) e colocadas para crescer em meio definido XDM₂ (Lemos *et al.*, 2003) a 29°C com rotação de 130 rpm. As células ficaram nesta condição por 6-7 dias até obtenção da densidade óptica (DO) de 0,3, equivalente a uma população de 10⁸ UFC/mL. Para avaliar o efeito do NAC no biofilme de *X. fastidiosa*, 3 mL do inóculo e 18 mL de meio XDM₂ foram colocados em *erlenmeyers* de vidro para crescimento do biofilme na superfície líquido-ar, assim como as diferentes concentrações de NAC. Após 14 dias para crescimento do biofilme foram realizadas as análises. Essas condições de crescimento e análise foram adotadas devido

a resultados de experimentos prévios realizados com o NAC em diferentes concentrações e condições de crescimento (Muranaka, 2007). Controles sem adição do composto também foram utilizados.

2.3. Concentrações de NAC utilizadas nos experimentos.

Para avaliar o efeito de NAC no biofilme de *X. fastidiosa in vitro*, foram utilizadas diferentes concentrações do composto 1 mg/mL, 2 mg/mL e 6 mg/mL. O pH do meio de cultura corrigido com NaOH 1M após a adição das diferentes doses de NAC. Já *in vivo* as concentrações utilizadas foram: 0,48 mg/mL, 2,4 mg/mL e 6 mg/mL e o pH da solução de Hoagland também foi ajustado com NaOH 1M para 6,8, já que o NAC em solução possui carácter ácido.

2.4. Avaliações do efeito de NAC no biofilme de *X. fastidiosa in vitro*.

2.4.1 Massa celular.

A massa celular dos biofilmes formados na superfície líquido-ar de cada *erlenmeyer* foi quantificada pelo método do cristal violeta descrito por Espinosa-Urgel *et al.*, (2000) (exemplificado na **figura 38**). Aos biofilmes coletados, lavados com água, foi adicionado 1 mL de cristal violeta 0,1% e depois de 5 minutos foram realizadas diversas lavagens com água. Um mL de etanol 100% foi adicionado e a absorbância das amostras medida a 590 nm. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste *t* ($P \leq 0.05$) com o programa *Assistat 7.3 beta software* (<<http://assistat.sites.uol.com.br>>). Foram realizadas 3 repetições biológicas. Os mesmos procedimentos e análises também foram realizados com as células recuperadas, após centrifugação para precipitação do *pellet*, do meio de cultura restante em cada *erlenmeyer*. Essas células restantes em suspensão no meio de cultura representariam a fração planctônica.

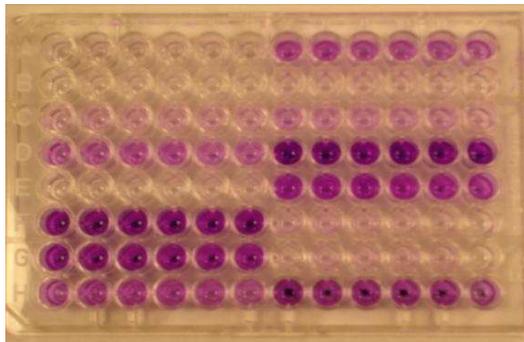


Figura 38. Biomassa total corado com cristal violeta. Após a eluição com etanol as amostras foram aplicadas em placas (6 réplicas) como a da figura para leitura da absorbância.

2.4.2. Quantificação de Exopolissacarídeos.

O quantidade total de EPS de cada amostra foi determinada através do método fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois *et al* (1956) (**Figura 39**). A curva padrão foi elaborada com a utilização de diferentes concentrações de glicose e a análise estatística foi realizada pelo teste *t* ($P \leq 0.05$) com o programa *Assistat 7.3 beta software* (<<http://assistat.sites.uol.com.br>>). Foram realizadas 3 repetições biológicas e 6 medidas por repetição.

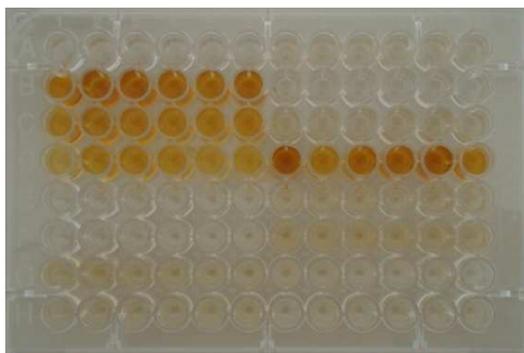


Figura 39. Amostras submetidas à quantificação do EPS. Placa contendo as amostras que tiveram sua absorbância analisada.

2.4.3. Análise do número de unidades formadoras de colônias.

O número de unidades formadoras de Colônia (UFC) das células da bactéria em biofilme na presença das diferentes concentrações de NAC foi avaliado após diluição seriada. Foram utilizadas três repetições biológicas e três placas por repetição. Controles sem adição de NAC também foram avaliados. Os mesmos procedimentos e análises também foram realizados com as células da fração planctônica presente em suspensão

no meio de cultura em cada *erlenmeyer*. No entanto, após centrifugação do meio de cultura restante em cada *erlenmeyer* para recuperação das células planctônicas, as mesmas foram lavadas com água *miliq* por 3 vezes através de repetidas pipetagens antes da diluição seriada das mesmas. Esse procedimento foi adotado na tentativa de eliminar qualquer resíduo de NAC, e assim a possibilidade da substância estar agindo apenas como um agente bacteriostático.

2.5. Avaliações do efeito de NAC no biofilme de *X. fastidiosa in vivo*.

2.5.1. Transmissão da CVC de plantas de laranja pêra infectadas para mudas sadias.

A CVC foi transmitida para mudas sadias de laranja pêra (*Citrus sinenses*) através das técnicas de encostia e garfagem (**Figura 40**). Para a técnica da encostia, um segmento do caule de uma planta de laranja pêra com os sintomas de CVC (planta inoculante) foi cortado e o câmbio colocado em contato com o de uma muda sadia (muda receptora), sendo essa área de contato entre os câmbios de aproximadamente 5 cm. Já na técnica da garfagem um pedaço de ramo destacado (garfo) da planta inoculante foi justaposto sobre a muda sadia e a região amarrada e recoberta com fita isolante. As mudas foram mantidas em tubetes com um sistema de irrigação, sob condições de telado. Após 30 dias a transmissão da CVC para as plantas foi avaliada através da amostragem das folhas acima da região da encostia ou garfagem. Foi realizada a extração de DNA total para a detecção molecular de *X. fastidiosa* via PCR convencional com a utilização de *primers* específicos para *X. fastidiosa* dos citros (estirpe 9a5c) (HARTUNG et al, 1994). As mudas com diagnóstico positivo para a presença da bactéria foram então utilizadas para os experimentos com NAC.

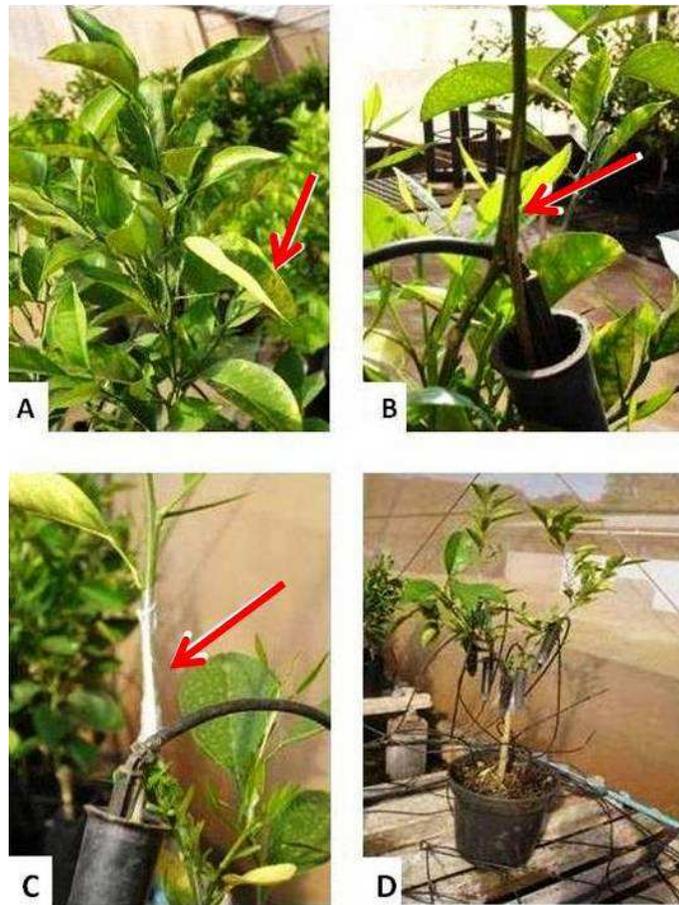


Figura 40. Detalhe do processo de transmissão de CVC para mudas saudáveis através das técnicas de encostia e garfagem. O caule de uma planta com os sintomas da CVC (A) é cortado e colocado em contato com o de uma muda saudável (B). A região é amarrada e coberta com fita isolante (C). As mudas foram mantidas em tubetes com sistema de irrigação acoplado e em condições de telado (D).

2.5.2 Experimentos com NAC nas mudas infectadas.

Foi realizada uma análise com PCR quantitativo, conforme descrito em sequência, para quantificação da população inicial de bactéria nas plantas. As plantas foram então transferidas para vasos de Leonard (**Figura 41**), construídos a partir de garrafas de vidro de 750 mL cortadas e pintadas com tinta metálica para evitar a penetração de luz. Na parte de cima do vaso foram adicionadas vermiculita e areia, previamente autoclavadas, e na parte coletora, solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) (**Figura 42**). Foram realizados dois experimentos com NAC, ambos conduzidos em casa de vegetação (**Tabela 20**). O primeiro deles foi um experimento piloto, no qual foram adicionadas as seguintes doses de NAC em 250 mL de solução de Hoagland &

Arnon (1950): 120 mg e 600 mg e experimentos controle sem adição do composto. Já o segundo ensaio contou com: plantas com adição de 120 mg, 600 mg e 1500 mg de NAC junto com 250 mL da solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) e experimentos controle sem a adição do composto. Foram realizadas 4 repetições biológicas para cada tratamento em cada experimento



Figura 41. Vaso de Leonard. À esquerda encontra-se o esquema de elaboração do vaso e à direita, o mesmo depois de pronto. As mudas foram plantadas na parte de cima do vaso com vermiculita e areia autoclavadas e na parte coletora (parte de baixo) foi colocada a solução nutritiva de Hoagland.



Figura 42. Plantas nos vasos de Leonard. Experimento conduzido na casa de vegetação.

Tabela 20. Quadro resumo das análises realizadas em cada um dos experimentos realizados *in vivo*.

Análises / Experimento		1	2
<i>Doses de NAC utilizadas</i>		120 e 600 mg	120, 600 e 1500 mg
<i>Quantificação da bactéria por qPCR</i>	<i>Tempo 0</i>	Sim	Sim
	<i>Após 1 mes</i>	Sim	Não
	<i>Após 3 meses</i>	Sim	Sim
<i>Quantificação do NAC por HPLC</i>		Sim	Sim
<i>Isolamento da bactéria após 3 meses de tratamento</i>		Não	Sim
<i>Avaliação visual dos sintomas folhares</i>		Sim	Sim
<i>Avaliação visual dos sintomas após interrupção do tratamento com NAC</i>		Não	Sim

2.5.3. Coleta das amostras para HPLC e PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

As amostras para análise em HPLC foram coletadas da solução nutritiva presente na parte coletora dos vasos e o restante da solução descartada. As amostras foram alocadas em freezer -80°C para posterior análise. No primeiro experimento realizado, após 30 e 90 dias de tratamento, foram coletadas folhas, escolhidas aleatoriamente, de cada planta. Já no segundo experimento foram coletadas as primeiras folhas logo acima do ponto de encostia/ garfagem, mas apenas após 90 dias de tratamento com o NAC. O DNA foi extraído com o kit INVITEK (*Invisorb Spin Plant Mini Kit*) para a quantificação da bactéria por qPCR.

Após a última coleta com 90 dias de tratamento as mudas do segundo experimento foram plantadas em terra e permaneceram na casa de vegetação para avaliação dos sintomas e desenvolvimento da planta após interrupção do tratamento com o NAC.

2.5.4. Quantificação absoluta da população bacteriana por qPCR

Para quantificação absoluta foi necessário inicialmente estabelecer uma curva padrão. Para tal, foi extraído DNA de *X. fastidiosa* e o número de células presente na amostra determinado de acordo com o seguinte raciocínio: uma fita de DNA de *X.*

fastidiosa possui 2679310pb, que foi multiplicado por 660 daltons, que é o peso molecular referente a 2 bases de nucleotídeos. Foi realizada então a conversão de Daltons para nanogramas (ng) e o número de células de cada amostra então calculado. Também foi realizada a extração e cálculo da quantidade de células presentes em cada amostra de DNA das folhas de laranja Pêra sadia. Foi feita uma diluição seriada de uma amostra de DNA de *X. fastidiosa* com número de células previamente determinado como descrito anteriormente. Essa diluição foi misturada a uma amostra de DNA de folhas de laranja Pêra sadia.

O DNA extraído das folhas das plantas submetidas aos diferentes tratamentos com NAC foi quantificado por espectrofotômetro e sua quantidade padronizada. As amostras foram então analisadas pelo qPCR em triplicata utilizando o aparelho ABI 7500 (Applied Biosystems).

2.5.5 Isolamento de bactérias dos pecíolos das folhas através de diluição seriada

Como as bactérias quantificadas através da técnica do qPCR poderiam estar mortas, foi realizado um isolamento, através de diluição seriada, das amostras do segundo experimento após 90 dias de tratamento com o NAC. Para isso a nervura principal e pecíolo de cada folha foram esterilizados, cortados e macerados junto com 1mL de tampão PBS. Foram retirados 100 µL desse tampão contendo as partes foliares maceradas e realizada uma diluição serial dessa amostra. Cada diluição foi plaqueada em placa contendo meio PW sólido com BSA (*bovine serum albumin*) (Davis et al., 1981). Foram plaqueadas as seguintes diluições de todas as amostras: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . Após 30 dias, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi contado.

2.5.6. Análise quantitativa de N-acetil-L-cisteína por HPLC

Essa parte do trabalho foi realizada com a colaboração da Dra. Maria Fátima das Graças F. da Silva e do Dr. Moacir Rossi Forim do Laboratório de Produtos Naturais, da Universidade Federal de São Carlos/SP (UFSCAR).

Para o desenvolvimento do método de quantificação do NAC foi utilizado um cromatógrafo Agilent Serie 1200 Modular, com um degaseificador (G1322A), bomba

quaternária (DE62964634), auto-injetor (DE64766244), forno de coluna (DE63072817) e um detector UV-Vis (DE 7161511). Os cromatogramas foram registrados através do *software* EZCrom.

A separação cromatográfica foi realizada no modo reverso de eluição, utilizando uma coluna analítica octadecilsilica (C18) Luna[®] (II) Phenomenex[®] (250 x 4,6 mm, 5µm, 100 Å - Torrance, CA, U.S.A.), esta, acoplada a uma coluna de segurança (Pré-coluna) utilizando um cartucho HOLDER[®] bicompartilhado contendo, em seu interior, um cartucho de segurança C18 (4x3 mm, de 5 µm, 100 Å) também adquirido da Phenomenex[®].

Foi realizada a derivatização do NAC com N-(1-pyrenyl) maleimide (NPM) como proposto por Wu et al. (2006) (**Figura 43**).

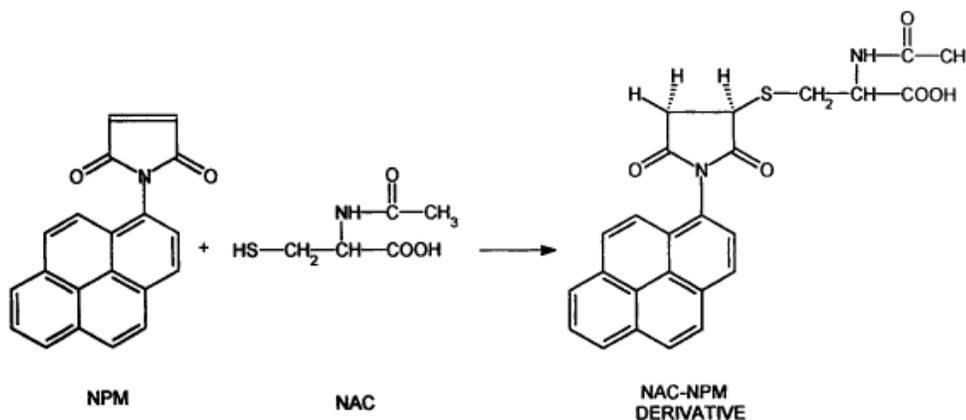


Figura 43. Reação de derivatização de NPM com NAC. Esse mecanismo de reação é similar ao que ocorre na adição de Michael em compostos carbonílicos alfa-beta insaturados. Com essa reação o composto formado (NAC-NPM) apresenta um grande número de insaturações, o que permite ao NAC ser detectado por um detector UV-Vis ou de Fluorescência.

2.5.6.1. Procedimento de derivatização de NAC e análise cromatográfica.

Foi preparada uma solução estoque de NAC de 100 µg/mL já na solução nutritiva de Hoagland. Com µL da solução foram adicionados a 300 µL do agente derivatizante (NPM). A mistura foi então incubada a 60°C por uma hora. Após esse tempo a reação foi estabilizada pela adição de 10 µL de ácido clorídrico (HCl) 2M. As amostras foram analisadas usando a coluna analítica de octadecilsilica (C18, descrita anteriormente), acoplada a uma coluna de segurança C18 com uma vazão de 1,2 mL/min, uma alça de amostragem de 20 µL e um comprimento de onda de detecção

fixo de 330 nm ($\lambda_{\text{máx}}$ absorção). Uma separação eficiente para a análise do NAC em um teste preliminar foi conseguida com uma fase móvel constituída de água e acetonitrila ($\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$) na proporção de 4:6 Com 0,1% de ácido fórmico na fase aquosa

2.5.6.2. Construção da curva analítica.

A curva analítica para o NAC foi construída com uma faixa linear de trabalho entre 5,0 e 100,0 $\mu\text{g/mL}$. Foi preparada uma solução de NAC na solução de Hoagland na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ e a partir dela a solução estoque de 100 $\mu\text{g/mL}$. Cada concentração da curva analítica foi preparada em triplicata a partir da solução estoque de 100 $\mu\text{g/mL}$ e compreendeu os pontos de 10,0; 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e 100,0 $\mu\text{g/mL}$.

Em seguida foram determinados os coeficientes de regressão **a** e **b** e o coeficiente de correlação **r**, levando a uma equação de reta. A área obtida para cada amostra foi aplicada à respectiva equação e, sua concentração determinada. Foi determinada também a média das três análises para cada amostra (**x**), o desvio padrão (**s**), o coeficiente de variação ($\text{CV} = \text{s}/\text{x} \cdot 100$) e a exatidão (valor obtido/valor adicionado.100), os quais conferem credibilidade aos dados gerados.

2.5.6.3. Limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD).

O LQ foi estabelecido como a menor concentração das três amostras de NAC que possa ser medida com uma precisão que não exceda o valor de 15% da variabilidade e a exatidão não ultrapassasse desvios de 15% do valor nominal da concentração. O LD foi estabelecido como a menor concentração em que se observa um sinal três vezes maior que o ruído do detector

2.5.6.4. Validação do método analítico

Foram verificadas a precisão e exatidão intra e interdia. Para isso, foram avaliadas 3 concentrações de NAC: uma baixa (correspondente a 120% da primeira concentração da curva analítica), uma média (41,67% da concentração mais alta da curva analítica), e outra alta (90% da maior concentração da curva analítica). A precisão intradia foi avaliada através de análises em quintuplicata das respectivas soluções em

um mesmo dia e a interdia foi obtida nas mesmas condições através de análises feitas em 3 dias não consecutivos. A exatidão e precisão foram então calculadas para todas as análises.

2.5.6.5. Medidas de estabilidade do padrão.

Foi verificada a estabilidade do padrão do NAC no auto-injetor e de degelo. A estabilidade no auto-injetor foi observada pela análise de um padrão de NAC preparado em uma concentração conhecida. Este padrão foi analisado a cada 2 horas durante um período total de 24 horas.

3. RESULTADOS

3.1. Experimentos *in vitro*

3.1.1. Massa celular

A massa celular dos biofilmes submetidos às diferentes dosagens de NAC foi reduzida em relação à condição controle (**Figura 44**). Nota-se que a maior diminuição da massa celular ocorreu com a maior dose de NAC, 6 mg/mL, chegando a uma redução de aproximadamente 100%.

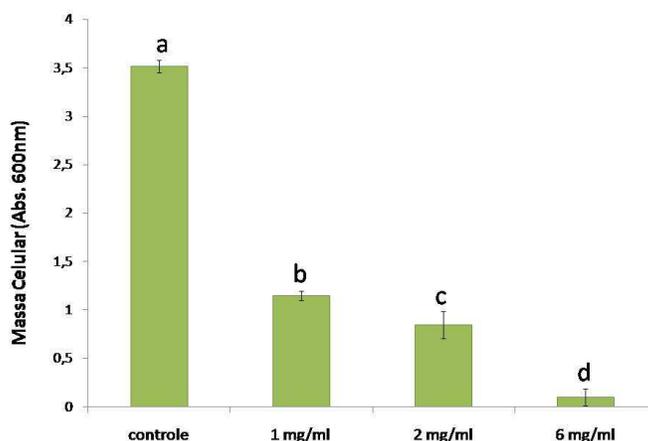


Figura 44. Quantificação da massa celular formada nos tratamentos com adição de 1 mg/mL, 2 mg/mL e 6 mg/mL de NAC e controle (sem adição do composto). As letras diferentes indicam uma diferença estatisticamente significativa ao nível de 5 % de probabilidade.

Já a quantificação da massa celular das células planctônicas presentes em cada *erlenmeyer* evidencia um aumento de massa quando foram adicionadas as diferentes dosagens de NAC (**Figura 45**).

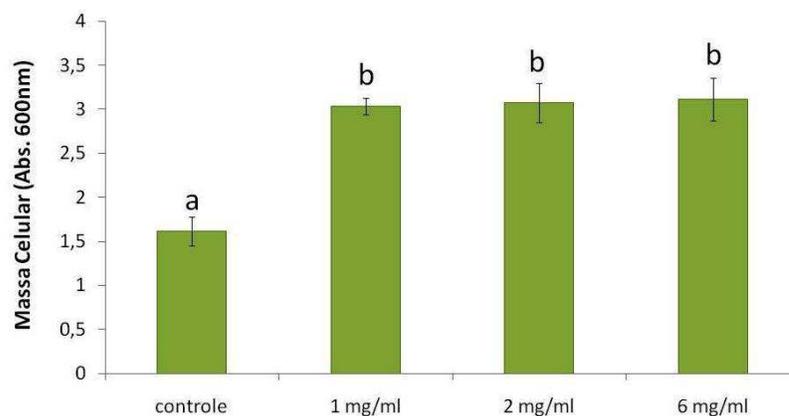


Figura 45. Quantificação da massa celular planctônica formada nos tratamentos com adição de 1 mg/mL, 2 mg/mL e 6 mg/mL de NAC e controle (sem adição do composto). As letras diferentes indicam uma diferença estatisticamente significativa ao nível de 5 % de probabilidade.

3.1.2. Quantificação do EPS

A regressão linear ($y = 52.145x - 3.2503$) a partir da curva elaborada com concentrações conhecidas de glicose foi utilizada para o cálculo dos valores de EPS em mg/L (**Figura 46**). A quantidade de EPS total foi maior no controle em relação aos tratamentos com NAC, como pode ser visualizados na **figura 47**.

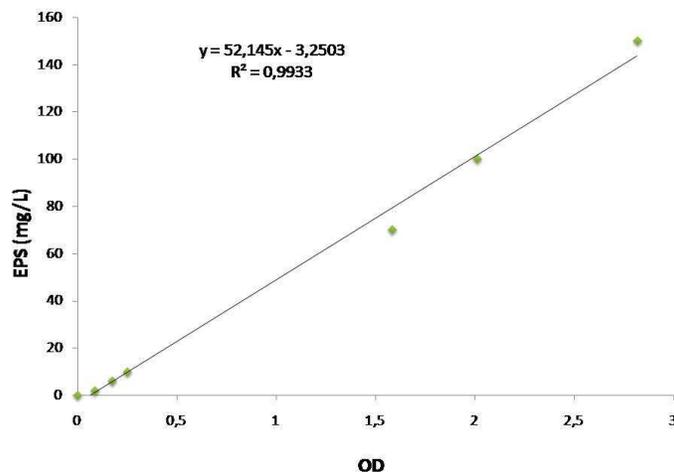


Figura 46. Curva padrão para quantificação de EPS (mg/L) elaborada através da medida de diferentes concentrações de glicose. A partir dessa curva padrão é possível a realização da correlação em a OD (densidade ótica) medida em espectrofotômetro com a quantidade de EPS na amostra.

