

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

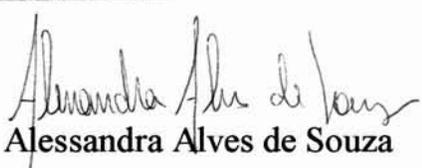


Raquel Caserta

**“Expressão, caracterização e purificação de adesinas envolvidas na
formação do biofilme de *Xylella fastidiosa*”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
RAQUEL CASERTA
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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


Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Alves de Souza

Campinas, 1 de Setembro de 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

C268e Caserta, Raquel
Expressão, purificação e caracterização de adesinas envolvidas na formação do biofilme de *Xylella fastidiosa* / Raquel Caserta. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Alessandra Alves de Souza.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Proteínas fimbriais. 2. Proteínas afimbriais. 3. Adesão inicial. 4. Agregação celular. 5. Biofilme. I. Souza, Alessandra Alves de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(scs/ib)

Título em inglês: Expression, purification and characterization of adhesins involved in biofilm formation of *Xylella fastidiosa*.

Palavras-chave em inglês: Fimbrial proteins; Non fimbrial proteins; Inicial adhesion; Celular aggregation; Biofilm.

Área de concentração: Genética de Microrganismos.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Alessandra Alves de Souza, Anete Pereira de Souza, Welington Luiz Araújo.

Data da defesa: 01/09/2008.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 1 de Setembro de 2008

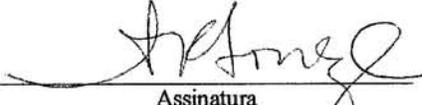
BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Alessandra Alves de Souza (Orientadora)



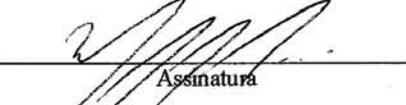
Assinatura

Profª. Dra. Anete Pereira de Souza



Assinatura

Prof. Dr. Wellington Luiz Araújo



Assinatura

Prof(a). Dr(a) Dagmar Ruth-Stach Machado

Assinatura

Prof. Dr. Marco Aurélio Takita

Assinatura

*Diz-se que,
mesmo antes de um rio cair no oceano,
ele treme de medo.
Olha para trás, para toda a jornada:
os cumes, as montanhas,
o longo caminho sinuoso através das florestas,
através dos povoados,
e vê à sua frente um oceano tão vasto
que entrar nele nada mais é do que
desaparecer para sempre.
Mas não há outra maneira.
O rio não pode voltar.
Ninguém pode voltar.
Voltar é impossível na existência.
Só se pode ir em frente.
O rio precisa arriscar e entrar no oceano.
E somente quando ele entra no oceano
é que o medo desaparece,
porque apenas então o rio saberá que
não se trata de desaparecer no oceano,
mas tornar-se oceano.
Por um lado é desaparecimento
e por outro lado é renascimento.
(autor desconhecido)*

*À minha mãe, que com força e alegria
mostra-me todos os dias a grandeza
de mulher que é*

Agradecimentos

Primeiramente e acima de tudo, agradeço a Deus por me capacitar na realização deste trabalho. Por guardar meus caminhos e me guiar, colocando em minha vida grandes oportunidades e pessoas incríveis,

À minha orientadora Dra. Alessandra Alves de Souza, por acreditar em mim e me fazer crescer como profissional, por me delegar planos e projetos que me pareciam impossíveis e hoje estão prontos e pelo estreitamento das nossas relações tanto profissionais como pessoais,

Às minhas irmãs e meu pai, por todas as vezes em que me ajudaram nessa caminhada e me ensinaram valores dos quais jamais esquecerei. À minha mãe pelo exemplo de vida,

Ao Caio, que há quatro anos faz de mim uma mulher muito feliz, me respeitando e me fazendo passar por momentos maravilhosos. Obrigada por todas as vezes que você proporcionou a calma que eu precisava, por um bom dia de pescaria ou por um lugar no seu peito, e assim ser capaz de continuar trabalhando,

À Nana, Vitor e tia Palmira, que me receberam tão bem (e tão cheios de guloseimas) durante os períodos que precisei de novas casas para a realização de algumas etapas deste trabalho,

À grandes amigas do Centro de Citricultura, Eliane, Mariana, Carol, Jaqueline e Lígia, pelos momentos de trabalho, descontração, choros e gargalhadas. Agradeço também a Juliana Baptista, que foi uma grande companheira todas as vezes em que ficamos overnight no laboratório,

À toda a equipe do Centro de Citricultura pelo apoio e auxílio no dia a dia, em especial a Dra. Maria Luisa Penteadou Natividade Targon, Dr. Marco Aurélio Takita e Dr. Helvécio Della Coletta Filho, com os quais aprendi muito,

Ao pessoal da salinha da pós, pelas aulas, cafezinhos, crescimento e convivência,

Ao Dr. Marcos Antônio Machado, pelo local de trabalho e oportunidade que me proporciona,

À professora Anete Pereira de Souza e toda a equipe do seu laboratório, no CBMEG, pelo espaço concedido e fundamental ajuda na realização desse trabalho. Em especial, agradeço a Dra. Luciana K. Rosselli por me ensinar expressar proteínas, uma etapa importante deste trabalho, e por estar sempre pronta para o meu SOCORRO!

À professora Dagmar Ruth-Stach Machado pela prontidão e competência na colaboração deste trabalho, ao Luis Peroni pelo auxílio com a obtenção dos anticorpos e José Raimundo por me proteger dos coelhos selvagens,

À todos do Laboratório Max Fefer, em especial ao Dr. Carlos Alberto Labate, Dr. Alexander Andrade e José Matheus Camargo Bonatto pela recepção, acompanhamento e assistência no seqüenciamento das proteínas,

Ao Dr. Elliot Watanabi Kitajima pela colaboração com a microscopia eletrônica de transmissão,

À Fapesp, pelo auxílio financeiro concedido.

Índice

Resumo.....	ix
Abstract.....	xi
1. Introdução.....	1
1.1 A citricultura brasileira e a clorose variegada dos citros.....	1
1.2 O genoma de <i>X. fastidiosa</i>: a revelação de um novo modelo de patogenicidade.....	4
1.3 Biofilmes bacterianos.....	5
1.3.1 O crescimento em biofilme.....	5
1.3.2 Vantagens adaptativas das células em biofilme.....	10
1.3.3 A formação de biofilme por <i>X. fastidiosa</i> e sua relação com a patogenicidade.....	11
1.4 O papel de adesinas na formação do biofilme.....	15
1.5 Adesinas fimbriais e afimbriais como candidatas a vacinas contra bactérias patogênicas.....	21
1.6 Adesinas fimbriais e afimbriais de <i>X. fastidiosa</i> e seu envolvimento na formação do biofilme.....	23
2. Hipótese do trabalho.....	30
3. Objetivo Geral.....	30
3.1 Objetivos específicos do trabalho.....	30
4. Materiais e método.....	31
4.1 Desenho dos primers.....	31
4.2 Extração de DNA total de <i>Xylella fastidiosa</i>, obtenção dos amplicons de interesse e purificação.....	33
4.3 Ligação dos fragmentos em pGEM-T e seqüenciamento.....	34
4.4 Seqüenciamento dos fragmentos <i>uspA1</i> e <i>uspA</i>.....	35
4.5 Digestão e purificação das construções em pGEM-T, do vetor pET28a e ligação no vetor de expressão.....	35
4.6 Teste de expressão das proteínas dos clones contendo pET28a.....	36
4.7 Purificação das proteínas.....	37
4.8 Seqüenciamento das proteínas purificadas por espectrometria de massa.....	38
4.9 Imunização dos coelhos para obtenção de anticorpos policlonais.....	40
4.10 Teste de concentração e especificidade dos anticorpos pelo método de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).....	40
4.11 Extração das proteínas totais e extracelulares das diferentes fases do biofilme.....	41
4.12 Quantificação das proteínas para western blot.....	42
4.13 Western blot das proteínas coletadas.....	42
4.14 Imunofluorescência das diferentes fases do biofilme utilizando os anticorpos contra as proteínas alvo.....	43
4.15 Imunolocalização através de microscopia eletrônica de transmissão das proteínas alvo em plantas infectadas.....	44
5. Resultados.....	46
5.1 Extração de DNA total, obtenção dos amplicons de interesse e purificação.....	46
5.2 Ligação dos amplicons em pGEM-T e seqüenciamento.....	46
5.3 Digestão e purificação dos transformantes contendo pGEM-T, do vetor pET28a e	

ligação em vetor de expressão.....	47
5.4 Teste de expressão dos transformantes positivos pET28a.....	48
5.5 Purificação das proteínas.....	51
5.6 Sequenciamento das proteínas de interesse.....	53
5.7 Teste de concentração e especificidade dos anticorpos pelo método de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).....	57
5.8 Expressão das proteínas fimbriais e afimbriais extraídas nas diferentes fases do biofilme avaliadas por Western Blot.....	60
5.8.1 Expressão temporal das proteínas fimbriais.....	60
5.8.2 Expressão temporal das proteínas afimbriais.....	62
5.8.3 Verificação da expressão de proteínas fimbriais e afimbrias na condição planctônica de crescimento.....	65
5.9 Imunofluorescência das diferentes fases do biofilme utilizando os anticorpos contra as proteínas alvo.....	66
5.9.1 Caracterização das fases do biofilme por fluorescência.....	66
5.9.2 Imunomarcção das proteínas alvo no biofilme de <i>X. fastidiosa</i>	68
5.10 Microscopia eletrônica de Transmissão de plantas infectadas e das fases do biofilme.....	79
6. Discussão.....	90
6.1 Amplificação dos genes de interesse, expressão das proteínas alvo e obtenção dos anticorpos policlonais.....	90
6.2 Expressão das proteínas fimbriais e afimbriais extraídas nas diferentes fases do biofilme avaliadas por Western Blot.....	91
6.3 Imunomarcção por fluorescência das proteínas alvo no biofilme.....	97
6.4 Localização das proteínas alvo em bactérias no xilema de plantas sintomáticas.....	100
7. Considerações finais.....	105
8. Referências bibliográficas.....	110
Anexo I – Curva de BSA.....	118
Anexo II – Produção Científica.....	119
1 Resumos publicados em congressos.....	119
2 Cursos.....	120
3 Publicação.....	120
4 Prêmio.....	120
10. Certificado de Bioética.....	121

Resumo

É inquestionável a importância da participação da citricultura na economia brasileira. O Brasil é o maior exportador de suco concentrado do mundo. Em 2007 as exportações brasileiras quase alcançaram 400 milhões de caixas de laranja, retrato de uma cultura que gera uma diversidade enorme de empregos diretos e indiretos, movimentando também a indústria de insumos. O estado de São Paulo tem maior destaque nessa produção e no final dos anos 80 foi severamente prejudicado pela Clorose Variegada dos Citros (CVC), uma doença que acarreta danos da ordem de milhões de dólares por diminuir o tamanho dos frutos e, por consequência, a quantidade de suco produzido. Foi comprovado que a bactéria causadora da CVC é a *Xylella fastidiosa*, um fitopatógeno de crescimento limitado ao xilema. Devido a importância da citricultura para o estado de São Paulo, a *X. fastidiosa* teve seu genoma completo seqüenciado e foram encontrados diversos genes relacionados a adesão, muitos deles similares a patógenos de humanos e animais. Isso sugeriu que a adesão e a formação do biofilme fossem fatores essenciais para a sobrevivência da bactéria na planta. Essa hipótese é reforçada pelo fato de plantas sintomáticas apresentarem colônias de bactérias aderidas nas paredes dos vasos do xilema. Trabalhos posteriores comprovaram que sua colonização se dá pela formação de um biofilme que ocasiona o bloqueio dos vasos, dificultando a eficiência do transporte de água e seiva pela planta. Nesse contexto, o estudo da participação de proteínas de adesão, sejam elas fimbriais ou afimbriais, é fundamental para o entendimento da formação e estrutura do biofilme. Por apresentarem funções distintas, adesinas fimbriais e afimbriais são expressas em momentos diferentes durante a formação do biofilme. Diante do exposto acima, o objetivo desse trabalho foi monitorar a expressão de duas adesinas fimbriais e duas adesinas afimbriais de *X. fastidiosa* envolvidas com a formação do biofilme *in vitro*. Para tal, foram realizados Western blot e microscopia de fluorescência utilizando anticorpos desenvolvidos contra as proteínas alvo. Os resultados revelaram que adesinas fimbriais se expressam preferencialmente nas fases iniciais do biofilme, enquanto que adesinas afimbriais estão expressas nas fases mais tardias, quando o biofilme já apresenta traços de agregação celular. Esse padrão de expressão sugere que a adesão inicial da bactéria ao substrato seja mediada por proteínas fimbriais e a adesão célula a célula seja função de proteínas afimbriais. Além disso, uma maior ou menor quantidade de cada proteína se

encontra expressa em todas as fases do biofilme, sugerindo haver uma regulação de expressão que resulta em interação biológica entre elas, a fim de manter a estabilidade e estruturação do biofilme. Com o objetivo de monitorar a expressão dessas adesinas in vivo, foram analisadas também secções ultrafinas de pecíolos de vinca, hibisco e citros infectados e apresentando sintomas da doença. Em todas as análises foi possível detectar a presença das proteínas alvo, comprovando que elas são necessárias para o processo de infecção da planta pela bactéria. Os resultados aqui apresentados demonstram que proteínas fimbriais e afimbriais, assim como em patógenos de humanos, são necessárias para a formação do biofilme de *X. fastidiosa*. Este é o único fitopatógeno cujo mecanismo de patogenicidade é a formação de um biofilme. Neste sentido, os resultados aqui apresentados são importantes no auxílio de possíveis controles de doenças formadas por biofilmes, uma vez que o tempo de expressão de cada adesina foi determinado, elas poderiam ser neutralizadas antes de desempenharem suas funções, quebrando a estabilidade do biofilme através da interrupção da interação entre as proteínas.

Abstract

The importance of citriculture in Brazilian's economy is unquestionable. Brazil is the major exporter of concentrate juice in the world. In 2007, Brazilian exportations of orange almost reached 400 million boxes, reflecting the importance of a product that generates an enormous diversity of direct and indirect jobs, even helping the insums industry. In Brazil, São Paulo state has a great prominence in orange production. In the 80's, the citrus fields were severely harmed by Citrus Variegated Chlorosis (CVC), a disease that causes losses of million dollars since it affects the fruit size and, consequently, juice production. It was proved that the *Xylella fastidiosa*, a phytopathogen that grows limited to the xylem vessels, is the causal agent of CVC. Due to the importance of citriculture in the São Paulo state, the genome of *X. fastidiosa* was sequenced and there were found many genes related to adhesion, some of them similar to human and animal pathogens. This fact suggested that adhesion and biofilm formation were essential for the survey of the bacteria within the plant. This hypothesis is supported by the fact that symptomatic plants have colonies of bacteria adhered to the walls in xylem vessels. Subsequent works demonstrated that the colonization occurs through the formation of a biofilm that blocks the vessels, reducing the efficiency of water and sap transportation. In this context, the study of the role of the fimbrial or afimbrial adhesion proteins is fundamental to the elucidation of the biofilm structure and formation. These adhesins show different functions, and because of that they are not expressed at the same time during biofilm formation. In face of what was shown above, the aim of this work was to monitor the expression of two fimbrial and two non fimbrial adhesins involved in biofilm formation *in vitro*. Western blot and fluorescence microscopy using polyclonal antibodies developed against the target proteins were performed, and the results revealed that fimbrial adhesins are expressed preferentially at the initial phases of biofilm formation, while non fimbrial adhesins are expressed at the late phases, when the biofilm already presents cellular aggregation traits. This expression pattern suggests that the initial adhesion of the bacteria to the substrate is mediated by fimbrial adhesins and that the function of cell to cell adhesion is performed by non fimbrial adhesins. Besides, each protein studied is found more or less to be expressed during all stages of biofilm development, suggesting the existence of a regulatory mechanism that results in a biological interaction between these proteins, in order to keep the stability and structure of the

biofilm. In order to accompany the expression of these adhesins *in vivo*, ultra thin sections of petioles of periwinkle, hibiscus and citrus infected by *X. fastidiosa* and presenting symptoms were prepared. All the sections showed the presence of the target proteins, suggesting that they are necessary to the infectious process of the plants. The results demonstrated that fimbrial and non fimbrial proteins, as well as in human pathogens, are necessary for the biofilm formation by *X. fastidiosa*. This is the only phytopathogen which requires the formation of a biofilm to cause the disease. In this way, the results obtained in this work may contribute with the development of possible approaches to control diseases caused by biofilm formation, once the expression profile of each adhesin was determined. In a possible attempt to prevent the symptoms, the interaction between these adhesins could be blocked, breaking the stability of biofilm.

1. Introdução

1.1 A citricultura brasileira e a clorose variegada dos citros

O Brasil é o maior produtor mundial de suco de laranja, sendo o carro-chefe desse título o estado de São Paulo que, desde a década de 60 investe em tecnologias para o melhoramento dessa atividade comercial. As indústrias de processamento de laranjas de São Paulo (incluindo o sul de Minas Gerais) juntamente com a Flórida dominam o mercado de suco de laranja mundial. São Paulo se tornou a maior região produtora de citros do mundo, impulsionada por seguidas geadas na Flórida, seu principal concorrente, que aumentaram os preços da fruta produzida na América do Norte (Neves & Boteon 2005). A alta da citricultura no estado de São Paulo foi alavancada pela instalação de um parque industrial voltado ao mercado externo de suco. Os investimentos surtiram efeito, já que em 2007, o estado contava com 212 milhões de laranjeiras em produção, resultando em 13.4 milhões de toneladas de laranjas para a produção de suco. Essa produção gera ao Brasil aproximadamente 2 bilhões de dólares anuais em exportações (Bové & Ayres, 2007). A citricultura paulista é auxiliada por fatores como bons solos, chuvas suficientes para garantir uma boa produção e a não precipitação de neve. O Brasil apresenta, ainda, uma mão de obra barata e abundante que diminui os custos da produção de citros. Ademais, a indústria brasileira aumentou os investimentos no processamento do citros assim como investimentos no transporte e facilitação das exportações de suco concentrado para Europa e América do Norte (Fernandes-Jr. 2003). Na produção de suco concentrado, 98% do volume é vendido ao mercado internacional e a maior parte é engarrafada pelas empresas norte americanas e européias. Por trás de todo o caminho que percorre a produção da fruta até chegar as mãos dos consumidores, há uma cadeia que gera empregos e movimentam economias locais, já que a citricultura paulista é concentrada em poucos municípios, bastantes dependentes da cultura (Neves & Boteon, 2005).

A produção de laranjas no estado de São Paulo cresceu muito entre os períodos de 1960/61 a 2001/02, passando de 150 milhões de caixas a 420 milhões (Fernandes Jr, 2003), Atualmente, a citricultura brasileira experimentou um decréscimo na produção, sendo que em 2006 o número estimado de caixas era de 350 milhões (Bové & Ayres, 2007). Essa redução pode ter ocorrido devido a diversos problemas causados por fitopatógenos e ao fortalecimento de

outras culturas. Uma doença bastante preocupante surgiu no final dos anos 80 e foi denominada Clorose Variegada dos Citros.

A Clorose Variegada do Citros (CVC) foi constatada em 1987 em pomares da região Noroeste do Estado de São Paulo, reduzindo a produção e o tamanho dos frutos das principais variedades de laranja doce, independentemente do porta-enxerto utilizado (Laranjeira *et al.*, 2005). Inicialmente, suspeitou-se de desequilíbrio nutricional ou mesmo de manifestação de nova estirpe do vírus da tristeza dos citros, que foi refutada em vista da ausência dos sintomas típicos. Posteriormente, concluiu-se que a CVC afeta a distribuição e absorção de certos nutrientes, especialmente zinco e potássio, cujos teores foliares são muito reduzidos. Tal redução independe de quantidades disponíveis no solo e da aplicação foliar de zinco (Laranjeira *et al.*, 2005).

A identidade da bactéria *Xylella fastidiosa* só foi confirmada em 1991 por Leite Junior & Leite, e foram feitas classificações de subespécies da bactéria de acordo com características das seqüências das regiões espaçadoras entre os genes 16S e 23S. Dentre elas, a subespécie *pauca* reúne somente as isoladas de citros (Schaad *et al.*, 2004).

A *X. fastidiosa* é uma bactéria Gram negativa, com formato de bastonete e de tamanho variável, podendo chegar até 0,3 a 0,5µm de diâmetro de 1 a 5µm de comprimento. Não apresenta motilidade, nem flagelos e não são pigmentadas (Chagas *et al.*, 1992). Caracteriza-se pelo crescimento lento em meio de cultura, sendo suas colônias circulares, discretas, medindo até 0,6 mm de diâmetro após 10 dias de incubação a 28°C, podendo alcançar 1,5 mm depois de 30 dias, com variações decorrentes do meio de cultura utilizado (Coletta-Filho, 2002).

A bactéria, depois de depositada no xilema, se adere e passa a se multiplicar, produzindo substâncias extracelulares. Entre essas substâncias, uma grande quantidade de polissacarídeos extracelulares é secretada, os quais contribuem para a formação de um biofilme na superfície dos vasos do xilema. Sobre esse material depositam-se mais bactérias que resultam em grandes agregados que podem interromper o fluxo regular de água e nutrientes através desses vasos. Os agregados celulares podem, em tese, contribuir para concentrar atividade de exoenzimas bacterianas, auxiliar na captura de nutrientes, acumular substâncias tóxicas, manter a agregação de células e proteger contra flutuações ambientais (Micheltore, 2000).

Inicialmente, os principais sintomas da CVC, decorrentes da colonização por *X. fastidiosa* em plantas de laranja doce, são manchas cloróticas na parte dorsal das folhas correspondendo a

pontos marrons com aspecto de goma na superfície ventral. As plantas severamente afetadas apresentam um aspecto de debilidade geral com ramos envassourados, uma superbrotação das gemas e folhas murchas nas horas quentes do dia, mesmo em condições de umidade. Finalmente há uma redução drástica no tamanho dos frutos, tornando a planta economicamente inviável. Esses sintomas sugerem haver um entupimento no xilema ocasionando principalmente o bloqueio do transporte de água e nutrientes, resultado, provavelmente, de uma eficiente capacidade de aderência e multiplicação da *X. fastidiosa* nesses vasos condutores (Machado *et al.*, 1994). Alguns sintomas foliares estão representados na figura 1B.

Os sintomas dos frutos surgem sempre após o aparecimento dos sintomas foliares e apenas nos ramos já afetados havendo uma tendência a frutificação em pencas (Laranjeira *et al.*, 2005). Os frutos são pequenos, endurecidos, aparentam deficiência de potássio e chegam a causar danos às fabricas de moagem de suco. O fruto adquire coloração de fruto maduro, embora algumas manchas marrons possam aparecer relacionadas à diminuição da espessura da casca (Laranjeira *et al.*, 2005).

A taxa de crescimento dos frutos de ramos atacados só se diferencia dos frutos sadios após o terceiro mês, tendo sua discrepância mais acentuada ao sétimo mês, quando até a relação altura/largura dos frutos tende a aumentar (Laranjeira *et al.*, 2005). Características como acidez, teor de sólidos solúveis e quantidade de suco também são fortemente afetados, inviabilizando o fruto tanto para o consumo in natura como para a produção de suco (Laranjeira *et al.*, 2005). Alguns dos sintomas da CVC nos frutos estão exemplificados nas figuras 1A e 1C.

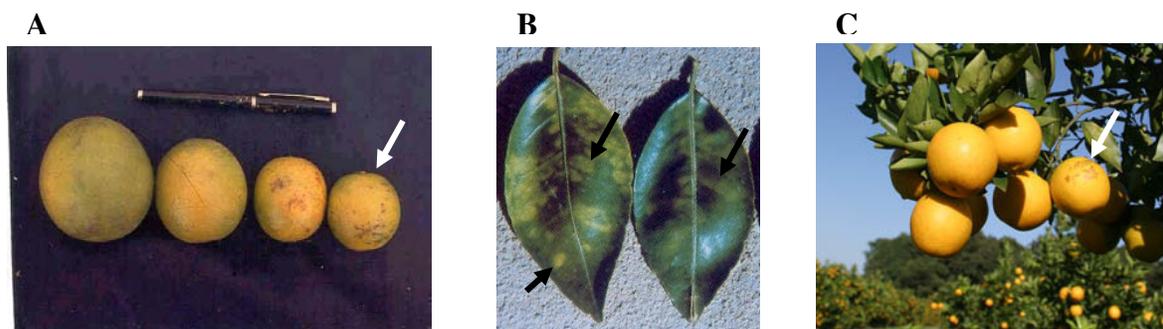


Figura 1: Alguns sintomas da CVC. **A.** Comparação de tamanhos entre frutos sadios e afetados pela doença (cortesia Dr. Marcos Machado). **B.** Sintomas de manchas cloróticas na face adaxial das folhas (www.ufrpe.br/fitopatologia/Xylecitos). **C.** Frutos afetados e sadios em um mesmo ramo da planta (www.agroanalysis.com.br).

A bactéria é transmitida através de um inseto vetor conhecido como cigarrinha (Hemíptera: Cicadellidae subfamília Cicadellinae) que se alimenta da seiva contida nos vasos do xilema das plantas (Hill & Purcell, 1995) e também é transmitida por porta enxertos, borbulhas ou mudas contaminadas (He *et al.*, 2000). O controle do vetor, bem como a produção de mudas em condições de telado são algumas maneiras de controle da disseminação da doença.

Embora a doença tenha surgido no Brasil há mais de 20 anos, sua erradicação ainda está longe de acontecer. Em 2005, dados elaborados pelo Fundecitrus estimavam que no ano anterior, 44% das laranjeiras do Estado de São Paulo apresentavam sintomas da doença. A produção sofre uma perda de 34,8 milhões de caixas, o que resulta em danos de aproximadamente 122 milhões de dólares anuais (Bové & Ayres, 2007).

Frente a tantos danos causados por essa bactéria e a necessidade de maior conhecimento acerca de suas características, a Fapesp apoiou a realização de um consórcio para o seqüenciamento do seu genoma em 1998 (Machado *et al.*, 2001).

1. 2 O genoma de *X. fastidiosa*: a revelação de um novo modelo de patogenicidade

A publicação do seqüenciamento do genoma de *X. fastidiosa* no ano de 2000 revelou a presença de 2.679.305 pares de bases no DNA cromossomal e uma quantidade de G+C igual a 52.7%. Foi possível identificar funções putativas de 47% das 2.904 regiões abertas de leitura (ORF). Há dois plasmídeos, um com 51.158 pares de bases (pXF51) e o outro com 1.285 pares de bases (pXF1.3). O maior plasmídeo contém 64 ORFs, 5 das quais codificam proteínas envolvidas na replicação do plasmídeo ou sua estabilidade e 20 proteínas envolvidas em conjugação. Uma das ORF codifica uma proteína similar a VapD, encontrada em diversas bactérias fitopatogênicas. Esse plasmídeo apresenta também vários transposons, o que sugere trocas interespecíficas de material genético. O plasmídeo pXF1.3 contém apenas 2 ORFs que codificam para proteínas associadas com replicação. As funções metabólicas têm açúcar como principal energia e fonte de carbono, apoiando a existência de um meio pobre em nutrientes no xilema (Simpson *et al.*, 2000).

Os mecanismos de patogenicidade de *X. fastidiosa* parecem envolver diversas estratégias, dentre elas a síntese de hemolisinas, colicinas, proteínas responsáveis por detoxificação, inativação de drogas e toxinas. Entretanto, o conhecimento mais intrigante revelado pelo

seqüenciamento do genoma está relacionado à ausência de genes de avirulência (*avr*), responsáveis pela interação planta patógeno que determina o desenvolvimento da doença ou a resistência do hospedeiro, e ausência de genes do sistema de secreção tipo III, responsáveis pela exportação das proteínas Avr. Por outro lado, a bactéria apresenta uma enorme diversidade de genes relacionados à síntese de EPS e proteínas de adesão. Dentre as proteínas de adesão, curiosamente, estão algumas relacionadas à adesão de patógenos a tecidos epiteliais humanos, nunca antes reportados em fitopatógenos (Simpson *et al.*, 2000). As informações do genoma, aliadas ao fato de que a causa dos sintomas da CVC é a obstrução dos vasos de xilema pela bactéria, levaram a hipótese de que o principal mecanismo de patogenicidade da *X. fastidiosa* seria a formação de um biofilme, que teria sua estrutura mantida, entre outros fatores, por proteínas de adesão.

1.3 Biofilmes bacterianos

1.3.1 O crescimento em biofilme

Durante muitos anos, microrganismos eram comumente descritos como organismos planctônicos, ou seja, suspensão de células individuais e de vida livre. Nas duas últimas décadas, o aumento dos avanços em técnicas de microbiologia tem salientado que diversas espécies de microrganismos crescem predominantemente em biofilmes em ambientes naturais (Costerton *et al.*, 1995). Biofilmes podem ser definidos como comunidades microbianas associadas a uma superfície, onde posição e relações espaciais de cada célula componente são predeterminadas por um ciclo de desenvolvimento coordenado, que é mediado (ao menos em parte) por moléculas sinalizadoras e alguns mecanismos de posicionamento celular (Stoodley *et al.*, 2002).

A preferência pelo crescimento em superfícies foi primeiramente relatada em 1943 por Claude Zobell, quando se reportava a bactérias marinhas. Costerton *et al.* (1999) estenderam essa observação a uma variedade de ecossistemas microbianos, incluindo aqueles que se desenvolvem em água corrente e aderidos a tecidos de eucariotos (Costerton *et al.*, 1999).

Existem basicamente três mecanismos que explicam a formação de biofilmes. Um deles é através da redistribuição de células aderidas, por movimentação na superfície (Dalton *et al.*, 1996; Korber *et al.*, 1995). Nesse modelo, são requeridas proteínas que desenvolvam o papel de

motilidade e agregação celular, como o caso de pili tipo IV, observado em estudos com *Pseudomonas aeruginosa* (O'Toole *et al.*, 1998). Um segundo mecanismo ocorre por divisão binária de células (Heydorn *et al.*, 2000). Quando há o processo de divisão celular, as células filhas se espalham ao redor e acima da superfície colonizada para formar os conjuntos de células, em uma maneira similar a formação de colônias em placas de ágar. O terceiro mecanismo de agregação envolve o recrutamento de células esparsas do fluido para a formação do biofilme (Tolker-Nielson *et al.*, 2000).

A resposta a uma questão central envolvendo essa condição de crescimento foi definitiva para o início de estudos mais detalhados envolvendo biofilmes: como células profundamente embebidas em biofilme podem ter acesso a nutrientes, incluindo oxigênio? Imagens de biofilmes vivos mostraram o crescimento de microcolônias de bactérias sésseis embebidas em uma matriz e entre elas espaços formados por canais de água (**Figura 2**). A estrutura básica do biofilme apresentada na figura 2 é uma compilação de imagens confocais de biofilmes vivos e hidratados formados por culturas de proteobactérias e de populações de espécies diferentes naturalmente associadas em ecossistemas. A microcolônia básica e os canais de água podem ser afetados por diversos fatores, mas sua principal característica é que a água presente nos espaços intercelulares pode ser circulada através dos canais e assim transportar nutrientes por toda comunidade microbiana (Lawrence *et al.*, 1991). A troca de nutrientes facilitada por essa arquitetura capacita comunidades em biofilme a desenvolver uma considerável espessura e complexidade enquanto mantém células individuais em estado de ótima nutrição nos diversos locais do biofilme (Stoodley *et al.*, 2002).

O biofilme apresenta fases de formação muito bem estabelecidas. Estas compreendem pelo menos: i) adesão inicial, caracterizada pela adesão de algumas células ou grupos de células a superfície a ser colonizada, ii) início da maturação, quando o biofilme já apresenta alta densidade celular, iii) biofilme maduro, quando a densidade celular atinge seu maior grau e a arquitetura do biofilme é altamente complexa, apresentando multicamadas organizadas e iv) fase de dispersão, na qual alguns grupos de células se destacam do biofilme maior para colonizarem outras partes do hospedeiro (Sauer *et al.*, 2002).

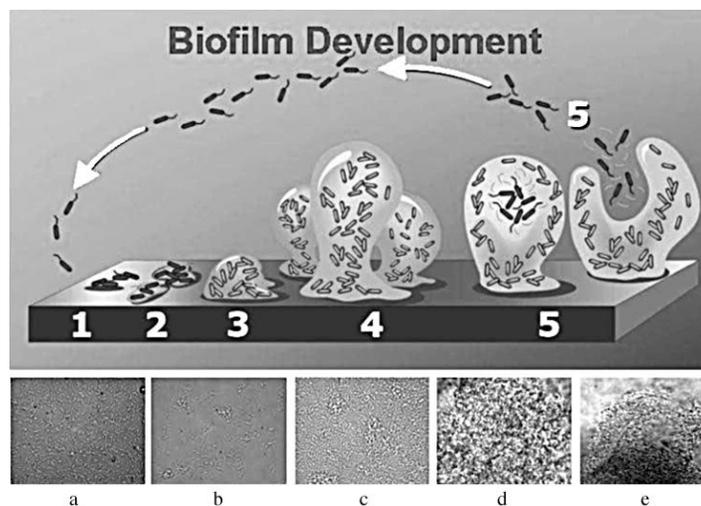


Figura 2: Diagrama mostrando o desenvolvimento do biofilme como um processo de cinco estágios. Estágio 1: adesão inicial de células a superfície. Estágio 2: produção de EPS resultando em uma adesão mais firme e irreversível. Estágio 3: desenvolvimento inicial da arquitetura do biofilme. Estágio 4: maturação da arquitetura do biofilme. Estágio 5: dispersão de células do biofilme. As figuras (a – e) abaixo do diagrama mostram os cinco estágios de desenvolvimento representado por fotomicrografia de *P. aeruginosa* em crescimento sob condições de fluxo contínuo em um substrato de vidro. Adaptado de Sauer *et al.*, 2002).