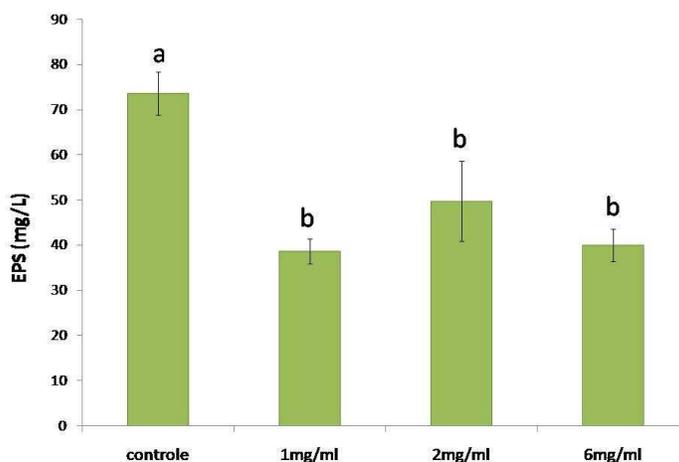


Figura 47. Quantificação de EPS no biofilme de *X. fastidiosa* submetido a 1 mg/mL, 2 mg/mL e 6 mg/mL de NAC em comparação com a situação controle (sem adição do composto). Letras diferentes indicam que houve uma diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% de probabilidade

De acordo com os experimentos de cristal violeta, a massa celular do biofilme quando submetido às diferentes dosagens de NAC foi menor, chegando a diminuir cerca de 100% com 6 mg/mL de NAC. Já a diminuição do EPS observada entre o controle e quando adicionada 6 mg/ml de NAC, por exemplo, foi apenas ao redor de 45%, logo, a média de produção de EPS por célula provavelmente aumentou.

3.1.3. Análise do número de unidades formadoras de colônias.

Essa parte dos experimentos foi realizada uma vez que com a determinação da massa celular, ambas as células, vivas e mortas são quantificadas, assim mesmo que exista um grande valor de massa celular, essa poderia ser composta apenas por células mortas. Com a diluição seriada e contagem do número de colônias é estimado o número de células vivas presentes nas amostras.

Para o tratamento com 6 mg/mL de NAC o número de células vivas presentes no biofilme teve uma redução de quase 100% (**Figura 48**), o que condiz com os resultados de massa celular.

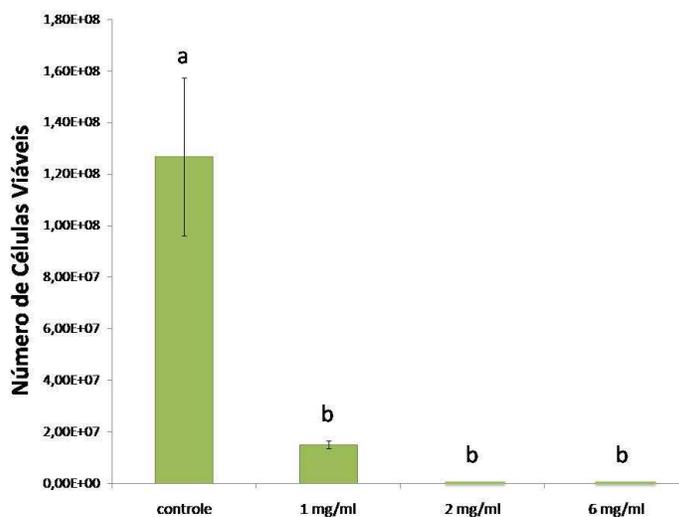


Figura 48. Número de células viáveis no biofilme de *X. fastidiosa* submetido a 1 mg/mL, 2 mg/mL e 6 mg/mL de NAC em comparação com a situação controle (sem adição do composto). Letras diferentes indicam que houve uma diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% de probabilidade

Pelos resultados da viabilidade celular e massa celular obtidos observou-se que o NAC já na concentração de 1 mg/mL foi capaz de inibir o crescimento da bactéria, uma vez que a quantificação de UFC/mL foi menor do que no biofilme controle.

Com relação à diluição seriada das células planctônicas o que observamos foi o oposto do ocorrido com as resultados de massa celular. Apesar desta ter aumentado nos diversos experimentos com NAC, constatou-se que as células em suspensão estão mortas, já que em diluição seriada das mesmas não foi possível a contagem de nenhuma UFC (dados não mostrados). Já no experimento controle, foi possível a contagem de grande quantidade de células, o que mostra que no controle, apesar da maioria das

células estarem formando o biofilme também é possível encontrar parte delas na fase planctônica.

3.2. Experimentos *in vivo*

No início dos experimentos *in vivo* quando o tratamento com NAC ainda não havia sido iniciado, todas as plantas apresentavam sintomas típicos da CVC, como pode ser observado na **figura 49**. A quantidade de células bacterianas presente nas amostras coletadas de cada planta foi determinada por qPCR e será apresentada no tópico seguinte.



Figura 49. Antes de início do tratamento com o NAC todas as plantas apresentavam sintomas típicos da CVC, como manchas cloróticas e necróticas nas folhas.

Após 3 meses de tratamento com o NAC em ambos os experimentos, a redução visual dos sintomas foliares foi evidente, como pode ser observado nas **figuras 50A, 51A, 52A e 53A**. Nessas figuras, além da planta após 3 meses de tratamento com NAC também é possível a visualização de algumas folhas coletadas após os 2 meses de interrupção do tratamento em que as plantas foram mantidas em casa de vegetação e plantadas em terra (amostras providas do experimento 2). No controle, sem tratamento com o NAC, foi visualizado um maior número de folhas com manchas cloróticas e necróticas além de sua incidência dos sintomas por folha também ter sido maior. Nos tratamentos com 120 e 600 mg de NAC ainda foi possível a visualização de alguns

pontos cloróticos nas folhas, mas em menor quantidade. Além disso, a doença parece ter sido mais severa nas plantas que não receberam o tratamento com NAC. Já nas plantas que receberam 1500 mg de NAC, quase não foi possível a visualização de sintomas, mas o desenvolvimento da planta foi claramente afetado. As folhas estavam sempre com a aparência de murcha e uma coloração amarela, que indica falta de micronutrientes, e que dificultou a identificação de sintomas típicos da CVC. Após 2 meses plantadas em terra essas plantas voltaram a brotar e crescer.

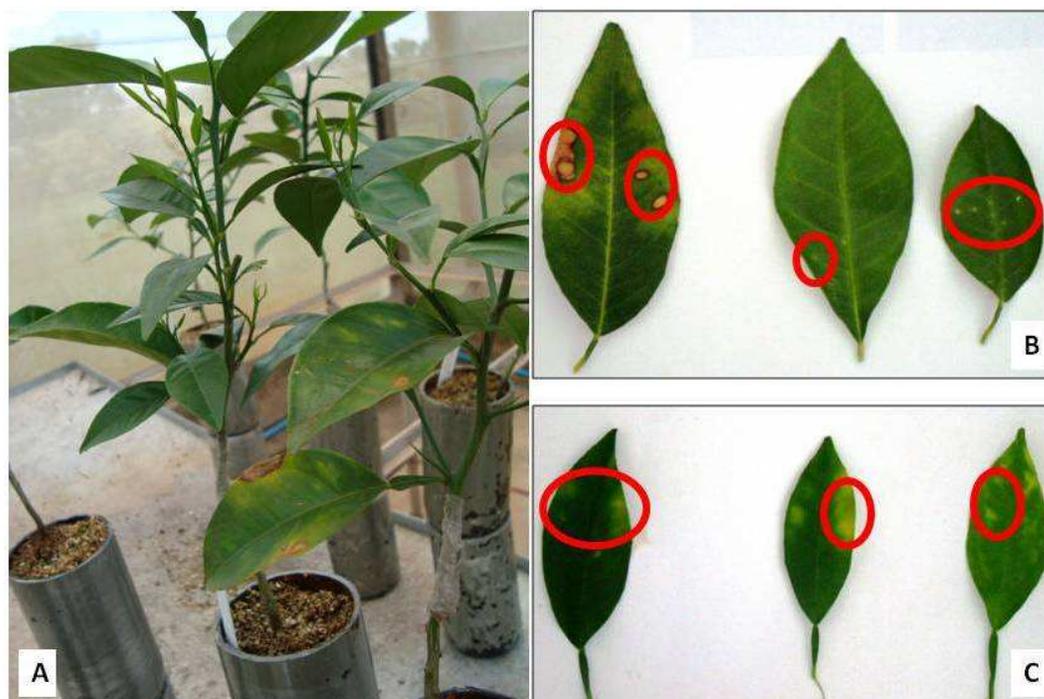


Figura 50. Plantas controle sem adição de NAC. É possível a visualização da planta inteira após 3 meses (A) e das folhas coletadas após 2 meses plantadas em terra e mantidas ainda em casa de vegetação (B e C). Os círculos vermelhos indicam pontos de lesão característicos da doença CVC.



Figura 51. Plantas submetidas ao tratamento com 120 mg de NAC. É possível a visualização da planta inteira após 3 meses (A) e das folhas coletadas após 2 meses plantadas em terra e mantidas ainda em casa de vegetação (B e C). Após 3 meses de tratamento quase não é possível a visualização de sintomas foliares (A). Os círculos vermelhos indicam pontos de lesão característicos da doença CVC (B e C).



Figura 52. Plantas submetidas ao tratamento com 600 mg de NAC. É possível a visualização da planta inteira após 3 meses (A) e das folhas coletadas após 2 meses plantadas em terra e mantidas ainda em casa de vegetação (B e C). A redução dos sintomas foliares é evidente e os resultados são parecidos com a adição de 120 mg de NAC. Os círculos vermelhos (B e C) indicam pontos de lesão característicos da doença CVC.



Figura 53. Plantas submetidas ao tratamento com 1500 mg de NAC. É possível a visualização da planta inteira após 3 meses (A) e das folhas coletadas após 2 meses plantadas em terra e mantidas ainda em casa de vegetação (B e C). Durante o tratamento com o NAC as plantas estavam sempre com a aparência de murcha e com as folhas amarelada (A). Após transplantadas para a terra, novas brotações surgiram, as folhas são novas e sem sintomas visíveis da CVC (B e C).

Após 2 meses de cultivo em terra, e sem tratamento com o NAC, foi possível averiguar que nas plantas que não haviam sido tratadas com o NAC, os sintomas da CVC apresentaram-se mais severos. As manchas cloróticas ocupavam a maior parte das folhas provocando lesões mais graves (**Figura 50B e C**). Além disso, a quantidade de folhas apresentando os sintomas da doença foi maior nas plantas sem tratamento com o NAC.

Já nas plantas que foram expostas à 120 e 600 mg de NAC, mesmo após 2 meses sem o tratamento, foram observados sintomas menos severos (**Figuras 51B-C, 52B-C**). As plantas que foram submetidas ao tratamento com 1500 mg (**Figura 53B-C**) de NAC mantiveram-se menos desenvolvidas, no entanto, várias brotações foram observadas. As folhas geralmente apresentavam-se menores e de coloração mais clara, indicando serem folhas novas. Nas mesmas não foram visualizadas manchas cloróticas.

No entanto, após 5 meses de tratamento os sintomas eram visíveis e com o mesmo grau de severidade em todas as plantas, mesmo aquelas submetidas ao tratamento com NAC.

3.2.1. Quantificação absoluta do número de bactérias por qPCR

Para a realização da quantificação absoluta do número de células de *X. fastidiosa* presente em cada amostra foi traçada uma curva padrão, obtida através dos valores de Ct gerados pelo qPCR para cada diluição de uma amostra padrão contendo uma quantidade conhecida de DNA de *X. fastidiosa* misturada com DNA de laranja Pêra (*Citrus sinensis*). A curva padrão obtida pode ser visualizada na **figura 54**.

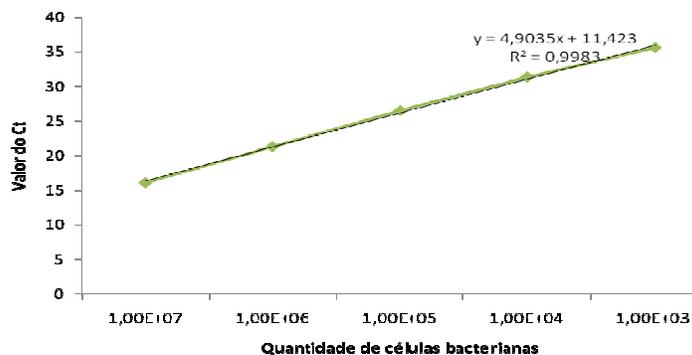


Figura 54. Curva padrão para a quantificação de células de *X. fastidiosa*.

Após a elaboração da curva o número de células bacterianas em cada amostra foi calculado, plotando-se o valor de Ct de cada amostra na curva padrão anteriormente gerada. O número médio de células de *X. fastidiosa* em cada amostra do experimento 1 pode ser visualizado na **figura 55** e do experimento 2, na **figura 56**. O tempo zero é referente à primeira coleta das folhas das plantas antes do início do tratamento com NAC e os tempos 1 e 3 referentes às coletas realizadas após 1 e 3 meses de tratamento.

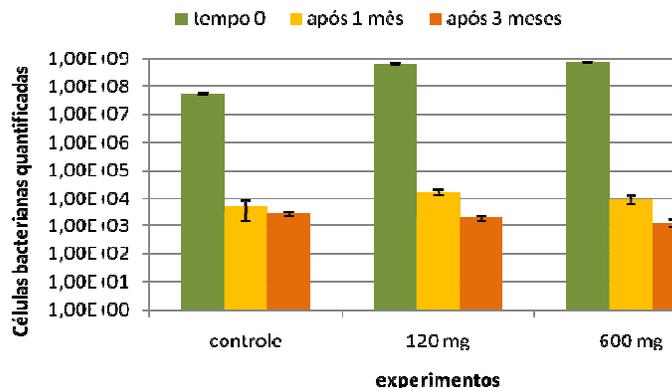


Figura 55. Número de células bacterianas quantificadas por qPCR nas amostras dos diferentes tratamentos do experimento 1.

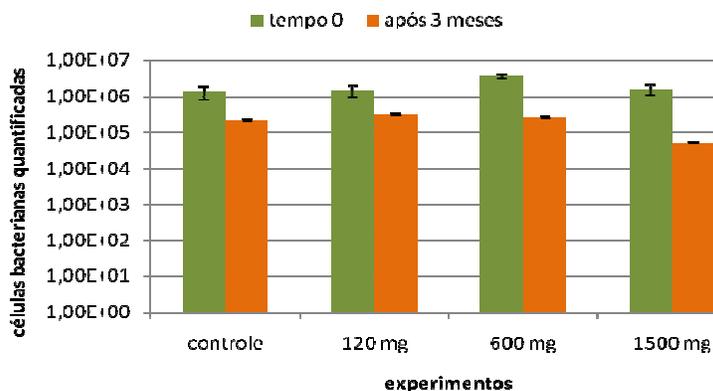


Figura 56. Número de células bacterianas quantificadas por qPCR nas amostras dos diferentes tratamentos do experimento 2.

Pelos resultados do experimento 1 é possível averiguar que não existe uma grande diferença entre o número de células bacterianas quantificadas com 1 ou 3 meses após o tratamento com o NAC, assim, no experimento 2 foram realizadas análises apenas após de 3 meses de tratamento. Com o passar do tempo foi observada uma diminuição do número inicial de bactérias nas plantas independente do tratamento avaliado, até mesmo no controle e, de modo geral, a quantidade de bactérias em cada planta não foi afetada pela presença do NAC.

3.2.2. Isolamento das bactérias

Para as plantas do experimento 2, também foi realizado o isolamento das bactérias presentes nas amostras de folhas coletadas após 3 meses de tratamento com o NAC. Os resultados obtidos estão apresentados na **figura 57** e **tabela 21**. Na tabela 21, para algumas amostras, mesmo após intervalo de 30 dias para crescimento das colônias, nenhuma delas pôde ser visualizada. Essas amostras apresentam a sigla *ind.* uma vez que o número de células bacterianas não pode ser determinado. A não determinação do número de colônias pode ser decorrente da não presença dessas células vivas nas amostras coletadas das plantas ou à própria técnica do isolamento. No entanto, como todos os procedimentos foram realizados no mesmo dia, com as mesmas soluções e pela mesma pessoa, são fortes os indícios de que a não detecção de células seria decorrente da não presença (ou morte) da bactéria na planta. Através dos dados obtidos é possível observar uma diminuição do número de células de *X. fastidiosa* com o tratamento com o NAC. Além disso, para as amostras em que foi possível determinar o número de UFC,

os dados resultantes da técnica de isolamento foram condizentes com aqueles encontrados utilizando-se qPCR.

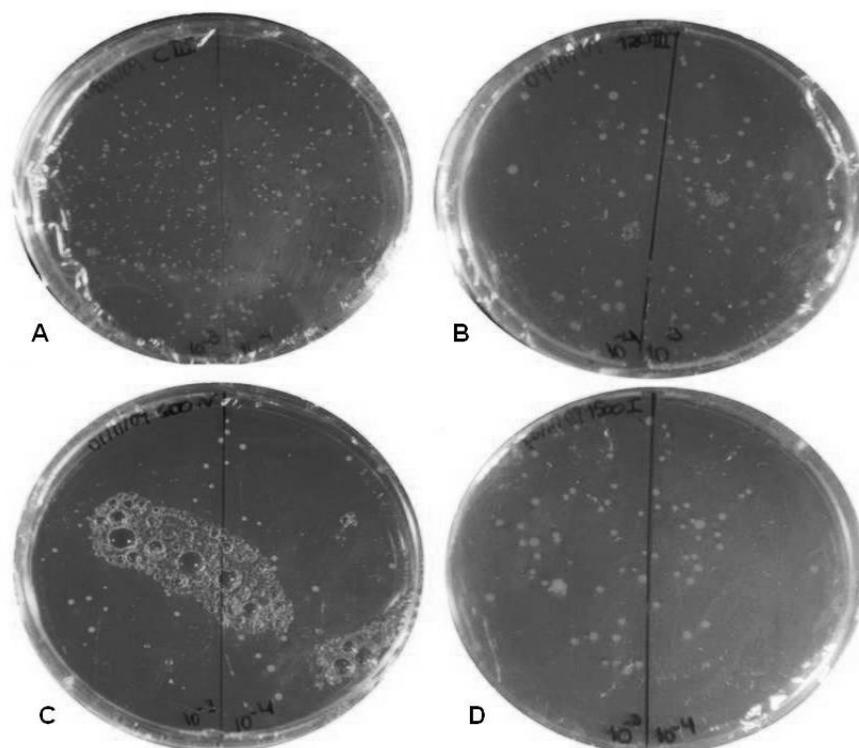


Figura 57. Diluição seriada do isolamento de *X. fastidiosa*. Em ambas as placas de Petri foram plaqueadas as mesmas diluições seriadas de cada amostra (10^{-3} e 10^{-4}). Em A foram plaqueadas as diluições da amostra controle, em B as do tratamento com 120 mg, em C com 600 mg e em D com 1500 mg.

Tabela 21. Número de UFC/mL em cada amostra do experimento 2.

Amostra	Tratamento	No. Bactérias por mL (isolamento)
I	Controle	Ind.
II	Controle	2,6E+06
III	Controle	2,58E+05
IV	Controle	2,96E+05
I	120 mg	9E+04
II	120 mg	Ind.
III	120 mg	Ind.
IV	120 mg	Ind.
I	600 mg	3E+04
II	600 mg	Ind.
III	600 mg	Ind.
IV	600 mg	4,8E+04
I	1500 mg	5E+04
II	1500 mg	6E+03
III	1500 mg	2E+04
IV	1500 mg	Ind.

3.2.3. Quantificação de NAC por HPLC

3.2.3.1. Derivatização de NAC

Foi preparada uma solução estoque de NAC a 100 $\mu\text{g/mL}$ já na solução nutritiva de Hoagland. 100 μL da solução foram adicionados a 300 μL do agente derivatizante (NPM). A mistura foi então incubada a 60°C por uma hora (**Figura 58**). Esse tempo de incubação da amostra a 60°C foi escolhido uma vez que em temperatura ambiente, para obtenção do mesmo sinal de detecção, seriam necessárias 6 horas (**Figura 59**). Após esse tempo a reação foi estabilizada pela adição de 10 μL de HCl 2M (**Figura 60**), que fez com que o pH da reação fosse menor de 2. As amostras foram analisadas usando uma coluna analítica de octadecilsilica (C18, descrita acima), acoplada a uma coluna de segurança C18 com uma vazão de 1,2 mL/min, uma alça de amostragem de 20 μL e um comprimento de onda de detecção fixo de 330 nm ($\lambda_{\text{máx}}$ absorção). Uma separação eficiente para a análise do NAC em um teste preliminar foi conseguida com uma fase móvel constituída de H₂O:ACN na proporção de 4:6 Com 0,1% de ácido fórmico na fase aquosa.

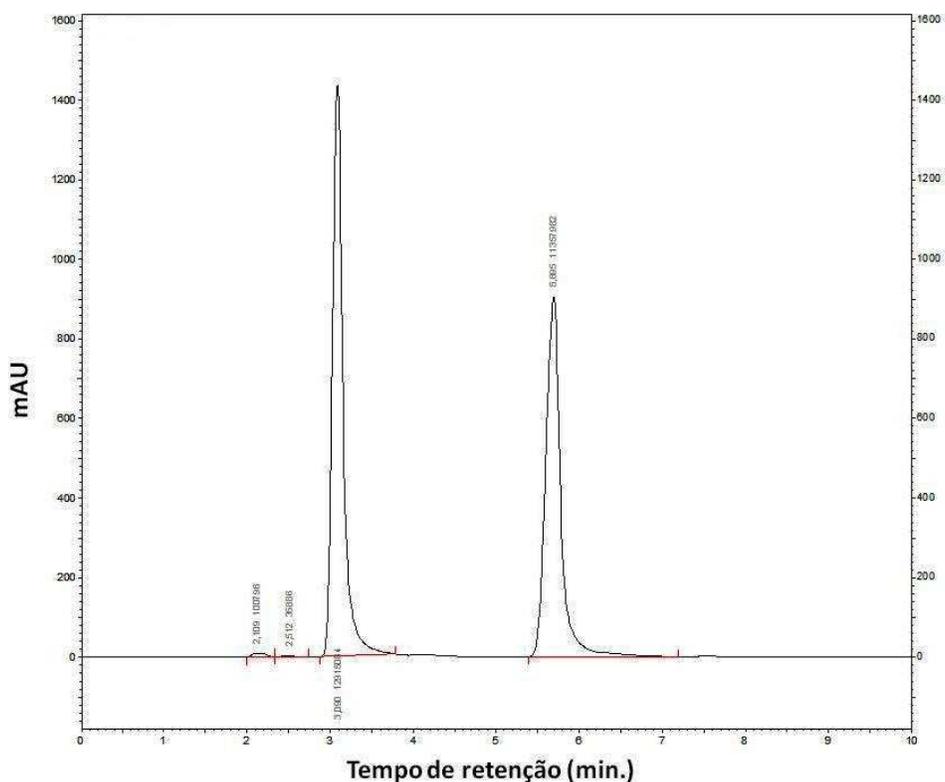


Figura 58. Cromatograma do produto de derivatização NAC-NPM (primeiro pico), após 1 hora a 60°C, provindo de uma amostra de NAC na concentração de 1000 µg/mL. Coluna Phenomenex C18, 25x4,6 mm, 5 µm Fase móvel H2O:ACN 30:70 $\lambda=330\text{nm}$.

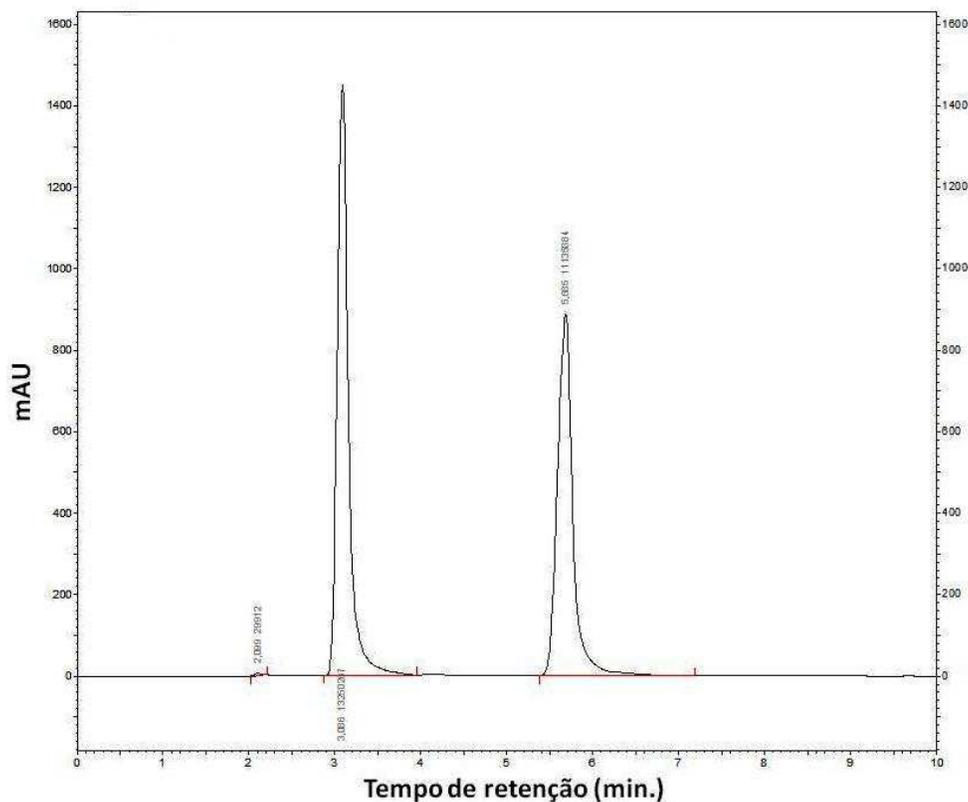


Figura 59. Cromatograma do produto de derivatização NAC-NPM (primeiro pico), após 6 horas a 60°C, provindo de uma amostra de NAC na concentração de 1000 µg/mL. Coluna Phenomenex C18, 25x4,6 mm, 5 µm Fase móvel H2O:ACN 30:70 $\lambda=330\text{nm}$. O mesmo sinal de detecção é obtido quando a mesma amostra é mantida por 1 hora a 60°C (Figura 35).

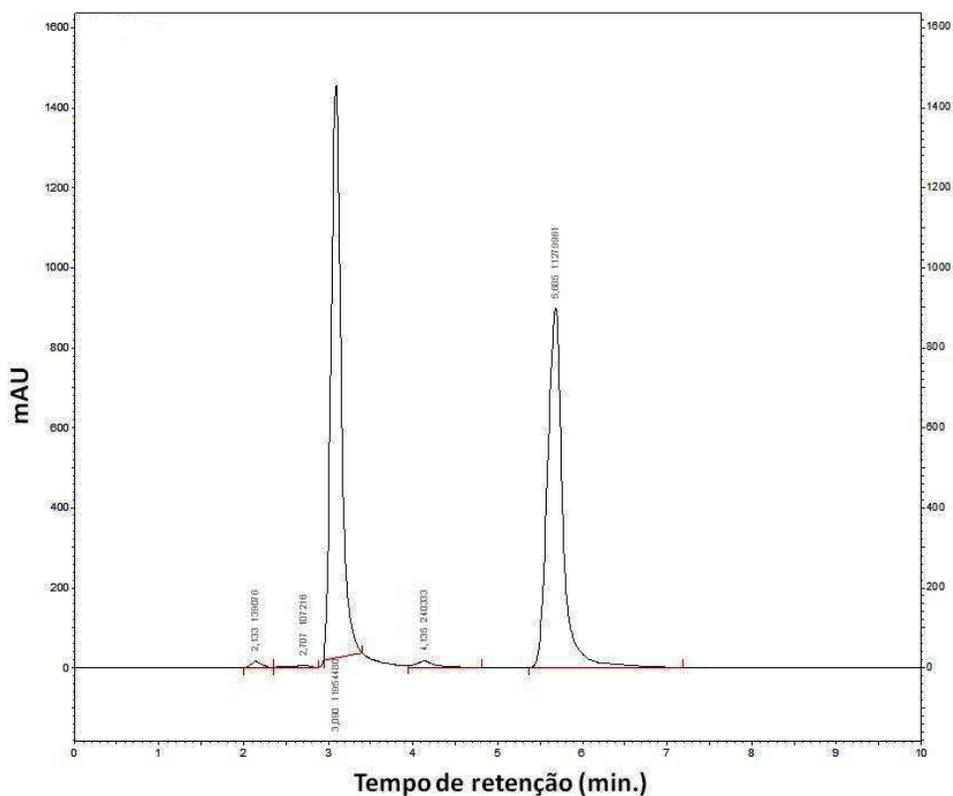


Figura 60. Cromatograma do produto de derivatização NAC-NPM (primeiro pico) utilizado para a corrida apresentada na figura 35, após 1 hora em temperatura ambiente, mostrando a estabilidade do produto da derivatização após a adição de 10 μ L de HCL 2M. Coluna Phenomenex C18, 25x4,6 mm, 5 μ m Fase móvel H2O:ACN 30:70 λ =330 nm.

3.2.3.2. Curva analítica e limites de quantificação e detecção

Após o estabelecimento das condições de derivatização de amostras e análise no HPLC, foi gerada uma curva padrão (**Figura 61 e 62**) através da qual as concentrações de NAC em amostras desconhecidas foram calculadas.

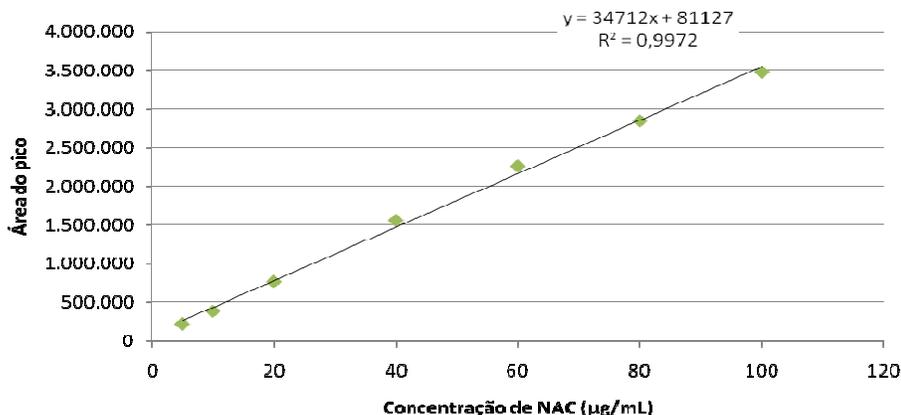


Figura 61. Curva padrão de NAC. A curva relaciona a concentração das amostras em µg/mL, no eixo X, com o valor da área dos picos referentes ao NAC apresentados no cromatograma, no eixo Y.

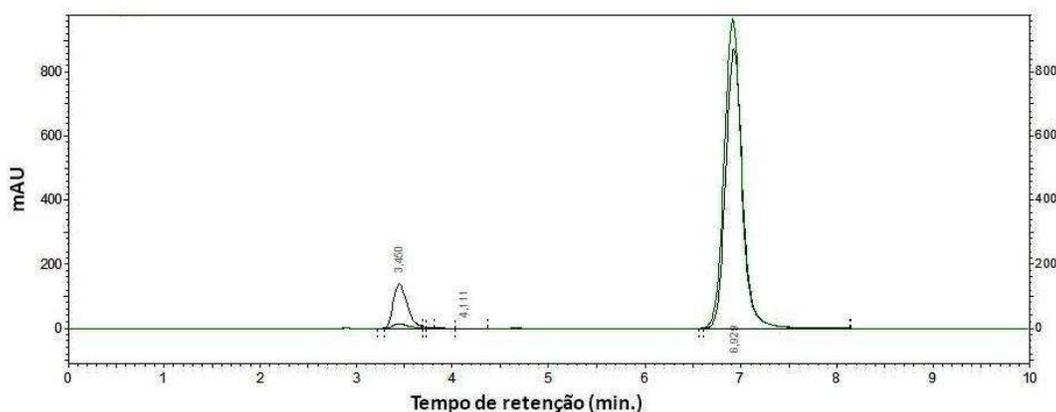


Figura 62. Cromatograma mostrando a menor concentração utilizada para a elaboração da curva, em verde, em comparação com a maior concentração, em preto. O primeiro pico é referente ao produto de derivatização NAC-NPM e o segundo, ao NPM restante.

A **figura 63** mostra o gráfico gerado a partir da área dos picos de NPM em cada uma das reações dos diferentes pontos que foram analisados para a confecção da curva padrão de NAC. É possível observar que essa curva é inversamente proporcional à curva gerada para o NAC.

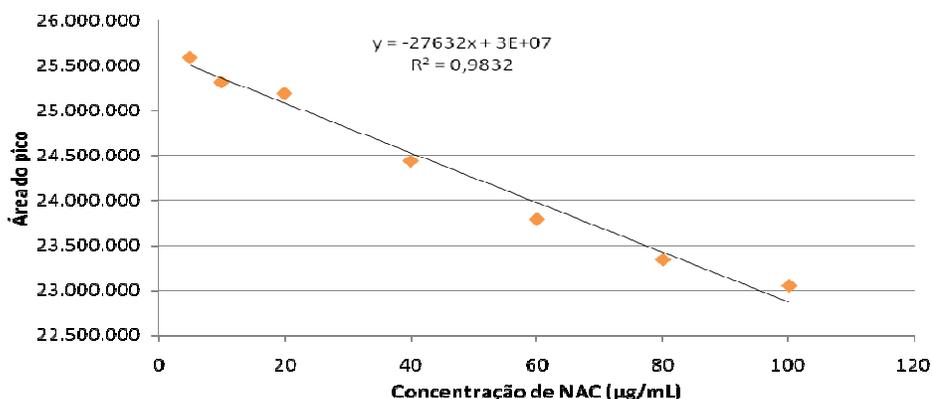


Figura 63. Curva padrão do NPM. No eixo X encontram-se as concentrações das amostras e no eixo Y os valores das áreas correspondentes. A curva é inversamente proporcional à curva gerada para o produto de derivatização NAC-NPM uma vez que o NPM é consumido durante a reação.

O limite de detecção calculado foi de 1,5 µg/mL e o limite de quantificação foi de 4,5 µg/mL. O limite de quantificação encontra-se abaixo do primeiro ponto da curva (5 µg/mL) o que mostra que a curva do NAC gerada esta adequada.

3.2.3.3. Validação do método analítico

Foram verificadas a precisão e exatidão intra e interdia. Para isso, foram avaliadas 3 concentrações de NAC: uma baixa (correspondente a 120% da primeira concentração da curva analítica) de 6 µg/mL, uma média (41,67% da concentração mais alta da curva analítica) de 50 µg/mL, e outra alta (90% da maior concentração da curva analítica) de 90 µg/mL. A precisão intradia foi avaliada através de análises em quintuplicata das respectivas soluções em um mesmo dia e a interdia foi obtida nas mesmas condições através de análises feitas em 3 dias não consecutivos (**Tabela 22**). A exatidão e precisão foram então calculadas (**Tabelas 23**).

Tabela 22. Precisão medida para 3 diferentes pontos da curva.

Amostras	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação
6 µg/mL	187713,4	2233,986	1,39
50 µg/mL	1461268	20364,74	0,90
90 µg/mL	2561011	23029,53	1,19

Tabela 23 Exatidão medida para 3 diferentes pontos da curva.

Amostras	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação
6 µg/mL	99,2	1,39	1,40
50 µg/mL	96,8	0,87	0,90
90 µg/mL	102,6	1,27	1,24

Como os coeficientes de variação medidos para os testes de precisão (**Tabela 22**) e exatidão (**Tabela 23**) ficaram abaixo de 2,0, que é o valor máximo permitido, o método desenvolvido para a quantificação do NAC mostrou-se preciso, exato e robusto.

3.2.3.4. Quantificação do NAC nas amostras coletadas

A partir da curva elaborada, a concentração de NAC presente em cada uma das amostras coletadas da parte coletora dos vasos de Leonard pôde então ser determinada (**Tabela 24**).

Tabela 24. Quantificação de NAC nas amostras coletadas

NAC total*	Conc. esperada **	Conc. medida	desv. Pad.
120 mg	0,48 mg/mL	0,288 mg/mL	0,0811
600 mg	2,4 mg/mL	1,98 mg/mL	0,4577
1500 mg	6 mg/mL	6,156 mg/mL	0,1818

*Quantidade total de NAC adicionado em cada um dos tratamentos

**Concentração de NAC calculada dividindo-se a quantidade total de NAC por 250 mL de solução nutritiva.

3.2.3.5. Estudo de degradação ambiental do NAC

Também foi realizado um estudo para verificar a degradação do NAC na solução nutritiva de Hoagland nas mesmas condições em que o experimento *in vivo* foi realizado. A solução nutritiva de Hoagland foi preparada e colocada na parte receptora dos vasos de Leonard (sem as plantas), assim como 600 mg de NAC. Os vasos de Leonard foram mantidos em casa de vegetação e após 1, 7 e 14 dias amostras recolhidas para quantificação do NAC em HPLC. Após a derivatização e análise das amostras esperava-se obter 187,5 µg/mL (750 µg/mL dividido por 4, fator de diluição da amostra

durante a reação de derivatização) de NAC se este não tivesse sofrido nenhuma degradação, no entanto, após 1 dia a concentração de NAC foi de 143,14 $\mu\text{g/mL}$ e após 7 e 14 dias, esta diminuiu para 63,22 $\mu\text{g/mL}$ e 3,15 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (**Figura 64**). A degradação da substância não seguiu uma taxa padrão, no entanto esse fato pode ser atribuído às diferentes temperaturas médias diárias, uma vez que durante as semanas de realização dos experimentos a flutuação de temperatura foi alta entre os dias.

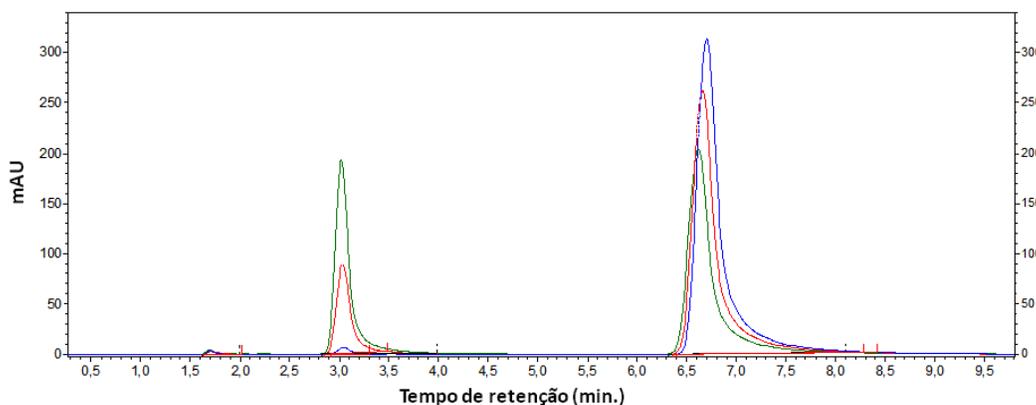


Figura 64. Cromatograma das amostras do experimento de degradação ambiental de NAC após 1 (verde), 7 (vermelho) e 14 dias (azul). O primeiro pico é referente ao produto de derivatização NAC-NPM e o segundo, ao NPM restante.

4. DISCUSSÕES

De modo geral o NAC afetou a formação de biofilme de *X. fastidiosa in vitro*, já que houve grande diminuição da massa celular e do número de células vivas da bactéria em biofilme quando exposta à substância. A diminuição da massa celular de biofilmes de diversas bactérias submetidos ao tratamento com NAC já foi reportada também por Pinna et al. (2005) que observaram que tal diminuição ocorreu principalmente com a adição de dosagens de NAC superiores a 1 mg/mL. Nos experimentos do presente trabalho com *X. fastidiosa*, foram testadas somente doses superiores a 1 mg/mL de NAC sendo que as 3 doses testadas foram capazes de diminuir a massa celular do biofilme da bactéria. Doses de NAC inferiores a 1 mg/mL já haviam sido estudadas previamente no trabalho de iniciação científica (Proc. FAPESP no 2007/51357-5.) sem que um resultado estatisticamente significativo tivesse sido observado. Ricotti (2005) em experimentos com *P. aeruginosa* determinou que a dose mínima para que a formação do biofilme, quantificada pela massa celular, fosse completamente inibida foi de 4 mg/mL de NAC. Apesar das diferentes doses mínimas inibitórias de crescimento

utilizadas nos trabalhos, o efeito do NAC em biofilmes de diferentes bactérias tem sido comprovado, o que sugere que o NAC possui um amplo espectro de ação. As diferenças nas doses mínimas de inibição podem ser explicadas pela diversidade de espécies e estirpes de bactérias estudadas (RIISE et al, 2000). Também é possível concluir que a ação do NAC é dose-dependente, e que esteja sujeita a outro fator: a quantidade do inóculo testado, como foi apontado por Parry *et al.* (1977). Nos diferentes trabalhos já mencionados, os inóculos não apresentavam a mesma quantidade de células (geralmente entre de 10^5 à 10^7 UFC/mL), o que dificulta a comparação precisa dos resultados. Por exemplo, Parry *et al.* (1976), assim como Ricotti (2005), trabalharam com *P. aeruginosa*, os primeiros encontraram uma taxa de inibição para o crescimento do biofilme de 2 µg/mL de NAC, enquanto o segundo autor encontrou uma concentração inibitória muito maior, 4 mg/mL. Risii et al (1999) realizaram experimentos com duas bactérias diferentes, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*, determinando a concentração do composto capaz de inibir 100% a formação do biofilme que foram respectivamente 10 e 50 mg/mL e as dosagens que diminuíram significativamente a produção do biofilme foram de 5 e 20 mg/mL, o que mostra que a susceptibilidade das diferentes bactérias ao NAC varia bastante. Olofsson et al. (2003) também estudaram várias espécies de bactérias Gram positivas e Gram negativas ao NAC e observaram que com a dose de 0,5 mg/mL, 5 das 10 espécies de bactérias testadas tiveram seu crescimento totalmente inibido, sendo que com 2 mg/mL de NAC houve uma inibição de crescimento de todas as espécies de bactérias testadas. Concluíram então, que o efeito do NAC foi diferente para cada espécie avaliada, mas que a diferença não dependia do fato da bactéria ser Gram positiva ou negativa.

No mesmo trabalho os autores também realizaram a quantificação de EPS no biofilme e encontraram diminuição da quantidade do mesmo. No entanto ao avaliarem quantidade total de EPS no biofilme, é preciso salientar o fato de que a massa celular também diminuiu assim uma diminuição total da quantidade de EPS pode mascarar um aumento da produção do exopolissacarídeo realizada por cada célula. Nos experimentos de quantificação de EPS do presente trabalho também foi realizada a quantificação total da substância não se padronizando a quantidade inicial de células para a realização da medida, assim houve uma diminuição geral na quantidade de EPS encontrada nas células de biofilme. Porém considerando também a diminuição do número de células a produção de EPS por célula provavelmente aumentou, o que poderia ser uma tentativa

das bactérias de dificultar a penetração de NAC no biofilme. Indução do EPS como um mecanismo de resposta a compostos antimicrobianos já foi reportada como forma de aumentar a resistência da bactéria (Wai et al, 1998).

O modo de ação do NAC no biofilme de bactérias ainda permanece desconhecido, porém têm-se sugerido que este deva interferir nos receptores adesivos através de sua capacidade de desfazer pontes dissulfeto. Segundo Leite *et al.* (2002) o processo inicial de adesão da *X. fastidiosa* é decorrente da presença de grupos thiols (SH) na superfície das células bacterianas. A presença destes grupos SH seria uma consequência da existência de proteínas transmembrana e adesinas que exibem resíduos de metionina na porção extracelular. O resíduo (SH) seria adesivo uma vez que possui carga negativa, porém, sua forma oxidada (S) não. Em um processo inicial de adesão, essas cargas negativas na membrana da bactéria estariam atraindo vários cátions como Ca^{2+} e Mg^{2+} , principalmente, além de alguns cátions monovalentes, como o Zn, e estes participariam de pontes unindo as membranas das bactérias às paredes dos vasos da planta, que seriam negativamente carregados devido à dissociação do ácido poligalacturônico (**Figura 65**). Esse seqüestro do zinco explicaria os sintomas de deficiência deste mineral na doença CVC. Quanto ao seqüestro de cálcio, o envolvimento de adesinas dependentes desse cátion já foi relatado para *Candida albicans*, um fungo patógeno humano (LEITE *et al.*, 2001).

Além disso, a *X. fastidiosa* apresenta um gene para a enzima MsrA (metionina sulfóxido redutase), que tem um papel importante na manutenção das propriedades adesivas dos grupos thiols da bactéria, pois os manteria na forma reduzida (SH). Essa enzima é encontrada também em algumas bactérias patogênicas de humanos, possuindo um papel igualmente importante (LEITE *et al.*, 2002)

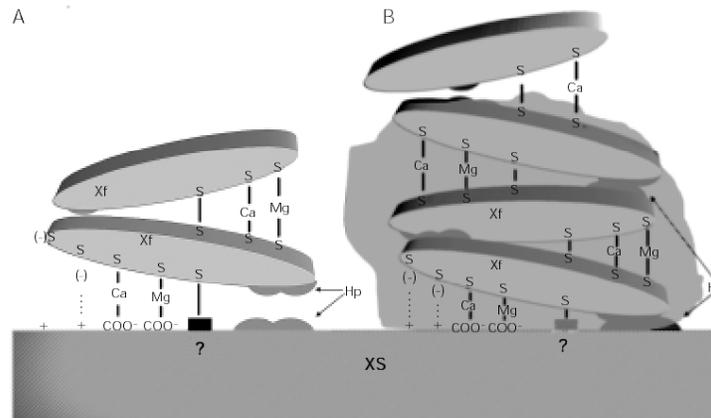


Figura 65. Modelo proposto para explicar a adesão e agregação de *Xylella fastidiosa*. A figura mostra uma célula de *X. fastidiosa* (Xf) em contato com a superfície do xilema (XS) e também com outra célula bacteriana. Todos os pontos potenciais de adesão estão representados. Na interação entre as células de *X. fastidiosa* e XS ocorrem interações hidrofóbicas entre a porção hidrofóbica (Hp) da bactéria e do xilema. Também ocorrem interações adicionais entre as superfícies com grupos contendo enxofre (grupos sulfídricos) e cargas, localizadas no xilema, (S-? S-+) diretamente ou ligadas pelo cálcio e magnésio (S-Ca-COO-, S-Mg-COO-). Acredita-se que a adesão células-célula seja mediada por interações hidrofóbicas, pela formação de pontes dissulfeto (S-S) e pelos grupos enxofre ligados por íons divalentes (S-Ca-S, S-Mg-S). A situação descrita em **B** envolve a deposição de multicamadas constituídas por células suportadas pela arquitetura provida pelos exopolissacarídeos, uma goma representada pela área sombreada. (LEITE *et al.*, 2002).

Assim o NAC, sendo um análogo de cisteína, e por possuir então, grupos SH, poderia por competição se ligar aos resíduos negativos das proteínas de adesão e evitar com que pontes dissulfeto fossem realizadas com outras células ou com uma superfície, comprometendo assim a eficiente adesão e por consequente a formação do biofilme. Sochman (2002) também propõem tal mecanismo de ação para a molécula, e que a mesma bloquearia receptores de adesão da bactéria.

Pelos resultados obtidos nesse trabalho, também sugere-se uma possível ação tóxica do NAC para as células bacterianas, já que através dos estudos com a diluição seriada de amostras de biofilme para contagem de UFC (unidades formadoras de colônia) foi possível verificar um menor ou não crescimento das bactérias quando submetidas ao tratamento com o NAC. Esse resultado poderia ser explicado por uma ação bacteriostática do NAC ou um efeito tóxico que resultaria na morte celular da bactéria. A hipótese do efeito bacteriostático foi descartada uma vez que novos experimentos de diluição seriada foram realizados depois de 3 lavagens com água e o não crescimento das células continuou sendo observado. Além disso, em uma situação

in vitro na qual não existem as respostas de defesa da planta infectada nem a forte pressão do fluxo xilema e os nutrientes encontram-se disponíveis no meio de cultura, se a ação da molécula fosse apenas na desestruturação do biofilme, este apenas não se formaria mas as células poderiam continuar vivas na forma planctônica, porém isto não ocorreu. Assim, presume-se que o NAC possua uma ação tóxica para as células de *X. fastidiosa*. Risii e colaboradores (1999) também citam um possível efeito tóxico do NAC.

Como o NAC se mostrou uma molécula promissora para o controle do biofilme de *X. fastidiosa in vitro*, foram realizados alguns estudos com plantas de laranja Pêra com sintomas de CVC. Os sintomas foram visivelmente menores quando as plantas foram submetidas ao tratamento com o NAC. Além disso, os resultados obtidos pelo isolamento de *X. fastidiosa* em meio de cultura sólido mostraram uma possível diminuição do número de bactérias nas plantas submetidas ao tratamento com o NAC. Com o uso da técnica de HPLC foi possível averiguar que o NAC poderia ser translocado pela planta, já que as concentrações medidas do composto estavam abaixo daquelas esperadas, e assim, chegar aos vasos de xilema afetados pela bactéria. No entanto, com a adição de 1500 mg de NAC a absorção da substância pela planta não ocorre. A adição de alta concentração do NAC (1500 mg em 250 mL da solução nutritiva) possivelmente foi responsável por causar um estresse salino (osmótico) na planta que por sua vez ativaria alguns mecanismos para evitá-lo. Visualmente a quantidade de solução de Hoagland absorvida por essas plantas foi muito baixa, o que também acreditamos ser responsável pela murcha das folhas e menor desenvolvimento fisiológico das plantas, já que a planta também enfrentou o estresse hídrico.

Com 1500 mg de NAC, apesar da técnica de HPLC mostrar que a substância não estaria sendo absorvida pela planta, houve uma diminuição do número de bactérias e de sintomas visíveis nas amostras das folhas. Podemos associar essa diminuição do número de bactérias e sintomas ao estresse osmótico, que por sua vez gerou um estresse hídrico na planta. O grande estresse proporcionado à planta pela alta concentração de NAC (1500 mg em 250 mL) causou uma queda das folhas, murcha e grande prejuízo visível para o desenvolvimento fisiológico da planta, assim essa talvez seja uma explicação do porque o número de bactérias quantificado tenha diminuído. Com as doses mais baixas (120 e 600 mg) de NAC, também foi observado uma grande diminuição dos sintomas e número de células bacterianas nas amostras das folhas, mas as plantas apresentaram o desenvolvimento fisiológico esperado para a idade e condições de crescimento. Assim,

nessas doses o NAC mostrou-se eficiente para o controle da bactéria não causando problemas para o desenvolvimento da planta.