Allegrucci *et al.* (2006) estabeleceram as fases do desenvolvimento do biofilme por *Streptococcus pneumoniae* e encontraram um padrão de desenvolvimento bastante similar ao

citado acima. Os autores puderam observar a fase inicial de formação através da adesão de diplococcus ou cadeias de células após 1 dia de inoculação da bactéria. Ao segundo, dia pequenos conjuntos de células que excediam 20µm de largura e altura eram detectáveis. Três dias após a inoculação, o biofilme aparecia mais estruturalmente complexo e toda a superfície do substrato estava coberta por células organizadas como grandes agrupamentos. Nesse mesmo trabalho, foi possível observar, através de imagens confocais, os canais de água permeando biofilmes maduros. Interessantemente, biofilmes formados por estirpes diferentes também diferiram, quanto à estrutura de sua fase madura, de acordo com o sorotipo a que pertencia. Foi possível detectar três grupos de estruturas, que exibiam desde biofilmes altamente organizados, até aqueles contendo pouca biomassa e uma estrutura mais aplainada, aparentando ser mais granular e com microcolônias dispersas e pequenas (Allegrucci *et al.*, 2006). Além das fases de adesão, Prakash *et al.* (2005) reportaram alterações fenotípicas de *Salmonella enterica* sorovar Gallinarum, a bactéria causadora da febre tifóide aviária, durante a formação do biofilme. Os autores constatam através de microscopia eletrônica de transmissão, que quando ocorre à adesão da bactéria ao substrato, a produção de fimbrias agregativas e exopolissacarídeos (EPS) é iniciada, ao passo que flagelos e pili começam a ser reprimidos. Ao sétimo dia de adesão, microcolônias são formadas e é possível notar uma grande quantidade de EPS e fimbrias agregativas ao redor do biofilme. Após essa fase, foi observada a perda da arquitetura formada pelas microcolônias e a presença de bactérias livres e de formato redondo (Prakash *et al.*, 2005). Outro exemplo relacionando a formação de biofilme envolvendo a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (Rigano *et al.*, 2007). Os autores compararam a capacidade de formação de biofilme do tipo selvagem dessa bactéria a de uma estirpe que apresentava uma mutação no gene *gumB* e concluíram que o mutante, defectivo para a produção de EPS, apresentava menor capacidade de adesão em diferentes superfícies testadas. Foi possível visualizar, através de microscopia confocal e bactérias transformadas com GFP, que *X. axonopodis* pv. citri apresenta adesão polar ao substrato durante a fase de início do biofilme, que é seguida por um crescimento alcançado por divisão e migração celular. Microcolônias foram observadas bem estabelecidas ao terceiro e quarto dias quando estruturas complexas começaram a se formar, estas apresentavam multicamadas celulares em contato, formando um biofilme de arquitetura que consistia de um complexo de células agrupadas, similar a uma colméia. Em contraste, os mutantes *gumB* foram

incapazes de formar tais estruturas após quatro dias de inoculação. Esses resultados sugerem que a presença de EPS é fundamental para o desenvolvimento da arquitetura do biofilme, através da promoção de agregação celular (Rigano *et al.*, 2007). Mutantes para genes do operon *gum* de *X. fastidiosa* de citros também foram obtidos. Esse fitopatógeno apresenta um operon *gum* muito similar ao de *X. axonopodis* pv. citri, entretanto, alguns genes estão ausentes. Quando os genes *gumB* e *gumF* foram mutados, as bactérias exibiram características celulares normais, morfologia típica de colônia e, diferentemente de *X. axonopodis* pv. citri, ausência de alteração na síntese de EPS. Contudo, foi possível notar uma reduzida capacidade de formação do biofilme por esses mutantes em meio BCYE, sugerindo que esses genes auxiliam no desenvolvimento do biofilme (Souza *et al.*, 2006). Por outro lado a relação dos genes *gum* com o EPS produzido por *X. fastidiosa* causadora de doença de Pierce, foi relatada por Roper *et al.* (2007). Os autores utilizaram uma estirpe mutante de *X. campestris* pv. campestris, que apresentava a inativação do gene *gumI*, para a produção de anticorpos contra o EPS produzido por essa bactéria. Os anticorpos foram empregados na detecção de EPS produzido em biofilmes por *X. fastidiosa* tanto *in vitro* quanto *in planta* e foi demonstrado que eles reconheceram o EPS em todas as condições testadas, sugerindo envolvimento desse polissacarídeo com a formação do biofilme. Neste caso, os autores discutem que no trabalho de Souza *et al.* (2006) a não detecção de diferenças na produção de EPS produzidos por mutantes *gumB* e *gumF* da estirpe 9a5c de *X. fastidiosa* foi devido ao método utilizado, que se baseou no peso seco do EPS de culturas planctônicas crescidas em meio XDM₂. Esse método não seria suficientemente sensível para a detecção de possíveis diferenças (Roper *et al.*, 2007).

É interessante ressaltar que durante o desenvolvimento do biofilme por *X. fastidiosa* ocorre a produção de uma matriz que envolve EPS. De acordo com Roper *et al.* (2007), em *X. fastidiosa* crescida em biofilme, o EPS produzido pelas células se comporta como uma cápsula firmemente aderida, esse caráter foi comprovado pelo fato de que quantidades muito próximas de EPS puderam ser quantificadas mesmo após lavagens com tampões contendo baixas e altas concentrações salinas, indicando que ele não é apenas ligado ionicamente. O trabalho demonstrou, através de imunomarcagem, que o EPS produzido pelas células em biofilme aumenta de acordo com o aumento da colônia. Após 24 horas de adesão *in vitro*, pouco EPS foi detectado, ao passo que ao oitavo dia foi possível visualizá-lo distribuído de maneira abundante por todo o

biofilme. O EPS de *X. fastidiosa* também foi detectado em vasos de videiras infectadas, onde estava associado à presença ou não de bactérias e aparentava auxiliar em sua oclusão (Roper *et al.*, 2007).

Quando o biofilme atinge o estágio maduro uma característica bastante marcante é a alta densidade celular. Esse fator leva ao desencadeamento de um sistema complexo de sinalização celular denominado ‘quorum sensing’ (QS). Esse sistema de sinalização regula positivamente ou negativamente a expressão de genes. Newton *et al.*, 2004 discutem que esse sistema de regulação é influenciado e está ligado a sinais ambientais e aqueles vindos do hospedeiro. Diversos sinais de QS, denominados autoindutores (AI), dentre eles moléculas relacionadas à acil homoserina lactonas, diésteres furanosil boratos, AI colera etc. (Defoirdt *et al.*, 2008). Em alguns microrganismos, os AI são detectados na superfície através de sua ligação a proteínas da membrana celular, essas proteínas receptoras formam um sistema de dois componentes que alimenta uma cascata de transdução de sinais de fosforilação e defosforilação (Taga *et al.*, 2003).

A fase final do biofilme é caracterizada pela dispersão de células (tanto individuais quanto em grupo) de um biofilme aderido a um substrato. A dispersão ativa é um evento fisiologicamente regulado. Alisson *et al.* (1998) demonstraram que seguido de uma incubação prolongada, biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* passaram por essa fase coincidentemente com uma redução do EPS. Em *Clostridium thermocellum* a entrada na fase estacionária tem sido correlacionada com um aumento da dispersão do biofilme do substrato (Lamed & Bayer 1986). Alterações no meio ambiente, como mudanças de pH, diminuição de nutrientes e limitação de oxigênio também podem aumentar níveis de dispersão (O’Toole *et al.*, 2000; Sauer *et al.*, 2004). Sauer *et al.* (2002) compararam o padrão de expressão protéica através de gel bidimensional e verificaram que células de *P. aeruginosa* que estavam se dispersando eram mais similares ao de células planctônicas do que de células de biofilmes maduros. Esse resultado indica que células em dispersão de biofilmes reverterem ao modo de crescimento planctônico; desta maneira, o ciclo de desenvolvimento de biofilmes se torna completo (Sauer *et al.*, 2002).

1.3.2 Vantagens adaptativas das células em biofilme

Sabe-se que as células que crescem em biofilmes apresentam grandes vantagens adaptativas devido, por exemplo, a presença da matriz que envolve as células em biofilme. Essa matriz fornece estrutura e coesividade à medida que mantém as células reunidas e seguras por uma “rede” protéica, sendo um fator de suma importância para o crescimento do biofilme (Danese *et al.*, 2000). Primeiramente, porque biopolímeros de EPS, um dos componentes da matriz, são altamente hidratados, o que retém água e evita a desidratação, além de auxiliar no transporte de substâncias pelo biofilme (Flemming *et al.*, 2007). Outra função da matriz é a de atribuir adesividade à colônia, mantendo as células aderidas mesmo em ambientes sujeitos a fortes pressões (Körstgens *et al.*, 2001). Finalmente, e não menos importante, é a função de proteção para o biofilme atribuída a matriz. A presença de uma camada gelatinosa de polissacarídeos protege as células contra a penetração de antibióticos e biocidas (Gordon *et al.*, 1988; Nichols *et al.*, 1988). Os polímeros da matriz podem agir como uma resina de troca iônica onde moléculas altamente carregadas são ativamente retiradas da solução ao passarem pela camada. Antes que penetrem pelo biofilme, moléculas teriam que saturar todos os sítios de ligação disponíveis (Gordon *et al.*, 1988; Nichols *et al.*, 1988). O acesso desses agentes é substancialmente reduzido pela presença de exopolímeros que, em adição ao agirem como sítios de adsorção, irão reagir quimicamente com biocidas, neutralizando-os. Isso resulta em uma maior resistência das células em biofilme contra tais agentes. Um exemplo disso é observado para a estirpe β -lactamase-negativa de *Klebsiella pneumoniae*, que apresenta seu crescimento em vida livre suscetível a $2\mu\text{g/mL}$ de ampicilina, ao passo que quando em biofilme, 66% da população foi capaz de suportar um tratamento com $500\mu\text{g/mL}$ de ampicilina por 4 horas (Stewart & Costerton 2001).

Embora a matriz que envolve o biofilme seja eficiente para o aumento da resistência das células a compostos antimicrobianos, a ativação de genes que atuam nesse sentido também é importante para esse processo. Foi demonstrado que além da resistência física promovida, as células em biofilme apresentam uma maior resistência genética do que as células plnactônicas, devido a regulação positiva de genes específicos (Mah *et al.*, 2003). Os autores demonstraram que mutantes para o gene *ndvB* de *P. aeruginosa* apresentavam a matriz do biofilme intacta, porém foram suscetíveis a tobramicina quando comparado ao tipo selvagem. Este foi o primeiro

relato da resistência genética das células em biofilme. Posteriormente, vários foram os trabalhos mostrando a importância da resistência genética das células em biofilme. Recentemente, foi demonstrado que *X. fastidiosa* em biofilme é pelo menos 3 vezes mais resistente a cobre do que as células planctônicas e que esta resistência é uma consequência do sinergismo entre a resistência física, promovida pelo EPS e pela regulação positiva de genes associados à resistência a multidrogas (Rodrigues *et al.*, 2007).

1.3.3 A formação de biofilme por *X. fastidiosa* e sua relação com a patogenicidade

Dentre várias outras, três informações foram muito importantes para tecer um novo entendimento acerca do modo de infecção de *X. fastidiosa*, i) observações que demonstravam que plantas apresentando os sintomas da doença tinham vasos do xilema obstruídos pela bactéria (Machado *et al.*, 1994), ii) a constatação da ausência de genes *avr*, e ausência de genes do sistema de secreção do tipo III, iii) a abundância de genes que codificam para diversas proteínas de adesão (Simpson *et al.*, 2000). Relacionadas, as informações levaram a crer que esse fitopatógeno apresentava crescimento em biofilme. Marques *et al.* (2002) em um estudo envolvendo métodos de crescimento *in vitro* de diversas estirpes de *X. fastidiosa* constatou que todas as estirpes cresciam formando agregados, que diferiam em tamanho e características entre elas. Quando crescidas sem agitação em frascos com meios de cultura foi possível visualizar a presença de grupos de células no fundo do frasco ou suspensos no líquido, especialmente para as estirpes que infectam citros e café, cujo meio de cultura das quais cresciam, apresentava-se pouco turvo. A turbidez do meio de cultura das estirpes que infectam amendoeiras, olmeiro, videiras e ameixeiras eram maiores, sugerindo um crescimento planctônico, contudo quando analisadas em microscópio óptico demonstraram que todas formavam grupos de células. Quando essas culturas foram submetidas à agitação, foi observada a formação de um halo de células aderidas na interface líquido-ar. O início do crescimento desses halos foi observado entre 1 a 3 dias para estirpes de videiras, 7 a 10 dias para estirpes de amendoeiras e aproximadamente 14 dias para estirpes de ameixeiras, a estirpe de citros não formou tais halos. Entretanto, De Souza *et al.* (2004) demonstraram que a formação desses halos pela estirpe 9a5c é possível, incubando-se bactérias recém isoladas de plantas sintomáticas em meio PW sólido e, depois de atingirem

determinada massa celular, realizar a transferência para meio PW líquido. Obedecendo a temperatura de 28⁰C e agitação de 120rpm, foi possível obter os halos referentes ao biofilme de *X. fastidiosa* de citros.

Microscopia eletrônica de varredura das células de *X. fastidiosa* da estirpe Temecula na condição de crescimento em biofilme revelou a formação de uma morfologia típica: grandes agregados celulares envolvidos por uma matriz exopolimérica abundante. Essa morfologia também foi relatada em um experimento onde todas as estirpes foram crescidas em pedaços de madeira dentro meio de cultura, de maneira geral, todas as partes expostas da madeira foram colonizadas pelas bactérias, via de regra, formando biofilmes (Marques *et al.*, 2002). Contudo diferenças como morfologia celular e modo espacial de organização foram observadas entre as diferentes estirpes. Interessantemente, a estirpe de citros apresentou um biofilme formado por células mais esparsas e usualmente rodeadas por grandes quantidades de matriz exopolimérica secretada por células individuais ou grupos de células em estágios iniciais de formação. Essas observações reafirmaram o que havia sido sugerido por Hopkins (1985) quando relatou que sucessivas passagens de culturas de células promoviam a perda da capacidade de agregação. Portanto, a virulência da bactéria poderia estar associada a esse modo de crescimento agregado que, além de bloquear mecanicamente os vasos do xilema causando os sintomas de estresse hídrico, concentra as células desempenhando um importante papel na regulação de virulência dependente de densidade celular.

Os trabalhos de desenvolvimento do biofilme *in vitro* possibilitaram a relação direta dessa estrutura com a patogenicidade da bactéria e tal inferência foi esclarecida *in planta* por Newman *et al.* (2003), quando compararam secções de pecíolos de folhas de videira (*Vitis vinifera*) com sintomas ou não da doença de Pierce e, analisando o xilema colonizado por bactérias transformadas com GFP, relataram que as folhas sintomáticas apresentavam cinco vezes mais vasos colonizados que as assintomáticas e que desses vasos colonizados, existiam dez vezes mais vasos bloqueados nas folhas sintomáticas que nas outras folhas. Contudo, uma grande porcentagem dos vasos de plantas sintomáticas não apresentavam-se totalmente bloqueados, indicando que a bactéria cresce preferencialmente em colônias que não causam bloqueio. Os autores demonstraram, então, uma relação direta entre o número de vasos bloqueados com os sintomas da doença. Mais que isso, as folhas sintomáticas apresentavam vinte vezes mais

colônias grandes de *X. fastidiosa* (1000 células ou mais) por secção, demonstrando que a frequência de colônias grandes, muitas das quais obstruindo os vasos, também está associada aos sintomas da doença (Newman *et al.*, 2003).

Finalmente, um modelo de crescimento das células em biofilme foi proposto através de estudos que indicaram a natureza da matriz que envolve a estrutura. Esta foi analisada por Osiro *et al.* (2004) através de análises por FTIR e revelou um padrão de picos referentes a lipídeos, proteínas, ácidos graxos, lipopolissacarídeos e polissacarídeos como constituintes dessa matriz. Os autores comprovaram também que não são necessárias grandes quantidades de EPS para que a bactéria consiga se aderir ao substrato, o que sugere uma forte participação de adesinas nesse processo. Nesse mesmo trabalho foi demonstrado que constituintes de EPS e proteínas de adesão são carregados positivamente. Essa natureza das adesinas é determinada pela alta presença de aminoácidos como lisina, arginina e histidina, que são positivamente carregados. As adesinas seriam importantes na atração inicial das células a parede negativa do substrato e, juntamente com velocidade de fluxo e pH do xilema, tempo de adaptação no hospedeiro e seus mecanismos de defesa, são fundamentais para o estabelecimento da colônia (Osiro *et al.*, 2004).

De Souza *et al.* (2003) desenvolveram um trabalho que auxiliou na confirmação da relação entre formação de biofilme e patogenicidade de *X. fastidiosa*. Através de inoculações de culturas da estirpe 9a5c de *X. fastidiosa* em primeira passagem - FP (virulentas - recentemente isoladas de plantas sintomáticas) e diversas passagens – SP (avirulentas - culturas após 1 ano de subcultivo) em laranjeiras doce e vinca. Foi possível detectar, através de PCR quantitativo em tempo real, bactérias em FP após 60 dias de inoculação, ao passo que, a detecção das bactérias em SP, só foi possível após 120 dias de inoculação. Além disso, após 180 dias, plantas inoculadas com culturas FP apresentavam elevado crescimento da população de bactérias, enquanto que naquelas inoculadas com culturas em SP houve declínio dessa população. Condizente com a densidade populacional, apenas plantas inoculadas com culturas virulentas apresentaram sintomas de CVC (De Souza *et al.*, 2003).

Nesse mesmo trabalho, foram reportadas diferenças na expressão gênica, por microarranjos de DNA, entre as condições de crescimento FP e SP de *X. fastidiosa*. Os genes expressos da primeira condição de crescimento pertenciam, em sua maioria, a grupos relacionados a patogenicidade, entre eles os que codificam para proteínas de adesão, como FimA

(proteína fimbrial similar a de *Xanthomonas hyacinthi*), duas adesinas não fimbriais (similares a UspA1 de *Moraxella catarrhalis* e Hsf de *Haemophilus influenzae*) e MsrA (que é responsável por manter a adesividade de proteínas). Além desses, foram detectados genes relacionados à adaptação ao ambiente como, colicinas e proteínas de resistência a multidrogas e um componente do sistema de secreção de enzimas de degradação e toxinas. Todo esse conjunto de genes infere que na condição de biofilme, a *X. fastidiosa* apresenta vantagens adaptativas como facilidade de colonização através de adesinas nos vasos do xilema, um local sujeito a forte turbulência e pressão, e capacidade competitiva devido à produção de substâncias antibacterianas, como as colicinas e eliminação de compostos antimicrobianos por bombas de efluxo (De Souza *et al.*, 2003).

Em complementação ao trabalho anterior, De Souza *et al.* (2004) realizaram um estudo da expressão global de genes de *X. fastidiosa* comparando-se as condições de crescimento biofilme e planctônica. Para isso, todas as fases de desenvolvimento do biofilme *in vitro* foram estabelecidas, dessa maneira pôde-se constatar que entre três e cinco dias de crescimento as células começaram a aderir ao substrato formando pequenos agregados. Ao décimo dia, grupos maiores de células iniciaram seu desenvolvimento, embora alguns grupos pequenos se mantivessem livres do biofilme. O desenvolvimento da arquitetura inicial do biofilme foi visto ao décimo quinto dia e atingiu seu auge ao vigésimo dia, quando os grupos de células atingiram maior densidade celular, caracterizando a fase madura do biofilme. A dispersão de células do biofilme foi vista aos 30 dias, caracterizada pela desagregação de grupos de células. As comparações de expressão gênica foram feitas utilizando-se células da fase madura do biofilme e células da fase planctônica com dez dias de crescimento, através de microarranjos de DNA. Foi demonstrado que 202 genes foram induzidos na primeira condição de crescimento, enquanto 32 genes foram reprimidos. Os genes induzidos foram relacionados a funções regulatórias, metabolismo de proteínas, manutenção de plasmídeo e biossíntese de aminoácidos, cofatores, polissacarídeos de superfície, lipopolissacarídeos e proteínas de transporte. Novamente, a expressão de genes que codificam para pili e para proteínas envolvidas na adesão da bactéria ao substrato foi encontrada. Esse resultado sugere que a expressão de pili e proteínas de adesão estejam relacionadas com a patogenicidade da bactéria, uma vez que o auxiliam na adesão da

bactéria aos vasos do xilema, causando seu bloqueio e, conseqüentemente os sintomas da doença (De Souza *et al.*, 2004).

Posteriormente, a expressão temporal de alguns genes relacionados à adesão, *fimA*, *uspA1* e *hsf*, foi avaliada por De Souza *et al.* (2005). A expressão de genes de adesão foi feita utilizando-se amostras de todas as fases do biofilme (3, 5, 10, 20 e 30 dias) de *X. fastidiosa* crescidas *in vitro*, pôde-se relacionar sua expressão aos diferentes tempos de crescimento. O gene *fimA*, foi induzido no terceiro, quinto e décimo dias de crescimento, havendo uma redução da expressão nos dias subseqüentes. A indução desse gene sugere que sua função está relacionada a adesão inicial da bactéria ao substrato. Os genes que codificam para adesinas não fimbriais *hsf* e *uspA1* também foram induzidos nas fases iniciais de crescimento. Contudo, o aumento mais significativo da expressão se deu ao quinto e décimo dias, sugerindo um papel tanto na adesão inicial das células como na formação da arquitetura do biofilme. Os resultados *in vitro* demonstram que genes que codificam para diferentes proteínas de adesão são expressos de acordo com o tempo de crescimento do biofilme de *X. fastidiosa*, o que sugere que desempenham funções distintas nesse processo. Além disso, os resultados obtidos nos experimentos *in planta* confirmam o envolvimento desses genes na adesão inicial da bactéria, uma vez que diferenças na sua expressão foram detectadas entre FP e SP após quinze dias de inoculação *in planta* (De Souza *et al.*, 2003).

1.4 O papel de adesinas na formação do biofilme

Certamente, para que o biofilme cresça com sucesso é preciso que sua estrutura esteja bem estabelecida. Como já discutido anteriormente, o EPS desempenha uma função importante no desenvolvimento do biofilme, contudo, existem biofilmes que apresentam quantidades reduzidas dessa matriz, indicando que a sua presença não é fator limitante para o desenvolvimento do processo. Entretanto, a formação de um biofilme não ocorre sem a participação de adesinas.

Adesinas bacterianas podem ser divididas em três grupos: (i) pili, que formam estruturas como fios de cabelo com 2 a 10nm de diâmetro; (ii) fimbrias, denominadas fimbrias agregativas ou

curli; e (iii) adesinas não fimbriais, que são proteínas oligoméricas ou poliméricas que são ancoradas na membrana externa (Hultgren *et al.*, 1993).

Representantes de adesinas do tipo pili são agrupados de acordo com diferentes características. Pili tipo I são estruturas filamentosas de superfície e são expressas ao redor da bactéria, podem atingir desde alguns microns até mais de 3 microns de comprimento. Essas organelas são estruturas compostas consistindo de uma haste helicoidal de 7 nm de diâmetro, dobrada a esquerda, feita de subunidades repetidas e unidas a uma ponta distal fibrilar de 3nm de espessura, contendo duas proteínas adaptadoras e uma que tem função de adesividade (Soto & Hultgren, 1999).

Em *E. coli*, ao menos nove genes são envolvidos na síntese de pili tipo I, suas funções foram determinadas por mutações pontuais em cada gene do operon *pap* e os genes encontrados codificam para PapA, a maior subunidade da fimbria, PapE que acopla a proteína PapG ao topo da fimbria, esta última com função de adesividade. PapF, PapC, PapJ e PapD são responsáveis pela iniciação da montagem, polimerização e estabilidade da estrutura. A regulação da expressão do operon é feita por PapI e PapB (Hultgren *et al.*, 1993).

Outro operon envolvido na síntese de fimbrias é composto por genes *fim*, que apresentam similaridade de função com os anteriormente descritos. Essas fimbrias são montadas por chaperonas que se encontram no espaço periplasmático, capturam as subunidades na membrana interna e as dirigem à membrana externa da bactéria, onde são entregues a uma proteína de membrana (Hultgren *et al.*, 1991). Na estirpe de *E. coli* conhecida como UPEC, por ser a causa de infecções renais e no epitélio da bexiga, a função de adesão e invasão desenvolvida por pili tipo I é amplamente conhecida (Cegelski *et al.*, 2008). Após a invasão do tecido, UPEC se replica rapidamente e o desenvolvimento de uma via complexa leva a formação de comunidades bacterianas intracelulares (IBCs), estruturas morfológicamente distintas com propriedades similares as de biofilme que protegem UPEC do hospedeiro (Mulvey *et al.*, 1998; Anderson *et al.*, 2003). Estudos recentes demonstraram a presença de pili tipo I em IBCs (Anderson *et al.*, 2003), o que sugere que a função dessas estruturas não seja somente a de adesão e invasão do urotélio. Corroborando com isso, Justice *et al.* (2006) relataram a deficiência em colonização extra e intracelular da estirpe UTI89, que exibe a redução de pili tipo I. Wright *et al.* (2007) em estudos envolvendo mutantes da estirpe UTI89 para FimA e FimH demonstraram uma drástica

redução da capacidade desse patógeno na adesão e invasão do epitélio da bexiga. O mesmo grupo desenvolveu uma estirpe que expressava pili tipo I somente antes da invasão urotelial e foi observado que intracelularmente as IBCs estavam ausentes, foram encontradas apenas células esparsas que não formavam características densas de biofilmes e falharam na persistência da infecção. Esses resultados sugerem que pili tipo I está relacionado com vias de desenvolvimento e de maturação de IBCs (Wright *et al.*, 2007).

Pili tipo II e tipo III não parecem estar relacionados à formação do biofilme, mas são elementos de sistemas de secreção envolvidos no desencadeamento de doenças. Pili tipo II fazem parte de um sistema celular secretório, conhecido também por via secretora geral, do qual fazem parte ao menos vinte componentes cuja ordem e arranjo dos genes que os codificam são conservados em várias bactérias. Exoproteínas que utilizam a via secretora do tipo II são sintetizadas com um peptídeo sinal e são translocadas primeiramente para o espaço periplasmático. Em mutantes para o sistema secretório tipo II, exoproteínas intermediárias rapidamente se acumulam no espaço periplasmático, onde passam pelo processo de dobramento (Strom *et al.* 1991) e oligomerização e são aparentemente “caçadas” quando a função secretória é restaurada.

Uma propriedade intrigante do aparato referente ao sistema de secreção tipo II é seu alto grau de especificidade em reconhecimento das exoproteínas que o utilizam. Não foi observada homologia nas seqüências primárias ou estruturas secundárias comuns entre elas. Como as exoproteínas são totalmente dobradas antes de passarem pelo aparato secretor, é possível que sinais de regiões protéicas ou outros determinantes tridimensionais sejam reconhecidos. Em outros casos, esse sistema de secreção é bastante permissivo, demonstrando que alguns microrganismos podem exportar diferentes proteínas não relacionadas de outros microrganismos, o que faz com que o entendimento dos mecanismos de reconhecimento para exportação de proteínas por esse aparato seja ainda mais difícil de entender (Nunn 1999).

Pili tipo III são envolvidos em um tipo de sistema de secreção bacteriano, denominado sistema de secreção tipo III (T3SS), que inocula proteínas efetoras de virulência diretamente no interior das células eucarióticas. Essas proteínas efetoras modulam funções celulares do hospedeiro. Uma característica comum desse sistema de secreção são os apêndices extracelulares dependentes de T3SS, que ligam a bactéria ao hospedeiro e atuam como condutores das proteínas

efetoras. Os apêndices de patógenos de animais, também chamados de complexos de agulha, são em sua maioria compostos por muitas cópias de uma única proteína bem pequena (10KDa). Quando as agulhas entram em contato com a célula hospedeira a síntese de um poro translocador composto de diferentes proteínas bacterianas se inicia na membrana plasmática da célula alvo. A formação desse poro é essencial para a inoculação das proteínas efetoras (Avr) e para o desencadeamento da doença (Saad *et al.*, 2008).

Pili tipo IV são conhecidos por suas diversas funções em bactérias, é também a única classe de pili expressa por diferentes bactérias gram negativas. Em *M. catarrhalis*, essas estruturas desempenham adesão, motilidade celular, formação de biofilme e fornecem capacidade de transformação genética por captura de DNA (Luke *et al.*, 2007). Esse tipo de pili é codificado em *P. aeruginosa* por um operon composto de quatro genes, *pil A – D*. O primeiro codifica PilA, a subunidade principal do pili, enquanto os outros três atuam na montagem da estrutura, sendo PilB uma proteína citoplasmática e, PilC e PilD são proteínas integrais de membrana. De modo geral, a montagem de pili tipo IV envolve uma peptidase sinal que marca a subunidade do pili para uma rota secretora, chaperonas protegem as superfícies de interação das subunidades durante a secreção. O ancoramento de pili na membrana envolve uma ou mais lipoproteínas específicas de membrana externa (Hultgren *et al.*, 1991).

Em *P. aeruginosa*, as principais funções atribuídas a pili tipo IV são motilidade celular e adesão. Foi demonstrado, em um trabalho recente, que essas duas funções parecem estar relacionadas a uma terceira: a formação do biofilme em sua estrutura similar a cogumelo (Barken *et al.*, 2008). Nesse estudo, os autores reportaram a deficiência da formação desse formato de biofilme por estirpes mutantes de *P. aeruginosa* que não expressavam alguns genes relacionados à formação de pili tipo IV. Mutantes para *pilH* apresentaram uma motilidade reduzida em placas de meio de cultura, mas foram capazes de formar a região da “tampa” do biofilme similar a cogumelo em cultura mista. Esta era composta por estirpes mutantes para *pilA*, que formavam um biofilme contendo apenas a haste da estrutura com células desprovidas de pili, e *pilH* que apresentava motilidade reduzida. Esta última estirpe foi capaz de formar as “tampas” sobre as hastes, embora elas fossem muito menos densas, maiores e de formato irregular que as do tipo selvagem. Esses resultados sugerem que pili tipo IV são necessários para a formação da morfologia correta do biofilme de *P. aeruginosa* (Barken *et al.*, 2008).

Outro tipo de proteína de adesão são as adesinas afimbriais que, diferentemente das fímbrias, formam apenas projeções na membrana externa. Um exemplo desse tipo de proteína é Hsf, primeiramente descrita por St. Geme III *et al.* (1996) como sendo um tipo de proteína formadora de pequenas fibrilas da superfície do sorotipo b de *H. influenzae*. Os autores relataram a existência de uma proteína não fimbrial comumente encontrada em diferentes sorotipos que promovia aderência a células epiteliais humanas cultivadas. Estudos de caracterização revelaram que se tratava de uma proteína bastante grande (acima de 200KDa), que apresentava alta similaridade com outra adesina, denominada Hia. Ambas compartilham duas seqüências altamente conservadas nas regiões N e C-terminais, contudo, Hsf apresenta um domínio repetitivo presente como cópia única em Hia. Outra característica similar é a capacidade de adesão específica, comprovada pela adesão dessas proteínas a células Chang, linfócitos B killer e células HeLa. Esse trabalho revelou que todos os sorotipos b, que são encapsulados, de *H. influenzae* possuíam um locus *hsf* altamente conservado, sugerindo que este fosse fundamental para o ciclo celular do patógeno (St. Geme III *et al.*, 1996).

Em um trabalho mais recente, Cotter *et al.* (2005) determinaram a função dos três domínios de adesão de Hsf, através da sua digestão e clonagem fusionada a GFP. Os níveis de fluorescência emitidos após ensaios de adesão a células Chang *in vitro* revelaram que o primeiro domínio (BD1) apresentou alto sinal de fluorescência, indicando uma eficiente ligação as células, o segundo domínio (BD2) apresentou um sinal fraco, ao passo que o sinal emitido pelo terceiro domínio (BD3) era comparado a apenas reação de fundo, indicativo da não ligação. Análises de modelagem de proteínas sugerem que a capacidade de aderência de BD1 e BD2 é dada por uma seqüência conservada de três aminoácidos que conferem caráter ácido para os domínios. Essa seqüência, denominada núcleo ácido, é muito similar ao domínio de adesão de Hia e parece não estar presente em BD3, no qual dois dos aminoácidos não são conservados (Cotter *et al.*, 2005).

Outro exemplo interessante é a proteína UspA1 (Ubiquitous Surface Protein A) de *M. catarrhalis*, uma bactéria que causa otite média aguda e doenças no trato respiratório superior de crianças e adultos. Essa proteína está presente em diversas estripes de *M. catarrhalis* e apresenta grande similaridade entre suas seqüências incluindo um peptídeo sinal, o que infere que a proteína é bastante conservada. A predição de tamanho de UspA1 sugere 83KDa, contudo elas

formam agregados protéicos em solução podendo apresentar tamanhos maiores, referentes a oligomerização de 2 a 3 monômeros (Cope *et al.*, 1999).

UspA1 foi classificada como membro da família de autotransportadoras de proteínas secretadas que inclui numerosas, e relativamente grandes macromoléculas bacterianas, que geralmente têm a função de aderência a células de hospedeiros (Henderson *et al.*, 1998). Essa função foi comprovada pela transformação de uma estirpe incapaz de formar biofilme (O35E) com o DNA cromossomal de uma estirpe formadora de biofilme (O46E), tendo como resultado a formação do biofilme pelas estirpes mutantes O35E T13 e O35E T14. Além disso, estas últimas foram submetidas a ensaios de adesão a células epiteliais Chang *in vitro*, demonstrando um resultado positivo. O gene *uspA1* desses mutantes foi inativado, o que causou uma redução tanto da capacidade de adesão a células Chang quanto da formação do biofilme, sugerindo que a proteína codificada por ele é fundamental para adesão da célula ao tecido do hospedeiro e também para o crescimento em biofilme (Pearson *et al.*, 2006).

A proteína UspA1 de *M. catarrhalis* é similar a uma adesina afimbrial denominada YadA, de *Yersinia enterocolitica* e *Yersinia pseudotuberculosis*. Nestes patógenos a adesão é crucial para a patogenicidade e, após invasão do tecido do hospedeiro, YadA predomina como adesina no tecido infectado. Essa proteína tem tamanho predito de 41 a 44 KDa, e forma agregados de 160 a 250KDa, sugerindo oligomerização de 3 a 4 monômeros. Com o objetivo de elucidar a estrutura molecular de YadA, células de *Y. enterocolitica* ou envelopes celulares isolados foram corados negativamente, sendo possível visualizar nos dois casos projeções na membrana em formato de “pirulito”, com uma haste de aproximadamente 18nm e uma cabeça glubular de 5nm, o que explica a aparência de dossel formada acima da membrana das células vistas ao microscópio eletrônico de transmissão (Hoiczuk *et al.*, 2000). Predições de estruturas coiled-coil dos aminoácidos da região de haste da proteína sugerem que esta é formada por sete domínios repetidos. Mutantes que apresentavam diferentes deleções nessa região repetitiva expressaram proteínas com diferenças no tamanho de suas hastes. A resolução dessa estrutura conclui que os aminoácidos 422 a 360 são responsáveis pelo domínio que ancora a proteína na membrana celular, de 360 a 224 estão os aminoácidos referentes à região da haste, e de 224 a 26 estão aqueles referentes ao domínio globular. Cada um desses domínios desenvolve funções diferentes, a porção N-terminal mais distal parece estar envolvida na ligação a neutrófilos, enquanto que a

parte mais proximal do N-terminal parece ser responsável pela capacidade de autoaglutinação, formando uma cobertura flexível que protege as células (Hoiczky *et al.*, 2000).

A formação do biofilme por *M. catarrhalis* parece estar intimamente associada à presença de UspA1. Pearson *et al.* (2006), estudando diversas estirpes da bactéria, notaram que algumas delas não formavam biofilmes. Uma destas, a estirpe O35E, após ser transformada com DNA da estirpe O46E positiva para formação de biofilme, alterou sua característica inicial obtendo-se diversos mutantes capazes de formar biofilmes. Dois deles, os mutantes T13 e T14 foram submetidos a ensaios de adesão a células Chang e apresentaram um aumento dessa capacidade quando comparados a estirpe O35E. O gene *uspA1* desses mutantes foi então inativado e as colônias resultantes não só reduziram a adesão a células Chang como foram menos capazes de formarem biofilmes. Esse mesmo gene, quando desligado na estirpe O46E também provocou redução da formação de biofilme. Esses estudos indicam que UspA1 atua na formação do biofilme em *M. catarrhalis* (Pearson *et al.*, 2006).

Tanto adesinas fimbriais quanto as afimbriais são alvos excelentes para vacinas, uma vez que são fatores de patogenicidade, são abundantes e, geralmente, bastante conservadas.

1.5 Adesinas fimbriais e afimbriais como candidatas a vacinas contra bactérias patogênicas

O passo chave para o desenvolvimento de vacinas está na seleção de um antígeno apropriado. Na era pré genômica, esse passo necessitava de uma cuidadosa pesquisa que levava muito tempo acerca do patógeno e sua patogênese e, no final, a seleção de candidatos era um tanto quanto fortuita. Atualmente, após o seqüenciamento de diversos patógenos de humanos, possibilidades fascinantes de buscas sistemáticas pela identificação de novos antígenos para vacinas têm emergido (Knaust & Frosch, 2004).

A seqüência de DNA providencia um banco de dados de todos os componentes protéicos de um organismo e diversas publicações sobre buscas e seleções de proteínas e peptídeos antigênicos têm sido reportadas. A princípio, todas as buscas por bom um antígeno dependem de determinadas características como (i) ele deve ser expresso ao menos em uma fase da infecção, (ii) ele tem que ser acessível ao sistema imune, (iii) ele precisa induzir resposta imune e (iv) ele

deve ser conservado entre as espécies e não deve conter regiões altamente variáveis (Knaust & Frosch, 2004). A procura por tais antígenos pode ser feita utilizando-se buscas *in silico*, ou com o auxílio de técnicas como microarranjos de DNA, que revelam a super expressão de genes em determinadas circunstâncias, ou o fenótipo de mutantes em bibliotecas knockouts.