Apesar do experimento com HPLC mostrar que o NAC, nas doses menores, poderia de fato estar sendo absorvido pela planta, o local exato para o qual a substância estaria sendo translocada e como ela estaria interagindo uma vez absorvida ainda não foram investigados. Para isso poderia ser realizado, futuramente, um estudo com a substância marcada radioativamente. Esse tipo de estudo é importante pois revelaria se a planta estaria competindo também, pelo uso do NAC, já que este é análogo de um aminoácido, a cisteína; se a substância poderia ser metabolizada já na raiz ou se de fato seria translocada até o vasos de xilema afetados pela bactéria. Pelas evidências obtidas através da diminuição visual dos sintomas nas plantas submetidas ao tratamento com o NAC, acreditamos que a substância de fato esteja sendo translocada através dos vasos condutores de seiva bruta, no entanto, a concentração que de fato é apresentada às bactérias poderia ser bem menor do que a esperada. Assim, o estudo detalhado sobre a translocação da substância é essencial até mesmo para que novos métodos de apresentação da mesma para a planta possam ser experimentados e discutidos.

Com base nos dados obtidos através dos experimentos realizados com as plantas, acreditamos que a substância possa ser absorvida e translocada através do xilema. Ao entrar em contato com a bactéria, por competição, evitaria que as pontes dissulfeto célula-célula e célula-superfície, se formem e assim impediria a formação eficiente do biofilme. Apesar de prevenir a formação do biofilme, como a dose de NAC apresentada para a bactéria deve ser bem menor do que as testadas *in vitro* provavelmente devido ao modo de apresentação e translocação, o efeito tóxico da substância pode ter sido menor. Mesmo assim através da técnica de isolamento foi visto que as células bacterianas provavelmente diminuiriam dentro da planta. Desse modo, o NAC não mataria todas as células, o que explicaria a pequena diferença observada no número de bactérias quantificadas, e não evitaria também que as bactérias se espalhassem pela planta. No entanto, como os sintomas da CVC têm sido associados à obstrução de vasos condutores, a não formação do biofilme evitaria que os sintomas aparecessem (**Figura 66**).

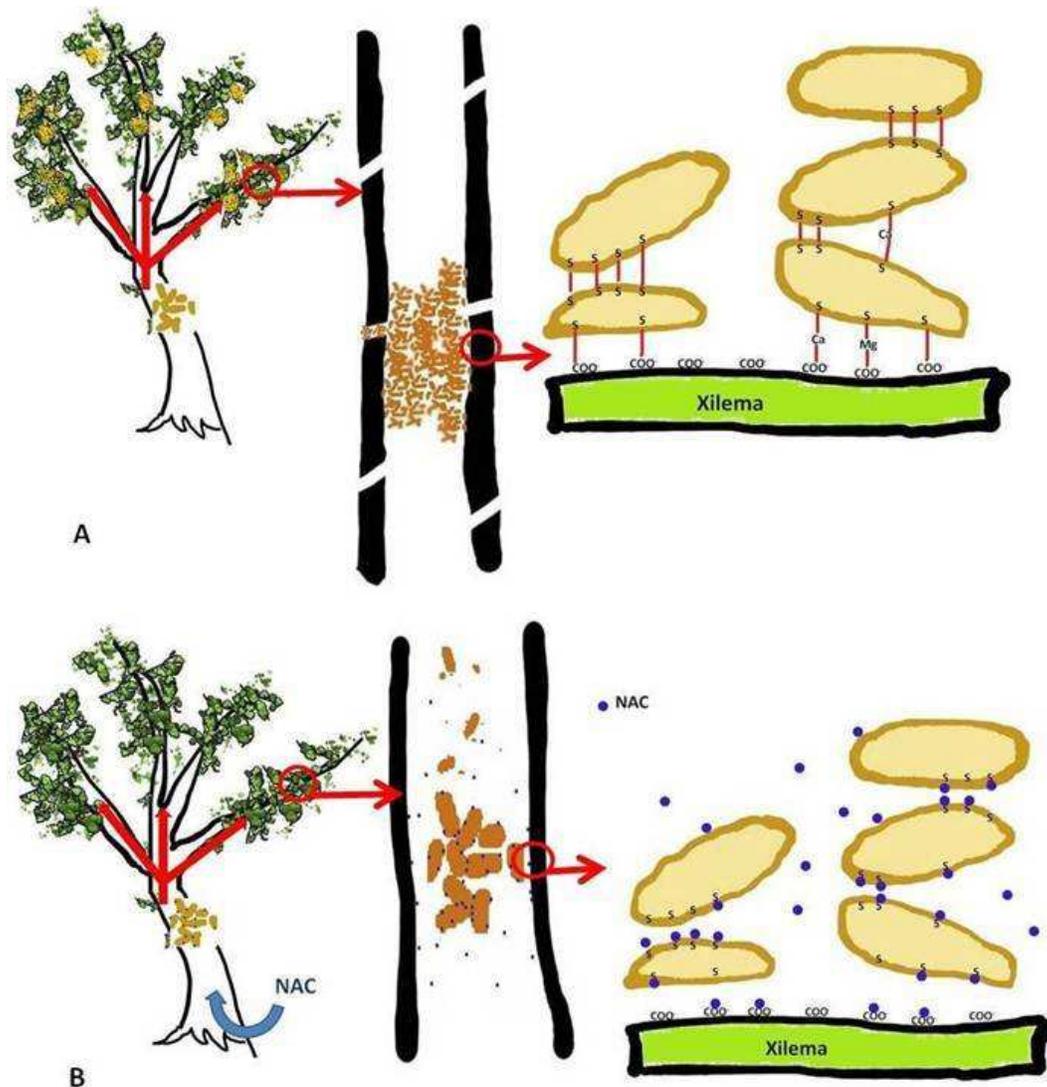


Figura 66. Modelo do modo de ação de NAC *in vivo*. Em **A**, está ilustrado o modo de evolução normal da doença com o aparecimento dos sintomas. As bactérias começam um processo de adesão entre si e na superfície do xilema, com a formação do biofilme, responsável pela obstrução de vasos condutores e aparecimento de sintomas. Já em **B**, o NAC atua evitando a formação do biofilme. A substância (representada em azul), por competição, se ligaria aos radicais das adesinas (fimbriais ou afimbriais) e do próprio xilema não permitindo assim que as pontes dissulfeto entre as adesinas das bactérias se realizassem, evitando a formação do biofilme. Assim sintomas visíveis não seriam observados ou observados em menor grau de severidade.

Além disso, pelo modelo proposto, a ação do NAC dependeria de sua disponibilidade para desfazer as pontes dissulfeto. Portanto, uma vez interrompida a apresentação da substância para a bactéria, como muitas ainda estariam vivas, poderiam formar o biofilme e novamente os sintomas apareceriam. Quando o tratamento com NAC foi interrompido, durante os primeiros dois meses ainda foi possível observar uma

diferença na quantidade de sintomas apresentada entre as plantas controle e as tratadas, no entanto após esse tempo observou-se o resurgimento dos sintomas. Esse tempo entre o interrompimento do tratamento e o surgimento de novos sintomas seria o tempo que as bactérias, ainda presentes nas plantas levariam formar seu biofilme e obstruir os vasos condutores.

Futuramente, outros estudos poderão ser realizados com o NAC com diferentes formas de administração para que se comprove qual modo seria mais eficiente. Além disso, é importante ressaltar que o presente trabalho foi pioneiro nesse estudo, assim muitos estudos e padronizações, por exemplo do tempo de administração, dose da substância entre outras variáveis ainda necessitariam ser realizados. Apesar do estudo da substância ser pioneiro para *X. fastidiosa*, este mostra-se promissor, pois resultados positivos puderam ser observados nos estudos realizados. Além disso, a substância é interessante pois como já vem sendo utilizada na medicina muitos estudos sobre sua influência no organismo humano já foram realizados, mostrando que ela não seria tóxica, ou seria capaz de provocar nenhuma outra adversidade à saúde humana. Pelos resultados de degradação também foi possível constatar um curto tempo de meia-vida da substância no ambiente, o que também evitaria riscos ambientais, como contaminações.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar dos grandes avanços nas últimas décadas, o estudo sobre o NAC e seus efeitos ainda é pouco compreendido. Existem muitas especulações, porém estudos mais detalhados sobre seu mecanismo de interferência na adesão e formação de biofilmes ainda devem ser realizados. Segundo Leite et al. (2001), este compreenderá um dos grandes desafios dos fitopatologistas neste novo século: entender a química, a bioquímica e a físico-química da adesão e procurar substâncias mais baratas que possam fazer o bloqueio da adesão em condições de campo, levando ao controle do patógeno, sem que seja preciso eliminar o organismo em questão ou contaminar o ambiente com produtos químicos de largo espectro.

Nesse sentido o NAC é uma molécula anti-adesiva promissora para desestruturação do biofilme de *X. fastidiosa in vivo*. O presente trabalho foi pioneiro ao realizar o estudo *in vitro* de uma substância que há tempos tem sido utilizada na medicina para o combate de doenças em humanos causadas por bactérias formadoras de

biofilmes, mas visando o controle de uma bactéria fitopatogena também formadora de biofilmes. Além disso, buscamos uma visão prática do possível efeito do NAC em plantas, visando uma real perspectiva de manejo da doença. Muitos outros estudos ainda terão que ser realizados antes que o NAC possa ser comercializado industrialmente , no entanto os resultados são promissores na busca de formas alternativas de controle de fitopatógenos e abre novas possibilidades de estudo.

BIBLIOGRAFIA

Almeida, R. P. P.; Purcell, A. H. 2006. Patterns of *Xylella fastidiosa* colonization of the precibarium of shapshooter vectors relative to transmission to plants. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, 99: 884-90.

Altschul, S. F., Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, 215: 403-10.

Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schaffer, A. A.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, 25: 3389-402.

Alva, H. K.; Chen, E. Q. 1995. Effects of external copper concentrations on uptake of troa elements by citrus seedlings. **Soil Science**, 159: 59-64.

Alves, E. 2003. *Xylella fastidiosa*: adesão e colonização em vasos do xilema de laranjeira doce, cafeeiro, ameixeira, fumo e espécies de cigarrinhas vetoras e formação de biofilme sobre a película de poliestireno. Tese apresentada a Escola superior de agricultura 'Luíz de Queiroz' - USP para obetenção do grau de doutor em Agronomia, Piracicaba.

Amaro, A. A.; Salva, R. A. 2001. Production of citrus nursery trees in São Paulo State: an economic vision. In: **INT. CONG. CITRUS NURSERYMEN**, Ribeirão Preto. Proceedings. Ribeirão Preto, 6: 55-66.

Beckman, K. B.; Lee, K. Y.; Golden, T.; Melov, S. 2004. Gene expression profiling in mitochondrial disease: assessment of microarray accuracy by high-throughput Q-PCR. **Mitochondrion**, 4: 453

Bolstad, B. M.; Irezarry, R. A.; Astrand, M.; Speed, T. P. 2003. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. **Bioinformatics**, 19: 185-193.

Boor, K. J. 2006. Bacterial Stress responses: what doesn't kill them can make them stronger. **PLOS Biology**, 4: 18-20.

Brodersen, D. E., W. M. Clemons, A. P. Carter, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly, and V. Ramakrishnan, O. 2000. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. **Cell**, 103:1143-115

Brooun A, Liu S, Lewis K. 2000. A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrob Agents Chemother.**, 44: 640-646.

Chatterjee, S.; Newman, K. L.; Lindow, S. E. 2008. Cell-to-cell signaling in *Xylella fastidiosa* supress moviment and xylem vessel colonization in grape. **MPMI**, 21: 1309-1315.

Chen, K.; Sun, G. W.; Chua, K. L.; Gam, Y-H. 2005. Modified virulence of antibiotic-induced *Burkholderia pseudomallei* filaments. **Antimicrob. Agents chemother.**, 49: 1002-1009.

Chopra, I.; Roberts, M. 2001. Tetracycline Antibiotics: mode of action, applications, molecular biology and Epidemiology of Bacterial resistance. **Microbiol and mol. Biol. Reviews**, 65: 232- 260.

Coletta-Filho, H. D.; Machado, M. A. 2003 Geographical Genetic Structure of *Xylella fastidiosa* from Citrus in São Paulo State, Brazil. **Phytopathology**, 93:28-34.

Connel, S. R.; Tracz, D. M.; Nierhaus, K. H.; Taylor, D.E. 2003. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 47:3675-3681.

Costerton, J. W.; Cheng, K.-J.; Geesey, G.G.; Ladd, T.I.; Nickel, J. C.; Dasgupta, M; Marrie, T. J. 1987. Bacterial Biofilms in Nature and Disease. **Ann. Rev. Microbiol.**, 41:435-464.

Costerton, J. W.; Lewandowski, Z.; Caldwell, D. E.; Korber, D.; Lappin, S. 1995. Microbial Biofilms. **Annu. Rev. Microbiol.**, 49: 711-745.

Czworkowski, S.; Wang, J.; Steitz, T. A.; Moore, P. B. 1994. The crystal structure of elongation factor G complexed with GDP at 2.7 Å resolution. **EMBO J.**, 13:3661-4.

Davey, M. E.; O'toole, G. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiol. Mol Biol.**, 64:847-867.

Davidson, A.; Dassa, E.; Orelle, C.; Chen, J. 2008. Structure, Function, and Evolution of bacterial ATP-Binding cassette systems. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 72: 317-364.

Davis, M. J.; French, W. J.; Schaad, N. W. 1981. Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum scald. **Curr. Microbiol.**, 5: 311-316.

De Kievit, T. R.; Iglewski, B. H. 1999. Quorum sensing, Gene expression, and Pseudomonas Biofilms. In: **Methods in Enzymology: Biofilms**. ed: Doyle, R. J. Academic Press, 310: 117-119.

De La Fuente, L; Burr, T. J., Hoch, H. C. 2007. Mutations in type I and type IV pilus biosynthetic genes affect twitching motility rates in *Xylella fastidiosa*. **J. Bacteriol.**, 189:7507-10.

De La Fuente, L; Burr, T. J., Hoch, H. C. 2008. Autoaggregation of *Xylella fastidiosa* cells is influenced by type I and type IV pili. **Appl Environ. Microbiol.**

De Souza, A. A.; Takita, M. A.; Coletta-Filho, H. D.; Caldana, C.; Goldman, G. H.; Yanai, G. M.; Muto, N. H.; Costa de Oliveira, R.; Nunes, L. R.; Machado, M. A. 2003. Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. **Mol. Plant. Microbiol. Interact.**, 16: 867-875.

- De Souza, A. A.; Takita, M. A.; Coletta-Filho, H. D.; Caldana, C.; Yanai, G.M., Muto, N. H.; Costa de Oliveira, R.; Nunes, L. R.; Machado, M. A. 2004. Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation in vitro. **FEMS Microbiology Letters**, 237:341-353.
- De Souza, A. A.; Takita, M. A.; Pereira, E. O.; Coletta-Filho, H. D.; Machado, M. A. 2005. Expression of pathogenicity-related genes of *Xylella fastidiosa* in vitro and in planta. **Curr. Microbiol.**, 50:223-8.
- De Souza, A. A.; Takita, M. A.; Coletta-Filho, H. D.; Barata, R. M.; Camargo, L. E.; Machado, M. A. 2006. Genômica Funcional de Bactérias Fitopatogênicas. In: Luz, W. C. (Org.). Revisão Anual de Patologia de Plantas. Passo Fundo: **RAPP**, 14: 1-57.
- Donadio, L. C.; Moreira, C. S.(eds.). 1998. Clorose Variegada dos citros. Bebedouro: Estação Experimental de Citricultura, p. 162.
- Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Anal. Chem.**, 28: 350-6.
- Dunny, G. M.; Leonard, B. A. B. 1997. Cell-cell communication in Gram- positive bacteria. **Annu. Microbiol.**, 51: 527-64.
- Engelberg-Kulka, H; Amitai, S; Kolodkin-Gal, I; Hazan, R. 2006 Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria. **PLoS Genet.**, 2:e135.
- Espinosa-Urgel, M.; Salido, A.; Ramos, J. L. 2000. Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. **J. Bacteriol.**, 182: 2363-9.
- Evans, D. J.; Allison, D. G.; Brown, M. R. W.; Gilbert, P. 1991. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms towards ciprofloxacin: effect of specific growth rate. **J. Antimicrobial Chemotherapy**, 27: 177-184.
- Fath, M. S.; Kolter, R. 1993. ABC transporters: bacterial exporters. **Microbiological Reviews**, 57: 995-1017.
- Feil, H.; Feil, W.S.; Lindow, S. E. 2007. Contribution of fimbrial and afimbrial adhesins of *Xylella fastidiosa* attachment to surfaces and virulence to grape. **Phytopathology**, 97: 318-24
- Fernandes Jr., Waldir Barros. "Analyses of the World Processed Orange Industry." Ph.D. Dissertation. Gainesville, FL: University of Florida, August 2003. p. 108.
- Fiorentino, G.; Ronca, R.; Cannio, R.; Rossi, M.; Bartolucci, S. 2007. MarR-Like Transcriptional Regulator Involved in Detoxification of Aromatic Compounds in *Sulfolobus solfataricus*. **J. Bacteriol.**, 189: 7351-7360.
- Fux, C. A.; Costerton, J. W.; Stewart, P. S.; Stoodly, P. 2005. Survival strategies of infectious biofilms. **TRENDS in Microbiology**, 13: 34-40.

- Gilbert, P.; Das, J.; Foley, I. 1997. Biofilm susceptibility to antimicrobial. **Adv. Dent. Res.**, 11: 160-167.
- Gilhabert, M. R.; Kirkpatrick, B. C. 2005. Identification of *Xylella fastidiosa* antivirulence genes: hemagglutinin adhesions contribute to *X. fastidiosa* biofilm maturation and colonization and attenuate virulence. **Mol. Plant-Microbe Int.**, 8: 856-68.
- Giulidori, A. M.; Gualerzi, C. O.; Soto, S.; Vila, J.; Tavío, M. M. 2007. Review on Bacterial Stress Topics. **Ann. NY Acad. Sci.**, 1113: 95-104.
- Goh, E. B.; Yim, G.; Tsui, W.; McClure, J.; Surette, M. G.; Davies, J. 2002. Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 99: 17025-17030.
- Gooderham, W. J.; Gellatly, S. L.; Sanschagrin, F.; McPehee, J. B.; Bains, M.; Cosseau, C.; Levesque, R. C.; Hancock, R. E. W. 2009. The sensor kinase PhoQ mediates virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**, 155: 699-711.
- Hantke, K. 2001. Bacterial zinc transporters and regulators. **Biometals**, 13: 239-49.
- Hartung, J. S.; Beretta, J.; Brlansky, R. H. et al. 1994. Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. **Phytopathology**, 84: 591-597.
- Hearon, S. S.; Sherald, J. L.; Kostka, S. J. 1980. Association of xylem-limited with elm, sycamore, and oak leaf scorch. **Canadian Journal of Botany**, 58: 1986-1993.
- Hoagland, D. R.; Amon, D. I. The water culture method for growing plants without soil. **Univ. of Calif. Circ.**, 347: 32.
- Hoiczuk, E.; Roggenkamp, A.; Reichenbecher, M.; Lupas, A.; Heesemann, J. 2000. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. **The EMBO Journal**, 19: 5989-5999.
- Hopkins, D. L., Adlerz, W. C. 1988. Natural host of *Xylella fastidiosa* in Florida. **Plant Disease**, 72: 429-431.
- Hopkins, D. L. 1989. *Xylella fastidiosa*- Xylem-limited bacteria pathogen of plants. **Annu Review of Phytopathology**, 27: 271-290.
- Hopkins, D. L. 1995. *Xylella fastidiosa*. In: Singh, U. S.; Singh, R. P.; Kohmoto, K. (eds). Pathogenesis and host specificity in plant diseases. Histopathological, biochemical, genetic and molecular bases. Vol. 1 – Prokaryotes. Elsevier Science Ltda. Great Britain, 185-197.
- Hopkins, D. L.; Purcell, A. H. 2002. *Xylella fastidiosa*: Cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. **Plant Disease**, 86: 1056-1066.

Horii, J.; Morita, M.; Muramatsu, H.; Muranaka, Y.; Yanno, T.; Maekawa, M. 2003. Effects of mupirocin at subinhibitory concentrations on flagella formation in *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis*.

Jacomino, A. P.; Modesto, J. C.; Beretta, M. J. G. et al. 1993. Transmissão controlada da clorose variegada dos citros (CVC). **Fitopatologia Brasileira**, v. 18, Suplemento.

Jishage, M.; Iwata, A.; Ueda, S.; Ishihama, A. 1996. Regulation of RNA polymerases sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: intracellular levels of factor species of sigma subunit under various growth conditions. **J. Bacteriol.**, 178: 5447-5451.

Katzen, F.; Ferreira, D. U.; Oddo, C. G.; Ielmin, M. V.; Becker, A.; Pühler, A.; Ielpi, L. 2008. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. **J. Bacteriol.**, 180: 1607-1617.

Keays, R.; Harrison, P. M.; Wendon, J. A.; Forbes, A.; Gove, C.; Alexander, G. J.; Williams, R. 1991. Intravenous acetylcysteine in paracetamol induced fulminant hepatic failure: a prospective controlled trial. **BMJ**, 303: 1026-29.

Keren, I.; Shah, D.; Spoering, A.; Kaldalu, N.; Lewis, K. 2004 Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 186:8172-80.

Kim, Y.; Wang, X.; Ma, Q.; Zhang, X-S.; Wood, T. 2009. Toxin-Antitoxin systems in *Escherichia coli* influence biofilm formation through YjgK (TabA) and fimbriae. **J. Bacteriol.**, 191: 1258-1267.

Kitajima, E. W.; Bakarcic, M.; Fernandes-Valiega, M. V. 1975. Association of rickettsia like bacteria with plum leaf scald disease. **Phytopathology**, 65: 476-479.

Koide, T.; Vencio, R. Z.; Gomes, S. L. 2006a. Global gene expression analysis of the heat shock response in the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. **J. Bacteriol.**, 188:5821-30.

Koide, T.; Salem-Izacc, S. M., Gomes, S. L., Vencio, R. Z. 2006b. SpotWhatR: a user-friendly microarray data analysis system. **Genet. Mol. Res.**, 5: 93-107.

Koller, O. C.; Oliveira, R. B. L.; Nunes, D. S.; Soglio, F. D.; Panzenhagen, N. V.; Sartori, I. A.; Manteze, F. 2006. Controle químico do cancro cítrico em plantas jovens sob manejo convencional e orgânico. **Cienc. Rural**, 36: 1043-1048.

Kustu, S.; Santero, E.; Keener, J.; Popham, D.; Weiss, D. 1989. Expression of σ^{54} (ntrA)- dependent genes is probably united by a common mechanism. **Microbiol. Reviews**, 53: 367-76.

Lacava, P. T.; Araujo, W. L.; Marcon, J.; Maccheroni, W. Jr; Azevedo, J. L. 2004. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. **Lett Appl Microbiol.**, 39: 55-9.

- Laranjeira, F. F. 1997. **Dinâmica temporal e espacial da clorose variegada dos citros**. Piracicaba, Dissertação de Mestrado apresentada à Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, USP, Piracicaba, 150.
- Laranjeira, F. F.; Amorim, L.; Bergamin-Filho, A.; Aguiar-Vildoso, C. I.; Coletta-Filho, H. D. 2005. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: Mattos- Junior, D., De Negri, J. D.; Pio, R. M.; Pompeu- Junior, J. (eds.). 2005. Citros. Instituto Agronômico, Campinas.
- Leite-Júnior, R. P.; Leite, R. M. V. B. C. 1991. Associação de *Xylella fastidiosa* com a clorose variegada dos citros. **Summa Phytopathology**, 17: 7.
- Leite, B.; Pascholati, S. F.; Kitajima, E. W.; Ishida, M. I. 2001. Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras. **RAPP**, 9: 1-41
- Leite, B.; Ishida, M. L.; Alves, E.; Carrer, H.; Pascholati, S. F.; Kitajima, E. W. 2002. Genomics and X-ray microanalysis indicate that Ca²⁺ and thiols mediate the aggregation and adhesion of *Xylella fastidiosa*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 35: 645-650.
- Lemos, E. G.; Alves, L. M.; Campanharo, J. C. 2003. Genomic-based design of defined growth media for the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 219: 39-45.
- Leningher et al. 2007. Princípios de Bioquímica. 4ª. Edição, Ed. Sarvier.
- Leu, L. S.; Su, C. C. 1993. Isolation, cultivation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*, the causal bacterium of pear leaf scorch disease in Taiwan. **Plant Disease**, 77: 642-646.
- Lewis, K. 2007. Persister cells, dormancy and infectious disease. **Nat. Rev. Microbiol.**, 5: 48-56.
- Li, W. B.; Pria, J. R.; Teixeira-Jr, D. C.; Miranda, V. S.; Ayres, A. J.; Franco, C. F.; Costa, M. G. 2001. Coffee leaf scorch caused by a strain of *Xylella fastidiosa* from citrus. **Plant Disease**, 85: 501-05.
- Li, W. B.; Pria, J. R.; Lacava, P. M.; Hartung, J. S. 2003. Presence of *Xylella fastidiosa* in sweet orange fruit and seeds and its transmission to seedlings. **Phytopathology**, 93: 953-958.
- Lima, J. E. O.; Miranda V. S.; Hartung, J. S.; Brlansky, R. H.; Coutinho, A.; Roberto S. R.; Carlos, E. F. 1998. Coffee leaf scorch bacterium: axenic culture, pathogenicity, and comparison with *Xylella fastidiosa* of citrus. **Plant Dis.**, 82: 94-97.
- Linares, J. F.; Gustafsson, I.; Baquero, F.; Martinez, J. L. 2006. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 103: 19484-9.
- Lopes, J. R. S.; Beretta, M. J. G.; Harakava, R. et al. 1996. Confirmação da transmissão por cigarrinhas do agente causal da clorose variegada dos citros, *Xylella fastidiosa*. **Fitopatologia Brasileira**, 21: 343 Suplemento.

- Machado, E. C.; Quaggio, J. A.; Lagoa, A. M. M. A.; Ticelli, M.; Furlani, P. R. 1994. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com CVC. R. **Bras. Fisiol. Veg.**, 6: 53-57.
- Machado, M. A.; De Souza, A. A.; Coletta-Filho, H. D.; Kuramae, E. E.; Takita, M. A. (2001). Genome and Pathogenicity of *Xylella fastidiosa*. **Mol. Biol. Today**, 2: 33-43.
- Maddocks, S. E.; Oyston, P. C. F. 2008. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. **Microbiology**, 154: 3609-3623.
- Mah, T. C.; O'toole. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **TRENDS in Microbiology**, 9: 34-39.
- Maiques, E.; Ubeda, C.; Campoy, S.; Salvador, N.; Lasa, I.; Novick, R. P.; Barbí, J.; Penades, J. R. 2006. B-lactam antibiotics induce SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.**, 188: 2726-29.
- Marucci, R. C.; Lopes, J. R. S.; Vendramim, J. D.; Corrente, J. C. 2005. Influence of *Xylella fastidiosa* infection of citrus on host selection by leafhopper vectors. **Entomol. Exp. Appl.**, 117: 95-103.
- Mattick, J. S. 2002. Type IV pili and twitching motility. **Annu. Ver. Microbiol.**, 56: 289-314.
- Mattos- Junior, D., De Negri, J. D.; Pio, R. M.; Pompeu- Junior, J. (eds.). 2005. Citros. Instituto Agronômico, Campinas.
- Meidanis, J.; Braga, M. D. V.; Almeida-VerjovskiI, S. 2002. Whole-Genome analysis of transporters in the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Microbiol and Molecular Biology.**, 66: 272-299.
- Meng, Y.; Li, Y.; Galvani, C. D.; Burr, T. J.; Hao, G.; Turnes, J. N. 2005. Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus-driven twitching motility. **J. Bacteriol.**, 187: 5560-67.
- Mircetich, S. M.; Lowe, S. K.; Moller, W. J. et al. 1976. Etiology of almond leaf scorch disease and transmission of the causal agent. **Phytopathology**, 66: 17-24.
- Molin, S et al 2000. Experimental reproducibility in flow-chamber biofilm. **Microbiology**, 146: 2409-2415 in Stewart, P. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. **Int. J. Med. Microbiol.**, 292: 107-113.
- Molin, S.; Tolker-Nielsen, T. 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. **Curr. Opin. Biotechnol.**, 14: 255-261.
- Morey, J. S.; Ryan J. C.; Van Dolah, F. M. 2006. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real time PCR. **Biol. Proced. Online**, 8: 175-93.

Muranaka, L. S. 2007 Estudo da dose resposta de N-acetil-L-Cisteina no crescimento, produção de exopolissacarídeos e formação de biofilme em *Xylella fastidiosa*. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho para obtenção do diploma de bacharel em Ciências Biológicas.

Newman, K. L.; Almeida, R. P., Purcell, A. H.; Lindow, S. E. 2004. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. **Proc. Natl Acad. Sci USA**, 101:1737-42.

Nies, D. H. 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. **FEMS Microbiol Rev.**, 27: 313-39.

Nobile, C.; Schneider, H. A.; Nett, J. E.; Sheppard, D. C.; Filler, S. G.; Andes, D. R.; Mitchell, A. P. 2008. Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. **Curr. Biol.**, 18: 1017- 1024.

Nunes L. R.; Rosato, Y. B.; Muto, N. H.; Yanai'G. M.; Da Silva, V. S.; Leite, D. B.; Golçalves, E. R.; De Souza, A. A.; Coletta-Filho, H.; Machado, M. A., Lopes, S. A.; Oliveira, R. C. 2003. Microarray analysis of *Xylella fastidiosa* provide evidence of coordinated transcription control of laterally transferred elements. **Genome research**, 13: 570-578.

Odermatt, A., Suter, H., Krapf, R.; Solioz, M. 1993. Primary structure of two P-type ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. **J. Biol. Chem.**, 268: 12775-12779.

Olofsson, A. C.; Hermansson, M.; Elwing, H. 2003. N-acetyl-L-Cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces. **Appl. Environ. Microbiol.**, 8: 4814-22.

Osiro, D.; Colnago, L. A.; Otoboni, A. M. M. B.; Lemos, E. G. M.; De Souza, A. A.; Coletta-Filho, H. D.; Machado, M. A. 2004. A kinetic model for *Xylella fastidiosa* adhesion, biofilm formation, and virulence. **FEMS Microbiology Letters**, 236: 309-314.

Paradella- Filho, O.; Sugimori, M. H.; Ribeiro, I. J. A. et al. 1995. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros. **Laranja**, 23: 46-49.

Parry, M. F.; Neu, H. C. 1976. Effect of N-acetylcysteine on antibiotic activity and bacterial growth in vitro. **J. Clin. Microbiol.**, 5: 58-61.

Pérez-Giraldo, C.; Rodríguez-Benito, A.; Morán, F. J.; Hurtado, C.; Blanco, M. T.; Gómez-García, A. C. 1997. Influence of N-acetylcysteine on the formation of biofilm by *Staphylococcus epidermidis*. **J. Antimicrob. Chemother.**, 39: 643-6.

Paoli, G. C.; Soyer, F.; Shively, J.; Tabita, F. R. 1998. Rhodobacter capsulatus genes encoding form I ribulose-1,5-biophosphate carboxylose/ oxygenase (cbbLS) and neighbouring genes were acquired by a horizontal gene transfer. **Microbiology**, 144:

- 219-277 in Maddocks, S. E.; Oyston, P. C. F. 2008. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. **Microbiology**, 154: 3609-3623.
- Parsek, M.; Greenberg, P. 2000. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. **PNAS**, 97: 8789-8793.
- Pattery, T.; Hernalsteens, J-P; De Greve, H. 1999. Identification and molecular characterization of a novel *Salmonella enteritidis* pathogenicity islet encoding an ABC transporter. **Molecular Microbiol.**, 33: 791-805.
- Paulsen, I. T.; Saier, M. H. 1997. A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. **J. Membr. Biol.**, 156: 99-103.
- Pinna, A.; Sechi, L. A.; Zanetti, S.; Carta, F. 2005. Detection of virulence factors in a corneal isolate of *Klebsiella pneumoniae*. **Ophthalmology**, 112: 883-887.
- Poola, R. B.; Nagalingam, B.; Gopalakrishnan, K. V. 1994. Performance studies with biomass-derived high-octane fuel additives in a two-stroke spark-ignition engine. **Biomass and bioenergy**, 6: 369-379.
- Purcell, A. H.; Finalay, A. H. 1979. Evidence for noncirculative transmission of Pierce's disease bacterium by sharpshooter leafhoppers. **Phytopathology**, 69: 393-395.
- Purcell, A. H., Hopkins, D. L. 1996. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. **Annual Review Phytopathology**, 34: 131-151.
- Purcell, A. H.; Saunders, S. R. 1999. Fate of Pierce's disease strain of *Xylella fastidiosa* in common riparian plants in California. **Plant Disease**, 83: 825-830.
- Ramage, G.; Vandewalle, K.; Bachmann, S. P.; Wickes, B. L.; López-Ribot, J. L. 2002. In vitro pharmacodynamic properties of three antifungal agents against preformed *Candida albicans* biofilms determined by time-kill studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 46: 3634-3636.
- Rhodus, V. 2000. Isolation of total RNA from *E. coli* for microarrays protocol. Metodologia desenvolvida por Virgil Rhodus e obtida através de contato pessoal <<http://carolgrosslab.ucsf.edu/gross/member.html#rhodus>>
- Richard-Fogal, C. L.; Frawley, E. R.; Kranz, R. G. 2008. Topology and function of CcmD in cytochrome c maturation. **J. Bacteriol.**, 190:3489-93.
- Ricotti, C. 2005. Influence of N-Acetyl-L-Cysteine on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* chronic wound isolates *in vitro*. **J. Am. Acad. Dermatol.**, 38.
- Riise, G. C. et al. 2000. Inhibitory effect of N-Acetylcysteine on adherence of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* to human oropharyngeal epithelial cells *in vitro*. **Respiration**, 67: 552-58.

- Roberto, S. R.; Coutinho, A.; Lima, J. E. O; Miranda, V. S.; Carlos, E. F. 1996. Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminales* e *Oncometopia faciales* em citros. **Fitopatologia Brasileira**, 21: 517-518.
- Rodrigues, C. M.; Takita, M. A.; Coletta-Filho, H. D.; Olivato, J. C.; Caserta, R.; Machado, M. A.; De Souza, A. A. 2008. Copper resistance of biofilm cells of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 77: 1145-57.
- Rossetti, V.; Garnier, M.; Bove, J. M.; Bereta, M. J. G.; Teixeira, A. R. R.; Quaggio, J. A.; Denegri, J. D. 1990. Occurrence of xylem-restricted bacteria in sweet orange trees affected by chlorotic variegation, a new citrus disease in Brazil. **Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences**, 310: 345-349.
- Saier, M. H. J.; et al. 2000 In: Meidanis, J.; Braga, M. D. V.; Almeida-VerjovskiI, S. 2002. Whole-Genome analysis of transporters in the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Microbiol and Molecular Biology.**, 66: 272-299.
- Sanderlin, R. S.; Heyderich-Alger, K. I. 2000. Evidence that *Xylella fastidiosa* can cause leaf scorch disease of pecan. **Plant Disease**, 84: 1282-1286.
- Schell, M. 1993. Molecular Biology of the LyzR family of transcriptional regulators. **Annu. Ver. Microbiol.**, 47: 597-626.
- Shah, D.; Zhang, Z.; Khodursky, A.; Kaldalu, N.; Kurg, K.; Lewis, K. 2006. Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. **BMC Microbiol.**, 12;6:53.
- Simpson, A. J. G.; Reinach, F. C.; Arruda, P.; et al. 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, 406: 151-159.
- Sochman, J. 2002. N-acetylcysteine in acute cardiology: 10 years later, what do we know and what would we like to know? **J. American College of Cardiology**, 39: 1422-1428.
- Souza, L. C.; Wulff, N. A.; Gaurivaud, P.; Mariano, A. G.; Virgílio, A. C.; Azevedo, J. L.; Monteiro, P. B. 2006. Disruption of *Xylella fastidiosa* CVC *gumB* and *gumF* genes affects biofilm formation without a detectable influence on exopolysaccharide production. **FEMS Microbiol. Lett.**, 257: 236-42.
- St. Geme, J. W.; Cutter, D.; Barenkamp, S. J. 1996. Characterization of the genetic locus encoding *Haemophilus influenzae* type b surface fibrils. **J. Bacteriol.**, 178: 6281-7.
- Stewart, P. S.; Roe, F.; Rayner, J.; Elkins, J. G.; Lewandowski, Z.; Oschsner, U. A.; Hassett, D. J. 2000. Effect of catalase on hydrogen peroxide penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **App. Environ. Microbiol.**, 2: 836-38.
- Stewart, P. S. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. **Int. J. Med. Microbiol.**, 292: 107-113

- Storz, G., Tartaglia, L. A. 1992. OxyR: a regulator of antioxidant genes. **J. Nutrit.**, 122: 627-30.
- Teitzel, G. M., Parsek, M. R. 2003. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl Environ Microbiol.**, 69: 2313-2320.
- Teitzel, G. M.; Geddie, A.; De Long, S. K.; Kirisits, M. S.; Whiteley, M.; Parsek, M. R. 2006. Survival and growth in the presence of elevated copper: transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, 188: 7242-56.
- Tirouvanziam, R.; Conrad, C. K.; Bottiglieri, I.; Herzenberg, L. A.; Moss, R. B. 2006. High-dose oral N-acetylcysteine, a glutathione producing, modulates inflammation in cystic fibrosis. **PNAS**, 103: 4628-33.
- Tubelis, A.; Barros, J. C.; Leite, R. M. V. B. 1993. Difusão de clorose variegada dos citros em pomares comerciais de laranjas no Brasil. **Laranja**, 14: 239-54.
- Van Melderen, L.; De Bast; M. S. 2009. Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities? **PLOS Genet.**, 5: e1000437.
- Varani, A. M.; Souza, R. C.; Nakaya, H. I.; Lima, W. C.; Almeida, L. G. P.; Kitajima, E. W.; Chen, J.; Civerolo, E.; Vasconcelos, A. T. R.; Van Sluys, A. M. 2008. Origins of *Xylella fastidiosa* prophage like regions and their impact in genome differentiation. **Plos One**, 3:1-15.
- Ventura, P.; Panini, R.; Pasini, M. C.; Scarpetta, G.; Salvioli, G. 1999. N-acetyl-L-cysteine reduces homocysteine plasma levels after single intravenous administration by increasing thiols urinary excretion. **Pharmacol. Res.**, 40: 350-50.
- Xu, K. D.; Mc Feters, G. A.; Stewart, P. S. 2000. Biofilm resistance to antimicrobials agents. **Microbiology**, 146: 547-549.
- Zaini, P. A.; Fogaça, A. C.; Lupo, F. G. N.; Nakaya, H. T.; Vêncio, R. Z. N.; Silva, A. M. 2008. The iron stimulon of *Xylella fastidiosa* includes genes for type IV pilus and Colicilin-like V bacteriocins. **J. Bacteriol.**, 190: 2368-78.
- Zheng, C. H.; Ahamed, K.; Rikitomi, N.; Martinez, G.; Nagatake, T. 1999. The effects of S-carboxymethylcysteine and N-acetylcysteine on the adherence of *Moraxella catarrhalis* to human pharyngeal epithelial cells. **Microbiol. Immunol.**, 43: 107-13.
- Wai, S. N.; Mizunoe, Y.; Takeda, A.; Kawabata, S.; Yoshida, S. 1998. *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation. **App. Environ. Microbiol.**; 64: 3648-3655.
- Warren, J. G. e Kirkpatrick, B. C. 2009. Inhibition of *Xylella fastidiosa* polygalacturonase to produce Pierce's disease resistant grapevines. **Phytopathology**, 99:S138-S138.

Watanabe, S.; Oguchi, Y.; Yokota, N.; Tokuda, H. 2007. Large scale preparation of homogeneous LolA-lipoproteins complex and efficient in vitro transfer of lipoproteins to the outer membrane in a LolB dependent manner. **Protein Sci.**, 16:2741-49.

Wells, H. J.; Raju, B. C.; Hung, H. Y. et al. 1987. *Xylella fastidiosa* gen. nov. sp. Nov.: gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* ssp. **International Journal of Systematic Bacteriology, Washington**, 37: 136-143.

Whiteley, M.; Bangera, M. G.; Bungarner, R. E.; Parsek, M. R.; Teitzel, G. M.; Lory, S.; Greenberg, E. P. 2001. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Nature**, 413: 860- 864.

Williams, P.; Camara, M.; Hardman, A. et al. 2000. Quorum sensing and population dependent control of virulence. **Philos. Trans R. Sect. B**, 355: 667-680.

Wu, W.; Goldstein, G.; Adams, C.; Matthews, R. H.; Ercal, N. 2006. Separation and quantification of N-Acetyl-L-Cysteine and N-Acetyl-L-Cysteine-Amide by HPLC with fluorescence detection., 20: 415-422.

ANEXOS

Tabela S125. CDS induzidas com 3 mM de CuSO₄

ID gene	Categoria Funcional LBI	Produto Gênico LBI	Produto Gênico LNCC	Fold change	P value
XF0846	I.A.2	beta-mannosidase precursor	XF0693 Beta-mannosidase - Mannanase	3,033	0,015
XF2255	I.B.10	acetyl coenzyme A synthetase	XF1953 Acetyl-coenzyme A synthetase -Acyl-activating enzyme	2,054	0,018
XF1734	I.C.2	NADP-alcohol dehydrogenase	XF1462 NADP-alcohol dehydrogenase ; giCVC	3,283	0,044
XF2459	I.C.3	c-type cytochrome biogenesis protein	XF2130 C-type cytochrome biogenesis protein CcmE -Heme chaperone	2,534	0,018
XF2460	I.C.3	c-type cytochrome biogenesis membrane protein	XF2131 C-type cytochrome biogenesis protein CcmF	2,549	0,021
XF1749	I.D	transcriptional regulator	XF1477 putative transporter ; giCVC	2,114	0,033
XF1752	I.D	transcriptional regulator (LysR family)	XF1480 transcriptional regulator -LysR family ; giCVC	2,079	0,017
XF1768	I.D	transcriptional regulator (LysR family)	XF1498 transcriptional regulator -LysR family ; giCVC	2,907	0,022
XF2038	I.D	transcriptional regulator	XF1757 transcriptional regulator	2,027	0,015
XF2062	I.D	transcriptional repressor	XF1783 transcriptional repressor	2,415	0,015
XF1000	II.A.1	acetylornithine deacetylase	XF0825 Acetylornithine deacetylase -N-acetylornithinase -NAO	2,063	0,014
XF1001	II.A.1	acetylglutamate kinase	XF0826 Acetylglutamate kinase -NAG kinase -AGK	2,373	0,014
XF1003	II.A.1	argininosuccinate lyase	XF0828 Argininosuccinate lyase -Argininosuccinase -ASAL	2,956	0,015
XF1004	II.A.1	glutamate 5-kinase	XF0829 Glutamate 5-kinase -Gamma-glutamyl kinase	4,389	0,016
XF1005	II.A.1	gamma-glutamyl phosphate reductase	XF0830 Gamma-glutamyl phosphate reductase -GPR -Glutamate-5-semialdehyde dehydrogenase	2,692	0,017
XF2712	II.A.1	pyrroline-5-carboxylate reductase	XF2356 Pyrroline-5-carboxylate reductase -P5CR	2,067	0,024
XF0864	II.A.2	cystathionine gamma-synthase	XF0708 Cystathionine gamma-synthase -O-succinylhomoserine -thiol-lyase	2,119	0,023
XF2100	II.A.2	aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	XF1819 Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase -ASP beta-hydroxylase	2,054	0,019
XF0585	II.B.1	5'-phosphoribosylglycinamide transformylase	XF0468 Phosphoribosylglycinamide formyltransferase -GAR transformylase	2,313	0,015
XF0832	II.D.12	siroheme synthase	XF0682 Multifunctional siroheme synthase: Uroporphyrinogen-III C-methyltransferase / Precorrin-2 dehydrogenase / Sirohydrochlorin ferrochelataze	2,669	0,038
XF1916	II.D.17	coenzyme F390 synthetase	XF1644 Putative phenylacetyl CoA ligase	2,085	0,046
XF0173	II.E	3-oxoacyl-[ACP] reductase	XF0139 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	2,642	0,041
XF1776	III.A.1	DNA topoisomerase III	XF1510 DNA topoisomerase III ; giCVC	2,348	0,033

XF0423	III.A.3	exodeoxyribonuclease V beta chain	XF0334 Exodeoxyribonuclease V beta chain	2,343	0,011
XF2081	III.A.4	DNA-damage-inducible protein	XF1800 Addiction module antitoxin, RelB/DinJ family protein	2,544	0,041
XF0296	III.A.5	type I restriction-modification system specificity determinant	XF0237 Type I restriction-modification enzyme, S subunit - DNA specificity domain	2,082	0,017
XF1774	III.A.5	DNA methyltransferase		2,778	0,046
XF2722	III.A.5	type I restriction-modification system specificity determinant	XF2366 Type I restriction-modification enzyme, S subunit - DNA specificity domain	2,843	0,017
XF2201	III.B.3	ribosomal protein L11 methyltransferase	XF1908 ribosomal protein L11 methyltransferase	3,743	0,022
XF2203	III.C.1	elongation factor P	XF1910 elongation factor P-like protein	2,579	0,014
XF2417	III.C.1	lipoprotein signal peptidase	XF2089 Lipoprotein signal peptidase II -SPase II	2,519	0,019
XF0220	III.C.3	proline dipeptidase	XF0174 Putative Xaa-Pro dipeptidase -Proline dipeptidase	2,231	0,031
XF0321	IV.A.2	porin O precursor	XF0260 Porin O -POP	2,171	0,008
XF0847	IV.A.2	beta-hexosaminidase precursor	XF0694 Beta-hexosaminidase - N-acetyl-beta-glucosaminidase	3,463	0,026
XF1739	IV.A.2	outer membrane protein	XF1467 conserved hypothetical protein ; giCVC	3,096	0,028
XF0063	IX	competence protein F	XF0047 competence protein F	2,538	0,011
XF0900	V.A.4	magnesium and cobalt transport protein	XF0738 Magnesium transport protein	3,460	0,011
XF1426	V.A.4	ion transporter	XF1179 Potassium voltage-gated channel	2,480	0,010
XF2455	V.A.6	heme ABC transporter ATP-binding protein	XF2127 C-type cytochrome biogenesis ATP-binding export CcmA -Heme exporter protein A	2,542	0,021
XF2456	V.A.6	heme ABC transporter membrane protein	XF2128 C-type cytochrome biogenesis protein CcmB -Heme exporter protein B	3,316	0,020
XF2457	V.A.6	heme ABC transporter membrane protein	XF2129 C-type cytochrome biogenesis protein CcmC -Heme exporter protein C	3,126	0,012
XF0659	V.B	cell cycle protein	XF0528 tRNA-Ile-lysidine synthase	2,276	0,020
XF1785	V.B	chromosome partitioning related protein	XF1520 chromosome partitioning related protein ; giCVC	2,931	0,028
XF0508	VI.A	phage-related terminase large subunit	XF0404 phage-related terminase large subunit -GP2; xfp6	2,578	0,027
XF0631	VI.A	phage-related integrase	XF0508 phage-related integrase	2,898	0,041
XF0682	VI.A	phage-related protein		2,310	0,028
XF0683	VI.A	phage-related DNA polymerase	XF0553 phage-related DNA polymerase -P45 ; xfp1	2,700	0,032
XF0711	VI.A	phage-related terminase large subunit		2,197	0,016
XF0719	VI.A	phage-related baseplate assembly protein	XF0588 phage-related baseplate assembly protein V -GPV	11,180	0,013
XF0723	VI.A	phage-related baseplate assembly protein		2,630	0,020
XF0724	VI.A	phage-related baseplate assembly protein		2,409	0,022
XF0725	VI.A	phage-related tail protein		2,194	0,014
XF0730	VI.A	phage-related tail protein	XF0598 phage-related tail protein ; xfp1	2,465	0,026
XF0732	VI.A	phage-related tail protein		2,508	0,031
XF1718	VI.A	phage-related integrase	XF1447 phage-related integrase; giCVC	2,980	0,017
XF2290	VI.A	phage-related protein	XF1980 phage-related DNA polymerase	4,811	0,016