A bactéria causadora de um tipo muito agressivo de meningite, *Neisseria meningitidis*, é um exemplo de estudos envolvendo esse novo tipo de busca por antígenos. Na tentativa de analisar quais genes estariam envolvidos na adesão da bactéria a células epiteliais humanas, a células do endotélio de micro capilares cerebrais e quais genes seriam ativados quando a bactéria entra em contato com o soro humano, foram realizados testes de microarranjos de DNA. Após diferentes culturas da estirpe MC58 do sorogrupo B de *N. meningitidis* serem submetidas ao contato com células Hep-2 (referentes ao epitélio), células HBMEC (referentes ao endotélio) e soro humano, o RNA total extraído foi utilizado para a síntese de cDNA e análise dos genes diferencialmente expressos. Nos três tratamentos foi possível identificar que alguns genes do operon que codifica pili tipo IV foram superexpressos, indicando que essa proteína está presente em diferentes estágios da infecção por *N. meningitidis*. Não apenas isso colabora com o aumento de atenções voltadas a esse antígeno, mas o fato dessa proteína estar presente em todos os sorotipos da espécie, estar disponível para o reconhecimento pelo hospedeiro e ser muito abundante, fazem de pili tipo IV alvos muito interessantes para vacinas contra essa bactéria (Kurz *et al.*, 2003).

Além de vacinas, algumas drogas que inibam ou dificultem a adesão de pili ou sua montagem também são estudadas como potenciais tratamentos contra infecções causadas por bactérias. No caso da primeira estratégia, alguns carboidratos derivados de ligantes de hospedeiros demonstraram alta eficácia no bloqueio de propriedades adesivas de pili tipo I tanto em ensaios biofísicos como em auto aglutinação (Cegelski *et al.*, 2008). A segunda estratégia foca o bloqueio de chaperonas envolvidas na montagem de pili. Essas drogas desenvolvidas a partir de regiões conservadas das chaperonas da via de montagem de pili têm uma eficiência bastante alta, uma vez que seu alvo de atuação é amplamente distribuído por diversas bactérias (Cegelski *et al.*, 2008). Estudos demonstraram que uma determinada classe desses inibidores de chaperonas foi eficaz em se ligar a suas regiões conservadas e inibir uma ligação proteína-

proteína, além de provocar a diminuição da agregação celular, afetando a formação do biofilme de *E. coli* (Pinkner 2006).

Não somente adesinas fimbriais são consideradas alvos potenciais para a síntese de vacinas, adesinas afimbriais também são amplamente estudadas. Esse é o caso das proteínas UspA1 e UspA2 de *M. catarrhalis*, duas proteínas de superfície de membrana que são muito abundantes na bactéria. A primeira delas tem a função de formação de biofilme e adesão das bactérias a células epiteliais (Aebi *et al.*, 1998), enquanto que UspA2 aparenta desempenhar a função de proteção da bactéria contra a resposta imune inata do hospedeiro, embora algumas proteínas expressas por diferentes isolados possa promover aderência (Lafontaine *et al.*, 2000). As duas proteínas compartilham regiões similares e bastante diferentes entre elas. Dentre os domínios conservados está aquele que se liga ao anticorpo monoclonal (Mab) 17C7, presente em ambas as proteínas geralmente em cópias múltiplas. A função biológica desse domínio altamente conservado é incerta, mas a sua expressão por todas as formas patogênicas das bactérias os torna candidatos atrativos a vacinas, como demonstrado em um trabalho que reportou a resistência adquirida de ratos e porcos da Índia a diferentes estirpes de *M. catarrhalis* depois de receberem inoculações das proteínas UspA1 e UspA2 (McMichael *et al.*, 1998).

Em adição aos dados em animais, anticorpos contra essas proteínas isolados de humanos reforçam seu uso em vacinas (Samukawa *et al.*, 2000). Adultos saudáveis são normalmente resistentes a doenças causadas por *M. catarrhalis* e têm altos títulos de anticorpos contra proteínas UspAs bacterianas. Por outro lado, idosos e crianças com idade entre 6 e 36 meses apresentam uma baixa titulação de anticorpos específicos para essas proteínas e são altamente suscetíveis a otite média. Os dados de experimentos com animais e as análises dos anticorpos de humanos apóiam o uso das proteínas UspAs para o desenvolvimento de vacinas. Estudos clínicos com a proteína UspA2 purificada de *M. catarrhalis* indicam seu uso seguro em adultos (McMichael 2001).

1.6 Adesinas fimbriais a afimbrias em *X. fastidiosa* e seu envolvimento na formação do biofilme

A abundância de genes similares a adesinas de patógenos de humanos reveladas pelo seqüenciamento do genoma de *X. fastidiosa* (Simpson *et al.*, 2000) e as evidências do

crescimento em biofilme desse fitopatógeno tanto *in vitro* como *in planta* (Marques *et al.*, 2002; De Souza *et al.*, 2003, 2004) sugerem que a adesão é um fator importante para o crescimento e desenvolvimento desse fitopatógeno. Análises da comparação do genoma de *X. fastidiosa* com o de *X. axonopodis* pv citri ressaltam essa importância. Embora habitem o mesmo hospedeiro, ambos os fitopatógenos ocupam locais diferentes e apresentam mecanismos distintos de patogenicidade. Mesmo apresentando um genoma bem menor, a estirpe 9a5c de *X. fastidiosa* apresenta genes que não são encontrados em *X. axonopodis* pv citri, ou ainda genes que se apresentam em mais de uma cópia. Dentre esses estão os genes que codificam pili tipo IV (Moreira *et al.*, 2004). O genoma de *X. axonopodis* pv citri apresenta cópias únicas dos clusters *pilB-pilC-pilE-pilD* e *pilE-pilY1-pilX-pilW-pilV-fimT*, enquanto *X. fastidiosa* apresenta uma cópia do operon *pilB-pilD* e duas cópias do operon *pilE-fimT* (Moreira *et al.*, 2004). Além desses, no genoma de *X. fastidiosa* estão presentes três genes relacionados a proteínas de superfície e três genes que codificam para proteína hemaglutininas. Esse fato demonstra a importância da participação de genes de adesão para *X. fastidiosa*.

Diversos autores comprovaram que mutações em adesinas, sejam elas fimbriais ou afimbriais provocam alterações na capacidade de formação de biofilme, na adesão célula a célula e redução da patogenicidade.

Feil *et al* (2003) desenvolveram mutantes de *X. fastidiosa* da estirpe Temecula que não produziam fimbrias tipo I e não produziam uma proteína que tem provável função de adesão. Os genes mutados foram *fimA*, que codifica a subunidade da haste da fimbria tipo I, *fimF*, uma das proteínas que compõe a porção distal da fimbria tipo I, e o gene *mrkD*, que apresenta um homólogo em *K. pneumoniae* que tem função de adesão. Os genes em *X. fastidiosa* foram desligados pela inserção de uma cópia contendo o gene de resistência a kanamicina. Para averiguar a morfologia de colônias dos mutantes para FimA e FimF, os autores utilizaram microscopia eletrônica de transmissão e puderam concluir que o tipo selvagem apresentava uma extensa rede de fimbrias que serviam para aderir as células a grade de prata onde foram inoculadas, assim como aderiam umas células as outras. Essa cultura era formada por grandes agregados celulares e muitas células apresentavam fimbrias medindo 3nm em diâmetro e alcançando de 0,2 a 2µm. Células do mutante FimA⁻ foram, em média, a metade do tamanho daquelas do tipo selvagem e aparentavam produzir um número muito menor de fimbrias, e os

apêndices que foram vistos eram menores e mais grossos. Esses mutantes formavam colônias que continham células menos agregadas. Os mutantes FimF⁻ apresentaram tamanho equivalente a 80% do tamanho das células da estirpe selvagem e produziram apenas poucas e muito curtas fimbrias, ademais, grandes agregados de mutantes FimF⁻ não foram vistos. Entretanto, a virulência desses mutantes não foi alterada, sendo que plantas inoculadas com eles apresentaram sintomas similares aquelas inoculadas com o tipo selvagem (Feil *et al.*, 2003).

Feil *et al.* (2007) reportaram ensaios de adesão para mutantes FimA⁻ e FimF⁻ de *X. fastidiosa* da estirpe Temecula, além de outros dois mutantes XadA⁻ (homólogo a UspA1 de *M. catarrhalis* e *X. fastidiosa* estirpe 9a5c) e HxfB⁻ (homólogo a uma hemaglutinina de *X. fastidiosa* estirpe 9a5c) defectivos na produção de adesinas afimbriais. Os experimentos com mutantes FimA⁻, FimF⁻ e XadA⁻ revelaram que eles não formaram biofilmes na parede de frascos contendo meio de cultura, enquanto que HxfB⁻ formou um fino biofilme após 24 horas de incubação. Contudo, a estirpe selvagem apresentou um crescimento em biofilme dez vezes maior que HxfB⁻. Uma relação inversa entre o número de células aderidas na parede do frasco e o número de células em suspensão no meio de cultura foi observada, sendo que as células das estirpes mutantes permaneceram, preferencialmente, em suspensão. Células da estirpe selvagem permaneceram aderidas a superfícies de vidro após 4 horas de exposição em sistema estático ou após 12 horas de exposição sob agitação, e se apresentaram como células individuais ou agregadas em pequenos ou grandes grupos. O tamanho dos agregados apresentou uma tendência de crescimento ao longo do tempo. Em contraste, FimA⁻ e FimF⁻ aderiram, quase exclusivamente, como células individuais independente do tempo de exposição a superfície. Se comparados os tempos de exposição, a estirpe selvagem apresentou mais células aderidas do que os mutantes em um mesmo intervalo de tempo. Os mutantes XadA⁻ e HxfB⁻ apresentaram uma densidade espacial menor em superfícies de vidro e as células aderidas se mostraram como pequenos ou grandes agregados, mas não como células individuais. Os autores concluíram que esses mutantes apresentavam reduzida capacidade de adesão inicial quando comparados a estirpe selvagem e que a adesão célula a célula não era função das proteínas XadA e HxfB, uma vez que mesmo mutadas as células ainda se apresentaram como agregados. Complementando o estudo, sugerem que essa adesão célula a célula seja desempenhada por proteínas fimbriais e que estas não desempenham função na adesão inicial da bactéria ao substrato. Outro resultado interessante diz respeito à

diminuição da virulência dos mutantes quando inoculados em videiras, o que relaciona a capacidade de adesão a patogenicidade da bactéria. Uma vez que esses mutantes não são eficientes em adesão e formação de biofilme, eles também não causam os sintomas mais severos da doença (Feil *et al.*, 2007). Como citado acima, esses mesmos autores reportaram, em 2003, a não diferença de sintomas entre plantas inoculadas com *X. fastidiosa* tipo selvagem e mutantes FimA e FimF, conflitando com as informações publicadas em 2007. Entretanto, essas diferenças nos resultados não foram discutidas por Feil *et al.* (2007).

Outro estudo envolvendo proteínas afimbriais foi desenvolvido por Guilhabert *et al.* (2005). O grupo realizou mutações aleatórias na estirpe Temecula de *X. fastidiosa* e inoculou as células testadas individualmente em videiras. Os mutantes daquelas que apresentaram sintomas mais severos foram analisados mais detalhadamente. Um dos mutantes apresentou a inserção do transposon em um gene com alta similaridade ao gene *hecA* de *Erwinia chrysanthemi*. Este codifica para uma hemaglutinina que é fundamental para a adesão da bactéria ao hospedeiro. Por razões de similaridade de seqüências, os autores denominaram esse gene *hxfA* (**h** relacionado a hemaglutinina, **xf** por ser de *X. fastidiosa* e **A** refere-se ao primeiro gene dessa classe listado) Os mutantes *hxfA*⁻ alcançaram as fases exponencial e estacionária primeiro do que células da estirpe selvagem, que tiveram seu tempo de duplicação da população calculado em 12 horas. Além disso, os mutantes que causaram sintomas de hipervirulência mostraram-se mais eficazes na motilidade celular em videiras infectadas do que a estirpe selvagem. Isso sugere que estirpes mais virulentas colonizam o hospedeiro mais rapidamente do que a estirpe selvagem. As células que não expressavam HxfA não formaram biofilmes em frascos com meio de cultura sob agitação no shaker. A morfologia das colônias dessas células foi observada em meio de cultura sólido e demonstrou um padrão bastante homogêneo de tapete, diferente da estirpe selvagem que cresceu formando grandes agregados celulares separados. Resultados de medidas de densidade óptica mostraram que colônias formadas pelos mutantes eram constituídas de menos células e, quando vistas ao microscópio eletrônico de transmissão, mostraram-se não agregadas, com pouca adesão entre as células, desta forma a função de adesão célula-célula foi atribuída para a proteína HxfA. Esses resultados foram confirmados *in planta*, onde os mutantes defectivos para essa proteína colonizaram o xilema formando apenas uma camada celular única, não apresentando agregações e multicamadas. Outra hemaglutinina identificada pelo grupo, HxfB, também foi mutada e as

colônias, além de reduzirem sua capacidade de formação de biofilme, apresentaram sintomas *in planta* similares aos do mutante HxfA, indicando que HxfB também tem função de adesão célula-célula. Esses genes foram classificados como sendo de antivirulência, porque uma vez desligados criam microrganismos capazes de causar sintomas mais severos. A severidade dos sintomas pode ser causada pela rápida colonização do xilema, uma vez que o crescimento em monocamadas facilita a colonização. Além disso, um biofilme formado por uma camada celular que envolve todo o vaso foi suficiente para promover uma disfunção no transporte de água e nutrientes pelo xilema (Guilhabert *et al.*, 2005).

Embora tenham estudado mutações na proteína HfxB, Feil *et al.* (2007) e Guilhabert *et al.* (2005) encontraram resultados contraditórios. No caso do primeiro, houve uma reduzida capacidade de indução de sintomas quando os mutantes inoculados em videiras foram analisados, por outro lado, Guilhabert *et al.* observaram o oposto, uma vez que as videiras que receberam os mutantes por eles desenvolvidos apresentaram sintomas mais severos que as plantas que receberam estirpes selvagens. Essas diferenças foram discutidas por Feil *et al.* (2007) em função de possíveis diferenças nas condições de crescimento das plantas testadas e um número reduzido de plantas analisadas por Guilhabert *et al.* (2005), o que poderia ter mascarado os resultados de severidade. Além disso, Feil *et al.* (2007) também reportam o fato da inserção do gene de resistência a kanamicina ter ocorrido na direção oposta ao da transcrição de HxfB, o que não ocorreu no caso de Guilhabert *et al.* (2005) que inseriram o gene de resistência ao antibiótico de maneira que a transcrição de parte da proteína possa ter ocorrido. Essas diferenças nas construções dos mutantes e na condução dos testes *in planta* podem ter ocasionado a discordância dos resultados observados pelos dois grupos.

Não somente proteínas hemaglutininas fornecem caráter agregativo ao biofilme, presença ou ausência de pili tipo I e tipo IV também alteram tal característica. Essa conclusão foi demonstrada por Li *et al.* (2007) trabalhando com estirpes mutantes de *Temecula*. Os autores desenvolveram uma linhagem de mutantes que não expressavam fímbrias tipo I, outra linhagem que não expressava fímbrias tipo IV e uma terceira, que não expressava nenhum tipo de fímbria. Fímbrias tipo I são muito numerosas, curtas e se expressam por toda a superfície da bactéria; fímbrias tipo IV são menos numerosas e mais longas, porém se expressam somente em regiões polares da bactéria. Além de reportarem alterações na motilidade dos mutantes em meio de

cultura sólido, sua capacidade de formação de biofilme também foi alterada. Quando culturas de células que não expressavam tipo I de fimbrias foram crescidas em meio líquido sob agitação foi observado um biofilme bastante reduzido, se comparado a estirpe selvagem. Esse biofilme era facilmente retirado da parede do frasco agitando-se em água destilada. Além disso, havia uma relação inversa entre quantidade de células aderidas e células livres na solução. Estas, no caso do mutante para fimbrias tipo I que são menores, se apresentaram como agregados relativamente grandes, compactados e distantes entre si. Estirpes mutantes que não expressavam pili tipo IV, o pili que apresenta um tamanho maior, formaram um biofilme maior do que o da estirpe selvagem, que permanecia intacto sob agitação em água destilada. Os agregados não aderidos formados pelos mutantes eram muito grandes. Em contraste, a estirpe mutante que não expressava nenhum tipo de fimbria não formou biofilme na parede do frasco e apresentou muitas células não aderidas no meio de cultura. Os agregados formados por ela eram muito numerosos, mas de tamanho bastante reduzido o que sugere que a presença de pili é importante para que as células se agrupem (Li *et al.*, 2007).

Diante do exposto acima, o estudo de adesinas de *X. fastidiosa* de citros e o seu papel durante o desenvolvimento do biofilme torna-se crucial para o entendimento da interação e colonização no hospedeiro, assim como, na busca por alternativas de controle através de compostos que possam interferir nas etapas da formação do biofilme.

Apesar dos avanços em trabalhos relacionados a *X. fastidiosa* que causa doença em videira, poucos são os estudos envolvendo a estirpe 9a5c, causadora da CVC, acerca das proteínas necessárias para a formação do biofilme, para a interação com o hospedeiro e, por consequência, para a patogenicidade. A dificuldade na obtenção de mutantes para a estirpe patogênica de citros é um empecilho para o aprofundamento dos conhecimentos sobre as peculiaridades da formação do seu biofilme. Neste sentido, a caracterização do seu processo de crescimento e interação com o hospedeiro a nível protéico é urgente, uma vez que mutantes para essa estirpe ainda não foram obtidos. Dessa forma, o estudo da expressão de proteínas de adesão durante o desenvolvimento do biofilme *in vitro*, sua marcação no biofilme *in situ* e sua localização quando a bactéria ocupa os vasos do xilema torna-se crucial para o entendimento do crescimento em biofilme e da interação e colonização no hospedeiro.

2. Hipótese do trabalho

As adesinas fimbriais (FimA e PilC) e afimbriais (Hsf e UspA1) são proteínas essenciais no processo de formação do biofilme de *X. fastidiosa* e isso poderia ser monitorado através de imunomarcação em diferentes fases de desenvolvimento do biofilme *in vitro*.

3. Objetivo Geral

Caracterizar a expressão dos genes que codificam as adesinas fimbriais FimA e PilC (tipo IV), e afimbriais Hsf e UspA1 durante as diferentes fases da formação do biofilme de *X. fastidiosa*.

3.1 Objetivos específicos do trabalho

- Clonar, expressar e purificar os genes referentes às proteínas fimbriais FimA e PilC bem como às proteínas afimbriais Hsf e UspA1;
- Obter anticorpos policlonais das proteínas FimA, PilC, Hsf e UspA1;
- Realizar Western Blot das proteínas nas diferentes fases de formação do biofilme *in vitro*;
- Realizar marcação por imunofluorescência das proteínas e acompanhar sua expressão por microscopia de fluorescência nas diferentes fases da formação do biofilme *in vitro*;
- Realizar imunolocalização das proteínas alvo por microscopia eletrônica de transmissão em vasos de xilema infectados por *Xylella fastidiosa*.

4. Materiais e métodos

4.1 Desenho dos primers

Os *primers* foram desenhados para amplificar seqüências codificadoras de regiões hidrofílicas e regiões de alta antigenicidade das proteínas em estudo. A antigenicidade das regiões a serem amplificadas é importante, uma vez que, a indução de resposta imune a essas proteínas foi uma das etapas posteriores desse trabalho. Por esse motivo, alguns conjuntos de *primers* foram desenhados a fim de conseguir diferentes regiões antigênicas das proteínas fimbriais PilC (*xf2538*) e FimA (*xf2539*), e afimbriais Hsf (*xf1516*) e UspA1 (*xf1529*). Em cada *primer* foi inserido um sítio de *EcoRI* na região 5' e um sítio de *HindIII* na região 3' para facilitar a clonagem direcionada no vetor pET28a. Os *primers* foram desenhados utilizando o programa Primer Select da Lasergene99 (DNASTAR, Inc.). As seqüências dos *primers* utilizados estão representadas na Tabela 1. As regiões escolhidas para cada proteína, assim como as informações de cada fragmento gerado estão demonstrados na Figura 3. O tamanho de cada peptídeo e a verificação do frame correto para o vetor pET28a também foram obtidos pelo mesmo programa e confirmado por BlastP (www.ncbi.nlm.nih.gov) e Expasy (<http://www.expasy.ch>).

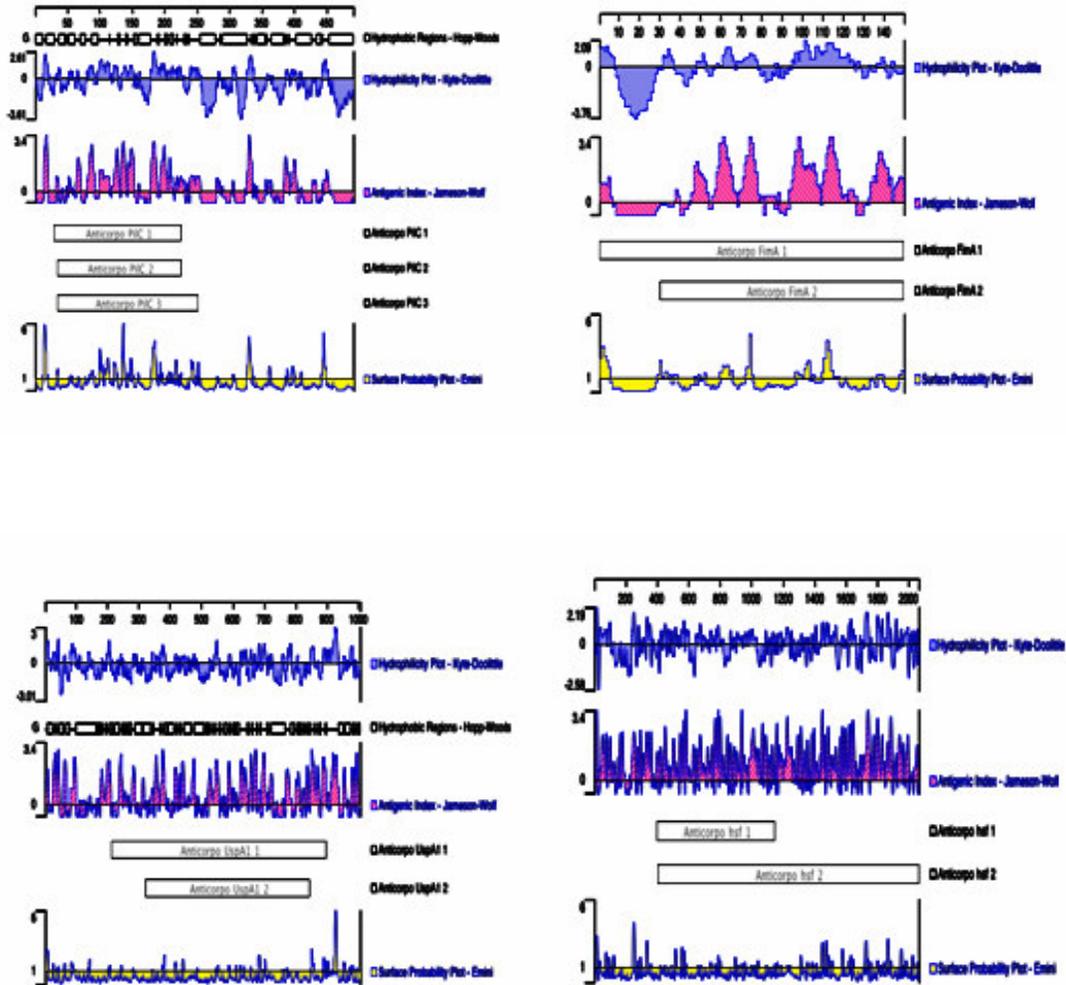


Figura 3: Desenho dos *primers* em regiões hidrofílicas e antigênicas de cada proteína. **A.** Regiões para proteína PilC gerando 21.596,85 (1) 20.783,92 (2) e 23.542,08 (3) Daltons, respectivamente. **B.** Regiões para proteína FimA gerando 11.821,95 (1) e 15.103,96 (2) Daltons, respectivamente. **C.** Regiões para proteína UspA1 gerando 65.330,00 (1) e 49.396,37 (2) Daltons, respectivamente. **D.** Regiões para proteína Hsf gerando 29001,68 (1) e 118.742,02 (2) Daltons, respectivamente.

Tabela 1: sequência dos *primers* direto e reverso utilizados para gerar fragmentos de interesse e para o seqüenciamento de UspA1 1.

Conjunto		Sequência do primer (5' - 3')	Tamanho
pilC 1	eco_for	GAATTCTGGGGCACGAGCTTTTATAGAT	568pb
	rev_hind4	AAGCTTCAGCCCTGACCAGATTGCGATAA	
pilC 2	eco_for	GAATTCTGGGGCACGAGCTTTTATAGAT	646pb
	hind_rev1	AAGCTTTTCCCTTCAGAGCCTCAATGTTC	
pilC 3	eco_for5	GAATTCGAAGAGCGCTTATGGGTGTGG	586pb
	hind_rev5	AAGCTTCAGCCCTGACCAGATTGCGATAAAG	
uspA1 1	f_eco2	GAATTCGAAGGCGTCTGACTCGGTTGCTCTA	1,564Kb
	r_hind1	AAGCTTTCGCCGAAATGCTGACACCACTT	
	F_inter*	GGAATTCATGACTAATGATGGAGGTTGCAGTGATGT	
	R_inter*	ATGACTAATGATGGAGGTTGCAGTGATGT	
uspA1 2	feco_long5	GAATTCGTGGCGGCATCGGTGAAG	2,056Kb
	rhind_in4	AAGCTTTAGCCGCCCATACTGTTA	
fimA1	f_eco	CGAATTCAAAGTTAAGGGCAACTCTCAAGT	148pb
	rev_hind	TAAGCTTTTATTTAGAGGCAATGCATCCAGAA GGT	
fimA2	f2_eco	GGAATTC AATTATGTCCAGGTCCCAACT	450pb
	rev_hind	TAAGCTTTTATTTAGAGGCAATGCATCCAGAA GGT	
fimA3	f_eco_int	CGAATTCATGAAGAAGCAACAAGGTTTTA	520pb
	rev_hind	TAAGCTTTTATTTAGAGGCAATGCATCCAGAA GGT	
hsf7	f1_eco	TGAATTCGCGGGCAGCAAGGTGATTAGC	882pb
	R_hind	CAAGCTTAGCGTTCACCCCTTATC	
hsf8	f_ecolong	GAATTCGCGGGTGCAGTGTC A	1,6Kb
	r1_hind	CAAGCTTAATTCCCACCTCAATACATCC	
hsf9	f1_eco	TGAATTCGCGGGCAGCAAGGTGATTAGC	1Kb
	r1_hind	CAAGCTTAATTCCCACCTCAATACATCC	

* refere-se aos *primers* internos desenhados para o seqüenciamento dos fragmentos *uspA1-1* e *uspA1-2*.

4.2 Extração de DNA total de *Xylella fastidiosa*, obtenção dos amplicons de interesse e purificação

Foi feita de uma extração de DNA total de *X. fastidiosa*, de acordo com Wilson (1987). Os amplicons de interesse para os genes *fimA* (*xf2539*), *pilC* (*xf2538*), *hsf* (*xf1529*), e *uspA1* (*xf1516*) foram obtidos através da PCR. As reações foram padronizadas para um volume final de 25µL, contendo de 70 a 100ng de DNA total, 50ng de cada *primer* (direto e reverso), 2,5mM de dNTP,

1,25µL de MgSO₄ (50mM), 2,5µL de tampão 10X (Invitrogen) e 1 unidade de *Taq Platinum* (Invitrogen). As reações foram incubadas a 94⁰ C por 3 minutos e foram feitos 35 ciclos de 55⁰ C por 1 minuto, 72⁰ C por 1 minuto e 30 segundos e 94⁰ C por 1 minuto, a extensão foi feita a 72⁰ C por 10 minutos. No caso da PCR para os fragmentos *uspA1-1* e *uspA1-2*, foi necessária a alteração de algumas condições para a obtenção dos amplicons desejados. Desta maneira, a concentração de MgSO₄ foi diminuída de 2,5mM para 1,8mM; a temperatura de anelamento dos *primers* foi aumentada em 8⁰C e o tempo de extensão foi diminuído em 30 segundos. O resultado da amplificação foi verificado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizado em luz UV. A purificação dos fragmentos obtidos foi feita de acordo com as instruções do kit 'GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification' (GE Healthcare).

4.3 Ligação dos fragmentos em pGEM-T e seqüenciamento

Os fragmentos purificados foram ligados em pGEM-T (Promega). A reação de ligação foi feita de acordo com as especificações do fabricante, sendo incubada durante 16 horas a 16 °C. Uma alíquota de 5µL de cada uma das construções foi utilizada para transformação da estirpe DH5α de *E. coli* por choque térmico. Os transformantes foram selecionados através de placas de meio LB sólido contendo 50µg/µL de ampicilina, 8µL IPTG (20mg/mL) e 40µL Xgal (24mg/mL), que foram incubadas por 16 horas a 37⁰C. Aproximadamente 20 colônias brancas foram selecionadas e crescidas em 4ml de meio LB líquido contendo 50µg/µL de ampicilina por 16 horas. O inóculo foi utilizado para realização de uma mini preparação plasmidial (mini-prep) (Sambrook et al., 1989). Após a mini-prep, os plasmídeos foram quantificados por comparação com um plasmídeo de concentração conhecida, através de corrida eletroforética utilizando gel de agarose a 1%. Para cada construção a ser seqüenciada, foi empregado o conjunto de *primers* utilizados previamente para originar o inserto, além dos *primers* específicos para o vetor pGEM-T, que flanqueiam a região de clonagem do inserto. O seqüenciamento foi realizado de acordo com as instruções da ABI (Applied Biosystem) para o DNA Sequencing Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction”, v 3.0, foi utilizado o seqüenciador ABI 3730. As seqüências obtidas foram utilizadas para busca de similaridades contra o banco de dados de *X. fastidiosa* utilizando a ferramenta BlastN e BlastX (<http://aeg.ib.unicamp.br/xf>).

4.4 Seqüenciamento dos fragmentos *uspA1* e *uspA2*

Os fragmentos, que têm tamanhos correspondentes a 1.500 e 2.000 pares de bases respectivamente, não apresentaram seqüenciamento completo devido a limitação do aparelho utilizado, que seqüencia no máximo 600 pares de base. Para certificação da integridade do fragmento clonado, foi necessário desenhar *primers* internos para que, ao final da reação, a seqüência total do fragmento fosse analisada. A seqüência dos fragmentos foi estabelecida utilizando dois pares de *primers*. Um par era composto pelos *primers* T7 e SP6 que se anelam ao vetor pGEM-T, e o outro par era composto por *primers* internos que se anelavam a posições 348 e 1102, respectivamente. A figura 4 é uma representação esquemática do seqüenciamento desses amplicons. O seqüenciamento de *uspA1* e *uspA2* gerou quatro fragmentos que foram utilizados para a montagem de uma seqüência consenso, esta foi utilizada para as análises de busca de similaridades através das ferramentas BlastN e BlastX (<http://aeg.ib.unicamp.br/xf>).

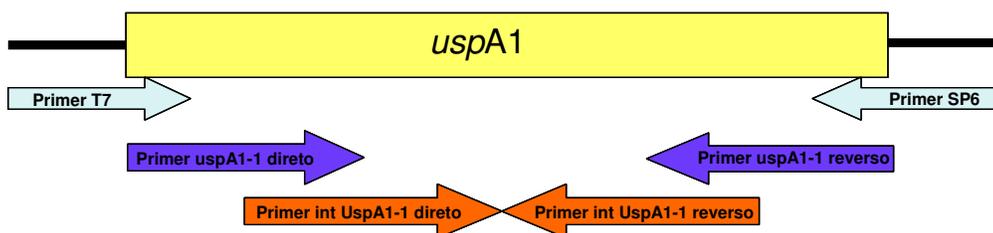


Figura 4: Estratégia de seqüenciamento dos fragmentos *uspA1-1* e *uspA1-2*. Para cada fragmento seqüenciado foram utilizados três pares de *primers*, o primeiro par era referente ao vetor em que o fragmento estava ligado, o segundo par foi utilizado para gerar o fragmento e o terceiro par foi desenhado para as posições 348 e 1102 interiores a seqüência do fragmento.

4.5 Digestão e purificação das construções em pGEM-T, do vetor pET28a e ligação no vetor de expressão

Os insertos ligados em pGEM-T que, após seqüenciados apresentaram 100% de similaridade com os respectivos genes de *X. fastidiosa*, foram digeridos com 10 unidades de *EcoRI* e 10 unidades de *HindIII* (Invitrogen), segundo especificações do fabricante. O vetor pET28a também

foi digerido com as mesmas enzimas. Após a digestão do vetor, este foi defosforilado utilizando-se a enzima “Calf Intestinal Alkaline Phosphatase” (CIAP) (Invitrogen). As reações foram realizadas segundo especificações do fabricante. Os insertos digeridos das construções em pGEM-T, e o vetor pET28a digerido e defosforilado foram submetidos a corrida eletroforética em gel de agarose 1% para quantificação e posterior purificação das bandas através do kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Helthcare).

Os insertos purificados foram ligados no vetor pET28a utilizando-se a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen), de maneira que a proteína expressa apresentasse uma fusão a 6 resíduos de histidina. A reação foi incubada por 16 horas a 16°C. Culturas permanentes dos insertos clonados em pET28a foram estocadas em DH5α. A linhagem *Rosetta* de *E. coli* foi transformada, como já descrito anteriormente, com as construções visando obter clones para expressão heteróloga das proteínas. Os transformantes foram selecionados em placas de meio de cultura LB sólido contendo 50µg/mL de kanamicina e validados por PCR utilizando-se *primers* específicos para cada construção.

4.6 Teste de expressão das proteínas dos clones contendo pET28a

As regiões protéicas foram ligadas em pET28a e transformados na linhagem *Rosetta* de *E. coli*. Foi feito um teste de expressão para averiguar se as regiões protéicas clonadas estavam sendo expressas na fração solúvel ou insolúvel do extrato bacteriano. Para comparar se havia diferença de expressão da proteína entre diferentes linhagens de *E. coli*, o inserto correspondente a *hsf9* foi também transformado na linhagem BL21 DE3.

Para avaliar a expressão da proteína, um pré inóculo contendo 2mL de meio LB, 50µg de kanamicina e o clone a ser testado foi crescido por 16 horas a 37°C a 300rpm. Este foi, então, inoculado em 98mL de meio LB com 50µg de kanamicina e colocado sob agitação de 300rpm a 37°C. O crescimento das células foi acompanhado até atingir um valor de DO igual a 0,6 e foi retirado dessa cultura 30mL (T0 - tempo antes da indução). O restante foi induzido com 1mM de IPTG ou 560mM de lactose por duas (T2) e quatro horas (T4) a 37°C. O restante da cultura também foi coletado (PR). Após cada coleta, a amostra foi centrifugada por 15min a 4000rpm em ultracentrífuga a 8°C. Todos os extratos foram ressuspensos em 1mL de tampão Tris 50mM, NaCl 300mM pH7,5; e as células foram rompidas através de sonicação e adição de 1mM de

lisozima. Foi adicionado também ao extrato 1mM de inibidor de protease Fluoridro de Fenilmetil Sulfonil (PMSF). Os extratos foram centrifugados e as frações sobrenadante e extrato insolúvel foram separadas. De cada amostra foi retirada uma alíquota de 20µL que foi misturada a 20µL de tampão redutor (1mL de Tris-HCl pH6,8 0,5M, 0,8mL de glicerol 100%, 1,6mL de SDS 10%, 0,4mL de β – mercaptoetanol, 0,2mL de Bromophenol blue e 4mL de água MilliQ autoclavada) e desnaturada por 5 minutos a 100⁰C. As amostras foram visualizadas em gel SDS - PAGE, composto por uma porção denominada empacotamento, de concentração igual a 5%, e uma porção denominada separação, de concentração igual a 12%. No caso da proteína FimA2, a porção de separação do gel apresentava concentração igual a 15%, por se tratar de uma proteína de tamanho pequeno. Os géis foram corados em solução contendo Coomassie brilliant blue R-250 e descorados em solução contendo metanol e ácido acético.