XF2291	VI.A	phage-related protein	XF1981 phage-related DNA polymerase	3,601	0,037
XF2292	VI.A	phage-related protein		2,187	0,039
XF2294	VI.A	phage-related protein	XF1984 KilA protein	2,079	0,017
XF2295	VI.A	phage-related protein	XF1985 Phage-related DNA/RNA helicase, SNF2 family	3,642	0,045
XF2480	VI.A	phage-related tail protein	XF0600 phage-related tail protein X -GPX ; xfp1	2,504	0,028
XF2482	VI.A	phage-related protein	XF2154 phage-related tail tape measure protein; xfp2	3,629	0,018
XF2487	VI.A	phage-related tail protein	XF0593 phage-related tail protein I -GPI; xfp1	2,368	0,015
XF2488	VI.A	phage-related baseplate assembly protein	XF0592 phage-related baseplate assembly protein J -GPJ ; xfp1	2,723	0,019
XF2489	VI.A	phage-related baseplate assembly protein	XF0591 phage-related baseplate assembly protein W -GPW; xfp1	2,713	0,019
XF2492	VI.A	phage-related baseplate assembly protein	XF2164 phage-related baseplate assembly protein V -GPV ; xfp2	11,173	0,014
XF2500	VI.A	phage-related terminase large subunit	XF0581 phage-related terminase large subunit -GP2 ; xfp1	2,254	0,015
XF2525	VI.A	phage-related DNA polymerase	XF2199 phage-related DNA polymerase -P45 ; xfp2	2,632	0,011
XF2528	VI.A	phage-related protein	XF1979 phage-related protein	5,080	0,016
XF1759	VI.B	conserved plasmid protein	XF1487 plasmid-related protein ; giCVC	2,979	0,040
XF1341	VII.C	copper homeostasis protein	XF1108 Copper homeostasis protein CutC	2,282	0,022
XF1729	VII.C	phenylacetaldehyde dehydrogenase	XF1458 aldo/keto reductase ; giCVC	2,744	0,044
XF1765	VII.C	drug:proton antiporter	XF1494 methylenomycin A resistance protein ; giCVC	2,282	0,044
XF1934	VII.C	HetI protein	XF1664 4-phosphopantetheinyl transferase HetI	2,119	0,017
XF2398	VII.C	hemolysin secretion protein D	XF2070 hemolysin secretion protein D	2,195	0,020
XF2550	VII.C	outer membrane hemolysin activator protein	XF2224 Outer membrane haemolysin secretion/activation protein	3,193	0,009
XF0845	VII.D	family 3 glycoside hydrolase	XF0692 Periplasmic beta-glucosidase -Cellobiase	2,276	0,030
XF0889	VII.F	hemagglutinin-like secreted protein	XF0728 Filamentous haemagglutinin -FHA adhesin like protein	5,353	0,017
XF2196	VII.F	hemagglutinin-like secreted protein	XF1904 Filamentous haemagglutinin -FHA adhesin like protein	3,049	0,022
XF2775	VII.F	hemagglutinin-like secreted protein	XF2417 Filamentous haemagglutinin -FHA adhesin like protein	2,967	0,019
XF2121	VII.H	virulence-associated protein E	XF1842 virulence-associated protein E; xfp5	2,449	0,050
XF0178	VIII.A	conserved hypothetical protein	XF0144 conserved hypothetical protein	2,533	0,020
XF0501	VIII.A	conserved hypothetical protein	XF0396 phage-related protein; xfp6	2,029	0,031
XF0510	VIII.A	conserved hypothetical protein	XF0406 phage-related portal protein -GPB -Minor capsid protein B; xfp6	2,744	0,015
XF0521	VIII.A	conserved hypothetical protein	XF0416 phage-related tail tape measure protein; xfp6	2,527	0,038
XF0537	VIII.A	conserved hypothetical protein	XF0432 phage-related protein; xfp6	2,200	0,033
XF0718	VIII.A	conserved hypothetical protein		9,647	0,019
XF0748	VIII.A	conserved hypothetical protein	XF0613 RNA 2-O-ribose	2,080	0,033

		protein		methyltransferase		
XF0848	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF0695 Glycosyl hydrolases family 18 protein	4,444	0,012
XF1560	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1296 phage-related protein; xfp3	2,787	0,041
XF1562	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1300 phage-related protein; xfp3	2,287	0,019
XF1596	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1333 Predicted transcriptional regulator ; xfp3	2,298	0,012
XF1597	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1334 conserved hypothetical protein ; xfp3	2,779	0,007
XF1754	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1482 integrase -fragment ; giCVC	2,164	0,038
XF1762	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1490 phage-related protein ; giCVC	3,675	0,037
XF1782	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1516 conserved hypothetical protein ; giCVC	3,158	0,046
XF2024	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1746 conserved hypothetical protein	2,423	0,024
XF2179	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1890 Nicotinate-nucleotide [NaMN] adenylyltransferase - Deamido-NAD+ pyrophosphorylase	2,380	0,015
XF2490	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF2162 conserved hypothetical protein ; xfp2	11,459	0,011
XF2491	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF2163 HTH-type transcriptional regulator	14,592	0,011
XF2493	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF0587 phage-related protein; xfp1	5,033	0,026
XF2763	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF2404 Phage-related addiction module antidote protein	2,252	0,043
XF2764	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF2405 Phage-related addiction module killer protein	2,558	0,032

I- metabolismo intermediário, II- biossíntese de pequenas moléculas, III- metabolismo de macromoléculas, IV- estrutura celular, V- processos celulares, VI- elementos genéticos móveis, VII- virulência e patogenicidade, VIII- Hipotéticas. CAT-LBI: categorias funcionais adotadas por Simpson et al. (2000), FUNCTION LBI: produto genico encontrado pelo site <<http://www.lbi.ic.unicamp.br/xf/>> , FUNCTION LNCC: produto gênico encontrado pelo site <<http://www.xylella.lncc.br/>>, p value e *fold change* claculados através do programa ArrayStar.

Tabela S226. CDS reprimidas com 3 mM de CuSO₄.

ID gene	Categoria Funcional LBI	Produto Gênico LBI	Produto Gênico LNCC	Fold change	P value
XF1610	I.A.2	fructokinase	XF1344 Putative fructokinase	0,391	0,006
XF0259	I.B.11	phosphomannose isomerase-GDP-mannose pyrophosphorylase	XF0211 Xanthan biosynthesis protein XanB: Mannose-6-phosphate isomerase / Mannose-1-phosphate guanylyl transferase [GDP]	0,422	0,037
XF0260	I.B.11	phosphoglucomutase/phosphomannomutase	XF0212 Phosphohexose mutases - Phosphoglucomutase/Phosphomannomutase	0,378	0,011
XF1606	I.B.11	UDP-glucose dehydrogenase	XF1341 UDP-glucose 6-dehydrogenase	0,485	0,017
XF1061	I.B.2	2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase	XF0869 2-dehydro-3-deoxy-phosphogluconate aldolase - KDPG-aldolase	0,393	0,011

XF1259	I.B.3	phosphoenolpyruvate synthase	XF1043 Phosphoenolpyruvate synthase -pyruvate phosphate dikinase	0,458	0,014
XF0657	I.B.9	alkaline phosphatase	XF0527 Alkaline phosphatase -ALP	0,380	0,025
XF0305	I.C.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase, subunit NQO7	XF0244 NADH-quinone oxidoreductase chain A -NQO7 subunit -NADH dehydrogenase I, chain A	0,452	0,024
XF0306	I.C.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase, subunit NQO6	XF0245 NADH-quinone oxidoreductase chain B -NQO6 subunit -NADH dehydrogenase I, chain B	0,449	0,017
XF0307	I.C.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase, subunit NQO5	XF0246 NADH-quinone oxidoreductase chain C -NQO5 subunit -NADH dehydrogenase I, chain C	0,430	0,018
XF0308	I.C.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase, subunit NQO4	XF0247 NADH-quinone oxidoreductase chain D -NQO4 subunit -NADH dehydrogenase I, chain D	0,448	0,032
XF0309	I.C.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase, subunit NQO2	XF0248 NADH-quinone oxidoreductase chain E -NQO2 subunit -NADH dehydrogenase I, chain E	0,256	0,011
XF0314	I.C.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase, subunit NQO10	XF0253 NADH-quinone oxidoreductase chain J -NQO10 subunit -NADH dehydrogenase I, chain J	0,481	0,049
XF1389	I.C.3	cytochrome O ubiquinol oxidase, subunit I	XF1148 Cytochrome O ubiquinol oxidase, subunit I -Ubiquinol oxidase chain A	0,446	0,017
XF0274	I.C.4	6-phosphofructokinase	XF0220 6-phosphofructokinase -Phosphohexokinase	0,347	0,016
XF0942	I.C.7	malate:quinone oxidoreductase	XF0775 Malate:quinone oxidoreductase -Malate dehydrogenase [acceptor] -MQO	0,435	0,022
XF1070	I.C.7	succinate dehydrogenase, membrane anchor subunit	XF0877 Succinate dehydrogenase cytochrome b556 subunit	0,382	0,014
XF1071	I.C.7	succinate dehydrogenase, membrane anchor subunit	XF0878 Succinate dehydrogenase hydrophobic membrane anchor protein	0,359	0,012
XF1073	I.C.7	succinate dehydrogenase iron-sulfur protein	XF0880 Succinate dehydrogenase iron-sulfur protein	0,313	0,035
XF1211	I.C.7	malate dehydrogenase	XF1003 Malate dehydrogenase	0,392	0,016
XF1549	I.C.7	dihydrolipoamide succinyltransferase S-	XF1286 Dihydrolipoalysine-residue succinyltransferase -E2 component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	0,318	0,022
XF0821	I.D	transcriptional regulator (Fur family)	XF0672 Metal-ion uptake regulator protein -Fur family	0,437	0,040
XF1408	I.D	RNA polymerase sigma-54 factor	XF1163 RNA polymerase sigma-54 factor	0,434	0,015
XF2593	I.D	two-component system, regulatory protein	XF2261 Phosphate regulon transcriptional regulatory protein	0,330	0,010
XF2272	II.A.2	5-methyltetrahydropteroyltrimethylglutamate--homocysteine methyltransferase	XF1964 5-methyltetrahydropteroyltrimethylglutamate--homocysteine methyltransferase -Methionine synthase	0,380	0,016
XF2443	II.A.2	beta-alanine synthetase	XF2115 Carbon-nitrogen hydrolase family protein	0,444	0,030
XF0458	II.B.1	nucleoside diphosphate kinase	XF0361 Nucleoside diphosphate kinase -NDK	0,217	0,016
XF1106	II.B.2	carbamoyl-phosphate synthase small chain	XF0907 Carbamoyl-phosphate synthase small [glutamine] chain	0,447	0,020

XF1107	II.B.2	carbamoyl-phosphate synthase large chain	XF0908 Carbamoyl-phosphate synthase large [ammonia] chain	0,498	0,024
XF2089	II.B.4	5'-nucleotidase	XF1808 5-nucleotidase	0,389	0,015
XF1199	II.D.10	thioredoxin	XF0992 Thioredoxin 1 -TRX1	0,496	0,030
XF1487	II.D.11	ubiquinone/menaquinone transferase	XF1230 Ubiquinone/menaquinone biosynthesis methyltransferase UbiE	0,500	0,041
XF1983	II.D.2	GTP cyclohydrolase I	XF1708 GTP cyclohydrolase I	0,434	0,049
XF0060	II.D.6	pyridoxal phosphate biosynthetic protein	XF0045 Pyridoxal phosphate biosynthetic protein -PNP synthase	0,463	0,021
XF0319	II.E	acetoacetyl-CoA reductase	XF0258 Acetoacetyl-CoA reductase	0,391	0,027
XF0671	II.E	3-oxoacyl-[ACP] reductase	XF0541 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	0,477	0,024
XF0136	III.A.1	DNA polymerase III holoenzyme chi subunit	XF0104 DNA polymerase III subunit chi	0,447	0,017
XF2157	III.A.1	DNA polymerase III, epsilon chain	XF1874 DNA polymerase III subunit epsilon	0,461	0,016
XF1483	III.A.3	site-specific recombinase	XF1226 Tyrosine recombinase XerC	0,390	0,009
XF0760	III.A.4	DNA mismatch repair protein MutL	XF0623 DNA mismatch repair protein MutL	0,486	0,010
XF1909	III.A.4	A/G-specific adenine glycosylase	XF1637 A/G-specific adenine glycosylase	0,435	0,039
XF0110	III.B.2	50S ribosomal protein L19	XF0084 50S ribosomal protein L19	0,326	0,032
XF0434	III.B.2	30S ribosomal protein S21	XF0341 30S ribosomal protein S21	0,408	0,017
XF0740	III.B.2	50S ribosomal protein L20	XF0606 50S ribosomal protein L20	0,420	0,040
XF1167	III.B.2	50S ribosomal protein L6	XF0963 50S ribosomal protein L6	0,228	0,032
XF1168	III.B.2	50S ribosomal protein L18	XF0964 50S ribosomal protein L18	0,178	0,028
XF1169	III.B.2	30S ribosomal protein S5	XF0965 30S ribosomal protein S5	0,221	0,049
XF1177	III.B.2	50S ribosomal protein L17	XF0973 50S ribosomal protein L17	0,403	0,032
XF1536	III.B.2	30S ribosomal protein S9	XF1277 30S ribosomal protein S9	0,276	0,019
XF1537	III.B.2	50S ribosomal protein L13	XF1278 50S ribosomal protein L13	0,234	0,038
XF2560	III.B.2	30S ribosomal protein S18	XF2236 30S ribosomal protein S18	0,418	0,010
XF2634	III.B.2	50S ribosomal protein L7/L12	XF2294 50S ribosomal protein L7/L12	0,311	0,049
XF0108	III.B.3	16S rRNA processing protein	XF0082 16S rRNA processing protein	0,395	0,015
XF0109	III.B.4	tRNA (guanine-N1-)-methyltransferase	XF0083 tRNA -guanine-N1--methyltransferase -tRNA [GM37] methyltransferase	0,442	0,011
XF1362	III.B.4	tRNA adenylyltransferase	XF1126 Multifunctional CCA protein: CCA-adding enzyme -tRNA nucleotidyltransferase / 2-nucleotidase / 2,3-cyclic phosphodiesterase	0,468	0,019
XF2246	III.B.6	ribonuclease III	XF1947 Ribonuclease III -RNase III	0,366	0,021
XF0576	III.C.1	metallopeptidase	XF0463 Zinc metalloprotease -Peptidase M13 family protein	0,409	0,016
XF2628	III.C.1	elongation factor Tu		0,473	0,015
XF2640	III.C.1	elongation factor Tu	XF2300 Elongation factor Tu -EF-Tu	0,475	0,017
XF0615	III.C.2	60kDa chaperonin	XF0494 60kDa chaperonin	0,391	0,020
XF0616	III.C.2	10kDa chaperonin	XF0495 10kDa chaperonin	0,483	0,020

XF0156	III.C.3	cysteine protease	XF0126 Putative peptidase C1-like protein -putative cysteine protease	0,202	0,016
XF0816	III.C.3	zinc protease	XF0669 Zinc metalloprotease -peptidase family M16 protein	0,354	0,040
XF2241	III.C.3	periplasmic protease	XF1943 Periplasmic protease MucD -peptidase family S1, chymotrypsin family	0,342	0,012
XF0975	IV.A.2	polyphosphate-selective porin O	XF0803 Porin O -POP	0,420	0,035
XF1024	IV.A.2	outer membrane protein H.8 precursor	XF0843 hypothetical protein	0,395	0,022
XF0759	IV.B	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase precursor	XF0622 N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	0,450	0,022
XF1050	IV.B	undecaprenyl pyrophosphate synthetase	XF0861 Undecaprenyl pyrophosphate synthetase -UPP synthetase	0,472	0,045
XF1309	IV.B	rod shape-determining protein	XF1081 Rod shape-determining protein MreB	0,428	0,011
XF2434	IV.C	lipopolysaccharide core biosynthesis protein	XF2106 Lipopolysaccharide core biosynthesis protein -Glycosyl transferase family 4 protein	0,476	0,018
XF0081	IV.D	outer membrane usher protein precursor	XF0061 Outer membrane usher protein	0,425	0,021
XF0372	IV.D	fimbrial assembly protein	XF0291 Fimbrial assembly protein PilP	0,283	0,019
XF0373	IV.D	fimbrial assembly protein	XF0292 Fimbrial assembly protein PilQ	0,411	0,018
XF2537	IV.D	pre-pilin leader peptidase	XF2214 Type IV pre-pilin-like proteins leader peptidase processing enzyme: Prepilin peptidase / N-methyltransferase	0,396	0,022
XF2539	IV.D	fimbrial protein	XF2216 Tfp pilus assembly protein, major pilin FimA/PilA - Type IV fimbrillin	0,199	0,011
XF1213	IX	GTP-binding elongation factor protein	XF1005 GTP-binding elongation factor protein	0,282	0,024
XF2207	V.A.1	cationic amino acid transporter	XF1913 Amino acid-polyamine-organocation superfamily protein	0,462	0,017
XF2142	V.A.2	ABC transporter phosphate permease	XF1860 Phosphate transport system permease protein	0,395	0,026
XF0320	V.A.3	Mg ⁺⁺ /citrate complex transporter	XF0259 Mg ⁺⁺ /citrate complex transporter	0,309	0,030
XF1320	V.B	cell division topological specificity factor	XF1091 cell division topological specificity factor	0,340	0,043
XF2281	V.B	chromosome partitioning protein	XF1972 Chromosome partitioning protein ParB	0,421	0,014
XF0684	VI.A	phage-related protein	XF0554 phage-related protein ; xfp1	0,478	0,043
XF1663	VI.A	phage-related protein	XF1391 phage-related antirepressor ; xfp4	0,373	0,030
XF0010	VII.C	biopolymer transport ExbB protein	XF0009 biopolymer transport ExbB protein	0,428	0,025
XF0132	VII.C	copper resistance protein A precursor	XF0100 Copper resistance protein A -multicopper oxidase family	0,401	0,015
XF1137	VII.C	NonF-related protein	XF0934 ThiJ/PfpI family protein	0,476	0,033
XF2093	VII.C	precursor of drug resistance protein	XF1812 acriflavine resistance protein A	0,491	0,031
XF2094	VII.C	multidrug-efflux transporter	XF1813 acriflavine resistance protein B	0,354	0,038
XF2586	VII.C	outer membrane export factor	XF2255 Outer membrane protein TolC	0,299	0,024
XF1516	VII.F	surface-exposed outer membrane protein	XF1257 Surface protein adhesin YadA-like -Xanthomonas adhesin XadA-like protein	0,196	0,011
XF1529	VII.F	surface protein	XF1270 Surface protein adhesin	0,468	0,050

				YadA-like -Xanthomonas adhesin XadA-like protein		
XF0006	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF0006 Peptidase M48 family protein -Ste24 endopeptidase	0,488	0,039
XF0184	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF0148 conserved hypothetical protein	0,493	0,015
XF0459	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF0362 Radical SAM enzyme, Cfr family protein	0,253	0,023
XF0460	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF0363 Tfp pilus assembly protein PilF/PilW	0,409	0,025
XF0464	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF0367 Putative lipoprotein	0,393	0,018
XF0550	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF0443 TonB-dependent receptor	0,484	0,026
XF1230	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1019 conserved hypothetical protein	0,455	0,021
XF1384	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1144 conserved hypothetical protein	0,322	0,008
XF1439	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1187 conserved hypothetical protein	0,424	0,044
XF1552	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1288 conserved hypothetical protein	0,495	0,009
XF1649	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1379 phage-related protein; xfp4	0,245	0,019
XF2013	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1737 5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase related protein	0,448	0,032
XF2227	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1932 Putative Holliday junction resolvase	0,417	0,032
XF2237	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1940 TonB-dependent receptor	0,290	0,037
XF2442	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF2114 Peptidyl-arginine deiminase -PAD related protein	0,499	0,021
XF2452	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF2124 Segregation and condensation protein B	0,448	0,009

I- metabolismo intermediário, II- biossíntese de pequenas moléculas, III- metabolismo de macromoléculas, IV- estrutura celular, V- processos celulares, VI- elementos genéticos móveis, VII- virulência e patogenicidade, VIII- Hipotéticas. CAT-LBI: categorias funcionais adotadas por Simpson et al. (2000), FUNCTION LBI: produto genico encontrado pelo site <<http://www.lbi.ic.unicamp.br/xf/>> , FUNCTION LNCC: produto gênico encontrado pelo site <<http://www.xylella.lncc.br/>>, p value e *fold change* claculados através do programa ArrayStar.

Tabela S3. CDS induzidas com 100 µg/mL de tetraciclina.

ID gene	Categoria Funcional LBI	Produto Gênico LBI	Produto Gênico LNCC	Fold change	P value
XF1234	I.A.2	carboxyphosphoenolpyruvate phosphonmutase	XF1022 Methylisocitrate lyase	2,562	0,001
XF2259	I.A.2	polyvinylalcohol dehydrogenase	XF1956 PQQ-dependent polyvinylalcohol dehydrogenase family protein	2,327	0,008
XF0392	I.B.10	methionine adenosyltransferase	XF0307 S-adenosylmethionine synthetase	2,144	0,001
XF1500	I.B.12	ATP sulfurylase, small subunit	XF1243 Sulfate adenylyltransferase subunit 2 - ATP-sulfurylase small subunit	2,706	0,005
XF0318	I.C.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO14 subunit	XF0257 NADH-quinone oxidoreductase chain N -NQO14 subunit -NADH dehydrogenase I,	2,073	0,007

			chain N		
XF0347	I.C.1	D-lactate dehydrogenase	XF0273 Glycolate oxidase subunit D	2,065	0,002
XF0323	I.D	two-component system, sensor protein	XF0262 two-component system, sensor protein	5,349	0,002
XF0390	I.D	two-component system, sensor protein	XF0306 Sensor histidine kinase protein	3,430	0,002
XF1182	I.D	lipase modulator	XF0977 Lipase chaperone -lipase modulator	2,549	0,003
XF1490	I.D	transcriptional regulator (MarR/EmrR family)	XF1233 HTH domain transcriptional regulator MarR-type	3,233	0,005
XF1843	I.D	nitrogen regulatory protein P-II	XF1578 Nitrogen regulatory protein P-II	2,049	0,044
XF1920	I.D	Trp operon transcriptional repressor	XF1648 Trp operon transcriptional repressor	3,590	0,004
XF2062	I.D	transcriptional repressor	XF1783 transcriptional repressor	2,525	0,006
XF2546	I.D	two-component system, sensor protein	XF2220 Sensor protein Pils	2,986	0,001
XFa0001	I.D	transcriptional regulator	XFb0001 transcriptional regulator	4,140	0,007
XF1915	II.A.4	anthranilate synthase component II	XF1643 Para-aminobenzoate synthase glutamine amidotransferase component II	3,275	0,039
XF2439	II.B.2	cytidylate kinase	XF2111 Cytidylate kinase -CMP kinase	2,321	0,002
XF0017	II.D.12	coproporphyrinogen III oxidase, aerobic	XF0015 Coproporphyrinogen 3 oxidase, aerobic -Coprogen oxidase	2,251	0,002
XF2306	II.D.12	delta-aminolevulinic acid dehydratase	XF1994 Delta-aminolevulinic acid dehydratase - Porphobilinogen synthase	2,666	0,005
XF1916	II.D.17	coenzyme F390 synthetase	XF1644 Putative phenylacetyl CoA ligase	2,047	0,039
XF0378	II.D.8	thiamin-phosphate pyrophosphorylase	XF0296 Thiamine-phosphate pyrophosphorylase -TMP-PPase	2,005	0,014
XF0771	II.E	acyl carrier protein	XF0633 Xanthomonadin biosynthesis acyl carrier protein - ACP	2,079	0,026
XF1087	II.E	cardiolipin synthase	XF0893 Phospholipase D family protein	2,186	0,007
XF1817	II.E	beta-ketoacyl-[ACP] synthase III	XF1554 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 3 -Beta-ketoacyl-ACP synthase III -KAS III	2,247	0,002
XF2025	III.A.1	DNA primase	XF1747 DNA primase TraC - Replication primase	2,588	0,004
XF1558	III.A.2	single-stranded DNA binding protein	XF1294 Single-stranded DNA-binding protein -Helix-destabilizing protein; xfp3	2,269	0,009
XF1892	III.A.3	endonuclease V (deoxyinosine 3'endonuclease)	XF1620 endonuclease V - deoxyinosine 3endonuclease	2,108	0,011
XFa0019	III.A.3	site-specific recombinase	XFb0019 DNA invertase	2,331	0,043
XF0071	III.A.4	formamidopyrimidine DNA glycosylase	XF0053 Formamidopyrimidine-DNA glycosylase -AP lyase MutM	2,411	0,016
XF0170	III.A.4	formamidopyrimidine DNA glycosylase	XF0136 Formamidopyrimidine-DNA glycosylase -AP lyase MutM	2,268	0,021
XF1326	III.A.4	DNA-3-methyladenine glycosidase	XF1097 DNA-3-methyladenine glycosylase	2,360	0,004
XF1904	III.A.4	holliday junction binding protein, DNA helicase	XF1632 Holliday junction ATP-dependent DNA helicase A	2,214	0,031
XF2081	III.A.4	DNA-damage-inducible	XF1800 Addiction module	2,299	0,005

		protein	antitoxin, RelB/DinJ family protein		
XF2598	III.A.4	6-O-methylguanine-DNA methyltransferase	XF2266 6-O-methylguanine-DNA methyltransferase -MGMT	2,727	0,003
XF1804	III.A.5	site-specific DNA-methyltransferase	XF1539 site-specific DNA-methyltransferase	2,885	0,011
XF1972	III.B.3	tRNA/rRNA methylase	XF1698 tRNA/rRNA methyltransferase	2,108	0,012
XF2781	III.B.4	ribonuclease P	XF2423 ribonuclease P protein component -protein c5 -RNase P	3,695	0,002
XF1502	III.B.5	RNA polymerase omega subunit	XF1245 DNA-directed RNA polymerase omega chain	2,200	0,006
XF2615	III.B.6	ribonuclease	XF2281 Guanyl-specific ribonuclease Sa -RNase Sa3	2,025	0,001
XF1436	III.C.1	disulfide oxidoreductase	XF1184 Thiol:disulfide interchange protein DsbA	2,908	0,002
XF0267	III.C.3	serine protease	XF0216 Extracellular serine protease	2,011	0,024
XF0103	IV.A.1	membrane protein	XF0077 Lipid A core-O-antigen polymerase related protein	2,128	0,005
XF1313	IV.A.1	rod shape-determining protein	XF1085 Rod shape-determining protein RodA	4,186	0,003
XF2780	IV.A.1	60kDa inner-membrane protein	XF2422 Inner membrane protein OxaA	2,499	0,004
XF1614	IV.B	penicillin binding protein	XF1346 Putative penicillin binding protein	2,441	0,020
XF0105	IV.C	3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase	XF0079 3-deoxy-D-manno-octulosonic-acid transferase -KDO transferase	3,217	0,002
XF0803	IV.C	UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] N-acetylglucosamine deacetylase	XF0662 UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] N-acetylglucosamine deacetylase	2,412	0,001
XF0918	IV.C	acyl-[ACP]-UDP-N-acetylglucosamine	XF0755 UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] glucosamine N-acyltransferase	2,640	0,009
XF0077	IV.D	fimbrial adhesin precursor	XF0058 Fimbrial adhesin protein	2,273	0,001
XF1791	IV.D	fimbrillin		3,288	0,001
XF0063	IX	competence protein F	XF0047 competence protein F	2,641	0,001
XF1078	IX	DNA uptake protein	XF0885 DNA uptake protein	4,234	0,002
XF1192	IX	integral membrane protein	XF0986 integral membrane protein	2,389	0,011
XF0324	V.A.4	periplasmic iron-binding protein	XF0263 ABC-type Fe ³⁺ transport system, periplasmic component	3,227	0,004
XF0599	V.A.4	TonB-dependent receptor for iron transport	XF0481 Catecholate siderophore receptor Fiu -TonB-dependent receptor Fiu	2,305	0,001
XF2019	V.A.4	Na ⁺ :H ⁺ antiporter	XF1741 Na ⁺ :H ⁺ antiporter	2,421	0,008
XF2328	V.A.4	ABC transporter sodium permease	XF2014 Na ⁺ extrusion ABC transporter permease	2,002	0,006
XF0226	V.A.6	protein-export membrane protein	XF0180 Protein-export membrane protein SecF	2,951	0,001
XF1913	V.A.6	type V secretory pathway protein	XF1641 Deoxyribonuclease TatD	2,461	0,021
XF0406	V.A.7	export protein	XF0320 Alx protein	2,492	0,001
XF1077	V.A.7	ABC transporter ATP-binding protein	XF0884 Lipoprotein-releasing system ATP-binding protein	3,088	0,001
XF2567	V.A.7	ABC transporter permease protein	XF2241 O-antigen export system permease protein	2,245	0,001
XF2582	V.A.7	ABC transporter ATP-binding protein	XF2253 Lipid A export ATP-binding/permease protein	2,179	0,003
XF0704	VI.A	phage-related protein	XF0571 phage-related protein - putative antirepressor; xfp1	3,780	0,012
XF0707	VI.A	phage-related protein		2,150	0,040
XF1645	VI.A	phage-related protein	XF1375 phage-related protein -	2,082	0,032

			putative antirepressor; xfp4		
XF1864	VI.A	phage-related protein		2,104	0,013
XF1869	VI.A	phage-related protein	XF1599 phage-related protein	4,424	0,002
XF1870	VI.A	phage-related protein	XF1600 phage-related protein	3,946	0,003
XF1875	VI.A	phage-related protein	XF1605 phage-related protein	4,091	0,003
XF1876	VI.A	phage-related protein	XF1606 phage-related protein	4,462	0,003
XF2288	VI.A	phage-related integrase	XF1977 phage-related integrase - tyrosine recombinase	3,162	0,008
XF2291	VI.A	phage-related protein	XF1981 phage-related DNA polymerase	2,798	0,048
XF2504	VI.A	phage-related protein	XF0576 phage-related lysozyme protein -P13 ; xfp1	2,238	0,030
XF2530	VI.A	phage-related integrase	XF2204 phage-related integrase - tyrosine recombinase ; xfp2	3,301	0,008
XF1590	VI.B	plasmid stabilization protein	XF1327 plasmid stabilization protein ; xfp3	2,042	0,030
XF2031	VI.B	plasmid stabilization protein	XF1751 plasmid stabilization protein	2,533	0,004
XF2032	VI.B	plasmid stabilization protein	XF1752 Plasmid stabilization protein ParE	3,020	0,002
XF2045	VI.B	conjugal transfer protein	XF1765 conjugal transfer protein TrbN	2,430	0,044
XF2050	VI.B	conjugal transfer protein	XF1771 conjugal transfer protein TrbH	2,254	0,044
XF2052	VI.B	conjugal transfer protein	XF1773 conjugal transfer protein TrbF	3,370	0,020
XF2054	VI.B	conjugal transfer protein	XF1775 conjugal transfer protein TrbD	4,298	0,003
XF2055	VI.B	conjugal transfer protein	XF1776 conjugal transfer protein TrbC	3,582	0,011
XF2056	VI.B	conjugal transfer protein	XF1777 conserved hypothetical protein	2,050	0,025
XF2058	VI.B	conjugal transfer protein	XF1779 conjugal transfer protein TraF	2,073	0,010
XF2066	VI.B	conserved plasmid protein	XF1786 conserved plasmid protein	5,717	0,006
XF2161	VI.B	conserved plasmid protein	XF1878 Plasmid-related putative entry exclusion protein	3,745	0,002
XFa0015	VI.B	conjugal transfer protein	XFb0015 conjugal transfer protein virB11	3,065	0,047
XFa0027	VI.B	plasmid maintenance protein	XFb0026 plasmid maintenance protein PemK	3,317	0,018
XFa0029	VI.B	plasmid stabilization protein	XFb0027 plasmid stabilization protein	3,605	0,011
XFa0041	VI.B	conjugal transfer protein	XFb0040 conjugal transfer protein TrbH	2,289	0,044
XFa0043	VI.B	conjugal transfer protein	XFb0042 conjugal transfer protein TrbF	3,415	0,022
XFa0047	VI.B	nickase	XFb0046 nickase	3,502	0,015
XF2303	VI.C	transposase	XF1991 Transposase, IS6 family	3,038	0,002
XF0175	VII.C	hemolysin III protein	XF0141 Hemolysin III, channel-type protein -Hly-III	4,081	0,002
XF1934	VII.C	HetI protein	XF1664 4-phosphopantetheinyl transferase HetI	2,269	0,016
XF2287	VII.C	TonB protein	XF1976 TonB-dependent receptor	2,531	0,004
XF2397	VII.C	toxin secretion ABC transporter ATP-binding protein	XF2069 Alpha-hemolysin translocation ATP-binding protein	2,141	0,004
XF2686	VII.C	multidrug efflux protein	XF2333 Multidrug-efflux transporter -multidrug resistance protein	3,330	0,001
XF2778	VII.C	thiophene and furan oxidation protein	XF2420 tRNA modification GTPase TrmE	2,537	0,012

XF0818	VII.D	endo-1,4-beta-glucanase		XF0670 Endo-1,4-beta-glucanase -Cellulase	2,515	0,001
XF2625	VII.G	heat shock protein		XF2287 Probable protease HtpX	2,854	0,022
XF0086	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF0064 Competence/damage-inducible protein CinA related protein	2,034	0,015
XF0177	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF0143 TatD-related deoxyribonuclease -Mg-dependent DNase	3,551	0,003
XF0178	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF0144 conserved hypothetical protein	2,506	0,006
XF0199	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF0159 conserved hypothetical protein	2,367	0,001
XF0214	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF0172 conserved hypothetical protein	2,280	0,005
XF0250	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF0203 Permease of the drug/metabolite transporter -DMT superfamily	2,096	0,013
XF0268	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF0217 sugar transporter	3,310	0,001
XF0338	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF0269 conserved hypothetical protein	2,423	0,004
XF0387	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF0303 tRNA-dihydrouridine synthase A	4,397	0,002
XF0449	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF0353 conserved hypothetical protein	2,996	0,003
XF0470	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF0370 conserved hypothetical protein	2,051	0,022
XF0472	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF0371 conserved hypothetical protein	2,017	0,005
XF0533	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF0428 conserved hypothetical protein; xfp6	2,391	0,003
XF0811	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF0667 conserved hypothetical protein	3,875	0,001
XF0966	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF0797 Tfp pilus assembly protein FimT	2,430	0,003
XF1054	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF0864 Putative rhomboid family membrane protein -peptidase family S54	3,229	0,003
XF1230	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1019 conserved hypothetical protein	2,129	0,017
XF1278	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1057 conserved hypothetical protein	3,399	0,001
XF1494	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1237 conserved hypothetical protein	2,022	0,015
XF1504	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1247 YicC-like family protein	2,124	0,005
XF1514	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1256 Auxin efflux carrier protein	2,761	0,022
XF1533	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1274 Peptidase M22 family protein	2,064	0,022
XF1560	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1296 phage-related protein; xfp3	2,024	0,041
XF1597	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1334 conserved hypothetical protein ; xfp3	2,208	0,046
XF1754	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1482 integrase -fragment ; giCVC	3,971	0,016
XF1755	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1483 conserved hypothetical protein ; giCVC	2,213	0,026
XF1919	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1647 NAD-PH-dependent FMN reductase family protein	4,538	0,014
XF1978	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1704 Integral membrane protein, YccS/YhfK family protein	2,550	0,001
XF2037	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1756 conserved hypothetical protein	2,279	0,009

XF2080	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1799 Addiction module toxin, RelE/StbE family protein	3,370	0,007
XF2126	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1847 phage-related protein ; xfp5	2,119	0,011
XF2257	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1954 conserved hypothetical protein	2,527	0,001
XF2347	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF2031 Polyketide cyclase / dehydrase family protein	2,509	0,003
XF2348	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF2032 SsrA-binding protein	2,192	0,001
XF2490	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF2162 conserved hypothetical protein ; xfp2	3,969	0,020
XF2536	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF2213 Dephospho-CoA kinase - Dephosphocoenzyme A kinase	3,183	0,002
XF2718	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF2363 hypothetical protein	3,278	0,001
XFa0025	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XFb0024 Acetyltransferase GNAT family protein	5,075	0,014
XFa0045	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XFb0044 conserved hypothetical protein	2,027	0,002
XFa0055	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XFb0053 conserved hypothetical protein	2,151	0,028

I- metabolismo intermediário, II- biossíntese de pequenas moléculas, III- metabolismo de macromoléculas, IV- estrutura celular, V- processos celulares, VI- elementos genéticos móveis, VII- virulência e patogenicidade, VIII- Hipotéticas. CAT-LBI: categorias funcionais adotadas por Simpson et al. (2000), FUNCTION LBI: produto genico encontrado pelo site <<http://www.lbi.ic.unicamp.br/xf/>> , FUNCTION LNCC: produto gênico encontrado pelo site <<http://www.xylella.lncc.br/>>, p value e *fold change* calculados através do programa ArrayStar.

Tabela S4. CDS reprimidas com 100 µg/mL.

ID gene	Categoria Funcional LBI	Produto Gênico LBI	Produto Gênico LNCC	Fold change	P value
XF0781	I.A.2	lipase/esterase	XF0643 Lipase/esterase	0,246	0,002
XF2432	I.A.2	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	XF2104 UDP-glucose pyrophosphorylase -UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase -UDPGP	0,307	0,001
XF1385	I.B.10	glycine decarboxylase	XF1145 Glycine dehydrogenase - Glycine cleavage system P-protein	0,266	0,001
XF1889	I.B.10	ferredoxin-NADP reductase	XF1617 ferredoxin-NADP reductase	0,371	0,019
XF2268	I.B.10	glycerol kinase	XF1961 Glycerol kinase - ATP:glycerol 3-phosphotransferase	0,296	0,001
XF0259	I.B.11	phosphomannose isomerase-GDP-mannose pyrophosphorylase	XF0211 Xanthan biosynthesis protein XanB: Mannose-6-phosphate isomerase / Mannose-1-phosphate guanylyl transferase [GDP]	0,232	0,001
XF0260	I.B.11	phosphoglucomutase/phosphomannomutase	XF0212 Phosphohexose mutases - Phosphoglucomutase/Phosphomannomutase	0,259	0,001
XF0609	I.B.11	GDP-mannose 4,6 dehydratase	XF0488 GDP-mannose 4,6 dehydratase	0,213	0,007
XF1468	I.B.11	phosphomannomutase	XF1213 Phosphoglucosamine mutase	0,430	0,001
XF1606	I.B.11	UDP-glucose dehydrogenase	XF1341 UDP-glucose 6-	0,180	0,002

			dehydrogenase		
XF2279	I.B.11	nucleotide sugar epimerase	XF1971 Nucleotide sugar epimerase -NAD-dependent sugar dehydratase	0,458	0,001
XF1061	I.B.2	2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase	XF0869 2-dehydro-3-deoxy-phosphogluconate aldolase -KDPG-aldolase	0,340	0,002
XF1062	I.B.2	6-phosphogluconate dehydratase	XF0870 6-phosphogluconate dehydratase	0,314	0,002
XF0977	I.B.3	malate oxidoreductase	XF0805 NADP-dependent malic enzyme -Malate dehydrogenase	0,286	0,001
XF1259	I.B.3	phosphoenolpyruvate synthase	XF1043 Phosphoenolpyruvate synthase -pyruvate phosphate dikinase	0,423	0,003
XF0657	I.B.9	alkaline phosphatase	XF0527 Alkaline phosphatase -ALP	0,366	0,010
XF0904	I.B.9	ATP-binding protein	XF0743 PhoH-like protein	0,413	0,001
XF0308	I.C.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase, subunit NQO4	XF0247 NADH-quinone oxidoreductase chain D -NQO4 subunit -NADH dehydrogenase I, chain D	0,474	0,003
XF0310	I.C.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase, subunit NQO1	XF0249 NADH-quinone oxidoreductase chain F -NQO1 subunit -NADH dehydrogenase I, chain F	0,484	0,004
XF0311	I.C.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase, subunit NQO3	XF0250 NADH-quinone oxidoreductase chain G -NQO3 subunit -NADH dehydrogenase I, chain G	0,341	0,003
XF2266	I.C.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	XF1959 glycerol-3-phosphate dehydrogenase	0,414	0,003
XF0053	I.C.3	flavoheмоprotein	XF0043 Flavoheмоprotein - Nitric oxide dioxygenase	0,203	0,003
XF0253	I.C.3	electron transfer flavoprotein alpha subunit	XF0205 Electron transfer flavoprotein subunit alpha -Alpha-ETF	0,388	0,012
XF1298	I.C.3	electron transfer flavoprotein ubiquinone oxidoreductase	XF1070 Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase -ETF dehydrogenase	0,447	0,008
XF1387	I.C.3	cytochrome O ubiquinol oxidase, subunit IV	XF1146 Cytochrome O ubiquinol oxidase, subunit IV -Ubiquinol oxidase chain D	0,403	0,004
XF1388	I.C.3	cytochrome O ubiquinol oxidase, subunit III	XF1147 Cytochrome O ubiquinol oxidase, subunit III -Ubiquinol oxidase chain C	0,149	0,001
XF1389	I.C.3	cytochrome O ubiquinol oxidase, subunit I	XF1148 Cytochrome O ubiquinol oxidase, subunit I -Ubiquinol oxidase chain A	0,219	0,001
XF2461	I.C.3	c-type cytochrome biogenesis protein/thioredoxin	XF2132 Cytochrome c biogenesis protein CcmG -Thiol:disulfide interchange protein DsbE	0,492	0,009
XF0274	I.C.4	6-phosphofructokinase	XF0220 6-phosphofructokinase -Phosphohexokinase	0,195	0,001
XF0823	I.C.4	phosphoglycerate kinase	XF0674 Phosphoglycerate kinase	0,420	0,032
XF0826	I.C.4	fructose-bisphosphate aldolase	XF0677 Fructose-bisphosphate aldolase class I -FBP aldolase	0,353	0,003
XF1291	I.C.4	enolase	XF1064 Enolase -2-phosphoglycerate dehydratase	0,469	0,003
XF0669	I.C.6	pyruvate dehydrogenase	XF0538 pyruvate dehydrogenase E1 component	0,211	0,001
XF0868	I.C.6	dihydrolipoamide dehydrogenase	XF0710 Dihydrolipoyl dehydrogenase - E3 component of pyruvate and 2-oxoglutarate dehydrogenases complexes	0,197	0,003
XF0869	I.C.6	dihydrolipoamide	XF0711 Dihydrolipoyllysine-	0,315	0,001

		acetyltransferase	residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex		
XF0292	I.C.7	aconitate hydratase 2	XF0234 Aconitase -aconitate hydratase -Citrate hydro-lyase	0,207	0,001
XF1073	I.C.7	succinate dehydrogenase iron-sulfur protein	XF0880 Succinate dehydrogenase iron-sulfur protein	0,428	0,002
XF1211	I.C.7	malate dehydrogenase	XF1003 Malate dehydrogenase	0,270	0,001
XF1535	I.C.7	citrate synthase	XF1276 Citrate synthase	0,427	0,014
XF1548	I.C.7	dihydrolipoamide dehydrogenase	XF1285 Dihydrolipoyl dehydrogenase -E3 component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	0,186	0,001
XF1549	I.C.7	dihydrolipoamide succinyltransferase S-	XF1286 Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase -E2 component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	0,085	0,001
XF1550	I.C.7	oxoglutarate dehydrogenase	XF1287 Alpha-ketoglutarate dehydrogenase -E1 component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	0,175	0,001
XF1554	I.C.7	fumarate hydratase	XF1290 Fumarate hydratase class II -Fumarase C	0,414	0,003
XF1855	I.C.7	fumarate hydratase	XF1588 Fumarate hydratase class I -Fumarase	0,362	0,011
XF2547	I.C.7	succinyl-CoA synthetase, beta subunit	XF2221 succinyl-CoA synthetase, beta subunit	0,152	0,001
XF2548	I.C.7	succinyl-CoA synthetase, alpha subunit	XF2222 Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha -Succinyl-CoA synthetase subunit alpha	0,164	0,001
XF2700	I.C.7	isocitrate dehydrogenase	XF2345 Isocitrate dehydrogenase [NADP]	0,376	0,001
XF1145	I.C.8	ATP synthase, alpha chain	XF0941 ATP synthase alpha subunit	0,249	0,001
XF1146	I.C.8	ATP synthase, delta chain	XF0942 ATP synthase delta chain	0,434	0,007
XF1350	I.D	RNA polymerase sigma-70 factor	XF1115 RNA polymerase sigma factor RpoD -Sigma-70	0,489	0,013
XF1540	I.D	transcriptional regulator (Crp/Fnr family)		0,373	0,003
XF1752	I.D	transcriptional regulator (LysR family)	XF1480 transcriptional regulator -LysR family ; giCVC	0,441	0,009
XF2145	I.D	phosphate regulon transcriptional regulator	XF1863 Phosphate transport system protein	0,448	0,021
XF1002	II.A.1	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	XF0827 N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase -NAGSA dehydrogenase	0,473	0,004
XF1004	II.A.1	glutamate 5-kinase	XF0829 Glutamate 5-kinase -Gamma-glutamyl kinase	0,494	0,031
XF2709	II.A.1	glutamate synthase, beta subunit	XF2353 Glutamate synthase [NADPH] small chain -Glutamate synthase subunit beta -NADPH-GOGAT	0,301	0,001
XF2710	II.A.1	glutamate synthase, alpha subunit	XF2354 Glutamate synthase [NADPH] large chain -Glutamate synthase subunit alpha	0,487	0,002
XF0099	II.A.2	dihydroxy-acid dehydratase	XF0074 dihydroxy-acid dehydratase	0,478	0,006
XF1473	II.A.2	aminotransferase	XF1217 Cysteine desulfurase -Selenocysteine lyase -Selenocysteine reductase	0,391	0,001
XF1818	II.A.2	2-isopropylmalate synthase	XF1555 2-isopropylmalate synthase -Alpha-IPM synthetase	0,490	0,001
XF1821	II.A.2	acetolactate synthase isozyme II, large subunit	XF1558 Acetolactate synthase isozyme II, large subunit -AHAS-II	0,375	0,002

XF2211	II.A.2	enolase-phosphatase	XF1917 Enolase-phosphatase E1 -2,3-diketo-5-methylthio-1-phosphopentane phosphatase	0,456	0,004
XF2272	II.A.2	5-methyltetrahydropteroyltryglutamate--homocysteine methyltransferase	XF1964 5-methyltetrahydropteroyltryglutamate--homocysteine methyltransferase -Methionine synthase	0,417	0,041
XF2375	II.A.2	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	XF2054 3-isopropylmalate dehydratase large subunit -Alpha-IPM isomerase -IPMI	0,451	0,016
XF2396	II.A.2	aminotransferase	XF2068 Aspartate aminotransferase -Transaminase A -AspAT	0,428	0,004
XF1334	II.A.4	3-dehydroquinate synthase	XF1103 3-dehydroquinate synthase	0,232	0,001
XF1369	II.A.4	chorismate synthase	XF1131 Chorismate synthase -5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate phospholyase	0,411	0,002
XF1376	II.A.4	tryptophan synthase alpha chain	XF1137 Tryptophan synthase alpha chain	0,482	0,007
XF2214	II.A.5	cyclase	XF1919 Imidazole glycerol phosphate synthase subunit -IGP synthase cyclase subunit	0,454	0,005
XF2215	II.A.5	phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide ribotide isomerase	XF1920 1--5-phosphoribosyl-5-[5-phosphoribosylaminomethylidene amino] imidazole-4-carboxamide isomerase	0,493	0,001
XF2217	II.A.5	imidazoleglycerolphosphate dehydratase/histidinol-phosphate phosphatase bifunctional enzyme	XF1922 Histidine biosynthesis bifunctional protein: Histidinol-phosphatase / Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase -IGPD	0,485	0,003
XF0205	II.B.1	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	XF0164 phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	0,466	0,004
XF0455	II.B.1	adenylosuccinate synthetase	XF0359 Adenylosuccinate synthetase -IMP--aspartate ligase -AdSS -AMPSase	0,447	0,005
XF0458	II.B.1	nucleoside diphosphate kinase	XF0361 Nucleoside diphosphate kinase -NDK	0,374	0,011
XF1423	II.B.1	phosphoribosylformylglycinamide synthetase	XF1176 Phosphoribosylformylglycinamide synthase -FGAM synthase -Formylglycinamide ribotide amidotransferase	0,364	0,002
XF1553	II.B.1	adenylosuccinate lyase	XF1289 Adenylosuccinate lyase -ASL	0,288	0,001
XF1106	II.B.2	carbamoyl-phosphate synthase small chain	XF0907 Carbamoyl-phosphate synthase small [glutamine] chain	0,487	0,005
XF1107	II.B.2	carbamoyl-phosphate synthase large chain	XF0908 Carbamoyl-phosphate synthase large [ammonia] chain	0,297	0,003
XF2089	II.B.4	5'-nucleotidase	XF1808 5-nucleotidase	0,405	0,001
XF2353	II.B.4	purine nucleoside phosphorylase	XF2035 5-methylthioadenosine phosphorylase -MTA phosphorylase	0,364	0,001
XF0608	II.C	mannosyltransferase	XF0487 Mannosyltransferase WbdA -Glycosyl transferase group 1 family protein	0,333	0,009
XF1297	II.C	gluconolactonase precursor	XF1069 Gluconolactonase -D-glucono-delta-lactone lactonohydrolase	0,183	0,003
XF2471	II.D.11	3-demethylubiquinone-9 methyltransferase	XF2143 3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase -DHHB methyltransferase	0,343	0,001

XF1332	II.D.12	uroporphyrinogen decarboxylase	XF1102 Uroporphyrinogen decarboxylase -UPD	0,215	0,001
XF0091	II.D.2	dihydropteroate synthase	XF0069 Dihydropteroate synthase -DHPS	0,495	0,002
XF1337	II.D.6	pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	XF1105 Pyridoxamine 5-phosphate oxidase -PNP/PMP oxidase	0,488	0,004
XF1888	II.D.8	thiamine biosynthesis protein	XF1616 Thiamine biosynthesis protein ThiC	0,264	0,003
XF0950	II.D.9	riboflavin-specific deaminase	XF0782 Bifunctional riboflavin biosynthesis protein: Riboflavin-specific deaminase / HTP reductase	0,321	0,005
XF0952	II.D.9	riboflavin synthase alpha chain	XF0784 Riboflavin synthase alpha chain	0,446	0,009
XF0953	II.D.9	GTP cyclohydrolase II/3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase	XF0785 Bifunctional riboflavin biosynthesis protein: GTP cyclohydrolase II / DHBP synthase -3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase	0,324	0,005
XF0049	II.E	biotin carboxylase subunit of acetyl CoA carboxylase	XF0041 biotin carboxylase subunit of acetyl CoA carboxylase	0,453	0,001
XF0319	II.E	acetoacetyl-CoA reductase	XF0258 Acetoacetyl-CoA reductase	0,264	0,002
XF0673	II.E	3-oxoacyl-[ACP] synthase II	XF0543 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase II	0,255	0,001
XF1970	II.E	3-oxoacyl-[ACP] synthase III	XF1696 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 3 -Beta-ketoacyl-ACP synthase III -KAS III	0,439	0,002
XF2269	II.E	3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase	XF1962 3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase	0,393	0,001
XF0136	III.A.1	DNA polymerase III holoenzyme chi subunit	XF0104 DNA polymerase III subunit chi	0,375	0,003
XF1127	III.A.1	TldD protein	XF0927 TldD protein -Putative modulator of DNA gyrase - Peptidase U62 family protein	0,268	0,006
XF2552	III.A.1	DNA gyrase subunit A	XF2226 DNA gyrase subunit A	0,386	0,011
XF1190	III.A.2	histone-like protein	XF0984 DNA-binding protein HU	0,427	0,003
XF0425	III.A.3	exodeoxyribonuclease V alpha chain	XF0335 Exodeoxyribonuclease V alpha chain	0,394	0,007
XF0045	III.A.4	transcription-repair coupling factor	XF0038 Transcription-repair coupling factor -ATP-dependent helicase Mfd	0,462	0,002
XF0760	III.A.4	DNA mismatch repair protein MutL	XF0623 DNA mismatch repair protein MutL	0,311	0,001
XF1902	III.A.4	holliday junction binding protein, DNA helicase	XF1630 Holliday junction ATP-dependent DNA helicase B	0,448	0,006
XF2725	III.A.5	type I restriction-modification system endonuclease	XF2370 Type I restriction-modification enzyme, R subunit -restriction endonuclease	0,434	0,003
XF1156	III.B.2	30S ribosomal protein S19	XF0952 30S ribosomal protein S19	0,288	0,003
XF1157	III.B.2	50S ribosomal protein L22	XF0953 50S ribosomal protein L22	0,325	0,007
XF1158	III.B.2	30S ribosomal protein S3	XF0954 30S ribosomal protein S3	0,318	0,002
XF1162	III.B.2	50S ribosomal protein L14	XF0958 50S ribosomal protein L14	0,453	0,003
XF1163	III.B.2	50S ribosomal protein L24	XF0959 50S ribosomal protein L24	0,321	0,001
XF1164	III.B.2	50S ribosomal protein L5	XF0960 50S ribosomal protein L5	0,237	0,002
XF1165	III.B.2	30S ribosomal protein S14	XF0961 30S ribosomal protein S14	0,142	0,002