Para o caso das proteínas que se apresentaram na fração insolúvel do extrato protéico, foi realizado um novo ensaio de expressão utilizando-se a temperatura de 25⁰C e tempos de 4 e 19 horas de indução com 1mM de IPTG. Essa nova condição foi testada na tentativa de retardar o crescimento da bactéria e, por conseqüência, a produção da proteína heteróloga também seria diminuída, evitando a formação de corpos de inclusão.

4.7 Purificação das proteínas

As proteínas foram purificadas utilizando-se o método de cromatografia de afinidade. A coluna foi lavada com água MilliQ autoclavada e adicionou-se 1mL de Ni-NTA Agarose (Quiagen). Após isso, a coluna foi carregada com quatro volumes de uma solução de 100mM NiSO₄ . 6H₂O e lavado com quatro volumes de água MilliQ autoclavada. O equilíbrio da coluna foi feito com quatro volumes de tampão (TrisHCl 50mM, NaCl 300mM, pH 7,0) no qual as amostras a serem purificadas estavam ressuspensas. As proteínas que se apresentaram expressas nos extratos solúveis T2, T4 e PR foram passadas pela coluna. O primeiro eluato coletado foi denominado FT. A primeira lavagem da coluna foi feita com quatro volumes de tampão contendo TrisHCl 50mM e NaCl 1M (pH 7,0), o eluato correspondente a essa lavagem foi denominado LAV. As três lavagens subseqüentes da coluna foram feitas utilizando 4mL de tampões que continham Tris 50mM, NaCl 300mM e concentrações crescentes de imidazol, que foram 10mM, 50mM e 200mM (pH 7,0). Os eluatos coletados continham a proteína com pouco,

ou nenhum contaminante. Uma alíquota de 20 μ L do eluato de cada etapa da purificação, assim como da mistura das frações solúveis T2, T4 e PR foram coletadas e adicionadas a 20 μ L de tampão redutor. As amostras foram desnaturadas a 100 $^{\circ}$ C por 5 minutos e visualizadas em gel SDS - PAGE.

4.8 Seqüenciamento das proteínas purificadas por espectrometria de massa

Essa etapa do trabalho foi realizada em colaboração com o professor Dr. Carlos Alberto Labate, no Laboratório Max Feffer no Departamento de Genética, Esalq – USP.

Foi feito um gel SDS 12%, como já descrito anteriormente, usando espaçadores largos. As amostras FimA, Hsf e UspA1 purificadas por cromatografia, bem como a fração insolúvel que continha PilC superexpressa, foram misturadas ao tampão redutor, desnaturadas por 1 minuto e carregadas no gel. Após a corrida eletroforética, o gel foi fixado em solução contendo 40% de etanol e 10% de ácido acético e corado em solução contendo Comassie Blue G250. As bandas de interesse foram cortadas do gel utilizando bisturi, cada banda foi recortada em pedaços menores e colocados em um eppendorf de 1,5mL. Foi adicionado às amostras 400 μ L de tampão contendo 25mM de bicarbonato de amônio (AMBIC) e 50% acetonitrila e as amostras foram agitadas em vortex com rotação bem baixa. À medida que a solução ficava azul, o tampão era trocado. Isso foi feito até que os pedacinhos das bandas do gel ficassem totalmente transparentes. As amostras foram incubadas em 200 μ L de acetonitrila 100% por 10 min a temperatura ambiente, por duas vezes. A acetonitrila foi descartada e as amostras foram secas durante 15 min a temperatura ambiente. A redução das amostras foi feita utilizando 100 μ L do tampão 20 mM de DTT e 50mM de AMBIC por 45min a 55 $^{\circ}$ C. O sobrenadante foi descartado e alquilação foi feita com 50 μ L de ácido indol acético por 45 min a temperatura ambiente no escuro. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram desidratadas com tampão contendo 25 mM de AMBIC e 50% acetonitrila por 15min a temperatura ambiente e agitação leve. O sobrenadante foi novamente descartado e adicionou-se por duas vezes a solução contendo 100% de acetonitrila por 15 min. Depois de descartar o sobrenadante, as amostras ficaram por 15 min a temperatura ambiente para secar. A digestão das proteínas foi feita utilizando tripsina. Uma alíquota de 150ng de tripsina foi misturada a 60 μ L de 25mM de AMBIC e 15 μ L dessa diluição foram adicionados a cada uma das

quatro amostras. O tampão 25 mM de AMBIC foi adicionado às amostras até que estas ficassem completamente imersas. As amostras permaneceram a 36°C overnight.

O sobrenadante das amostras foi reservado e utilizado como controle antes da eluição. Às amostras foram adicionados 100µL de acetonitrila 50% e ácido fórmico 5%, por 10 minutos para o bloqueio da trispsina. Foram realizadas duas lavagens utilizando 100µL de acetonitrila 50% e ácido fórmico 1% por 10 minutos, e outras duas lavagens utilizando 100µL de metanol 100% por 10 minutos. Todos os sobrenadantes foram adicionados no mesmo eppendorf e os 700µL resultantes foram evaporados em SpeedVac e dissecador em câmara fria. O pellet foi solubilizado em 12µL de ácido fórmico 1%.

As proteínas foram sequenciadas em espectrômetro de massas Q-TOF-Ultima API (ESI-MS/MS *quadrupole/aceleração orthogonal time-of-flight*) da Water-Micromass acoplado a um sistema *on-line* de HPLC capilar, CapLC (Waters®).

A separação dos peptídeos foi realizada usando-se uma pré-coluna C18 (0.18 x 23.5mm Nanoease trapping C18 Waters®) seguida por uma coluna de fase reversa C18 (LC nanoease Symmetry® 300 3.5µm 75 x 100mm Waters®). Os peptídeos foram eluídos através da variação do gradiente do tampão A (95% v/v H₂O, 5% v/v acetonitrila e 0,1% v/v ácido fórmico) e do tampão B (95% v/v acetonitrila, 5% v/v H₂O e 0,1% v/v ácido fórmico). Durante a corrida o fluxo usado foi de 250nL.min⁻¹ durante 60 minutos.

A ionização das moléculas por electrospray foi realizada com uma voltagem fixa de 3.000 V, temperatura de 90°C sob 5 psi de nitrogênio. Os espectros foram adquiridos em modo MS/MS automaticamente com um limiar de 35 *counts*, dentro de uma amplitude de 50 a 2.000m/z. As aquisições foram realizadas simultaneamente com o peptídeo padrão GFP através do sistema Nanolock Spray da Micromass, para corrigir as variações de calibração que ocorrem ao longo do tempo.

Os espectros de massas das amostras foram analisados e processados utilizando os programas MassLynx NT BioLynx V 4.0 e ProteinLynx V 2.1 da Micromass e submetidas para sua identificação ao banco de dados SWISS-PROT (Bairoch et al., 2005) e NCBI através do programa BlastP (Altschul et al., 1997). De acordo com análises de probabilidade através do MASCOT, somente significâncias $P < 0,05$ foram aceitas.

4.9 Imunização dos coelhos para obtenção de anticorpos policlonais

Essa etapa do trabalho foi feita em colaboração com a professora Dra. Dagmar Ruth Stach-Macahdo laboratório de Microbiologia e Imunologia da Unicamp.

Para imunização foram utilizados coelhos machos da linhagem Branca da Nova Zelândia, de idade aproximada de dois meses e peso 2,5 Kg. Foi utilizado um coelho para cada proteína. As proteínas FimA, Hsf e UspA1, que foram purificadas por cromatografia de afinidade, foram coletadas diretamente dos eluatos. Contudo, a proteína PilC, que se apresentou insolúvel, foi recortada do gel SDS – PAGE, corado com Cmassie Blue 0,1% diluído em água, e masserada . Em cada animal foram inoculadas três doses de 150µg das proteínas Hsf e FimA, e 100µg das proteínas UspA1 e PilC. A primeira foi aplicada juntamente com o Adjuvante Completo de Freund (ACF) (Sigma), e as doses seguintes foram misturadas ao Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) (Sigma). Um intervalo de dez dias entre uma dose e outra foi respeitado. A aplicação foi feita no dorso do coelho em quatro pontos diferentes. Para tais inoculações, a concentração das proteínas Hsf, FimA e UspA1 foram estimadas de acordo com a absorbância da amostra coletada após a purificação. A concentração da proteína PilC foi estimada com o auxílio do programa Scion Image, após corrida em gel SDS – PAGE.

4.10 Teste de concentração e especificidade dos anticorpos pelo método de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Transcorridos os dias após as três inoculações iniciais das proteínas, foi feita uma pequena sangria da artéria central de uma das orelhas do coelho para verificar a titulação dos anticorpos. Após o sangue ser incubado a 37⁰C por 30 minutos, soro e parte sólida foram separados por centrifugação. O soro foi inativado por 1 hora a 56⁰C e utilizado para a realização de um teste ELISA, empregando como antígenos as proteínas purificadas, que foram utilizadas para produzir o anticorpo. A reação foi feita em uma placa de 96 poços, aos quais foram adicionados 3µg do antígeno. A placa foi incubada no escuro por 16 horas a 4⁰C. O bloqueio dos poços foi feito com tampão PBS e 2% de leite desnatado e após incubação a 37⁰C por 1 hora, foram feitas três lavagens com PBS - tween 20 e aplicado à placa 100µl por poço do anti-soro. A concentração testada do antisoro variou de 1:500 a 1:32.000, e como controle negativo foi utilizado somente tampão PBS. Foram feitas três lavagens com PBS – tween 20 e em seguida aplicados a cada poço

100µL de antisoro anti Ig-G de coelho conjugado com fosfatase alcalina. A placa foi incubada a 37⁰C por 1 hora, e novas lavagens foram feitas. Foi aplicado em cada poço 100µL de p-Nitrofenil Fosfato (pNPP) (1mg/mL). A placa foi incubada por 1 hora no escuro e a temperatura ambiente, a leitura da absorbância foi feita a 405nm. De acordo com a titulação dos anticorpos, foi feita nova inoculação das proteínas e após dez dias, a sangria branca do coelho. Esta é realizada para obtenção de grande quantidade de antisoro. Os coelhos foram anestesiados com quetamina e xilosina, de acordo com o peso de cada um. O sangue foi coletado com o auxílio de uma agulha acoplada a uma cânula, que foi introduzida na região torácica do animal. Após a coleta, o sangue foi preparado como descrito anteriormente e novo ensaio ELISA foi realizado. Neste, as diluições testadas do anti-soro variaram de 1:10.000 a 1:256.000.

4.11 Extração das proteínas totais e extracelulares das diferentes fases do biofilme

Foram feitas três repetições biológicas para os experimentos de extração de proteínas.

Antes de ser utilizado para cada repetição biológica, a concentração do pré-inóculo foi previamente padronizada para uma medida de absorbância igual a OD₆₀₀ = 0,1, correspondente a 10⁸ UFC/mL.

Culturas da estirpe 9a5c de *X. fastidiosas* recém isoladas de planta sintomática foram mantidas em 50mL de meio PW a 28⁰C e sob agitação de 130rpm. Essas culturas foram utilizadas somente até a oitava repicagem, uma vez que passado esse tempo a bactéria começa a perder a capacidade de formar biofilme. Uma alíquota de 10mL de um pré-inóculo contendo células crescidas durante sete dias foi adicionado a 50mL de meio PW sem BSA para a formação dos biofilmes a serem coletados. Foram coletadas proteínas totais de biofilmes de bactérias crescidas por três, cinco, dez, quinze, vinte e trinta dias. A coleta foi feita lavando-se as células em biofilme três vezes com 1mL de tampão de lavagem (10mM de TrisHCl pH 8,8, 3mM de KCl, 50mM de NaCl, 1 mM de PMSF e 5mM de EDTA pH 8,0) e centrifugação por 2 min a 5.000rpm. O sobrenadante, onde se encontram as proteínas fracamente aderidas, foi separado em um novo eppendorf. Ao pellet foram adicionados 50µL de solução de lise (1mM de TrisHCl pH 8,8, 1% w/v de SDS, 5mM de EDTA e 1mM de PMSF) e 100mM de DTT (Invirogen), as amostras foram fervidas por 3 min e estocadas a -80⁰C (método 1 – M1). Além desse método, as proteínas totais também foram coletadas utilizando-se um 1mL de tampão de extração contendo

(50mM de Tris pH 8,0; 25mM de NaCl; 5mM de EDTA pH 8,0; 2% Triton X-100), à cada extrato foi adicionado 1mM de lisozima e as amostras foram deixadas por 20 min no gelo. Foi adicionado também 1mM de PMSF e foram feitos 5 ciclos de sonicação durante 10 segundos cada, na potência 40. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000Xg e apenas o sobrenadante foi utilizado para análises de expressão das proteínas (método 2 – M2). Esse método também foi utilizado para coletar proteínas de *X. fastidiosa* na condição planctônica de crescimento, ou seja, a condição na qual a bactéria não se encontra aderida na forma de biofilme, mas cresce livre no meio de cultura. Essa condição é obtida após, no mínimo, dez repicagens semanais da cultura.

4.12 Quantificação das proteínas para Western blot

As proteínas extraídas dos biofilmes foram quantificadas para que erros de medida da intensidade das bandas após Western blot fossem minimizados. A quantificação foi feita pelo método de Lowry, utilizando-se como comparação uma curva padrão com concentrações de albumina (BSA) entre 25µg/mL e 500µg/mL. Para 100µL de cada solução de BSA foi adicionado 100µL do reagente de Lowry (Invitrogen) e homogeneizado com o auxílio de vortex; essa mistura foi deixada por 20 min a temperatura ambiente. Foi feita nova homogeneização e foram adicionados 50µL do reagente Folin e Ciocauteu fenol. Após isso, a mistura foi incubada no escuro e a temperatura ambiente por 30 min. A leitura da absorbância foi feita a 740nm, utilizando-se como branco apenas água, que foi preparada como as outras amostras.

4.13 Western blot das proteínas coletadas

Foram feitos ensaios separados para cada repetição biológica de proteínas extraídas.

Amostras das proteínas de todas as fases foram padronizadas para uma mesma concentração antes da aplicação em gel de SDS. Este foi feito em uma concentração de 12% para as proteínas fimbriais e 9% para as afimbriais, porque eram de maior peso molecular, a corrida foi feita a 120V até que as proteínas chegassem próximo ao fim do gel. Feito isso, o gel foi incubado duas vezes, por 30 min, em tampão de transferência (48mM Trisma-base; 39mM glicina; 0,04% SDS; 20% metanol) a temperatura ambiente. As proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (Hybond C extra, Amersham), de acordo com as especificações da LKB (LKB-

Produkter, Bromma, Sweeden), no aparelho Multiphor II Novablot, durante 2 horas, a 0,8 mA/cm². Após a transferência, as membranas foram bloqueadas por 3 horas, sob agitação, em tampão TBS (0,1M Trisma-base; 0,9% NaCl; pH7,6) contendo 5% de leite em pó desnatado. As membranas foram incubadas durante 16 horas a temperatura ambiente, em tampão contendo TBS, 0,1% de Tween 20 (TBS-T), 5% de leite em pó desnatado e os anticorpos nas diluições adequadas. Cada anticorpo policlonal desenvolvido contra UspA1, Hsf, FimA e PilC foi adicionado separadamente em cada membrana. Após 16 horas de hibridização, as membranas foram lavadas por 3 vezes com TBS-T e incubadas por 1 hora em TBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado e o conjugado goat anti-rabbit IgG fosfatase alcalina (SIGMA). A revelação das membranas foi feita em solução contendo 25ml de tampão de reação (0,1M Tris-HCl pH 9,5; 0,1M NaCl; 5mM MgCl₂), 2mg de BCIP (5-bromo 4-chloro 3-indolyl phosphate) e 4mg de NBT (nitro blue tetrazolium). Após a revelação, as membranas foram lavadas em água destilada e secas em papel absorvente.

4.14 Imunofluorescência das diferentes fases do biofilme utilizando os anticorpos contra as proteínas alvo

Lamínulas de vidro de 12 mm de diâmetro foram colocadas em placas NUNC de 24 poços (Nunclon delta SI Multidish 24 wells - Nunc A/S, Roskilde, Denmark) contendo 900µL de meio PW por poço. Sobre as lamínulas foi adicionado 100µL de um pré – inóculo da estirpe 9a5c de *Xylella fastidiosa*, ajustado para uma DO = 0,1. Essas culturas foram deixadas a 28⁰C sem agitação e foram analisadas aos 3, 5, 10, 15, 20 e 30 dias de crescimento, correspondentes às fases de formação do biofilme. as análises de imunofluorescência foram realizadas segundo Roper (2007). Para a análise ao microscópio de fluorescência, o meio PW foi retirado gentilmente com uma pipeta e o biofilme foi marcado com os anticorpos separadamente em uma diluição de 1:1.000 em solução contendo 1% de BSA em PBS. A placa foi envolvida em papel alumínio e incubada por 1 hora a 37⁰C, após isso, foram feitas 2 lavagens com 1mL de PBS contendo 0,2% de BSA. Para a localização das proteínas no biofilme, foi utilizado uma diluição de 1:1.000 em tampão PBS contendo 0,2% de BSA do anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado com rodamina (Santa Cruz). A placa foi envolvida com papel alumínio e incubada por 1 hora a 37⁰C. Novas lavagens foram feitas. A contrastação das células do biofilme foi feita com

o corante para ácido nucléico Syto 9, diluído 600 vezes em água MilliQ autoclavada. A placa foi incubada a temperatura ambiente por 15 min, no escuro. As imagens foram feitas no microscópio Olympus UIS2 Fluorescence utilizando os filtros U-MWB2 e U-MWG2, em um aumento de 10.000 vezes.

Os controles negativos foram feitos de duas maneiras. Primeiramente, foi utilizado o biofilme crescido por 15 dias incubado apenas com o anticorpo contra UspA1, o anticorpo secundário não foi utilizado. Esse controle foi realizado com o objetivo de verificar se a ligação do anticorpo primário com a proteína alvo produziria fluorescência. No segundo controle realizado, apenas o anticorpo secundário conjugado com o fluoróforo foi adicionado ao biofilme, sem que o anticorpo primário estivesse presente. O objetivo desse teste foi verificar se a ligação do anticorpo secundário era específica.

4.15 Imunolocalização através de microscopia eletrônica de transmissão das proteínas alvo em plantas infectadas

Essa etapa do trabalho foi realizada em colaboração com o professor Dr. Eliot Wanabi Kitajima, no laboratório de Microscopia Eletrônica NAP/ MEPA na Esalq – USP.

Para imunolocalização das proteínas fimbriais e afimbriais, amostras de pecíolos de folhas de citros, hibisco e vinca infectados com *X. fastidiosa* foram cortados em pedaços menores e desidratados utilizando soluções de etanol 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, deixando a amostra durante 10 min em cada solução. Depois de desidratadas, as amostras foram emblocadas em resina LR White (London Resin Company). Secções ultrafinas das amostras foram obtidas utilizando micrótomo e foram colocadas sobre grades de níquel recobertas com Formvar para a realização da imunomarcção. Para este processo, as grades com as secções foram incubadas em gotas de tampão de pré-incubação (PBS 0,01M contendo 0,15M de cloreto de sódio, 1% de BSA e 0,05M de glicina) por 40 min em câmara úmida. Após isso, as grades foram transferidas para gotas de solução para diluir anticorpos primários (PBS 0,01M; 0,15M de cloreto de sódio e 0,1% de BSA) contendo o anticorpo desejado na diluição de 1:100 ou 1:200, onde foram deixadas por 5 ou 16 horas na câmara úmida e temperatura ambiente, dependendo do anticorpo em estudo. As grades foram lavadas em tampão de lavagem (PBS 0,01M; 0,15M de cloreto de sódio e 1% de BSA) três vezes, deixando-as 5 minutos em cada gota e transferidas para gotas de solução para

diluição de anticorpos conjugados com ouro coloidal (PBS 0,01M; 0,15M de cloreto de sódio; 0,1% de BSA; 1% de polietilenoglicol e 2,22% de gelatina de peixe), que continha anticorpos IgG anti-rabbit (Sigma) na diluição de 1:50. A incubação dessa etapa foi feita por 1 hora a temperatura ambiente em câmara úmida. Foi feita nova lavagem no tampão de lavagem, como descrito anteriormente, além de outras três lavagens em gotas de água destilada. A contrastação das grades foi feita em gotas de acetato de uranila 3% e citrato de chumbo, incubando-as por 15 min em cada gota. O excesso foi retirado em lavagens com água, deixando as grades por 5 min em cada gota. Após secagem, as grades foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão modelo Zeiss EM 900.

Resultados

5.1 Extração de DNA total, obtenção dos amplicons de interesse e purificação

O DNA da estirpe 9a5c de *X. fastidiosa* foi utilizado como molde para a reação de PCR. A concentração de DNA obtida após extração foi de aproximadamente 75ng/μl (dados não mostrados). A obtenção de apenas uma banda após PCR para cada um dos pares de *primers* testados sugeriu alta especificidade. As Figuras 5A, B e C demonstram, respectivamente, alguns fragmentos de interesse obtidos por PCR e exemplos das purificações dos fragmentos *uspA1-1* e *uspA1-2* obtidos após alterações na reação de PCR (como especificado no Material e Métodos).

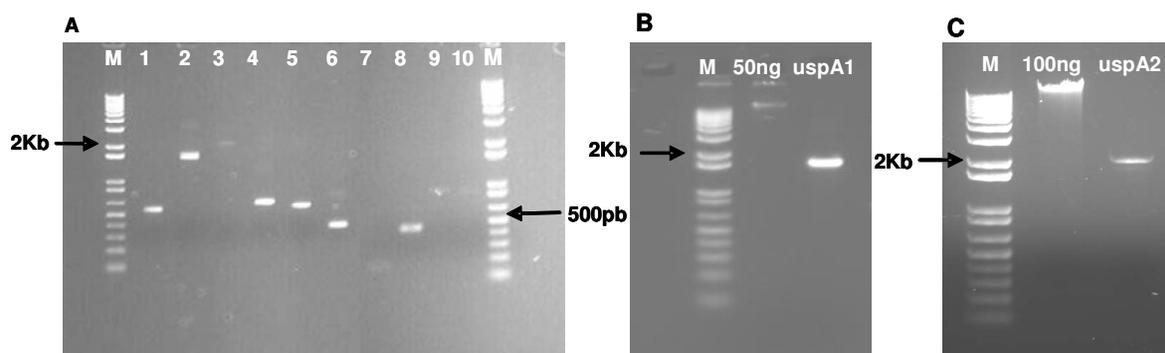


Figura 5: Obtenção e purificação dos fragmentos obtidos por PCR. **A.** Ordem do gel: M. ladder 1Kb plus, 1. *pilC-1* (560pb), 2. *uspA1-1* (1,5 Kb), 3. *uspA1-2* (2Kb), 4. *pilC-2* (640pb), 5. *pilC-3* (580pb), 6. *fimA-2* (450pb), 7. *fimA-1* (148pb), 8. *fimA-3* (520 pb), 9. *hsf-7* (882pb), 10. *hsf-9* (1Kb), M. ladder 1Kb plus. **B.** Fragmento *uspA1-1* purificado; M – marcador 1Kb plus, marcador 50ng, *uspA1* purificado. **C.** Purificação do fragmento *uspA1-2*; M – marcador 1Kb plus, marcador 100ng, *uspA1-2*.

5.2 Ligação dos amplicons em pGEM-T e seqüenciamento.

Para aumentar o número de cópias dos fragmentos gerados por PCR estes foram ligados em pGEM-T. A ligação dos fragmentos apresentou alta eficiência, uma vez que o número de colônias brancas era mais alto que o de colônias azuis, sugerindo inserção do inserto no vetor. Foram escolhidas aproximadamente dez colônias transformantes por placa para a realização de PCR visando excluir a presença de falsos positivos. Os transformantes positivos, ou seja, aqueles que apresentaram amplicons da altura referente ao esperado, após PCR utilizando o par de *primers* para cada inserto, foram selecionados para mini prep.

O DNA de todos os transformantes positivos para os amplicons de interesse foram seqüenciados. Para a análise dos dados, as seqüências do vetor pGEM-T foram excluídas utilizando o software SeqMan, do pacote Lasergene 99, e a seqüência fasta gerada dos amplicons

foi utilizada para busca de similaridades contra o banco de dados de *X. fastidiosa*. Aproximadamente seis colônias para cada amplicon apresentaram 100% de identidade com os respectivos genes de *X. fastidiosa*. Os clones que apresentaram amplicons com algum erro de incorporação de nucleotídeo foram descartados.

A estratégia de seqüenciamento dos amplicons *uspA1-1* e *uspA1-2* contou com a necessidade de desenhar mais dois *primers* internos para que toda a seqüência pudesse ser analisada com maior segurança. A seqüência consenso gerada após seqüenciamento apresentou alta qualidade, possibilitando as análises e a escolha dos amplicons que não apresentaram erros de incorporação de nucleotídeos.

5.3 Digestão e purificação dos transformantes contendo pGEM-T, do vetor pET28a e ligação em vetor de expressão

Após a verificação da não ocorrência de erros de incorporação de nucleotídeos, foram selecionadas algumas construções para a digestão. Somente as construções que apresentaram 100% de identidade com os respectivos genes de *X. fastidiosa* foram submetidas a digestão com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*. Para que a ligação no vetor de expressão fosse direcional, este também foi digerido com as mesmas enzimas. A digestão apresentou resultado satisfatório, uma vez que após a digestão, todas as amostras apresentaram a banda de tamanho esperado (**Figura 6**).

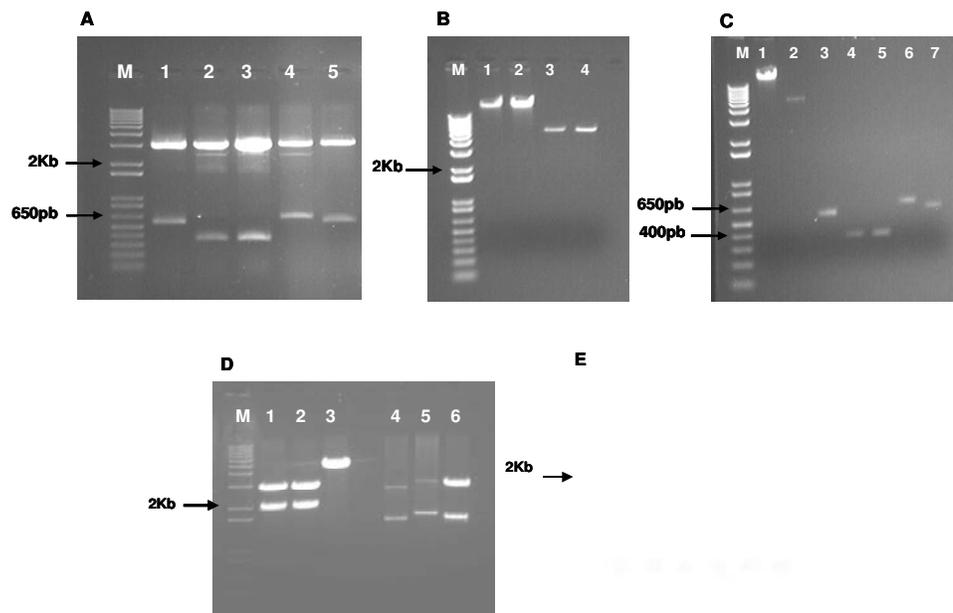


Figura 6: Resultados da digestão com *EcoRI* e *HindIII* dos fragmentos clonados em pGEM-T. **A.** M. Ladder 1Kb plus, 1. *pilC*-1 (560pb), 2. *fimA*-2 clone 1 (450pb), 3. *fimA*-2 clone 2 (450pb), 4. *pilC*-2 (640pb) e 5. *pilC*-3 (580pb). **B.** Purificação da digestão do vetor pET28a. M. ladder 1Kb plus, 1. marcador 50ng, 2. marcador 100ng. 3 e 4. pET28a digerido com *EcoRI* e *HindIII* e defosforilado (5,3Kb). **C.** Purificação de alguns insertos digeridos e seqüenciados. M. ladder 1Kb plus, 1. marcador 100ng, 2. pET28a digerido, 3. *pilC*-1, 4. *fimA*-2 clones 1, 5. *fimA*-2 clone 2, 6. *pilC*-2 e 7. *pilC*-3. **D.** Digestão com *EcoRI* e *HindIII* dos fragmentos *uspA1*-1 e *uspA1*-2 clonados em pGEM-T. M – marcador 1 Kb plus, 1, 2 e 3 *uspA1*-2 (2Kb) e 4, 5 e 6 *uspA1*-1 (1,5 Kb). **E.** Quantificação da purificação dos fragmentos digeridos. M- marcador 1Kb plus, marcador 50ng, 1, 2 e 3 referem-se ao *uspA1*-1, e 4 e 5 referem-se ao *uspA1*-2.

Após purificação dos fragmentos digeridos, estes foram ligados em vetor de expressão e a linhagem *Rosetta* de *E. coli* foi transformada com sucesso. Após PCR de colônia utilizando o par de *primers* para cada inserto gerado, a quase totalidade dos transformantes apresentou a banda de tamanho esperado (Dados não mostrados).

5.4 Teste de expressão dos transformantes positivos pET28a

A fim de avaliar a expressão dos insertos clonados em pET28a uma amostra da construção contendo *hsf* ligado a pET28a foi inserida nas estirpes de *E. coli* BL21DE3 e *Rosetta*. O teste de expressão realizado com essa construção não demonstrou diferenças de expressão entre as estirpes (**Figura 7A**). A super expressão das proteínas Hsf, FimA e UspA1 foi bastante

Resultados

evidente e estas foram expressas tanto na fração solúvel quanto na insolúvel do extrato protéico, sendo possível purificá-las posteriormente. O tempo de duas horas de indução foi suficiente para obter as proteínas de interesse. As proteínas PilC1, PilC2 e PilC3 foram expressas somente na fração insolúvel do extrato protéico e apresentaram super expressão em tempos variáveis de indução. Após a indução da expressão das proteínas, foi verificado que os tamanhos esperados para cada uma delas (incluindo a fusão com a cauda de histidina) foram observados, sendo que Hsf apresentou 34KDa, FimA2 apresentou 18KDa, UspA1-1 apresentou 54KDa, UspA1-2 apresentou 69KDa, e PilC1, PilC2 e PilC3 apresentaram, respectivamente, 26KDa, 25KDa e 27KDa. Os resultados estão demonstrados na figura 7.

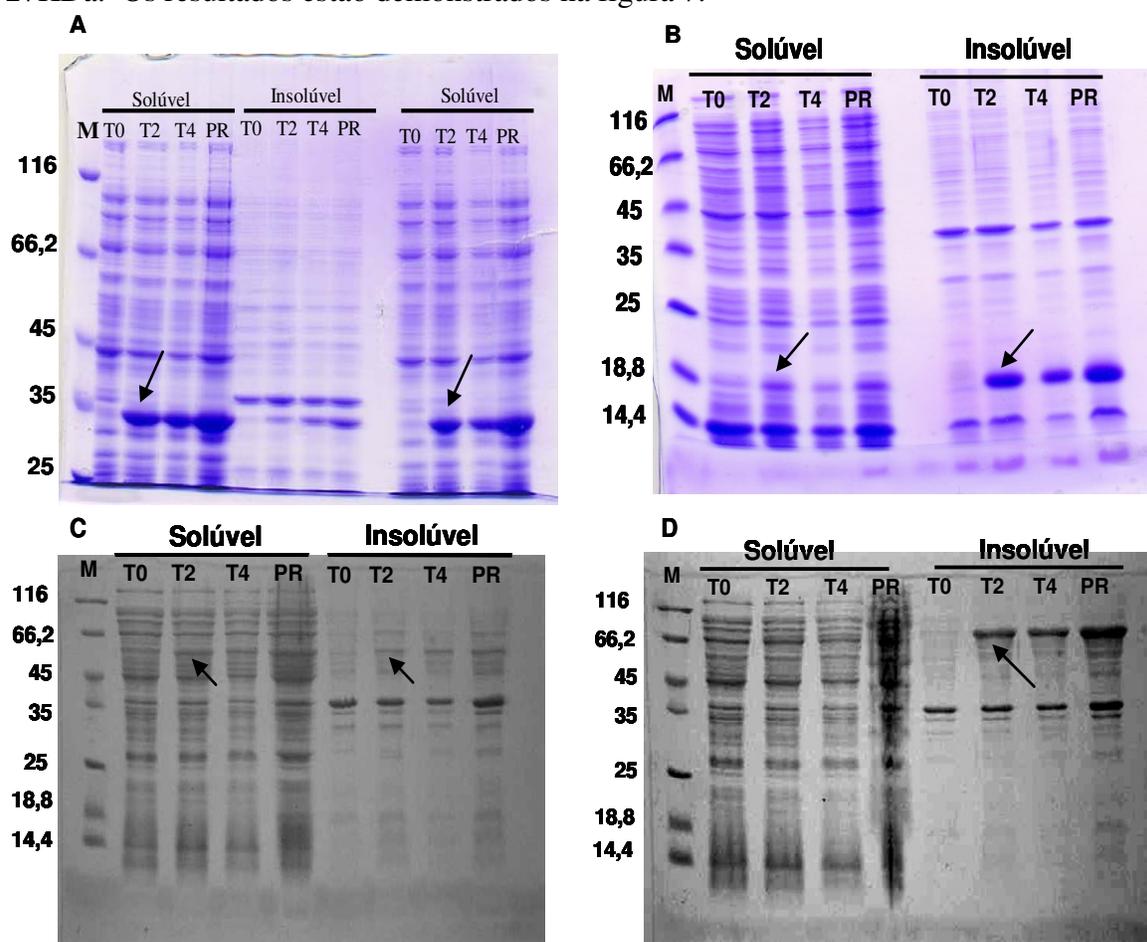


Figura 7: Géis SDS demonstrando os resultados dos testes de expressão para as proteínas avaliadas. As letras **M** e **M1** referem-se, respectivamente, aos marcadores “Molecular Weight Marquer” (Fermentas) e “Rainbow™” (Amersham Pharmacia Biotech). **T0**, **T2**, **T4** e **PR** referem-se aos tempos antes da indução, duas horas de indução, quatro horas de indução e ‘pellet’ restante induzido por quatro horas, respectivamente. **A.** Hsf9 (tamanho esperado 34KDa), sendo que as duas primeiras colunas “Solúvel” e “Insolúvel” referem-se à linhagem BL21 DE3, e a última coluna “Solúvel” refere-se à linhagem *Rosetta*; **B.** FimA2 (tamanho esperado 18KDa); **C.** UspA1-1 (tamanho esperado 54KDa). *Continua.*

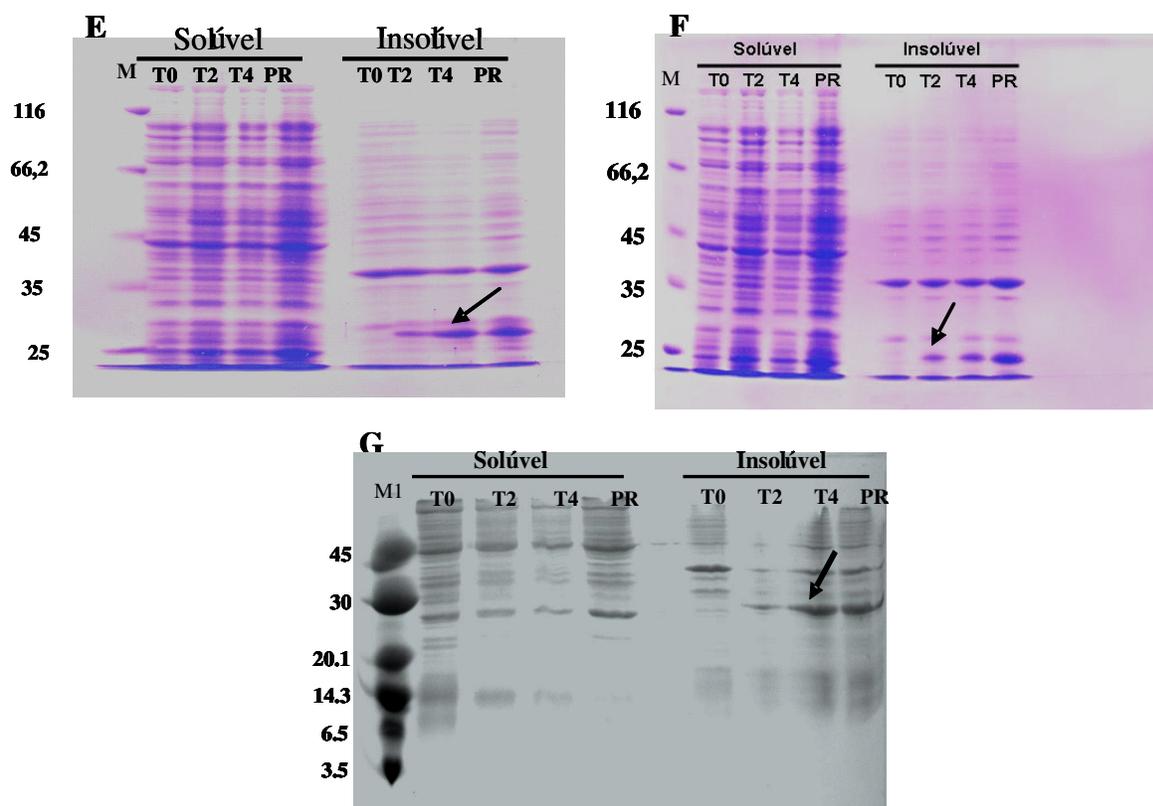


Figura 7 (continuação): Teste de expressão para as proteína avaliadas. **D.** UspA1-2 (tamanho esperado 69KDa) e **E.** PilC1 (tamanho esperado 26KDa); **F.** PilC2 (tamanho esperado 25KDa); **G.** PilC3 (tamanho esperado 27KDa). As setas indicam as bandas de interesse. O tamanho das bandas e dos marcadores é indicado em quilo Daltons (KDa).