XF1166	III.B.2	30S ribosomal protein S8	XF0962 30S ribosomal protein S8	0,200	0,006
XF1167	III.B.2	50S ribosomal protein L6	XF0963 50S ribosomal protein L6	0,223	0,004
XF1168	III.B.2	50S ribosomal protein L18	XF0964 50S ribosomal protein L18	0,258	0,001
XF1169	III.B.2	30S ribosomal protein S5	XF0965 30S ribosomal protein S5	0,331	0,005
XF1170	III.B.2	50S ribosomal protein L30	XF0966 50S ribosomal protein L30	0,372	0,011
XF1171	III.B.2	50S ribosomal protein L15	XF0967 50S ribosomal protein L15	0,287	0,006
XF1173	III.B.2	30S ribosomal protein S13	XF0969 30S ribosomal protein S13	0,479	0,007
XF1174	III.B.2	30S ribosomal protein S11	XF0970 30S ribosomal protein S11	0,354	0,001
XF1175	III.B.2	30S ribosomal protein S4	XF0971 30S ribosomal protein S4	0,188	0,001
XF1177	III.B.2	50S ribosomal protein L17	XF0973 50S ribosomal protein L17	0,348	0,010
XF2634	III.B.2	50S ribosomal protein L7/L12	XF2294 50S ribosomal protein L7/L12	0,328	0,002
XF2635	III.B.2	50S ribosomal protein L10	XF2295 50S ribosomal protein L10	0,251	0,002
XF2636	III.B.2	50S ribosomal protein L1	XF2296 50S ribosomal protein L1	0,425	0,003
XF0939	III.B.3	ribosomal large subunit pseudouridine synthase D	XF0772 Ribosomal large subunit pseudouridine synthase D -rRNA-uridine isomerase D	0,361	0,004
XF1200	III.B.3	ribosomal small subunit pseudouridine synthase	XF0993 Ribosomal small subunit pseudouridine synthase A -rRNA-uridine isomerase A	0,411	0,003
XF0428	III.B.4	tryptophanyl-tRNA synthetase	XF0336 tryptophanyl-tRNA synthetase	0,415	0,007
XF0549	III.B.4	methionyl-tRNA synthetase	XF0442 methionyl-tRNA synthetase	0,444	0,003
XF0822	III.B.4	glutamyl-tRNA synthetase	XF0673 Glutamyl-tRNA synthetase -GluRS	0,455	0,002
XF0927	III.B.4	methionyl-tRNA formyltransferase	XF0762 methionyl-tRNA formyltransferase	0,393	0,003
XF1338	III.B.4	glutamyl-tRNA synthetase	XF1106 Glutamyl-tRNA synthetase	0,498	0,006
XF1856	III.B.4	aspartyl-tRNA synthetase	XF1589 aspartyl-tRNA synthetase	0,394	0,006
XF1959	III.B.4	glycyl-tRNA synthetase beta chain	XF1686 Glycyl-tRNA synthetase beta chain -GlyRS	0,308	0,003
XF1960	III.B.4	glycyl-tRNA synthetase alpha chain	XF1687 Glycyl-tRNA synthetase alpha chain -GlyRS	0,499	0,002
XF2418	III.B.4	isoleucyl-tRNA synthetase	XF2090 Isoleucyl-tRNA synthetase -IleRS	0,228	0,001
XF0252	III.B.5	ATP-dependent RNA helicase	XF0204 ATP-dependent RNA helicase	0,351	0,027
XF1176	III.B.5	RNA polymerase alpha subunit	XF0972 DNA-directed RNA polymerase alpha chain	0,319	0,013
XF2632	III.B.5	RNA polymerase beta' subunit	XF2292 DNA-directed RNA polymerase beta chain -RNA polymerase beta subunit	0,372	0,005
XF2638	III.B.5	transcription antitermination factor	XF2298 transcription antitermination protein NusG	0,473	0,001
XF1505	III.B.6	ribonuclease PH	XF1248 ribonuclease PH -RNase ph -tRNA nucleotidyltransferase	0,425	0,003
XF2158	III.B.6	ribonuclease H	XF1875 Ribonuclease HI -RNase HI	0,471	0,006
XF2246	III.B.6	ribonuclease III	XF1947 Ribonuclease III -RNase III	0,309	0,006
XF0235	III.C.1	initiation factor IF-2	XF0190 initiation factor IF-2	0,416	0,001
XF0576	III.C.1	metallopeptidase	XF0463 Zinc metalloprotease -Peptidase M13 family protein	0,232	0,002

XF0838	III.C.1	peptidyl-prolyl isomerase	cis-trans	XF0687 Chaperone surA - Peptidyl-prolyl isomerase	0,381	0,003
XF0857	III.C.1	L-isoaspartate methyltransferase	O-	XF0702 Protein-L-isoaspartate O- methyltransferase -PIMT	0,385	0,003
XF1111	III.C.1	peptide chain release factor 2		XF0912 Peptide chain release factor 2 -RF-2	0,439	0,004
XF1605	III.C.1	peptidyl-prolyl isomerase	cis-trans	XF1340 FKBP-type peptidyl- prolyl cis-trans isomerase -PPIase	0,227	0,001
XF2203	III.C.1	elongation factor P		XF1910 elongation factor P-like protein	0,470	0,023
XF2244	III.C.1	signal peptidase I		XF1945 Signal peptidase I - Leader peptidase I	0,413	0,010
XF2417	III.C.1	lipoprotein signal peptidase		XF2089 Lipoprotein signal peptidase II -SPase II	0,383	0,008
XF2473	III.C.1	elongation factor P		XF2145 Elongation factor P -EF- P	0,477	0,003
XF2585	III.C.1	protein-L-isoaspartate methyltransferase	O-	XF2254 Protein-L-isoaspartate O- methyltransferase -PIMT	0,374	0,001
XF2629	III.C.1	elongation factor G		XF2289 Elongation factor G -EF- G	0,351	0,003
XF0615	III.C.2	60kDa chaperonin		XF0494 60kDa chaperonin	0,166	0,006
XF0616	III.C.2	10kDa chaperonin		XF0495 10kDa chaperonin	0,371	0,027
XF0978	III.C.2	heat shock protein G		XF0806 Chaperone protein HtpG -heat shock protein HtpG	0,337	0,010
XF2339	III.C.2	DnaJ protein		XF2023 Chaperone protein DnaJ	0,395	0,008
XF0138	III.C.3	aminopeptidase A/I		XF0106 Cytosol leucine aminopeptidase -LAP	0,211	0,002
XF0156	III.C.3	cysteine protease		XF0126 Putative peptidase C1- like protein -putative cysteine protease	0,293	0,043
XF0816	III.C.3	zinc protease		XF0669 Zinc metalloprotease - peptidase family M16 protein	0,161	0,001
XF1026	III.C.3	serine protease		XF0844 Extracellular serine protease	0,435	0,013
XF1479	III.C.3	peptidase		XF1223 Protease II - Oligopeptidase B	0,474	0,001
XF1944	III.C.3	peptidyl-dipeptidase		XF1671 Peptidyl-dipeptidase	0,302	0,005
XF2241	III.C.3	periplasmic protease		XF1943 Periplasmic protease MucD -peptidase family S1, chymotrypsin family	0,204	0,001
XF0082	IV.A.1	chaperone protein precursor		XF0062 Fimbrial assembly chaperone protein	0,229	0,003
XF0256	IV.A.1	glucose-1-phosphate thymidyltransferase		XF0208 Glucose-1-phosphate thymidyltransferase -dTDP- glucose synthase	0,325	0,005
XF0033	IV.A.2	PilE protein		XF0027 Tfp pilus assembly protein PilE	0,251	0,002
XF0343	IV.A.2	outer membrane protein		XF0272 Outer membrane porin F -OmpA family protein	0,279	0,002
XF0975	IV.A.2	polyphosphate-selective porin O		XF0803 Porin O -POP	0,249	0,001
XF1024	IV.A.2	outer membrane protein H.8 precursor		XF0843 hypothetical protein	0,114	0,001
XF1046	IV.A.2	outer membrane antigen		XF0857 Outer membrane protein assembly factor -surface antigen D15 family	0,355	0,001
XF0416	IV.B	lipoprotein precursor		XF0327 VacJ-like lipoprotein	0,469	0,001
XF0759	IV.B	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase precursor		XF0622 N-acetylmuramoyl-L- alanine amidase	0,418	0,007
XF1309	IV.B	rod shape-determining protein		XF1081 Rod shape-determining protein MreB	0,326	0,001
XF1896	IV.B	outer membrane protein P6 precursor		XF1624 Pal protein - Peptidoglycan-associated lipoprotein	0,309	0,003
XF0257	IV.C	dTDP-4-dehydrorhamnose		XF0209 dTDP-4-	0,459	0,025

		3,5-epimerase	dehydrorhamnose 3,5-epimerase - dTDP-L-rhamnose synthetase		
XF0258	IV.C	dTDP-4-keto-L-rhamnose reductase	XF0210 dTDP-4-dehydrorhamnose reductase - dTDP-6-deoxy-L-mannose dehydrogenase	0,372	0,010
XF0611	IV.C	dTDP-glucose 4-6-dehydratase	XF0490 dTDP-glucose 4,6-dehydratase	0,358	0,003
XF0612	IV.C	dolichol-phosphate mannosyltransferase	XF0491 Glycosyl transferase group 2 family protein	0,459	0,012
XF0879	IV.C	lipopolysaccharide biosynthesis protein	XF0720 Lipopolysaccharide biosynthesis mannosyltransferase -glycosyltransferase 1 family	0,430	0,004
XF1289	IV.C	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase	XF1063 2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase - KDO 8-P synthase	0,395	0,002
XF1646	IV.C	UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-glucosamine N-acyltransferase	XF1376 UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] glucosamine N-acyltransferase; xfp4	0,474	0,016
XF2299	IV.C	3-deoxy-manno-octulosonate cytidyltransferase	XF1988 3-deoxy-manno-octulosonate cytidyltransferase -CMP-KDO synthetase	0,493	0,001
XF0081	IV.D	outer membrane usher protein precursor	XF0061 Outer membrane usher protein	0,394	0,004
XF0083	IV.D	fimbrial subunit precursor	XF0063 Fimbrial adhesin protein	0,171	0,003
XF0369	IV.D	fimbrial assembly membrane protein	XF0288 Fimbrial assembly protein PilM	0,380	0,001
XF0372	IV.D	fimbrial assembly protein	XF0291 Fimbrial assembly protein PilP	0,162	0,001
XF0373	IV.D	fimbrial assembly protein	XF0292 Fimbrial assembly protein PilQ	0,223	0,001
XF1632	IV.D	twitching motility protein	XF1364 Twitching motility protein PilU -Pilus retraction protein	0,253	0,016
XF1633	IV.D	twitching motility protein	XF1365 Twitching motility protein PilT -Pilus retraction protein	0,220	0,007
XF2538	IV.D	fimbrial assembly protein	XF2215 Type IV fimbrial assembly protein PilC	0,330	0,003
XF2539	IV.D	fimbrial protein	XF2216 Tfp pilus assembly protein, major pilin FimA/PilA - Type IV fimbriillin	0,206	0,029
XF2544	IV.D	pilus biogenesis protein	XF2218 Type IV fimbrial assembly protein PilB	0,343	0,001
XF1213	IX	GTP-binding elongation factor protein	XF1005 GTP-binding elongation factor protein	0,444	0,002
XF1624	IX	carboxylesterase	XF1356 Carboxylesterase	0,432	0,008
XF1724	IX	sugar-phosphate dehydrogenase	XF1453 sugar-phosphate dehydrogenase ; giCVC	0,346	0,003
XF1744	IX	oxidoreductase	XF1472 short-chain dehydrogenase/oxidoreductase ; giCVC	0,409	0,002
XF2243	IX	GTP binding protein	XF1944 GTP-binding elongation factor LepA	0,498	0,007
XF2645	IX	isopentenyl monophosphate kinase	XF2305 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase -CMK	0,476	0,009
XF2207	V.A.1	cationic amino acid transporter	XF1913 Amino acid-polyamine-organocation superfamily protein	0,323	0,002
XF1345	V.A.2	ABC transporter sulfate permease	XF1111 Sulfate transport system permease protein	0,456	0,003
XF1346	V.A.2	ABC transporter sulfate permease	XF1112 Sulfate transport system permease protein	0,499	0,002
XF2141	V.A.2	ABC transporter phosphate binding protein	XF1859 Phosphate-binding periplasmic protein	0,144	0,001
XF2144	V.A.2	phosphate ABC transporter	XF1862 Phosphate import ATP-	0,441	0,016

		ATP-binding protein	binding protein		
XF0320	V.A.3	Mg ⁺⁺ /citrate complex transporter	XF0259 Mg ⁺⁺ /citrate complex transporter	0,479	0,005
XF1402	V.A.3	phosphotransferase system enzyme I	XF1157 Phosphoenolpyruvate-phosphotransferase - Phosphotransferase system, enzyme I	0,404	0,001
XF2267	V.A.3	glycerol uptake facilitator protein	XF1960 glycerol uptake facilitator protein	0,320	0,002
XF0367	V.A.4	voltage-gated potassium channel beta subunit	XF0286 Voltage-gated potassium channel subunit beta -Kv-beta-2	0,397	0,005
XF0395	V.A.4	bacterioferritin	XF0310 Bacterioferritin -BFR	0,272	0,001
XF0944	V.A.7	ABC transporter ATP-binding protein	XF0776 ABC transporter ATP-binding protein	0,348	0,001
XF1474	V.A.7	ABC transporter membrane protein	XF1218 FeS assembly protein SufD	0,256	0,003
XF1476	V.A.7	ABC transporter membrane protein	XF1220 FeS assembly protein SufB	0,474	0,014
XF0800	V.B	cell division protein	XF0659 cell division protein FtsQ	0,293	0,005
XF0801	V.B	cell division protein	XF0660 cell division protein FtsA	0,293	0,003
XF0802	V.B	cell division protein	XF0661 cell division protein FtsZ	0,422	0,002
XF1321	V.B	septum site-determining protein	XF1092 Septum site-determining protein MinD -Cell division inhibitor	0,158	0,001
XF1322	V.B	cell division inhibitor	XF1093 Septum site-determining protein MinC	0,316	0,001
XF2247	V.B	GTP binding protein	XF1948 GTP-binding elongation factor Era	0,489	0,036
XF2281	V.B	chromosome partitioning protein	XF1972 Chromosome partitioning protein ParB	0,332	0,001
XF2282	V.B	chromosome partitioning protein	XF1973 Chromosome partitioning protein ParA	0,301	0,001
XF1564	VI.A	phage-related lysozyme		0,122	0,001
XF1570	VI.A	phage-related protein		0,180	0,001
XF1573	VI.A	phage-related protein		0,462	0,001
XF1663	VI.A	phage-related protein	XF1391 phage-related antirepressor ; xfp4	0,139	0,002
XF1669	VI.A	phage-related lysozyme	XF1302 phage-related lysozyme - P13 ; xfp3	0,123	0,001
XF1675	VI.A	phage-related protein	XF1307 phage-related terminase large subunit protein ; xfp3	0,176	0,001
XF1678	VI.A	phage-related protein	XF1310 phage-related protein ; xfp3	0,436	0,002
XF1706	VI.A	phage-related tail fiber protein	XF1435 phage-related long tail fiber protein -Gp37 ; xfp4	0,266	0,001
XF2524	VI.A	phage-related protein	XF2198 phage-related protein ; xfp2	0,354	0,026
XF1574	VI.B	plasmid-related protein		0,212	0,001
XF1679	VI.B	plasmid-related protein	XF1311 phage-related head morphogenesis protein; xfp3	0,211	0,001
XF0010	VII.C	biopolymer transport ExbB protein	XF0009 biopolymer transport ExbB protein	0,360	0,001
XF0011	VII.C	biopolymer transport ExbD1 protein	XF0010 Biopolymer transport ExbD1 protein	0,433	0,001
XF0132	VII.C	copper resistance protein A precursor	XF0100 Copper resistance protein A -multicopper oxidase family	0,211	0,002
XF0133	VII.C	copper resistance protein B precursor	XF0101 Copper resistance protein B	0,386	0,003
XF0668	VII.C	hemolysin-type calcium binding protein	XF0537 hemolysin-type calcium binding protein	0,252	0,001
XF1011	VII.C	hemolysin-type calcium binding protein	XF0836 hemolysin-type calcium binding protein -RTX prokaryotic toxin family	0,276	0,002
XF1131	VII.C	PmbA protein	XF0929 TldE/PmbA protein - Putative modulator of DNA	0,350	0,003

			gyrase -Peptidase U62 family protein		
XF1532	VII.C	oxidative stress transcriptional regulator	XF1273 Hydrogen peroxide-inducible genes activator	0,490	0,006
XF1726	VII.C	2,5-dichloro-2,5-cyclohexadiene-1,4-diol dehydrogenase	XF1455 short chain dehydrogenase ; giCVC	0,403	0,012
XF1827	VII.C	organic hydroperoxide resistance protein	XF1562 organic hydroperoxide resistance protein	0,410	0,022
XF2093	VII.C	precursor of drug resistance protein	XF1812 acriflavine resistance protein A	0,326	0,003
XF2094	VII.C	multidrug-efflux transporter	XF1813 acriflavine resistance protein B	0,287	0,001
XF2232	VII.C	catalase/peroxidase	XF1936 Catalase/peroxidase HPI	0,477	0,005
XF2407	VII.C	bacteriocin	XF2079 hemolysin-type calcium binding protein -RTX prokaryotic toxin family	0,230	0,001
XF2416	VII.C	drug tolerance protein	XF2088 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	0,214	0,002
XF2586	VII.C	outer membrane export factor	XF2255 Outer membrane protein TolC	0,205	0,001
XF2614	VII.C	superoxide dismutase [MN]	XF2280 Superoxide dismutase [Mn]	0,398	0,003
XF0889	VII.F	hemagglutinin-like secreted protein	XF0728 Filamentous haemagglutinin -FHA adhesin like protein	0,366	0,034
XF1516	VII.F	surface-exposed outer membrane protein	XF1257 Surface protein adhesin YadA-like -Xanthomonas adhesin XadA-like protein	0,121	0,001
XF1529	VII.F	surface protein	XF1270 Surface protein adhesin YadA-like -Xanthomonas adhesin XadA-like protein	0,215	0,001
XF1981	VII.F	surface protein	XF1707 Surface protein adhesin YadA-like -Xanthomonas adhesin XadA-like protein	0,274	0,003
XF0418	VII.G	toluene tolerance protein	XF0329 Toluene tolerance protein Ttg2D	0,372	0,001
XF1623	VII.G	periplasmic glucan biosynthesis protein	XF1355 Glucans biosynthesis glucosyltransferase H	0,482	0,002
XF0290	VII.H	aconitase	XF0232 Aconitase -aconitate hydratase -Citrate hydro-lyase	0,204	0,001
XF1987	VII.H	VacB protein	XF1712 Ribonuclease R -RNase R	0,280	0,001
XF0363	VIII.A	conserved hypothetical protein	XF0282 Putative lipoprotein / OmpA family protein	0,148	0,001
XF0460	VIII.A	conserved hypothetical protein	XF0363 Tfp pilus assembly protein PilF/PilW	0,424	0,003
XF0461	VIII.A	conserved hypothetical protein	XF0364 conserved hypothetical protein	0,353	0,001
XF0464	VIII.A	conserved hypothetical protein	XF0367 Putative lipoprotein	0,328	0,002
XF0510	VIII.A	conserved hypothetical protein	XF0406 phage-related portal protein -GPB -Minor capsid protein B; xfp6	0,469	0,007
XF0550	VIII.A	conserved hypothetical protein	XF0443 TonB-dependent receptor	0,186	0,001
XF0553	VIII.A	conserved hypothetical protein	XF0445 Putative lipoprotein LppC	0,418	0,004
XF0554	VIII.A	conserved hypothetical protein	XF0446 conserved hypothetical protein	0,496	0,009
XF0565	VIII.A	conserved hypothetical protein	XF0455 conserved hypothetical protein	0,378	0,003
XF0757	VIII.A	conserved hypothetical protein	XF0620 conserved hypothetical protein	0,340	0,003
XF0758	VIII.A	conserved hypothetical protein	XF0621 Putative ATP-binding protein	0,391	0,004

XF0761	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF0624 conserved hypothetical protein	0,356	0,001
XF0834	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF0684 2-octaprenyl-3-methyl-6-methoxy-1,4-benzoquinol hydroxylase	0,356	0,007
XF0906	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF0744 tRNA-i-6A37 thiotransferase	0,489	0,004
XF0940	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF0773 conserved hypothetical protein	0,253	0,002
XF0948	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF0780 Transcriptional repressor NrdR	0,404	0,001
XF1126	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF0926 conserved hypothetical protein	0,321	0,002
XF1252	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1036 Putative lipoprotein	0,388	0,002
XF1264	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1047 Outer membrane autotransporter beta-domain protein	0,435	0,002
XF1300	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1072 ABC-type uncharacterized transport system, auxiliary component	0,470	0,002
XF1382	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1142 DNA-binding protein Dps -DNA protection during starvation protein	0,495	0,022
XF1384	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1144 conserved hypothetical protein	0,315	0,002
XF1482	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1225 conserved hypothetical protein	0,274	0,001
XF1552	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1288 conserved hypothetical protein	0,434	0,001
XF1571	VIII.A	conserved protein	hypothetical		0,220	0,001
XF1608	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1342 conserved hypothetical protein	0,306	0,002
XF1649	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1379 phage-related protein; xfp4	0,127	0,001
XF1676	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1308 phage-related protein ; xfp3	0,211	0,001
XF1702	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1431 transcriptional regulator ; xfp4	0,365	0,005
XF1750	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1478 hydrolase of the alpha/beta superfamily ; giCVC	0,466	0,013
XF1894	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1622 radical activating enzyme	0,473	0,019
XF1895	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1623 conserved hypothetical protein	0,332	0,002
XF2090	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1809 inorganic polyphosphate/ATP-NAD kinase	0,473	0,003
XF2237	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1940 TonB-dependent receptor	0,283	0,001
XF2270	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF1963 Aldose 1-epimerase family protein -Mutarotase -Glycoside hydrolase-type carbohydrate-binding protein	0,407	0,002
XF2409	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF2081 Superfamily I DNA helicase	0,469	0,003
XF2453	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF2125 Ribosomal large subunit pseudouridine synthase B	0,493	0,003
XF2472	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF2144 Amidohydrolase family protein	0,454	0,005
XF2474	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF2146 conserved hypothetical protein	0,454	0,005
XF2551	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF2225 Peptidase S9 family protein -prolyl oligopeptidase family, clan SC	0,485	0,007
XF2575	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF2248 4-hydroxy-3-methylbut-	0,392	0,007

		protein		2-en-1-yl diphosphate synthase		
XF2594	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF2262 Peptidase M48 family protein	0,468	0,001
XF2760	VIII.A	conserved protein	hypothetical	XF2401 conserved hypothetical protein	0,353	0,001

I- metabolismo intermediário, II- biossíntese de pequenas moléculas, III- metabolismo de macromoléculas, IV- estrutura celular, V- processos celulares, VI- elementos genéticos móveis, VII- virulência e patogenicidade, VIII- Hipotéticas. CAT-LBI: categorias funcionais adotadas por Simpson et al. (2000), FUNCTION LBI: produto genico encontrado pelo site <<http://www.lbi.ic.unicamp.br/xf/>> , FUNCTION LNCC: produto gênico encontrado pelo site <<http://www.xylella.lncc.br/>>, p value e *fold change* calculados através do programa ArrayStar.