As proteínas PilC1, PilC2 e PilC3, que se apresentaram somente na fração insolúvel do extrato, foram submetidas a novos testes de expressão utilizando as temperaturas de 30⁰C e 25⁰C durante a indução. Esse mesmo procedimento também foi feito para a proteína UspA1. Isso foi feito na tentativa de fazer com que as proteínas fossem expressas mais vagarosamente e não fossem armazenadas em corpos de inclusão. No caso da expressão de PilC1 a 30⁰C, a diminuição da temperatura não alterou a fase em que a proteína foi expressa (**Figura 8A**). Já a expressão a 25⁰C resultou na expressão da proteína PilC1 na fase solúvel do extrato, bem como aumentou a quantidade da proteína UspA1 expressa na fração solúvel (**Figura 8B**). A diminuição da temperatura não apresentou o resultado desejado para as proteínas PilC2 e PilC3, já que continuaram na fração insolúvel do extrato (**Figura 8C**). Os resultados estão demonstrados na figura 8.

Resultados

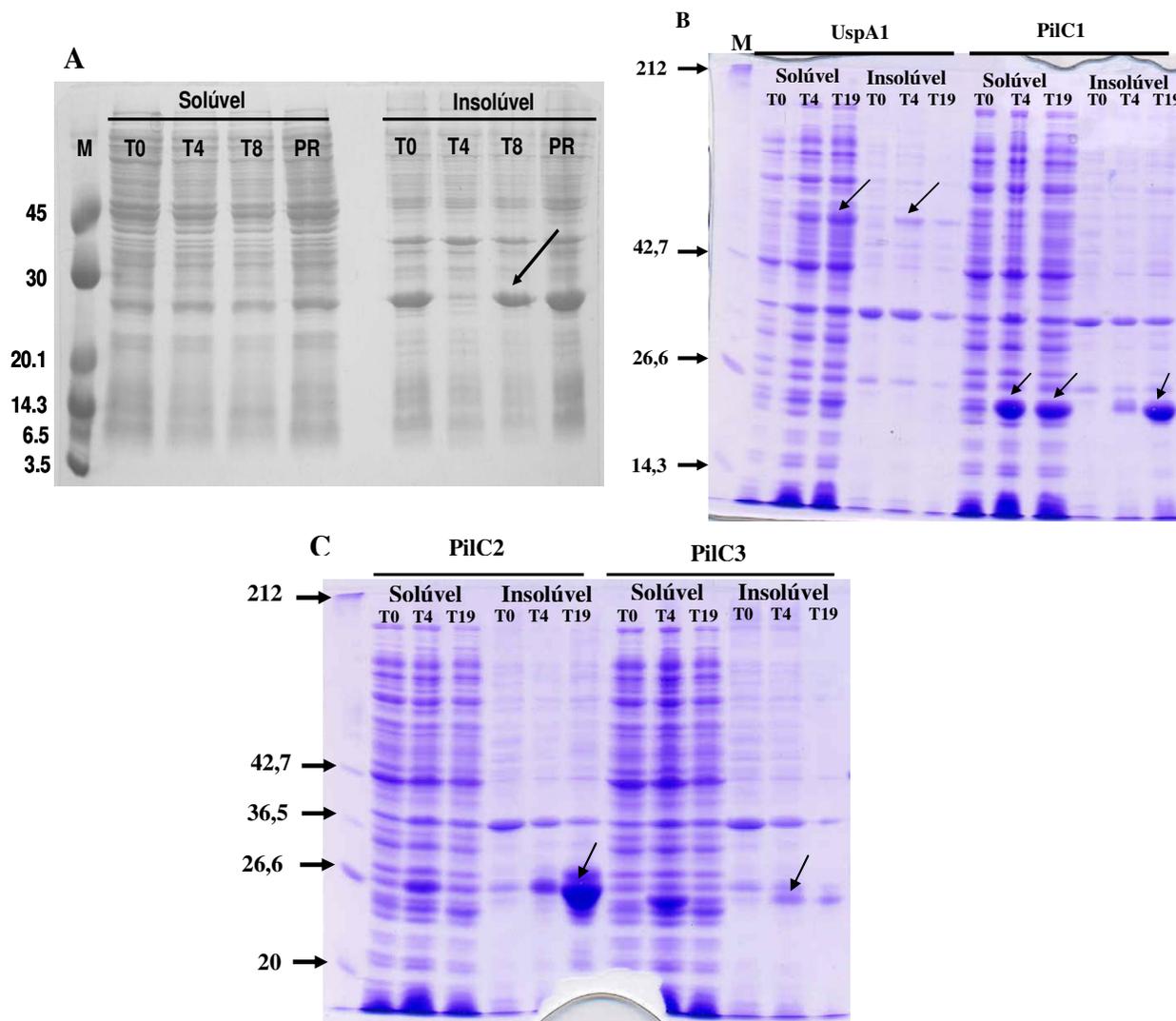


Figura 8: Tentativa de solubilização das proteínas PilC1, PilC2, PilC3 e UspA1. **A.** Teste de expressão de PilC1 a 30°C. M – Marcador Molecular Rainbow, T0 (antes da indução), T2 e T4 (duas e quatro horas de indução a 30°C), PR (pellet restante). **B.** Teste de expressão de UspA1 e PilC1 a 25°C. A figura representa as proteínas dos extratos solúveis e insolúveis. Marcador Molecular New England, T0 (antes da indução), T4 e T19 (quatro e dezenove horas de indução a 25°C). **C.** Teste de expressão de PilC2 e PilC3 a 25°C. A figura representa as proteínas dos extratos solúveis e insolúveis. Marcador Molecular New England, T0 (antes da indução), T4 e T19 (quatro e dezenove horas de indução a 25°C). As setas indicam as proteínas de interesse.

5.5 Purificação das proteínas

A fim de obter proteínas puras para serem utilizadas como antígenos para obtenção de anticorpos policlonais, as frações solúveis dos extratos Hsf, FimA, UspA1 e PilC1 foram submetidas a purificação por cromatografia de afinidade. Foi possível obter as proteínas Hsf, FimA e UspA1 totalmente puras após a última passagem da solução contendo 200mM de

Resultados

imidazol. A concentração obtida das proteínas Hsf e FimA puras foi bastante satisfatória, como demonstram as figuras 9A e 9B, contudo, a proteína UspA1 pura apresentou uma concentração muito baixa (**Figura 9C**).

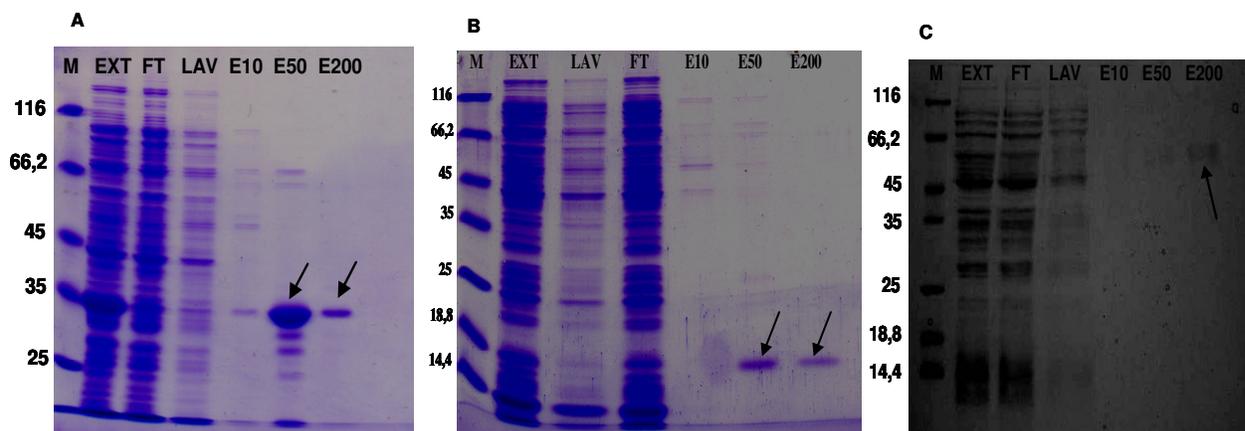


Figura 9: Resultado da purificação das proteínas Hsf e FimA. As letras M - Molecular Weight Marquer - Fermentas, EXT - extrato solúvel, FT - flow through, LAV - lavagem com tampão Tris 50mM e NaCl 1M; E10, E50 e E200- lavagens com tampões contendo 10, 50 e 200mM de Imidazol, respectivamente. As setas indicam o tamanho esperado das bandas. A. Proteína Hsf. B. Proteína FimA. C. Proteína UspA1-1.

Não foi possível purificar PilC1. Após passagem do extrato solúvel pela coluna, a proteína foi totalmente eluída juntamente com todas as outras contaminantes. Isso ocorreu porque a proteína não se ligou à coluna de níquel, possivelmente devido a um dobramento que teria feito com que as caudas de histidina não ficassem acessíveis. A tentativa de obtenção de mais UspA1 no extrato solúvel também não apresentou o resultado esperado, uma vez que após purificada, a concentração da proteína foi apenas um pouco maior do que aquela expressa a 37⁰C. Os resultados estão demonstrados na figura 10A. UspA1 foi conseguida em maiores concentrações após indução de 400mL de cultura a 25⁰C (**Figura 10B**).

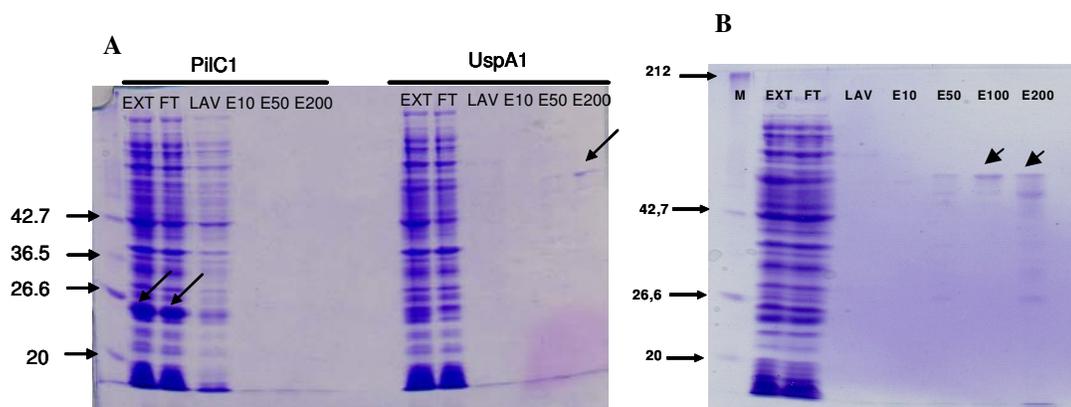


Figura 10: Gel de SDS demonstrando os resultados da purificação de PilC1 e UspA1 expressas a 25⁰C. **M.** Marcador New England, EXT - extrato solúvel, FT - flow through, LAV - lavagem com tampão Tris 50mM e NaCl 1M; E10, E50 e E200- lavagens com tampões contendo 10, 50 e 200mM de Imidazol, respectivamente. As setas indicam as proteínas desejadas. **A.** Purificação de PilC e UspA1 a 25⁰C. **B.** Purificação de UspA1 expressa em larga escala e induzida a 25⁰C.

5.6 Sequenciamento das proteínas de interesse

Visando confirmar a identidade das proteínas purificadas que seriam utilizadas para produção de anticorpos policlonais, foi realizado o sequenciamento dos peptídeos digeridos com tripsina. Primeiramente, foi feito um gel SDS 12% onde as proteínas de interesse foram recortadas para posterior digestão e sequenciamento. As bandas indicadas por setas na figura 11 foram recortadas para sequenciamento.

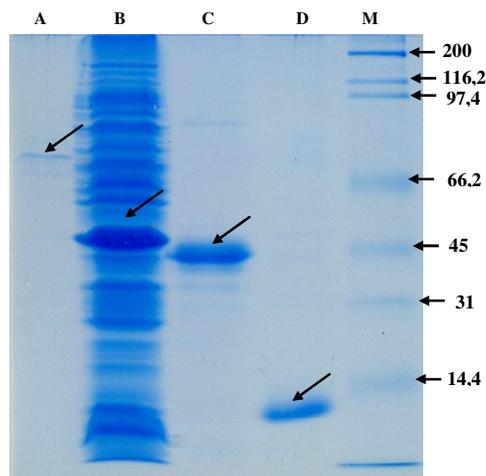


Figura 11: Gel SDS 12% evidenciando as bandas que foram recortadas para sequenciamento. A. UspA1; B. PilC; C. Hsf; D. FimA; M. Marcador Molecular Broad-Range da BioRad.

Resultados

Os resultados gerados pelo seqüenciamento através do ESI – QTOF confirmaram a identidade das proteínas estudadas nesse trabalho. A Tabela 2 expõe o resultado do seqüenciamento de FimA, que apresentou como resultado a identidade com a proteína fimbrial de *X. fastidiosa* (xf2539), a busca encontrou 35 peptídeos que cobriram 24% da proteína e estão marcados em vermelho na seqüência abaixo.

Tabela 2: Resultados gerados pelo seqüenciamento de FimA.

Protein hits	Acession	Score	Mr (Da)	pI	Coverage (%)	Peptides matched
Fimbrial protein XF2539 [imported] - <i>Xylella fastidiosa</i> (strain 9a5c)	C82544	369	15586	8,75	24	35

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Score	Peptide
		1119.5520			
560.7950	1119.5754		20.9	90	K.STSNASDIGLR.T
560.7950	1119.5754	1119.5520	20.9	94	K.STSNASDIGLR.T
560.7964	1119.5782	1119.5520	23.4	30	K.STSNASDIGLR.T
560.7964	1119.5782	1119.5520	23.4	22	K.STSNASDIGLR.T
560.7995	1119.5844	1119.5520	29.0	15	K.STSNASDIGLR.T
560.7997	1119.5848	1119.5520	29.3	66	K.STSNASDIGLR.T
560.8011	1119.5876	1119.5520	31.8	11	K.STSNASDIGLR.T
560.8031	1119.5916	1119.5520	35.4	34	K.STSNASDIGLR.T
560.8035	1119.5924	1119.5520	36.1	38	K.STSNASDIGLR.T
560.8041	1119.5936	1119.5520	37.2	11	K.STSNASDIGLR.T
560.8042	1119.5938	1119.5520	37.4	37	K.STSNASDIGLR.T
560.8062	1119.5978	1119.5520	41.0	24	K.STSNASDIGLR.T
560.8063	1119.5980	1119.5520	41.1	11	K.STSNASDIGLR.T
560.8065	1119.5984	1119.5520	41.5	23	K.STSNASDIGLR.T
560.8066	1119.5986	1119.5520	41.7	32	K.STSNASDIGLR.T
560.8072	1119.5998	1119.5520	42.7	25	K.STSNASDIGLR.T
560.8082	1119.6018	1119.5520	44.5	17	K.STSNASDIGLR.T
560.8093	1119.6040	1119.5520	46.5	100	K.STSNASDIGLR.T
560.8116	1119.6086	1119.5520	50.6	17	K.STSNASDIGLR.T
560.8189	1119.6232	1119.5520	63.6	19	K.STSNASDIGLR.T
560.8209	1119.6272	1119.5520	67.2	21	K.STSNASDIGLR.T
565.8212	1129.6278	1129.5979	26.5	93	K.VQAESLIADGK.S
565.8214	1129.6282	1129.5979	26.9	7	K.VQAESLIADGK.S
565.8218	1129.6290	1129.5979	27.6	82	K.VQAESLIADGK.S
565.8242	1129.6338	1129.5979	31.8	23	K.VQAESLIADGK.S
565.8266	1129.6386	1129.5979	36.1	70	K.VQAESLIADGK.S
565.8286	1129.6426	1129.5979	39.6	46	K.VQAESLIADGK.S

Resultados

565.8326	1129.6506	1129.5979	46.7	12	K.VQAESLIADGK.S
565.8328	1129.6510	1129.5979	47.1	28	K.VQAESLIADGK.S
565.8367	1129.6588	1129.5979	54.0	33	K.VQAESLIADGK.S
565.8488	1129.6830	1129.5979	75.4	20	K.VQAESLIADGK.S
693.3989	1384.7832	1384.7562	19.5	103	R.SQLTAALADITPGK.V
693.4028	1384.7910	1384.7562	25.2	18	R.SQLTAALADITPGK.V
693.4531	1384.8916	1384.7562	97.8	92	R.SQLTAALADITPGK.V
					R.SQLTAALADITPGKVQAESLIADGK.
833.1415	2496.4027	2496.3435	23.7	73	S

1 MKKQQGFNLI ELMIVIAIIA VLAAIALPMY QNYVAR**SQLT AALADITPGK**
51 **VQAESLIADG KSTSNASDIG** LRTDTTRCGI TVKVDAAGTA NITCKVKGNS
101 QVNDKTIAWD RTSDNSAGTN GVNNGGVWTC SSTVTSDALR PSGCIASK

O seqüenciamento de PilC foi realizado a partir de uma amostra da proteína oriunda da fração insolúvel do extrato protéico após indução da expressão (Figura 11). O resultado do seqüenciamento gerou um elevado número de peptídeos contaminantes da amostra, o que era esperado, já que mesmo cuidando para recortar do gel apenas a banda correspondente a proteína de interesse, é inevitável a contaminação por outras proteínas de *E. coli*. Esse número grande de peptídeos impossibilitou as análises através do programa MASCOT disponível no laboratório Max Fefer. Contudo, a proteína de interesse nesse caso é seguramente a PilC desejada. Vários testes prévios como digestão do vetor contendo o inserto referente ao gene, seqüenciamento do fragmento, obtenção de banda de tamanho predito após indução da expressão e presença de banda única do tamanho predito (www.aeg.lbi.unicamp.br/xf) após western blot, discutido posteriormente nesse trabalho, confirmaram se tratar de PilC.

O resultado do seqüenciamento de Hsf apresentou como resultado a identidade com a proteína de superfície de *X. fastidiosa* (xf1529), a Tabela 4 demonstra que a busca encontrou 13 peptídeos que cobriram 5% da proteína, e estão marcados em vermelho na seqüência abaixo.

Tabela 4: Resultados gerados pelo seqüenciamento de Hsf.

Protein hits	Accession	Score	Mr (Da)	pI	Coverage (%)	Peptides matched
Surface protein XF1529 [imported] - <i>Xylella fastidiosa</i> (strain 9a5c)	D82671	187	204030	4,86	5	13

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Score	Peptide
531.7744	1061.5342	1061.5353	-0,99	93	K.NTDGNLTISK.S
531.7869	1061.5592	1061.5353	22.6	32	K.NTDGNLTISK.S
531.7879	1061.5612	1061.5353	24.4	12	K.NTDGNLTISK.S
531.7928	1061.5710	1061.5353	33.7	24	K.NTDGNLTISK.S
559.8181	1117.6216	1117.5880	30.1	21	K.FGNVVINNGGK.I
559.8571	1117.6996	1117.5880	99.9	21	K.FGNVVINNGGK.I
561.3330	1120.6514	1120.6240	24.5	8	R.IHLQLADSPK.F
691.3625	1380.7104	1380.6521	42.2	18	K.SGDSNDVVFNLK.D
847.4072	1692.7998	1692.7989	0.56	30	K.VDGMTSGTTVVNNDGVK.V
847.4113	1692.8080	1692.7989	5.40	27	K.VDGMTSGTTVVNNDGVK.V
855.3849	1708.7552	1708.7938	22.57	58	K.VDGMTSGTTVVNNDGVK.V
1092.5673	4366.2401	4366.2041	8.24	8	K.VISHVAAGVVSETSTDAVNGS QLNAVQVQASQPVTFTGNEGAVK.R
1092.6259	4366.4745	4366.2041	61.9	13	K.VISHVAAGVVSETSTDAVNGSQLN AVQVQASQPVTFTGNEGAVK.R

1 MVFIAPYSSK PHGKEPLHTI LFVALSLSLP YTEKANAQVY INDGMDGGCQ
51 RIVDNGSASG VERTVATQCS EDPWTVTGYA RFFGPGSGTAA EQQGASRNLT
101 LGGSLYVNSG QVGVNDVLNK TYSIRMGSVI TMNTVAGTNA IAIGSAQSSA
151 ADALKASLAT KASGARAI AI GAKASADGVD TVALGSGATA GTGASSIAIG
201 LNASAVNGAV AVGGGALVTV PDGAVALGLN SVASTGKGLS GYDPKTKTTS
251 TDASAAWKST LAAVSIGDVS STNLKTRQLS GLAAGTSNTD AVNVAQLKVV
301 DEIASRGWNL TASGANSNV APGSSVDLKN TDKNLTITKA IGSNDVQFNL
351 NKDVKVTTLA VGDALLNTDG IALGTDVLSL TTGLAITDGP AVTASGIDAG
401 SKVISHVAAG AVSETSTDAV NGSQNAVQV QASQPVTFTG NEGAVKRSLG
451 QSVVISGESS TAGTYSGGNL KSVVDEAAGR **IHLQLADSPK FGNVVINNGG**
501 **KISGV**TAGTE ETDAVNFSQL KSISTAVDQG WTLTASGSNG SKVASGGTVD
551 LK**NTDGNLTI** **SKSGDSNDVV** **FNLKDFKVD** **GMTSGTTVVN** **NDGVK**VGSDV
601 ALGTTGLTIT DGPAVTASGI DAGSK**VISHV** **AAGVVSETST** **DAVNGSQLNA**
651 **VQVQASQPVT** **FTGNEGAVKR** SLGQSVVISG ESSTAGMYSG GNLKSVVDEA

O seqüenciamento de UspA1 apresentou como resultado identidade com uma proteína de membrana externa de *X. fastidiosa* (xf1516), a Tabela 5 demonstra que a busca encontrou 6 peptídeos que cobriram 10% da proteína, e estão marcados em vermelho na seqüência abaixo.

Tabela 5: Resultados gerados pelo seqüenciamento de UspA1

Protein hits	Accession	Score	Mr (Da)	pI	Coverage (%)	Peptides matched
Surface-exposed outer membrane protein XF1516 [imported] - <i>Xylella fastidiosa</i>	C82672	405	98281	7,17	10	6

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Score	Peptide
759.3655	1516.7164	1516.7845	-44.89	82	R.ATANAIGSSVLGVDSR.A
769.3839	1536.7532	1536.7532	0.02	39	R.TYEANVLSIGSGNGR.G
799.9739	1597.9332	1597.8060	79.6	52	R.IVNVGDGIGNNDAVNK.S
880.9922	1759.9698	1759.8952	42.4	84	K.SQLDGVGTASVNDVAASVK.T
894.9738	1787.9330	1787.9265	3.65	97	K.SQLDGVGTASVNDVVASVK.N
994.5337	1987.0528	1987.0586	-2.89	56	K.VVSGVAVSDSSVAANAQVLSK.G

1 MKENQIYRKF WNLSLGSWSV ASHMTNDGGC SDVVLRHSGV RNRSLVLAIG
 51 LALTSVTHAQ SVKSPAMVTA SKVMVAHVDS QVNRTADRIP TGDGSELMTH
 101 MALDWKFFPF GNNSIAIGYF SKAFAPNAIA LGYNSSVTQS ANNGVALGSN
 151 STVSGVNSVA LGAGSMASEL NVISVGGGDG VTGPAVRR**IV NVGDGIGNND**
 201 **AVNKSQLDGV TASVNDVAAS VK**TIALTNQV TGSSVASASG KESTAIGSGA
 251 QAVADNTVAF GGRAIANAVG ASALGFDSHA KGINSTTVGT QSVSLGQGGV
 301 SLGYNSFVGE GSFNGLALGS NSLVLLQGV D SVALGSGSMA SEPNNVSVGS
 351 GDGLRGPVAV RIVNVGDGIG NNDAVNK**SQL DGV**TASVNDV **VASVK**NIAGA
 401 IQITGSGVAS VSGQDSTAAG ASAQAAGDSS IALGARSAN AIGSSALGVD
 451 GHALGANSTA LGGQSTAISE GGTSLGYNSF VGQSATNGIA LGSNAIVSGV
 501 NSVALGAGSV ASELNVISVG GGDGVTGPAV RRIVNVGDGI GNNDAVNKSQ
 551 LDGVTASVND VAASVKKIVG TIQITGSGVA SAIGKDSTAT GASAQAVGDS
 601 SVALGTR**ATA NAIGSSVLGV DSR**ARGINST ALGRQSNAIG DGSVSLGFNS
 651 FVRQSGEHGV ALGTDAGVSG KDSIALGYGS **R**TYEANVLS**I GSGNGR**GGPA
 701 TRRIVNVSSG NLSQLSTDAV NGGQLFQTLS SMASILGGGA AVGAQGVLVA
 751 PVYQIQGSSY GSVGAALKAL DGKVTDIDHR VNVNSNLAAG AASTLSASK
 801 PVSMSSTEAV GVAK**VVSGVA VSDSSVAANA QVLSK**GSGVS ISATGGSSQS
 851 SDEVQTSSVG MDSLGSLLNV RKVTMAAGML ATDGVSKTQL DNSMAAANSY
 901 TDARFSALND SFESLRSDVN GQMRRQDRRI SRQGAMGAAM LNMATSAAGI
 951 HTQNRVAGV GFQNGQAALS LGYQRAISDR STVTIGGAFS SGDSSVGVGA
 1001 GFGW

Os resultados do sequenciamento confirmam que as proteínas purificadas após indução da expressão e utilizadas para produção de anticorpos se tratam daquelas de interesse, assegurando que os resultado subsequentes sejam referentes a ligação dos anticorpos nas proteínas alvo.

5.7 Teste de concentração e especificidade dos anticorpos pelo método de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Para monitorar a expressão de proteínas de adesão ao longo do desenvolvimento do biofilme, fez-se necessário que anticorpos fossem produzidos contra as proteínas alvo para auxiliar nesse processo. Após as induções e coletas dos anticorpos é necessário avaliar a qualidade e quantidade dos mesmos.

Resultados

Para o teste da qualidade dos anticorpos gerados contra as proteínas de interesse foi realizado um teste ELISA empregando como antígenos as proteínas purificadas, que foram utilizadas para produzir o anticorpo. Para a escolha da melhor diluição a ser utilizada para cada anticorpo foram gerados gráficos utilizando valores de diluições entre 1:500 a 1:40.000.

A figura 12 representa o teste do anticorpo contra FimA, onde é demonstrada reação positiva contra o antígeno até uma diluição de 1: 8.000. Na diluição de 1: 500 do antígeno o anticorpo apresentou uma absorbância de 1,4 indicando uma alta titulação desses anticorpos.

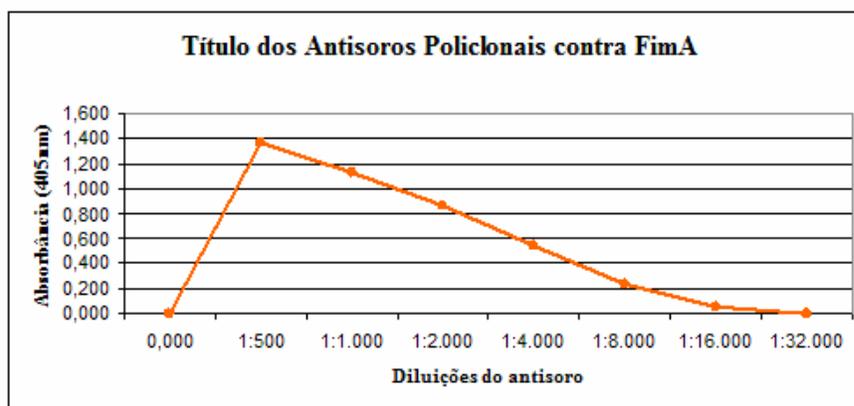


Figura 12: Teste de diluição de anticorpos policlonais contra FimA.

A figura 13 representa o teste do anticorpo contra PilC, onde é demonstrado que houve reação positiva contra o antígeno até uma diluição de 1:40.000. Na menor diluição do antígeno (1:500) a absorbância apresentada pelo anticorpo foi acima de 2,0 o que indica um título alto de anticorpos.

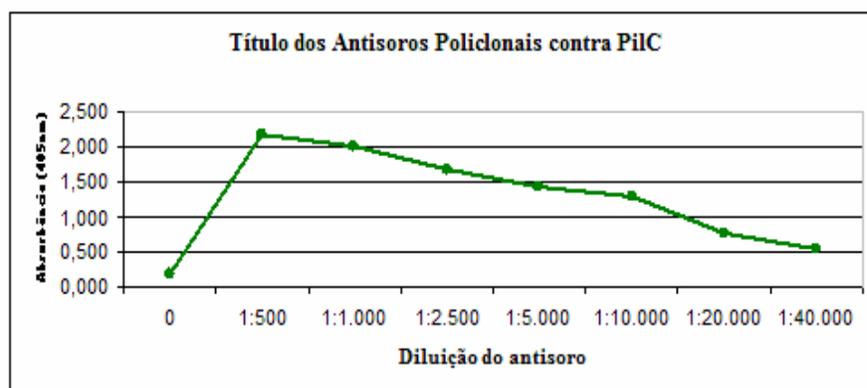


Figura 13: Teste de diluição de anticorpos policlonais contra PilC.

A figura 14 representa o teste do anticorpo contra a proteína Hsf, onde é demonstrada reação positiva contra o antígeno até a diluição de 1:32.000. Na menor diluição testada a absorbância apresentada pelos anticorpos foi acima de 2,5 indicando alta titulação.

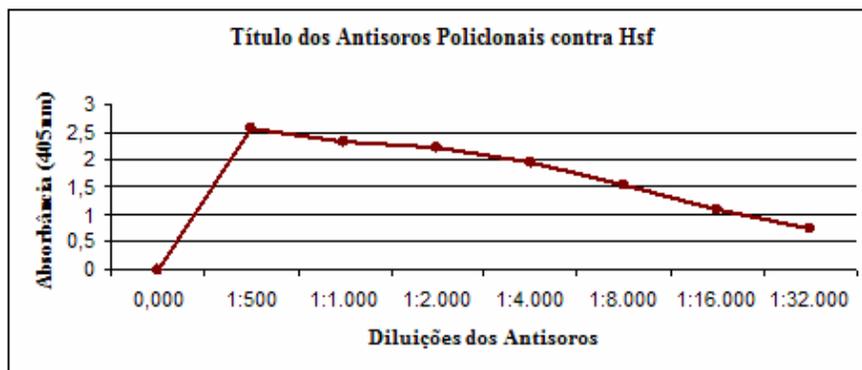


Figura 14: Teste de diluição de anticorpos policlonais contra Hsf.

A figura 15 representa o teste do anticorpo contra UspA1, onde é demonstrado que houve reação positiva contra o antígeno até a diluição de 1:40.000. Assim como para Hsf, a absorbância apresentada pelos anticorpos na diluição 1:500 foi acima de 2,5 indicando alta titulação.

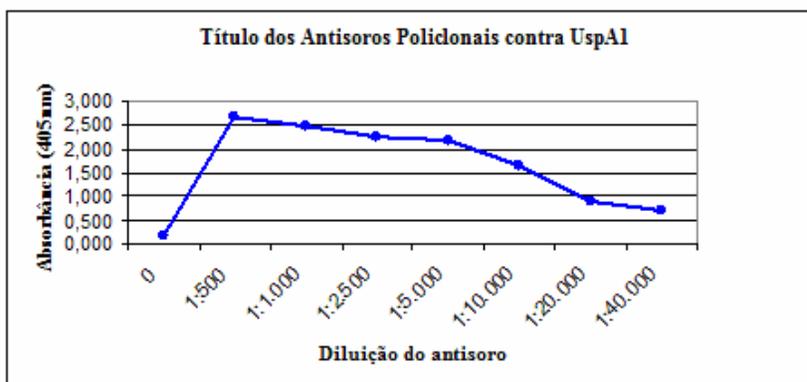


Figura 15: Teste de diluição de anticorpos policlonais contra UspA1.

Os resultados demonstram que todas as proteínas utilizadas como antígeno provocaram uma reação imune bastante satisfatória, comprovada pela qualidade dos anticorpos gerados. Além

de apresentarem excelente título, sua reatividade foi estrita ao antígeno alvo, não reagindo com tampão PBS, utilizado como o controle negativo das análises.

5.8 Expressão das proteínas fimbriais e afimbriais extraídas nas diferentes fases do biofilme avaliadas por Western Blot

Com o objetivo de determinar em quais etapas do desenvolvimento do biofilme proteínas fimbriais e afimbriais são expressas, foi realizado Western blot com proteínas totais extraídas de cada fase. A marcação foi feita com os anticorpos policlonais desenvolvidos contra cada uma delas.

Para a realização do Western blot, uma mesma concentração de proteínas foi aplicada por gel SDS. Essas concentrações foram ajustadas utilizando o método Lowry modificado (1951). Para tal foi realizada curva padrão com BSA, cujo R^2 foi de 0,96 (Anexo 1).

Foram testados dois métodos de extração das proteínas das fases do biofilme (M1 e M2), e foi possível avaliar que cada um deles foi eficaz na detecção de tipos diferentes de proteínas.

5.8.1 Expressão temporal das proteínas fimbriais

Primeiramente, a análise *in silico* da proteína FimA estudada nesse trabalho revelou que esta é a subunidade que compõe a haste da fímbria tipo IV. A haste é um polímero composto por subunidades que variam de tamanho entre 15,5 a 18KDa. Pili tipo IV são envolvidos na adesão de bactérias ao hospedeiro, mobilidade celular e são considerados fatores de virulência. O tamanho predito para FimA em www.aeg.lbi.unicamp.br/xf é 15,4KDa, correspondente com o tamanho observado após Western blot, sugerindo que a banda é referente a proteína alvo.

Através do Western blot realizado com proteínas extraídas pelo M1 foi possível detectar a expressão da proteína FimA mais significativamente nas fases iniciais do biofilme. A banda referente à proteína aparece na altura de, aproximadamente, 15KDa, e está de acordo com o predito em www.aeg.lbi.unicamp/xf. Além disso, foi possível comprovar que anticorpos contra FimA não reconhecem a proteína fimbrial PilC. (**Figura 16**). As análises de Western blot detectaram FimA durante todas as fases de desenvolvimento do biofilme, contudo, sua expressão foi mais acentuada nas fases iniciais, principalmente aos cinco dias (**Figura 16**).

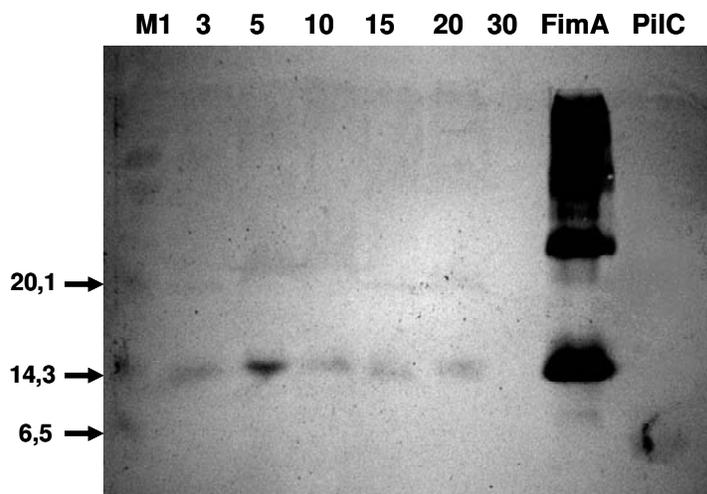


Figura 16: Western blot contendo proteínas totais extraídas das fases de crescimento do biofilme de *X. fastidiosa*. **M1.** Marcador Rainbow™ (Amersham Pharmacia Biotech). Canaletas 3 a 30 são referentes ao tempo, em dias, de crescimento do biofilme. **FimA.** Extrato contendo a proteína FimA completamente purificada. **PilC.** Extrato insolúvel contendo PilC superexpressa.

A proteína PilC estudada nesse trabalho também participa da formação do pili tipo IV, contudo é uma proteína responsável pela montagem dessa estrutura.

Assim como para FimA, o M1 proporcionou a detecção clara da proteína PilC que, após análises de western blot, mostrou-se expressa em todas as fases do biofilme, contudo, parece demonstrar um aumento aos 5 e 10 dias de crescimento, representando a fase inicial e início da maturação (**Figura 17**). A proteína apresentou uma banda única na altura de 55KDa, condizente com o predito para PilC em (www.aeg.lbi.unicamp/xf). Foi possível verificar ainda que os anticorpos desenvolvidos contra PilC não apresentaram reação cruzada contra FimA, outra proteína fimbrial estudada no trabalho.

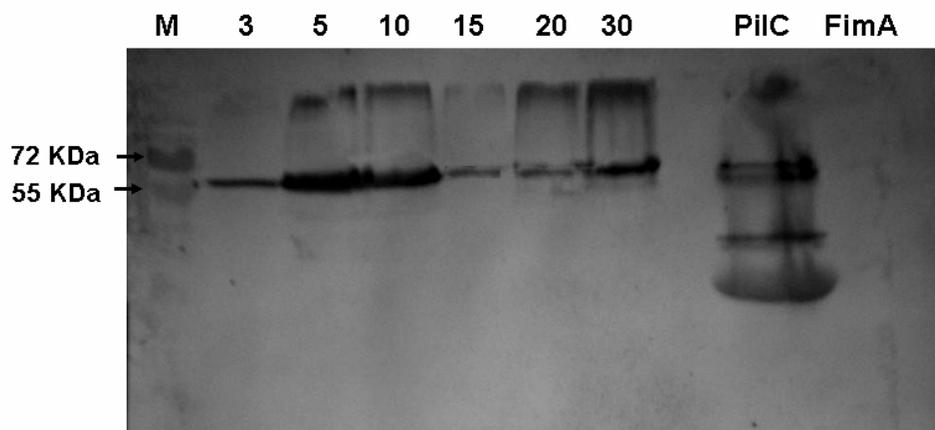


Figura 17: Western blot contendo proteínas totais extraídas das fases de crescimento do biofilme de *Xf*. **M.** Marcador PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas). Canaletas 3 a 30 são referentes ao tempo, em dias, de crescimento do biofilme. **PilC.** Extrato insolúvel contendo PilC superexpressa. **FimA.** Extrato contendo a proteína FimA completamente purificada.

5.8.2 Expressão temporal das proteínas afimbriais

A eficácia do M1 para a detecção de proteínas fimbriais não teve o mesmo sucesso para as adesinas afimbriais Hsf e UspA1. Western blots realizados com proteínas extraídas por esse método não apresentaram resultados satisfatórios, em função disso, outro protocolo de extração, o M2, foi testado.

Uma das adesinas afimbriais estudadas nesse trabalho foi Hsf. Seu tamanho predito é 204KDa e apresenta-se como proteína de superfície de *X. fastidiosa*, que tem função de adesão (www.aeg.lbi.unicamp.br).

A proteína Hsf pôde ser detectada através do M2, evidenciando-se fortemente expressa nas fases mais tardias de crescimento do biofilme, como demonstra a figura 18. Pôde-se notar a presença de uma banda de aproximadamente 200KDa (indicado por seta) que começa a ser fracamente detectada aos 5 dias, fase de início do biofilme, e tem sua intensidade fortemente aumentada ao décimo dia, início da maturação do biofilme. Bandas menores, oriundas de uma possível quebra da proteína ou devido à inespecificidade do anticorpo, também foram detectadas (**Figura 18**). Os resultados demonstraram que a expressão da proteína Hsf só foi detectada nas fases em que o biofilme apresenta alta densidade celular. Anticorpos contra Hsf não reagiram com a proteína Uspa1 (dados não mostrados).

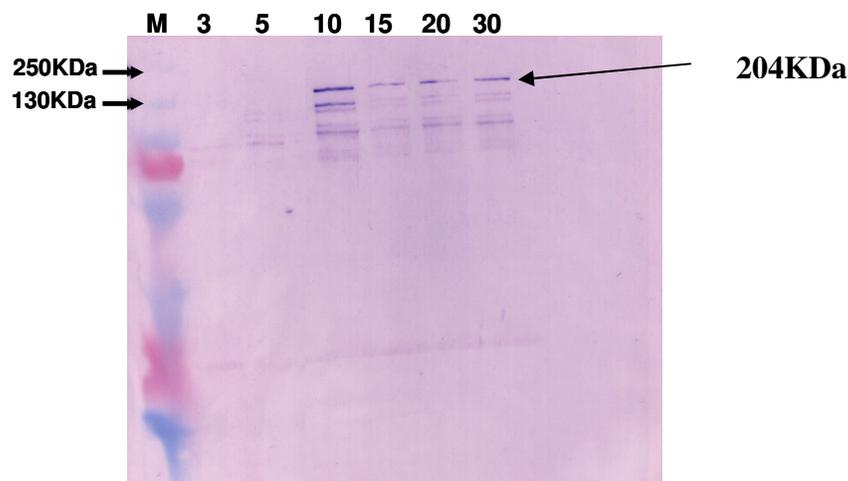


Figura 18: Western blot contendo proteínas totais extraídas das fases de crescimento do biofilme de *X. fastidiosa*. M. Marcador PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas). Canaletas 3 a 30 são referentes ao tempo, em dias, de crescimento do biofilme.

O M2 também foi eficaz para a extração de UspA1. Esta é uma proteína que apresenta função de adesão e tamanho de 98,3KDa, conforme predito em www.aeg.lbi.unicamp.br. Análises de alinhamento e buscas por domínios revelaram que se trata de uma proteína similar a XadA, da estirpe Temecula de *X. fastidiosa*, e UspA1, da bactéria *M. catarrhalis*.

O resultado de Western blot para a detecção da expressão de UspA1 possibilitou a clara observação de uma banda de tamanho aproximado de 70KDa e de intensidade bastante alta desde as fases iniciais do biofilme (**Figura 19**). É possível verificar ainda que UspA1 apresenta-se expressa desde o início do biofilme, mas tem uma possível acentuação da expressão nas fases maduras, conforme o aumento da densidade celular do biofilme. Esse padrão de expressão sugere que se trata de uma proteína que tem tanto a função de aderir inicialmente as células ao substrato como a de manter essas células unidas a medida em que o biofilme aumenta. Anticorpos desenvolvidos contra UspA1 não reagiram com a proteína Hsf (dados não mostrados).

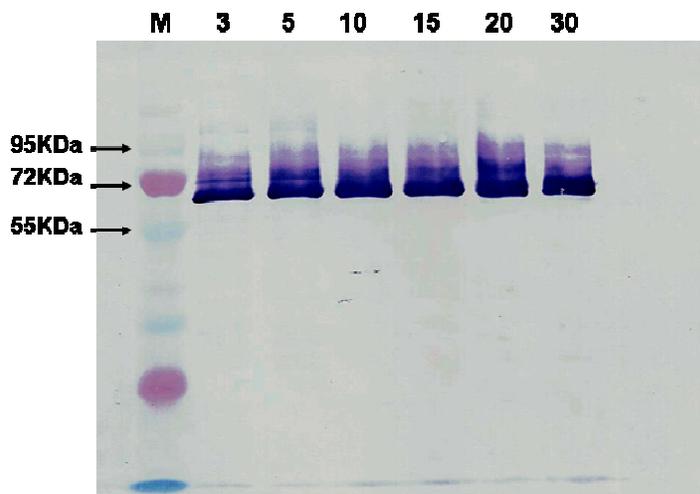


Figura 19: Western blot contendo proteínas totais extraídas das fases de crescimento do biofilme de *X. fastidiosa*. M. Marcador PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas). Canaletas 3 a 30 são referentes ao tempo, em dias, de crescimento do biofilme.

No caso de UspA1 detectada por Western blot, o tamanho observado apresentou-se menor do que o predito em www.aeg.lbi.unicamp/xf, já que o tamanho predito era de 98KDa e o observado foi de 70KDa. Na tentativa de entender o porquê da discrepância entre o predito e o observado em UspA1, foram realizadas buscas *in silico* de possíveis regiões de peptídeo sinal, que ao serem clivadas, pudessem diminuir o tamanho das proteínas. No caso de UspA1, os 150 primeiros aminoácidos da sequência foram submetidos a uma análise pelo programa SignalP server 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) e foi encontrado um sítio de clivagem entre os peptídeos 23 e 24 (ASH-MT) que poderia ser alvo de serina proteases (**Figura 20**). Ainda de acordo com a figura 26, resíduos de aminoácidos próximos a posição 60 poderiam apresentar algum putativo sítio de clivagem. Em *X. fastidiosa* foi encontrado a Protease IV (*xf2685*), uma serina peptidase pertencente a família MEROPS peptidase S49 que atua em sítios cujas serinas ocorram em domínios transmembrana, que poderia clivar o peptídeo sinal de UspA1 (<http://hydra.icgeb.trieste.it/sbase/>). Foi realizada então uma busca por predição de tamanho de UspA1 pelo programa ProtParam (<http://ca.expasy.org/cgi-bin/protparam>), utilizando a sequência de peptídeos após os 60 aminoácidos iniciais, região em que putativos sítios de clivagem poderiam ser encontrados. O resultado apresentou uma proteína de 95KDa, o que não corresponde ao que foi encontrado nas análises de Western blot.

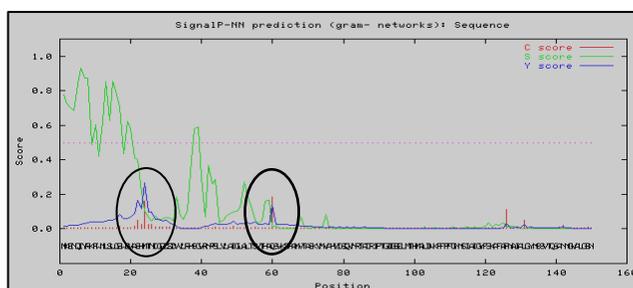


Figura 20: Resultado da análise dos 150 primeiros aminoácidos da sequência de UspA1 para a predição de peptídeo sinal.

Entretanto, mesmo com o tamanho muito menor apresentado no Western blot para UspA1 a banda refere-se seguramente a proteína alvo de *X. fastidiosa*, uma vez que o seqüenciamento da proteína utilizada como antígeno para a obtenção de anticorpos policlonais demonstrou identidade com a proteína UspA1.

5.8.3 Verificação da expressão de proteínas fimbriais e afimbrias na condição planctônica de crescimento

A fim de verificar a expressão das proteínas de adesão de *X. fastidiosa* na condição planctônica, foi realizado Western blot utilizando proteínas extraídas dessa condição após 10 dias de crescimento, correspondente a fase de maior densidade celular.

As concentrações das proteínas carregadas no gel de SDS (padronizadas pelo método Lowry) foram as mesmas para os experimentos de biofilmes e, nessas concentrações, nenhuma das adesinas estudadas foi detectada (**Figuras 21A, 21B, 21C e 21D**). Isso sugere que essas proteínas são expressas somente na condição de biofilme de *X. fastidiosa*.

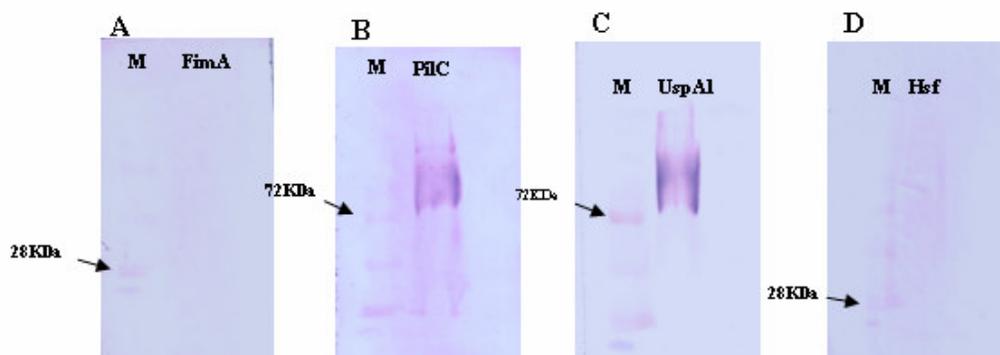


Figura 21: Western blot realizado utilizando proteínas extraídas da fase planctônica de crescimento. **M.** Marcador molecular “Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus” (Fermentas) **A.** Anticorpos contra FimA. **B.** Anticorpos contra PilC. **C.** Anticorpos contra UspA1 e **D.** Anticorpos contra Hsf.

5.9 Imunofluorescência das diferentes fases do biofilme utilizando os anticorpos contra as proteínas alvo

Para avaliar a expressão das proteínas *in situ* durante as fases de formação do biofilme, células de *X. fastidiosa* foram inoculadas em lamínulas de vidro como superfície de adesão para a formação do biofilme. As lamínulas foram analisadas aos 3, 5, 10, 15, 20 e 30 dias de crescimento, referentes a todas as fases de desenvolvimento da bactéria. Foi utilizado o método de imunomrcação segundo Roper *et al.* (2007). Foi possível visualizar todas as fases da formação do biofilme. Os anticorpos contra as proteínas alvo reconheceram os antígenos, permitindo o acompanhamento de suas expressões nos biofilmes marcados. Nas imagens compostas dos controles negativos não foi observado, em nenhum dos casos, a presença de fluorescência na cor vermelha referente ao reconhecimento do anticorpo secundário ao primário.

5.9.1 Caracterização das fases do biofilme por fluorescência

De maneira geral, pôde-se visualizar que aos três dias de crescimento, tanto pequenos agregados celulares como células individuais aderidas a lâmina de vidro estão presentes (**Figura 22A**). Aos cinco dias, é possível visualizar que células individuais são menos numerosas e que agregados um pouco maiores são mais freqüentes, com um início discreto de formação de multicamadas celulares (**Figura 22B**). Biofilmes com dez dias de crescimento já apresentam multicamadas celulares e são maiores e mais densos. Já é possível visualizar a presença de canais (indicados por setas brancas nas figuras) por onde água é transportada juntamente com nutrientes e moléculas diversas. Não há mais células individuais (**Figura 22C**). Uma estruturação maior ocorre aos 15 dias de crescimento, quando é possível visualizar biofilmes muito bem estabelecidos, grandes e com multicamadas bastante agregadas (**Figura 22D**). Aos vinte dias é a fase de maior densidade celular quando todas as características de um biofilme maduro são observadas. É possível encontrar biofilmes que apresentam células em multicamadas muito densas. A colônia é bem estabelecida e sua arquitetura conta com reentrâncias e porções bastante volumosas (**Figura 22E**). A fase de dispersão celular é bem característica em um biofilme de 30 dias, quando é possível notar que buracos são formados no interior da colônia, com ausência de células. As multicamadas celulares já não se encontram tão agregadas, existe um padrão de frouxidão onde é possível determinar células individuais entre as vizinhas. Nessa fase, agregados

celulares que parecem ter se desprendido dos biofilmes maiores são comumente encontrados (Figura 22F).

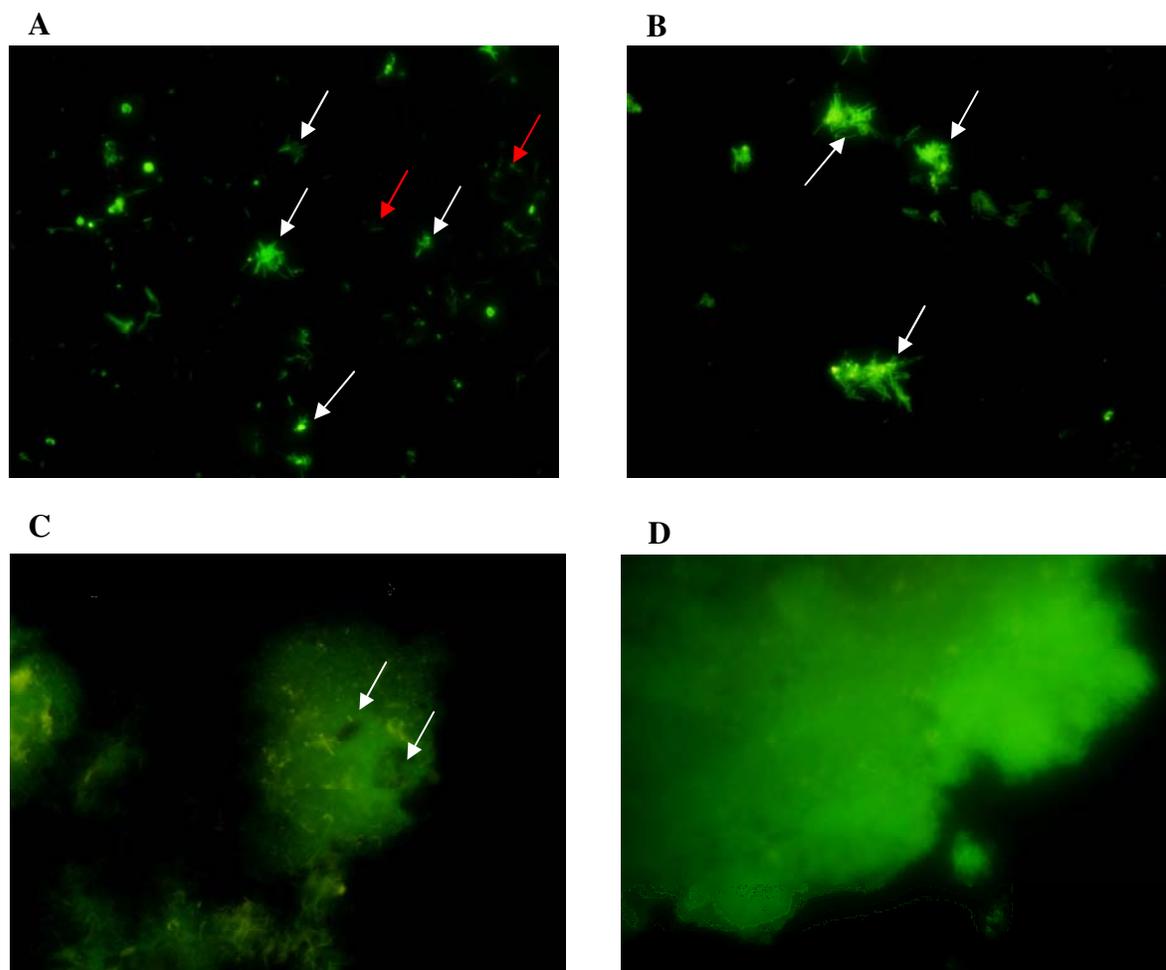


Figura 22: Fases do desenvolvimento do biofilme de *X. fastidiosa* vistas por fluorescência. **A.** Crescimento durante 3 dias; setas vermelhas indicam células individuais aderidas e setas brancas indicam pequenos agregados aderidos. **B.** Crescimento durante 5 dias; setas brancas indicam agregados maiores aderidos. **C.** Crescimento durante 10 dias; setas brancas indicam canais de água. **D.** Crescimento durante 15 dias. Aumento 100X. *Continua.*

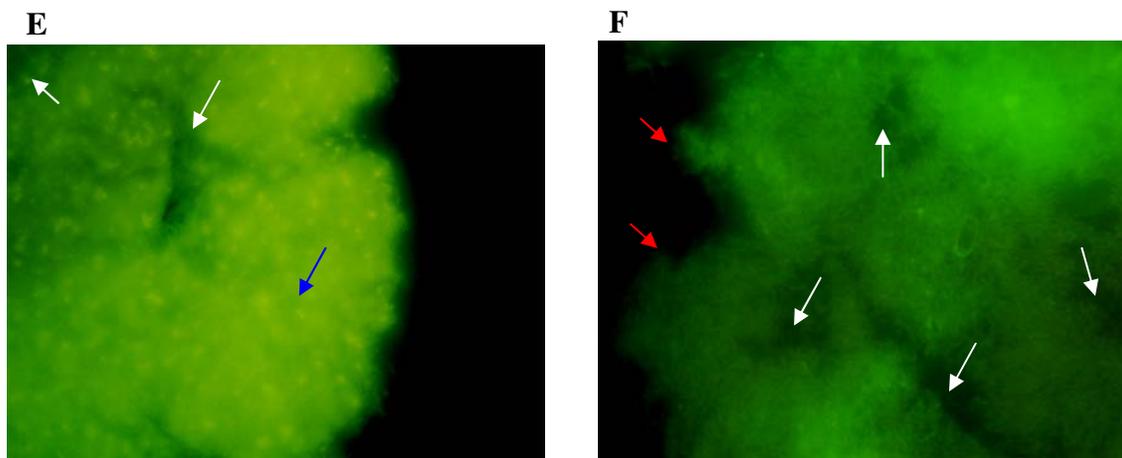


Figura 22 (continuação): Fases do biofilme. **E.** Crescimento durante 20 dias; setas brancas indicam reentrâncias e a seta azul indica uma porção volumosa do biofilme (multicamadas celulares). **F.** Crescimento durante 30 dias; setas brancas indicam buracos na estrutura e setas vermelhas demonstram células individuais. Aumento 100X.

5.9.2 Imunomarcacão das proteínas alvo no biofilme de *X. fastidiosa*

Para verificar a expressão das adesinas ao longo da formacão do biofilme de *X. fastidiosa* foi realizada a microscopia de fluorescência utilizando os anticorpos contra as proteínas alvo e um anticorpo secundário conjugado com um fluorofóforo. Para a análise da expressão das proteínas o método de marcação por fluorescência foi eficaz, uma vez que permitiu a detecção dos locais onde as proteínas estavam expressas. Além disso, os resultados de imunomarcacão foram condizentes com aqueles obtidos para expressão de proteínas por Western blot.

Para certificacão dos resultados de fluorescência foram realizados testes independentes sem a incubacão com os anticorpos contra as proteínas alvo e sem a incubacão com os anticorpos conjugados com rodamina (Santa Cruz), em biofilmes crescidos por 30 dias. Os testes realizados como controles negativos demonstraram que a fluorescência observada nas figuras é resultado somente da ligacão de anticorpos secundários com os primários e não de ligacões inespecíficas, uma vez que não foi verificado nenhuma fluorescência na cor vermelha nas imagem compostas (Fig. 23A e 24A). As figuras 23A, 23B e 23C representam o teste sem a incubacão com anticorpos contra as proteínas alvo. As figuras 24A, 24B e 24C representam o teste sem a incubacão com os anticorpos conjugados com Rodamina (Santa Cruz).

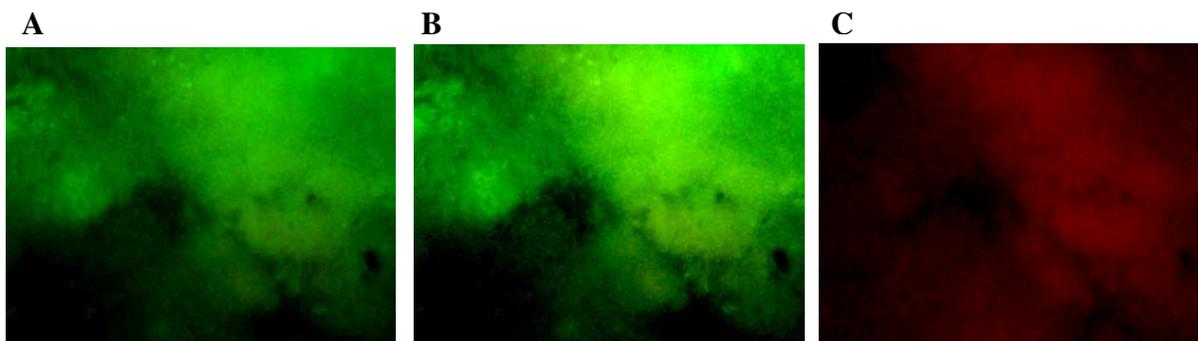


Figura 23: Teste controle em biofilme de 30 dias sem a incubação com anticorpos contra a proteína UspA1. **A.** Imagem composta pela sobreposição das imagens B e C; **B.** Biofilme marcado com Syto 9; **C.** Biofilme marcado com Rodamina (Santa Cruz). Aumento 100X.

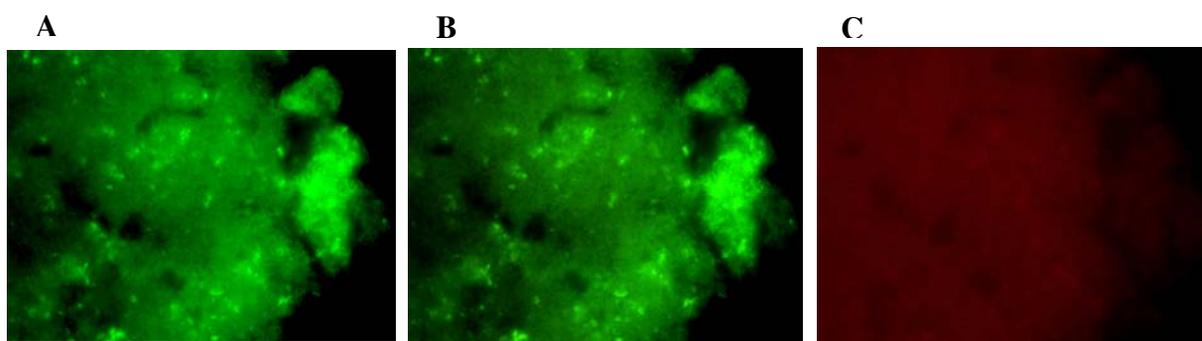


Figura 24: Teste controle em biofilme de 30 dias sem a incubação com anticorpos conjugados com Rodamina (Santa Cruz). **A.** Imagem composta pela sobreposição das imagens B e C; **B.** Biofilme marcado com Syto 9; **C.** Biofilme marcado com Rodamina (Santa Cruz). Aumento 100X.

A proteína FimA foi expressa já aos três dias de crescimento da colônia, apresentando uma forte marcação na coloração vermelha, mesmo quando os agregados celulares eram pequenos. Sua localização no biofilme foi mais central, indicada pela seta na figura 25A. Aos cinco dias, a proteína foi mais expressa e sua marcação pôde ser vista em quase todas as células constituintes da colônia em formação (**Figura 25D**). No décimo dia, quando a densidade celular é maior, a expressão da proteína não foi alta. Ela apresentou-se um pouco mais difundida pelo biofilme (**Figura 25G**), visualizado por uma coloração avermelhada espalhada pelo biofilme, indicada por setas na figura 25G. Essa tendência de haver difusão da proteína pelo biofilme

Resultados

continuou dos 15 aos 20 dias de crescimento da colônia (**Figuras 25J e 25N**). Uma expressão mais centralizada voltou a ocorrer aos 30 dias, fase em que porções menores de biofilme são vistas novamente (**Figura 25Q**). Essa centralização é visualizada por uma coloração alaranjada mais concentrada em uma só região, indicada por setas na figura 25Q. Esses resultados demonstram que FimA é mais expressa quando a colônia apresenta um número menor de células, sugerindo sua função de adesão inicial das células ao substrato, como discutido anteriormente. Contudo, a continuidade da expressão dessa proteína, ainda que fraca, durante todas as fases de desenvolvimento do biofilme sugere que ela também é necessária para a manutenção da estrutura.

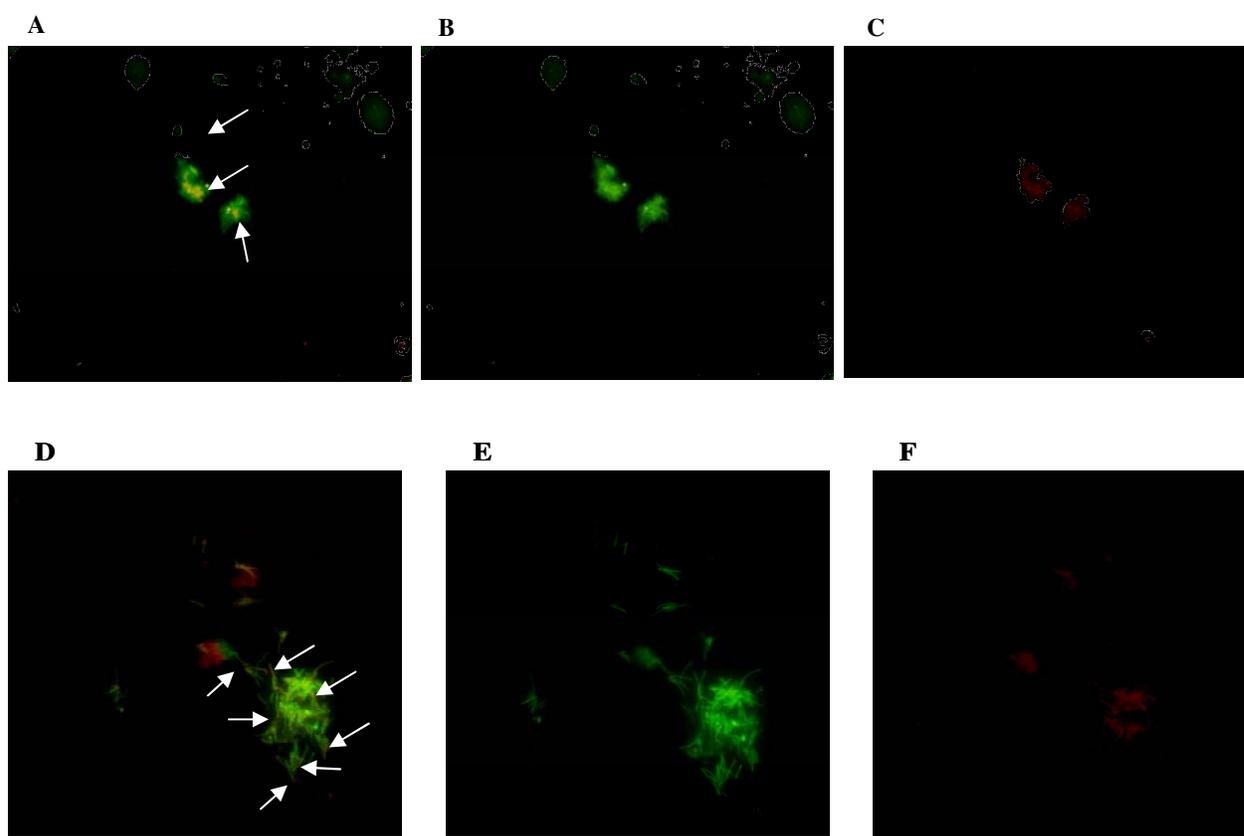


Figura 25: Expressão de FimA ao longo das fases de crescimento do biofilme de *X. fastidiosa*. Figuras da coluna da esquerda referem-se a sobreposição das imagens verdes e vermelhas correspondentes, evidenciando a expressão de FimA, em vermelho ou laranja, durante as fases de formação do biofilme. Figuras da coluna do meio referem-se aos biofilmes marcados com Syto 9 (Invitrogen). Figuras da coluna da direita referem-se aos biofilmes marcados com Rodamina (Santa Cruz). **25A, 25B, 25C.** Imagens de biofilmes de 3 dias de crescimento; **25D, 25E, 25F.** Imagens de biofilmes de 5 dias de crescimento. As setas indicam a fluorescência referente a expressão da proteína FimA. Aumento 100X. *Continua.*

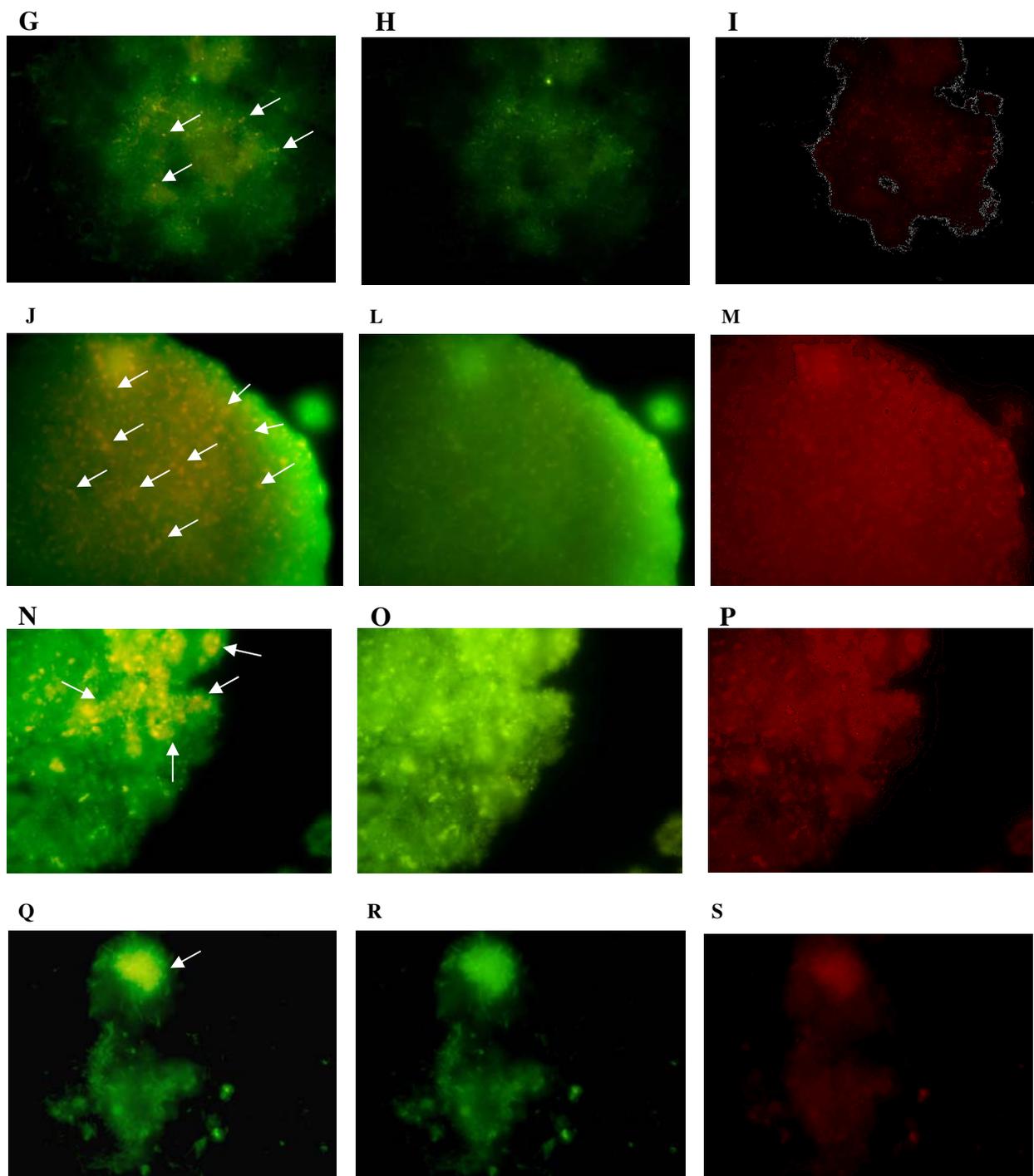


Figura 25 (continuação): Expressão de FimA. **25G, 25H, 25I.** Imagens de biofilmes de 10 dias de crescimento; **25J, 25L, 25M.** Imagens de biofilmes de 15 dias de crescimento; **25N, 25O, 25P.** Imagens de biofilmes de 20 dias de crescimento; **25Q, 25R, 25S.** Imagens de biofilmes de 30 dias de crescimento. As setas indicam a fluorescência referente a expressão da proteína FimA. Aumento 100X.

Resultados

No caso da proteína PilC foi possível observar que, assim como para FimA, a maior expressão foi nas fases iniciais da formação do biofilme. Aos três dias de expressão tanto no centro quanto nas extremidades do pequeno biofilme, foi visualizado alta fluorescência decorrente da expressão da proteína, observada por uma coloração alaranjada, indicada por seta na figura 26A. Aos cinco dias, sua expressão foi mais elevada, cobrindo todo o biofilme (visualizado pela forte cor laranja, indicada por seta) (**Figura 26D**). No décimo dia PilC ainda apresentou elevada expressão, contudo foi restrita a algumas áreas e não distribuída por todo o biofilme (**Figura 26G**). Aos quinze e vinte dias, a proteína teve sua expressão fortemente reduzida, representada por apenas alguns pontos espalhados no biofilme (**Figuras 26J e 26N**). A expressão de PilC parece ter novo aumento aos trinta dias, especialmente em porções menores, onde pode se ver a fluorescência referente a expressão da proteína novamente concentrada em algumas regiões (indicada por setas) (**Figura 26Q**).

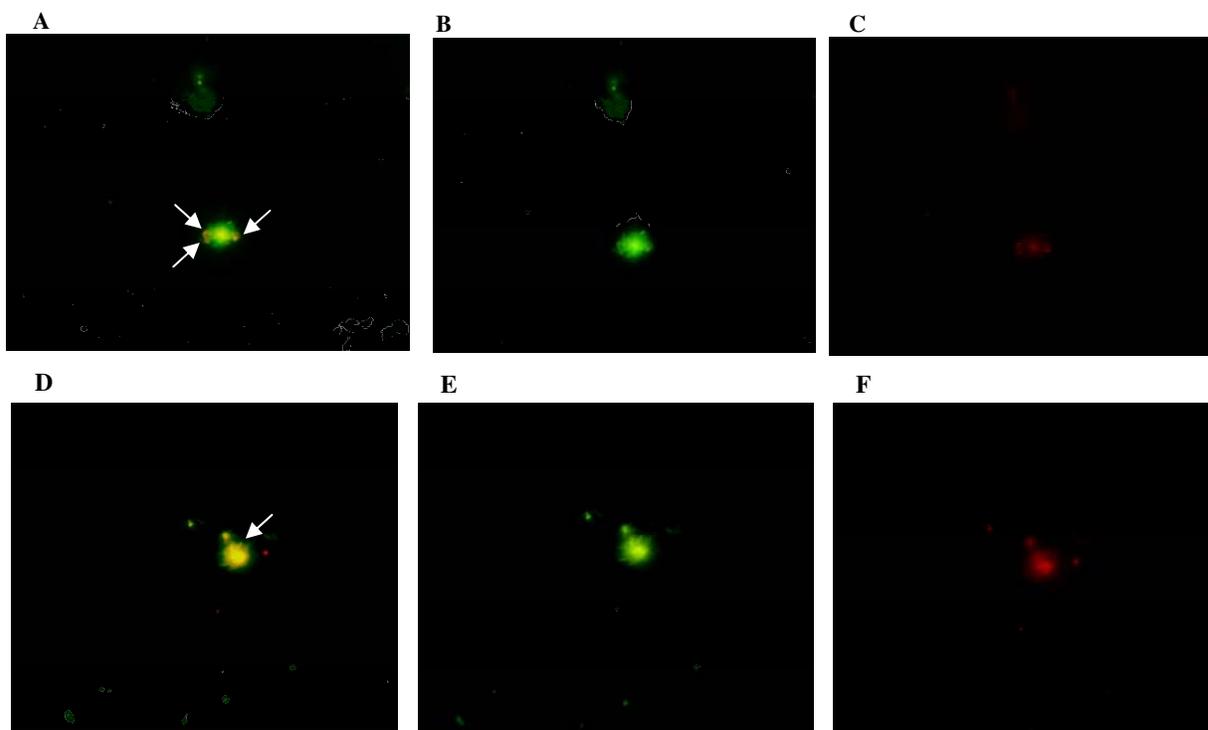


Figura 26: Expressão de PilC ao longo das fases de crescimento do biofilme de *X. fastidiosa*. Figuras da coluna da esquerda referem-se a sobreposição das imagens verdes e vermelhas correspondentes, evidenciando a expressão de PilC, em vermelho ou laranja, durante as fases de formação do biofilme. Figuras da coluna do meio referem-se aos biofilmes marcados com Syto 9 (Invitrogen). Figuras da coluna da direita referem-se aos biofilmes marcados com Rodamina (Santa Cruz). **26A, 26B, 26C.** Imagens de biofilmes de 3 dias de crescimento; **26D, 26E, 26F.** Imagens de biofilmes de 5 dias de crescimento. As setas indicam a fluorescência referente a expressão da proteína. Aumento 100X. *Continua.*

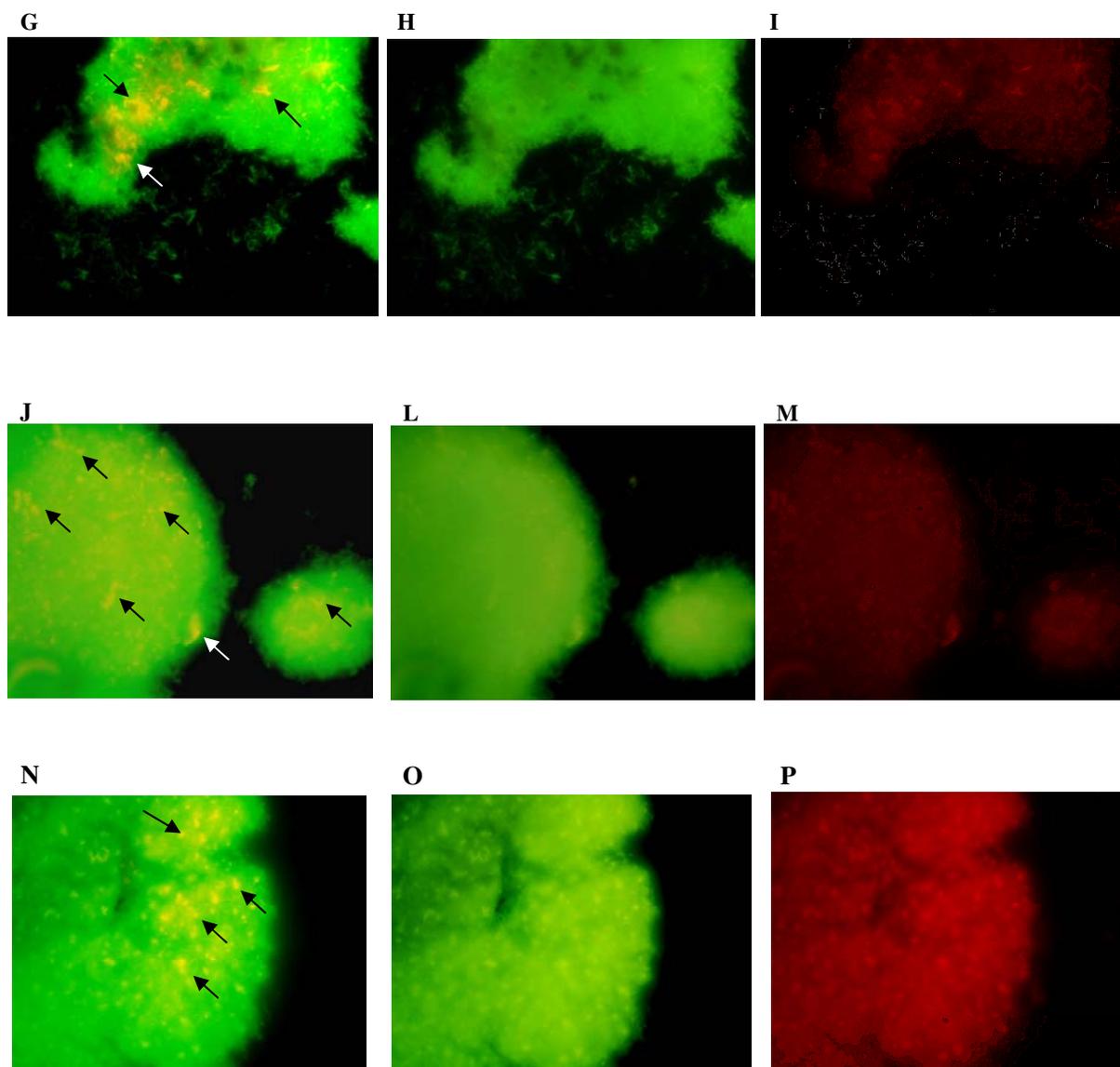


Figura 26 (continuação): Expressão de PilC. **26G, 26H, 26I** Imagens de biofilmes de 10 dias de crescimento; **26J, 26L, 26M.** Imagens de biofilmes de 15 dias de crescimento; **26N, 26O, 26P.** Imagens de biofilmes de 20 dias de crescimento. As setas indicam a fluorescência referente a expressão da proteína. Aumento 100X. *Continua.*

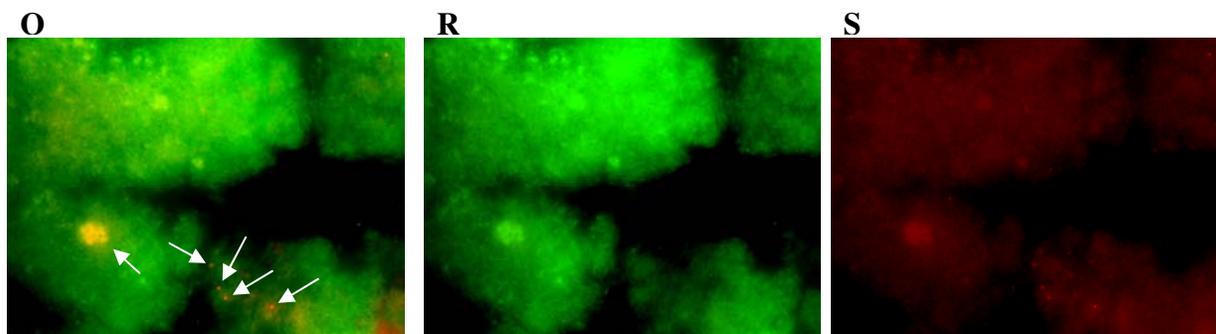


Figura 26 (continuação): Expressão de PilC. **26Q, 26R, 26S.** Imagens de biofilmes de 30 dias de crescimento. As setas indicam a fluorescência referente a expressão da proteína. Aumento 100X.

As proteínas afimbriais se comportaram de maneira bem diferente das proteínas fimbriais Hsf, uma proteína que se apresenta apenas como projeções na membrana, não foi expressa aos três dias de crescimento do biofilme, corroborando com os resultados de Western blot demonstrados anteriormente. A expressão não foi detectada em células individuais aderidas nem em pequenos agregados, ou seja, não foram visualizadas marcações de fluorescência (**Figura 27A**). Sua expressão, ainda que fraca, pôde ser vista aos cinco dias, quando os agregados celulares eram um pouco maiores (**Figura 27D**). Um aumento considerável da expressão de Hsf ocorreu aos 10 dias, indicado por um aumento no sinal da fluorescência (indicado por setas), sugerindo sua função de adesão célula a célula, já que nessa fase o biofilme apresenta um início de organização em multicamadas celulares (**Figura 27G**). A expressão dessa proteína foi intensa aos quinze dias e aumentou aos vinte dias mostrando-se presente por todo o biofilme, em forma de uma coloração alaranjada bastante evidente e difundida (**Figuras 27J e 27N**). Na fase de dispersão celular, Hsf ainda é encontrada bastante expressa e parece estar associada aos locais de quebra dos grupos celulares menores que se destacam, representado por setas (**Figura 27Q**). Os resultados da expressão de Hsf ao longo do desenvolvimento do biofilme denotam que essa proteína é necessária quando a estrutura começa a ter sua densidade populacional aumentada e enquanto essa situação tende a ser mantida a proteína continua presente.

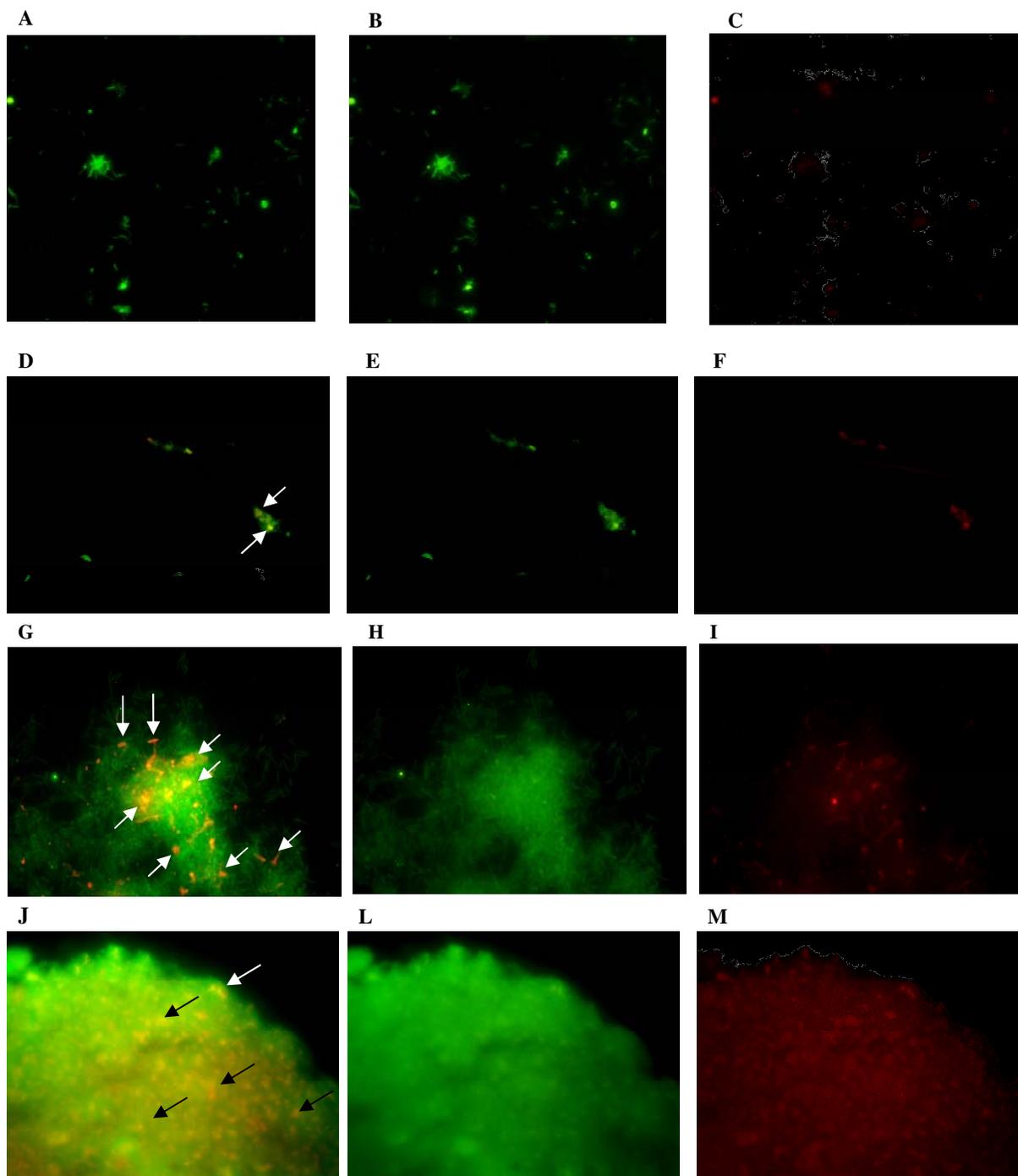


Figura 27: Expressão de Hsf ao longo das fases de crescimento do biofilme de *X. fastidiosa*. Figuras da coluna da esquerda referem-se a sobreposição das imagens verdes e vermelhas correspondentes, evidenciando a expressão de Hsf, em vermelho ou laranja, durante as fases de formação do biofilme. Figuras da coluna do meio referem-se aos biofilmes marcados com Syto 9 (Invitrogen). Figuras da coluna da direita referem-se aos biofilmes marcados com Rodamina (Santa Cruz). **27A, 27B, 27C.** Imagens de biofilmes de 3 dias de crescimento; **27D, 27E, 27F.** Imagens de biofilmes de 5 dias de crescimento; **27G, 27H, 27I.** Imagens de biofilmes de 10 dias de crescimento; **27J, 27L, 27M.** Imagens de biofilmes de 15 dias de crescimento. Aumento 100X. *Continua.*

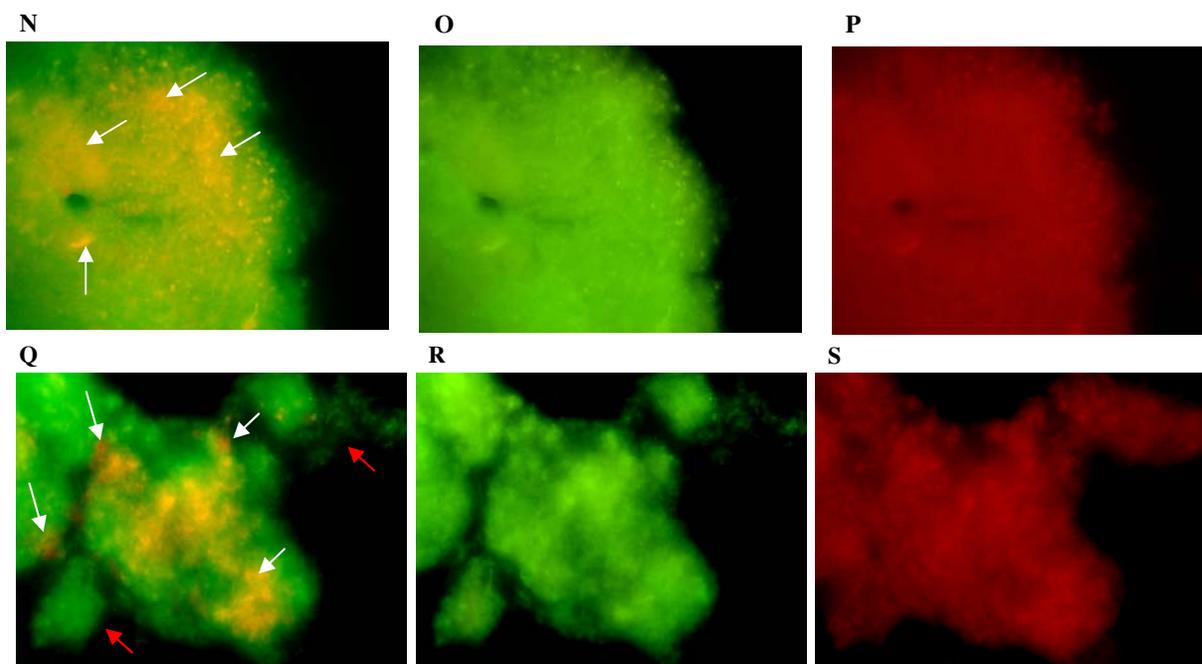


Figura 27 (continuação): Expressão de Hsf. **27N, 27O, 27P.** Imagens de biofilmes de 20 dias de crescimento; A seta azul na figura **O** indica um canal de transporte do biofilme. **27Q, 27R, 27S.** Imagens de biofilmes de 30 dias de crescimento; setas vermelhas indicam grupos celulares que se destacam do biofilme maior. As setas brancas indicam fluorescência referente a expressão da proteína. Aumento 100X.

No caso da proteína UspA1, sua expressão pôde ser identificada ao terceiro dia, contudo, ao contrário do que foi verificado para PilC e FimA, essa adesina foi expressa apenas em alguns pontos do biofilme, referente a algumas marcações vermelhas nas células (indicadas por setas) (**Figura 28A**). Aos cinco dias UspA1 teve sua expressão aumentada (**Figura 28D**), mas a expressão foi mais acentuada aos dez dias, evidenciada por uma forte coloração alaranjada, quando o biofilme se apresenta em multicamadas (**Figura 28G**). Nessa fase foi possível identificar também que a proteína está associada a reentrâncias no biofilme ainda não preenchidas por células (indicadas por setas azuis na figura **28H**). A expressão de UspA1 aos quinze, vinte e trinta dias se mostra como “ilhas” protéicas, indicadas por setas, muito diferente do observado para as outras proteínas. Aos quinze dias a densidade celular é alta e aumenta aos vinte dias, sendo acompanhada pela expressão da proteína UspA1, que se mostrou mais acentuada neste último ponto, como demonstram as fortes marcações vermelhas (**Figuras 28J e 28N**). Na fase de

dispersão celular UspA1 ainda se encontra expressa em “ilhas”, contudo, estas são menos numerosas que anteriormente (**Figura 28Q**).

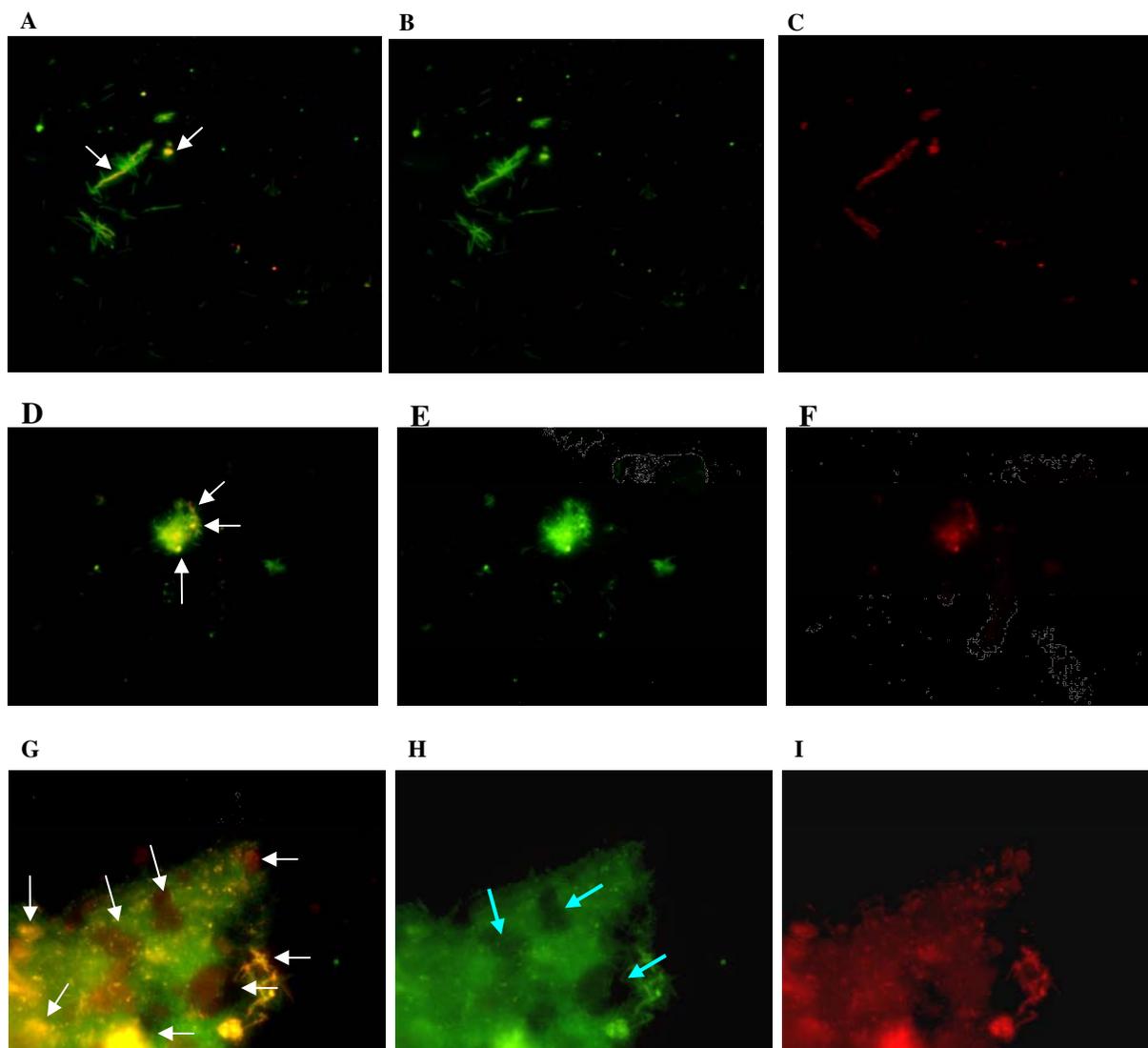


Figura 28: Expressão de UspA1 ao longo das fases de crescimento do biofilme de *X. fastidiosa*. Figuras da coluna da esquerda referem-se a sobreposição das imagens verdes e vermelhas correspondentes, evidenciando a expressão de UspA1, em vermelho ou laranja, durante as fases de formação do biofilme. Figuras da coluna do meio referem-se aos biofilmes marcados com Syto 9 (Invitrogen). Figuras da coluna da direita referem-se aos biofilmes marcados com Rodamina (Santa Cruz). **28A, 28B, 28C.** Imagens de biofilmes de 3 dias de crescimento; **28D, 28E, 28F.** Imagens de biofilmes e 5 dias de crescimento. **28G, 28H, 28I.** Imagens de biofilmes de 10 dias de crescimento. Setas azuis indicam reentrâncias. As setas brancas indicam fluorescência referente a expressão da proteína. Aumento 100X. *Continua.*

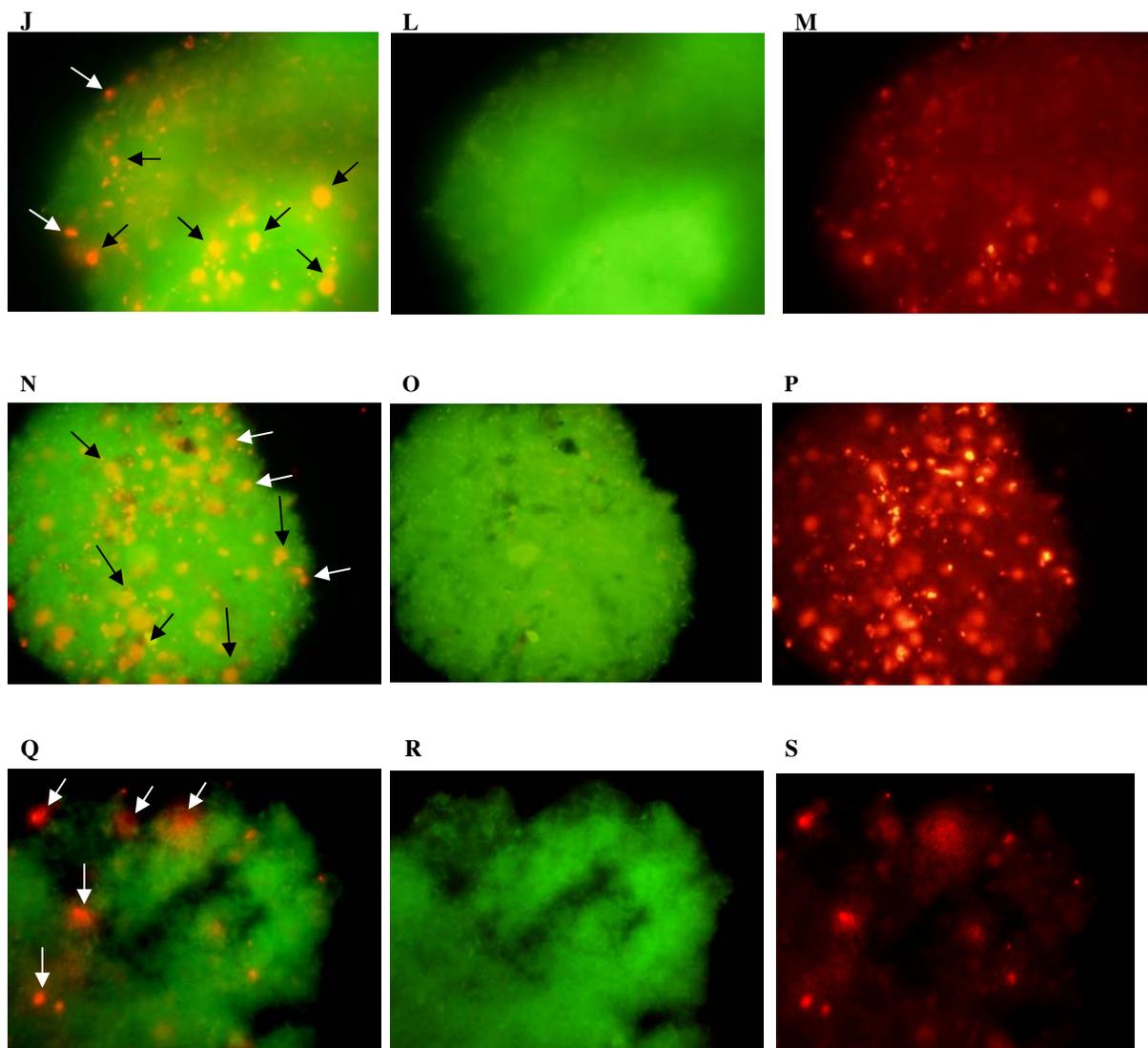


Figura 28 (continuação): Expressão de UspA1. **28J, 28L, 28M.** Imagens de biofilmes de 15 dias de crescimento; **28N, 28O, 28P.** Imagens de biofilmes de 20 dias de crescimento; a seta azul indica um canal de transporte **28Q, 28R, 28S.** Imagens de biofilmes de 30 dias de crescimento. As setas indicam a fluorescência referente a expressa das proteínas. Aumento 100X.

5.10 Microscopia eletrônica de Transmissão de plantas infectadas e das fases do biofilme

Com o objetivo de verificar se a expressão das adesinas fimbriais e afimbriais ocorre também em bactérias no interior dos vasos do xilema, foi realizada a microscopia eletrônica de transmissão de pecíolos de hibisco, vinca e citros infectados por *X. fastidiosa*.

Com os resultados dos experimentos de imunomarcagem em plantas infectadas por *X. fastidiosa* foi possível observar a marcação para todas as proteínas em estudo e estas mostraram-se expressas em vinca e hibisco, hospedeiros alternativos, bem como em citros, planta com sintomas de CVC. Tanto em vasos de xilema com poucas bactérias como naqueles totalmente obstruídos pelo fitopatógeno todas as proteínas foram identificadas pela marcação, isso demonstra que todas elas são requeridas durante o processo de formação do biofilme. Além disso, a presença da marcação demonstra que os epitopos das proteínas alvo não foram danificados durante o processamento da amostra e estão disponíveis nos hospedeiros.

Os resultados demonstram que proteínas de naturezas similares, foram marcadas em locais equivalentes da célula. A proteína FimA estudada nesse trabalho é a subunidade principal de pili tipo IV. Sua marcação aparece preferencialmente associada a membranas celulares, apresentando-se abundante nesses locais. Como é possível notar nas figuras 29A, B e C, a localização da proteína é marcada por apenas um ponto e não uma sequência linear deles, que seria esperado, já que FimA é a proteína que faz parte das subunidades da haste do pili. As figuras 29A, B e C são referentes a citros, vinca e hibisco, respectivamente, e representam vasos de xilema obstruídos por bactérias. É possível verificar, através de expressão de FimA, que essa proteína é requerida para a formação do biofilme *in planta* e, por estar presente em todas as estirpes presentes nos hospedeiros, demonstra-se que não tem sua expressão específica para uma delas e as proteínas podem apresentar algum grau de similaridade. FimA está presente não só em vasos obstruídos por bactérias, como mostra a figura 29D, onde foram encontradas apenas quatro bactérias em um vaso e estas apresentaram marcação da proteína associada a parede celular. Foi possível visualizar, ainda, as fímbrias produzidas por *X. fastidiosa* (**Figura 29E**).

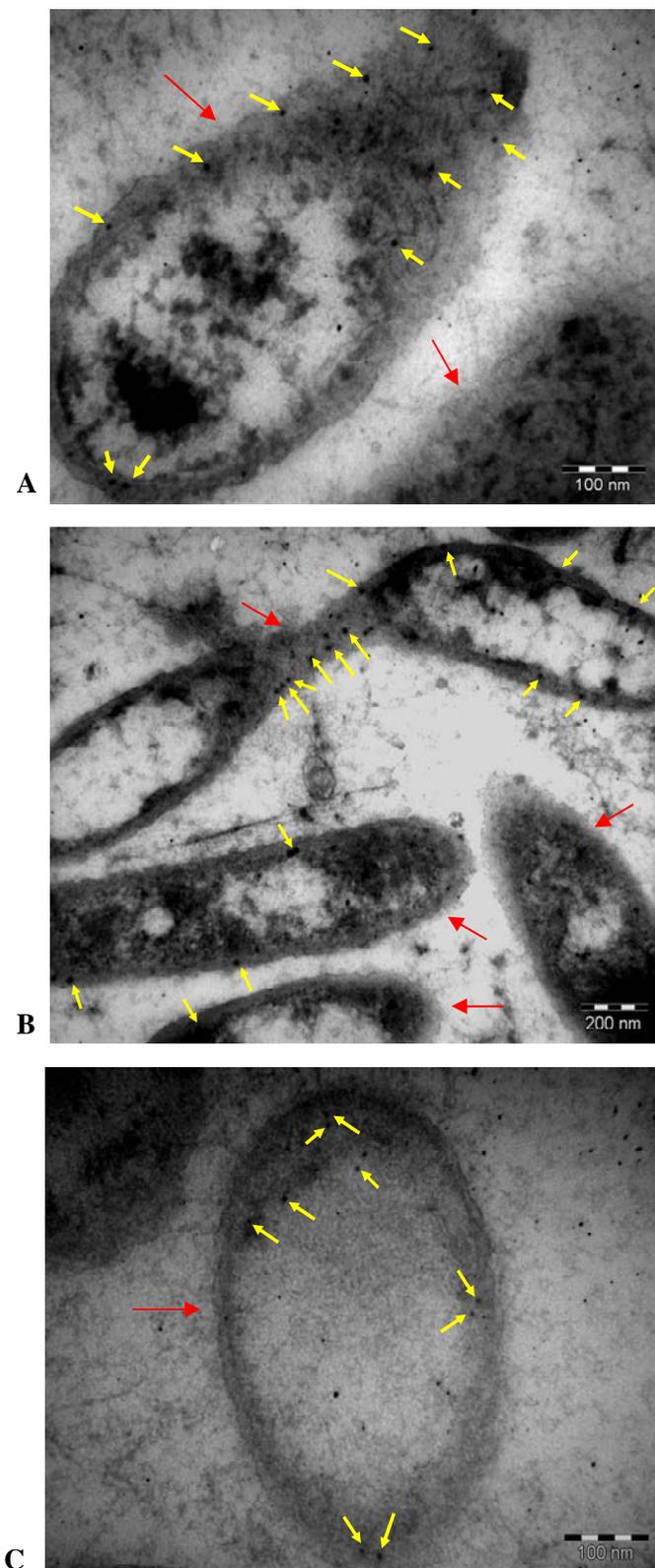


Figura 29: Marcação da proteína FimA vista ao microscópio eletrônico de transmissão. **A.** Vaso de xilema de citros obstruído por bactérias. **B.** Vaso de xilema de vinca obstruído por bactérias. **C.** Vaso de xilema de hibisco obstruído por bactérias. *Continua.*

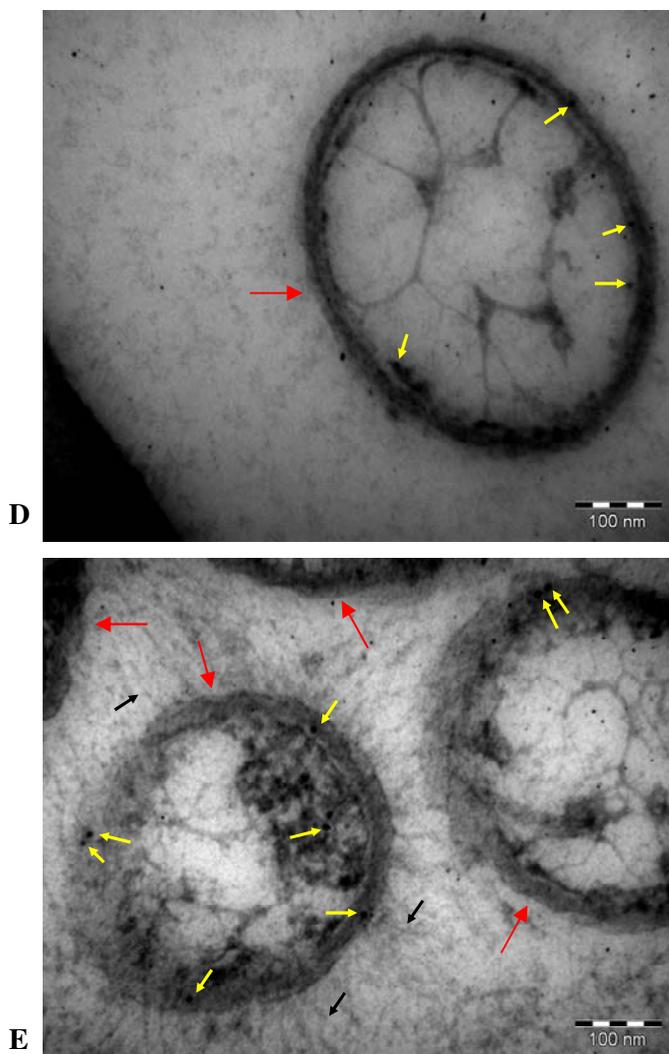


Figura 29 (continuação): Detecção da expressão de FimA. **D.** Bactéria isolada encontrada em um vaso de xilema de citros. **E.** Fímbrias de *X. fastidiosa* ao redor de uma bactéria em uma vaso de xilema de citros. As setas amarelas indicam a marcação para FimA e as setas pretas indicam fímbrias. Em todas as figuras, as bactérias são indicadas por setas vermelhas. Os diferentes formatos que as bactérias apresentam ocorrem em função dos planos em que elas foram cortadas.

A detecção para a proteína PilC também mostrou-se associada a parede, condizente com o local ocupado por ela, já que se trata de um proteína envolvida com a montagem de pili tipo IV (www.ncbi.nlm.nih.gov/blastp). PilC foi expressa pelas três estirpes nos hospedeiros testados, citros, vinca e hibisco, e por ter apresentado reação positiva com anticorpos contra PilC de 9a5c também é possível sugerir algum grau de similaridade entre as proteínas de diferentes estirpes (**Figuras 30A, B e C**). Assim como para FimA, não foi possível identificar diferenças de

expressão em vasos contendo poucas ou muitas bactérias, como verificado em um vaso de xilema de hibisco contendo apenas algumas bactérias (**Figura 30D**).

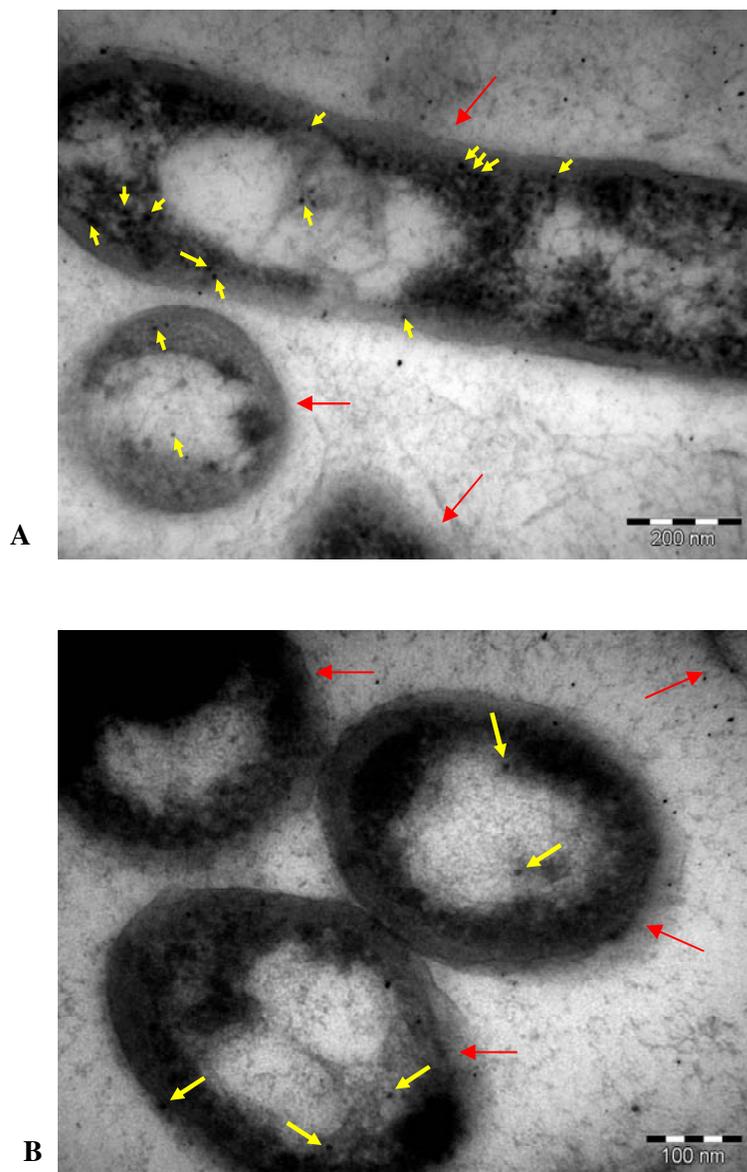


Figura 30: Marcação da proteína PilC vista ao microscópio eletrônico de transmissão. **A.** Vaso de xilema de citros obstruído por *X. fastidiosa*. **B.** Vaso de xilema de vinca obstruído por *X. fastidiosa*. *Continua.*

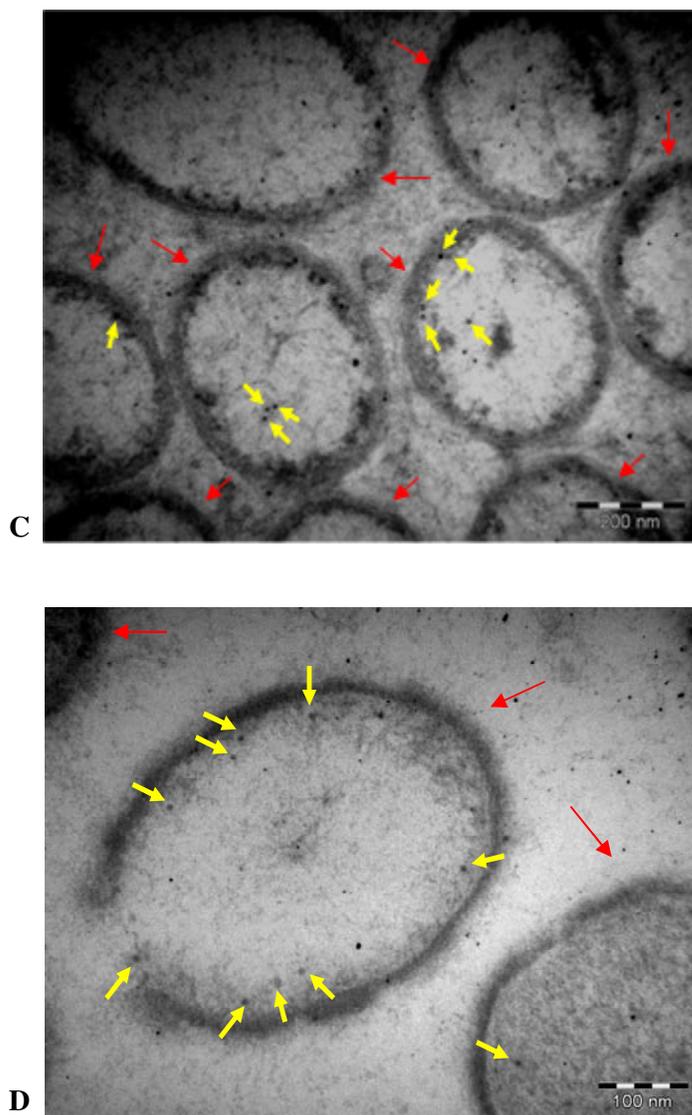


Figura 30 (continuação): Detecção de PilC. **C.** Vaso de xilema de hibisco obstruído por *X. fastidiosa*. **D.** Um vaso de xilema de hibisco com poucas células de *X. fastidiosa*. As setas amarelas indicam a marcação para PilC. Em todas as figuras, as bactérias são indicadas por setas vermelhas. Os diferentes formatos que as bactérias apresentam ocorrem em função dos planos em que elas foram cortadas.

Para o caso das proteínas afimbriais Hsf e UspA1, a marcação demonstrou-se predominantemente do lado de fora da célula, concordando com o local reportado para essas proteínas.

Resultados

No caso de Hsf, foi possível notar sua expressão tanto quando as bactérias se encontram obstruindo totalmente um vaso do xilema com uma densidade populacional alta da bactéria (**Figura 31A**), como quando vaso contém apenas poucas bactérias (**Figura 31B**). Hsf também foi visualizada em todos os hospedeiros testados e não parece se expressar mais especificamente em um deles, como demonstrado nas figuras 31C, 31D e 31E, que representam citros, vinca e hibisco, respectivamente.

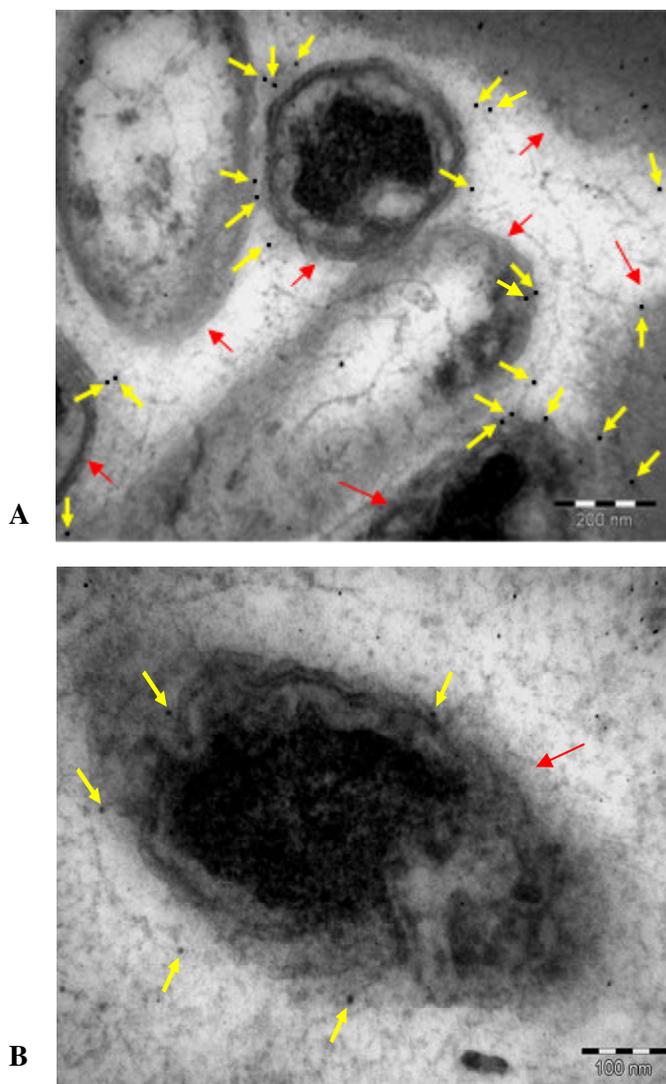


Figura 31: Marcação da proteína Hsf vista ao microscópio eletrônico de transmissão. **A.** Vaso de xilema de citros apresentando uma densidade populacional bastante alta de *X. fastidiosa*. **B.** Vaso de xilema de citros contendo poucas bactérias. *Continua.*

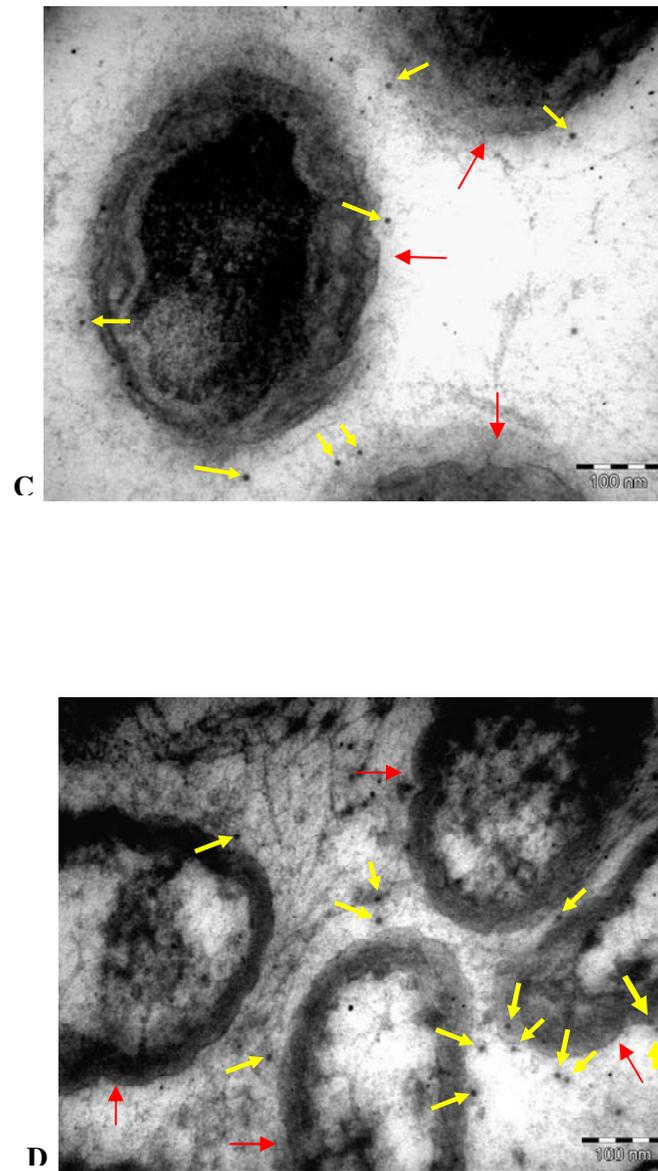


Figura 31 (continuação): Detecção de Hsf. **C.** Vaso de xilema de citros obstruído por *X. fastidiosa*. **D.** Vaso de xilema de vinca obstruído por *X. fastidiosa*. *Continua.*

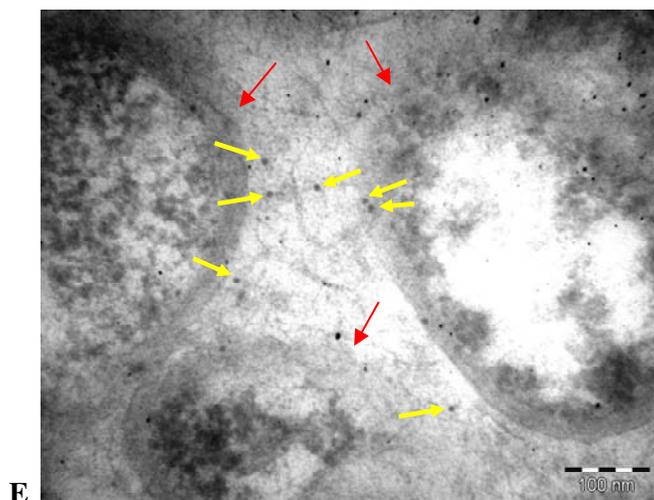


Figura 31 (continuação): Detecção de Hsf. **E.** Vaso de xilema de hibisco obstruído por *X. fastidiosa*. As setas amarelas indicam a marcação para Hsf. Em todas as figuras, as bactérias são indicadas por setas vermelhas. Os diferentes formatos que as bactérias apresentam ocorrem em função dos planos em que elas foram cortadas.

A proteína UspA1 também pôde ser encontrada expressa nos vasos dos hospedeiros testados. Embora a expressão de UspA1 seja abundante, ela parece ter sua expressão aumentada em vasos com alta densidade populacional de *X. fastidiosa*, como encontrado em citros (**Figura 32A e 32D**) e hibisco (**Figura 32B**) além disso, é possível notar o que parece ser uma concentração protéica nessa condição, o que não ocorre quando existem poucas bactérias por vaso (**Figura 32C e 32E**). A proteína UspA1 foi encontrada igualmente expressa em citros e hibisco. Não foi possível obter bons resultados para a marcação em vinca, a marcação de fundo manteve-se muito alta, mesmo em diluições mais baixas de anticorpo, o que dificultou as análises.

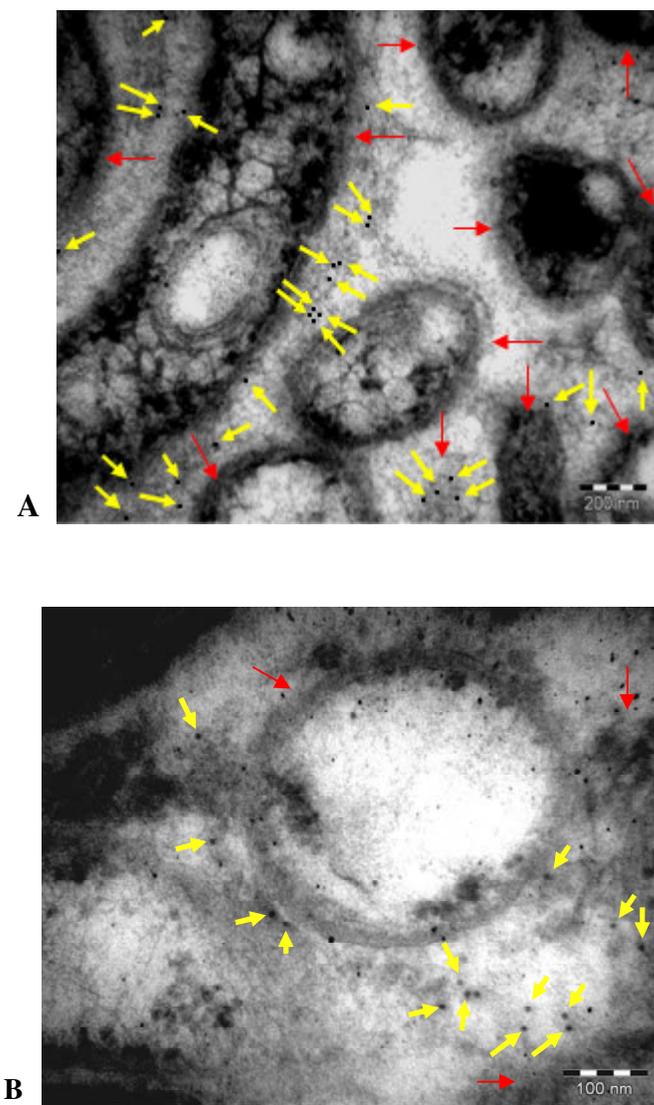


Figura 32: Marcação da proteína UspA1 vista ao microscópio eletrônico de transmissão. **A.** Vaso de xilema de citros apresentando uma densidade populacional bastante alta de bactérias. **B.** Vaso de xilema de hibisco apresentando alta densidade populacional de bactérias. *Continua.*

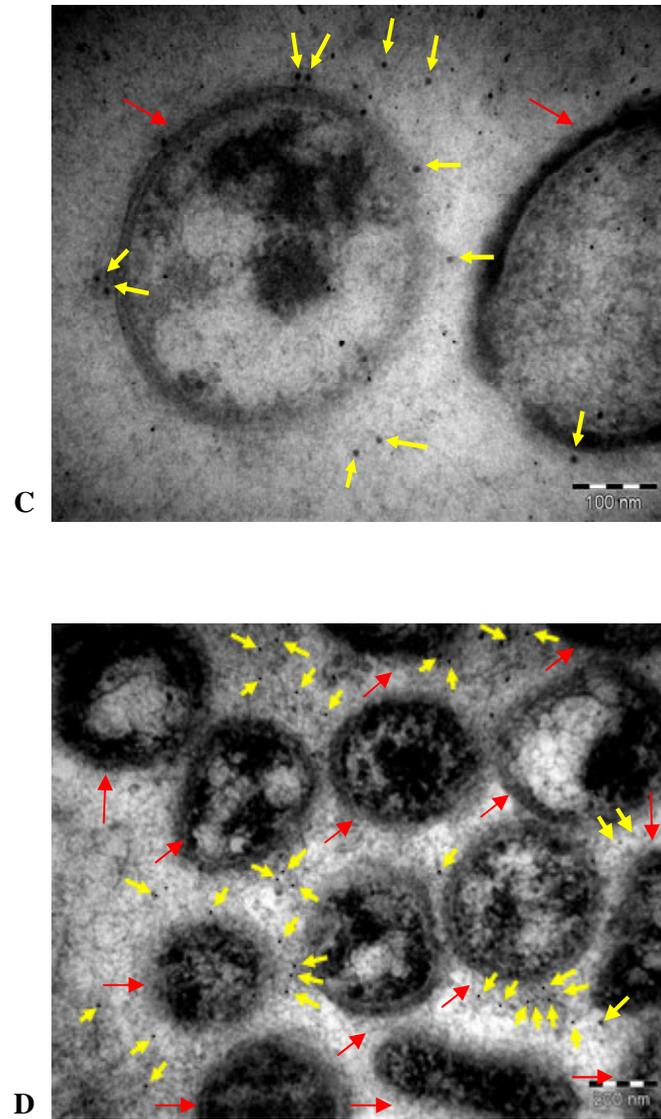


Figura 32 (continuação): Detecção da proteína UspA1. **C.** Vaso de xilema hibisco com poucas bactérias. **D.** Vaso de xilema de citros obstruído por bactérias. *Continua.*

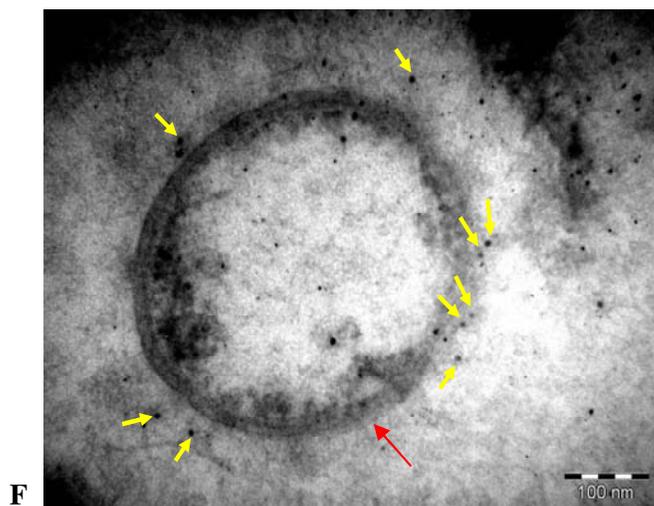
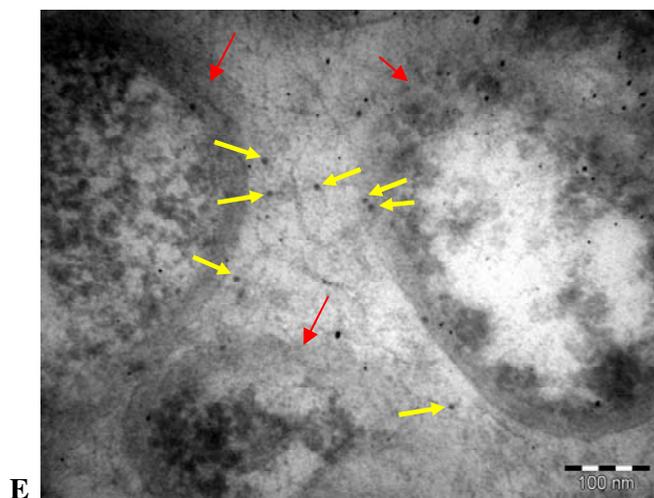


Figura 32 (continuação): Detecção da proteínas UspA1. **E.** Vaso de xilema de hibisco obstruído por bactérias. **F.** Vaso de xilema de hibisco com poucas bactérias. As setas amarelas indicam a marcação para UspA1. Em todas as figuras, as bactérias são indicadas por setas vermelhas. Os diferentes formatos que as bactérias apresentam ocorrem em função dos planos em que elas foram cortadas.

6. Discussão

6.1 Amplificação dos genes de interesse, expressão das proteínas alvo e obtenção dos anticorpos policlonais

O objetivo inicial do trabalho concentrou-se na obtenção de anticorpos de alta especificidade contra as proteínas alvo. Para que isso fosse possível, foi necessário o desenho de *primers* que amplificasse regiões de alta antigenicidade das proteínas e em regiões hidrofílicas.

Os resultados envolvendo a amplificação dos fragmentos de interesse demonstraram que a especificidade dos *primers* testados foi alta, uma vez que apenas uma banda do tamanho esperado foi encontrada após PCR na maioria dos pares de *primers* testados, exceto para *uspA1-1* e *uspA1-2*. Nesse caso, ajustes nas condições da reação de PCR foram eficazes para a amplificação de fragmentos de tamanho esperado (como citado em materiais e métodos). O seqüenciamento desses insertos após ligação em pGEM-T demonstrou identidade de seqüência com os respectivos genes de *X. fastidiosa* (www.aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf), indicando a não ocorrência de erros de incorporação de nucleotídeos e assegurando a qualidade do inserto utilizado. Após a digestão, ligação no vetor de expressão que fusionou as proteínas a uma cauda de histidina, e inserção dessas construções em *Rosetta*, os testes de indução da expressão das proteínas demonstraram que todas elas apresentaram banda do tamanho esperado, calculado segundo a seqüência de aminoácidos através do programa ProtParam.

A maioria das proteínas foi obtida na fase solúvel do extrato protéico, apresentando uma alta concentração. Entretanto, algumas proteínas se apresentaram na fração insolúvel do extrato, provável resultado da formação de corpos de inclusão. Na tentativa de evitar que esses corpos de inclusão fossem formados, foi realizada a indução da expressão em temperaturas mais baixas, objetivando a diminuição da taxa de expressão das proteínas e, por conseqüência, sua presença na fase solúvel do extrato. Essa estratégia apresentou sucesso no caso de *UspA1-1* e de *PilC1*, que foram expressas na fração solúvel do extrato após indução a 25^oC.

As amostras contendo a fração com as proteínas solúveis foram purificadas através de cromatografia de afinidade, em coluna carregada com NiSO₄. Esse método foi eficiente, uma vez que a maioria das proteínas que foram submetidas à cromatografia foram purificadas com sucesso, não apresentando contaminações nas últimas frações coletadas. A única exceção desse processo foi o caso da proteína *PilC1*, que após a cromatografia foi encontrada apenas nas

primeiras frações coletadas, indicando que ela não se ligou a coluna. Isso pode ter ocorrido por um provável dobramento da proteína que indisponibilizou as caudas de histidina que haviam sido fusionadas. No caso de PilC, a banda referente a proteína super expressa foi recortada do gel para as etapas seqüentes do trabalho. Foi necessária a certificação da identidade dessas proteínas através do seu seqüenciamento, o que foi realizado utilizando o aparelho ESI-QTOF. Amostras purificadas das proteínas FimA, Hsf e UspA1, e a banda referente a PilC, recortada do gel, foram digeridas com tripsina e analisadas. O resultado do seqüenciamento confirmou a identidade de todas as proteínas purificadas, contudo, o programa utilizado para buscar as seqüências no banco de dados não conseguiu analisar PilC devido ao grande número de peptídeos gerados, provavelmente em função das proteínas contaminantes encontradas no gel. Entretanto, a obtenção de banda de tamanho predito após indução da expressão e presença de banda única do tamanho predito (www.aeg.lbi.unicamp.br/xf) após Western blot, discutido posteriormente nesse trabalho, confirmaram se tratar de PilC.

Os anticorpos policlonais obtidos contra as proteínas alvo foram testados pelo método ELISA e demonstraram especificidade e titulação adequadas para os testes posteriores, que tinham por objetivo determinar em quais fases de crescimento do biofilme de *X. fastidiosa* as adesinas estudadas estariam expressas. Os anticorpos foram empregados na localização dessas proteínas no biofilme crescido *in vitro* e também na marcação das proteínas de bactérias em vasos de xilema de plantas infectadas.

6.2 Expressão das proteínas fimbriais e afimbriais extraídas nas diferentes fases do biofilme avaliadas por Western Blot

A fim de determinar em quais fases de desenvolvimento do biofilme adesinas fimbriais e afimbriais são expressas, proteínas totais foram extraídas das fases de crescimento do biofilme *in vitro* e foi realizado Western blot com os anticorpos contra as proteínas alvo. A concentração das proteínas aplicadas no gel foi previamente padronizada de acordo com uma curva padrão obtida por BSA, de regressão linear (R^2) de 0,956, demonstrando que a curva foi satisfatória para ser utilizada nas análises de quantificação do teor de proteína total. A padronização da concentração de proteínas evita diferenças de concentrações entre as repetições biológicas, evidenciando apenas diferenças referentes à expressão das proteínas entre as fases do biofilme.

Nesse trabalho foram analisadas as adesinas fimbriais FimA e PilC, que constituem o pili tipo IV de *X. fastidiosa*. Pili tipo IV são envolvidos na adesão de bactérias ao hospedeiro, motilidade celular e são considerados fatores de virulência (Luke *et al.*, 2007). A análise *in silico* de FimA demonstrou que o tamanho esperado dessa proteína é de aproximadamente 15KDa, e que esta é a subunidade protéica que compõe a haste do pili, e é similar a FimA de *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. Neste microrganismo foi demonstrado que FimA forma o feixe que constitui a haste da fimbria tipo IV (Ojanen-Reuhs *et al.*, 1997). No experimento de Western blot realizado nesse trabalho, foi observada uma banda de tamanho aproximado de 15KDa, condizente com o predito *in silico*. A banda referente a FimA se encontra mais expressa aos cinco dias de desenvolvimento do biofilme, fase de adesão inicial. Esse resultado concorda com o que já havia sido reportado por De Souza *et al.* (2005) que verificaram uma maior expressão de *fimA* ao terceiro, quinto e décimo dias de crescimento do biofilme de *X. fastidiosa in vitro*, sugerindo que FimA é uma proteína importante para as fases iniciais da formação do biofilme, provavelmente pela função de aderência das bactérias ao substrato, já que na sua sequência são encontradas diversas cisteínas que poderiam formar pontes dissulfeto com a superfície, promovendo adesão celular (Leite *et al.*, 2002).

Outra proteína estudada nesse trabalho foi PilC. Seu tamanho predito pelo site do Projeto Genoma *X. fastidiosa* (www.aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf) é 55KDa e segundo análises da sua sequência de aminoácidos, essa proteína faz parte da montagem de pili tipo IV. O tamanho da banda observado após Western blot foi de 55KDa e sua expressão ocorreu em todas as fases do biofilme, embora pareça apresentar um aumento ao quinto e décimo dias, correspondentes às fases de adesão inicial e início da maturação. Essa proteína parece demonstrar um novo aumento da expressão aos 30 dias de formação do biofilme, sugerindo que sua atividade é novamente requerida na fase de dispersão celular. A observação de uma maior expressão de PilC ao quinto e décimo dias sugere que ela possa estar envolvida com a adesão da bactéria a superfície e o início da adesão célula a célula, contudo, a continuidade de um nível de expressão ao longo do biofilme sugere um papel na manutenção dessa adesão. De Souza *et al.*, (2004a), em experimentos de micro arranjos de DNA, encontraram o gene *pilC* 2,78 vezes mais expresso na condição de biofilme maduro quando comparado ao crescimento planctônico, demonstrando que PilC também participa da fase de alta densidade celular. Além disso, Li *et al.*, 2007 discutem que pili tipo IV,

como é o caso de PilC, também participam de adesão inicial da bactéria ao substrato. Os autores demonstraram que mutantes da estirpe Temecula que só expressavam esse tipo de pili (estirpe 6E11) formaram biofilmes aderidos à parede de frascos, assim como apresentaram movimentação no substrato, sugerindo que a adesão dessas bactérias era eficiente. De fato, pili tipo IV são proteínas que têm função de movimentação celular, comprovada por curtas distâncias de recuperação de mutantes para esse tipo de pili após inoculação das bactérias em videiras (Meng *et al.*, 2005). Um aumento da expressão protéica de PilC aos 30 dias pode estar relacionado a fase de desagregação das células do biofilme, já que em *X. fastidiosa* esse tempo se refere a fase tardia (De Souza *et al.*, 2004) e é caracterizado pela desagregação de grupos de celulares do biofilme maduro.

Os resultados para a expressão das proteínas fimbriais sugerem que estas são, aparentemente, mais requeridas no momento de adesão entre as células e a superfície colonizada, evento que ocorre nos primeiros dias do desenvolvimento do biofilme de *X. fastidiosa*. Essa hipótese é baseada na detecção de uma única banda, de mesmo tamanho predito para as proteínas FimA e PilC, que aparece nas fases iniciais do biofilme. Embora não pareça majoritária, a função de agregação celular dessas proteínas não pode ser descartada, uma vez que sua expressão ainda ocorre nas fases maduras do biofilme, mas apresenta-se mais reduzida.

A expressão das proteínas FimA e PilC nos primeiros dias de formação do biofilme demonstradas nesse trabalho concordam com a expressão dos genes *fimA* e *pilC* observadas por De Souza *et al.* (2004, 2005). Esses autores reportaram que tanto *fimA* quanto *pilC* são expressos na condição de biofilme, além disso, *fimA* foi expresso ao terceiro, quinto e décimo dias de crescimento. A correspondência entre os dias em que as proteínas fimbriais foram detectadas expressas no biofilme e o aumento da expressão dos genes relacionados a elas por De Souza *et al.* (2004, 2005) são as únicas informações a respeito do papel temporal dessas adesinas na estirpe 9a5c, causadora da CVC. Juntas, essas informações reforçam a hipótese de que proteínas fimbriais são fatores de patogenicidade de *X. fastidiosa*, uma vez que atuam na adesão inicial da bactéria ao substrato e auxiliam na formação do biofilme.

Para a análise da expressão das adesinas afimbriais foi necessário a utilização de uma nova metodologia de extração de proteínas (M2). Esta metodologia utiliza Triton X-100 ao invés de SDS, como utilizado no M1. A alteração do detergente utilizado pode ter sido determinante na

extração dessas proteínas, uma vez que Triton X-100 é um detergente não inônico e pode ter auxiliado na solubilização das proteínas Hsf e UspA1.

De acordo com as análises do tamanho da proteína, Hsf apresenta 204KDa. Sua expressão não foi detectada nas fases de início do desenvolvimento do biofilme, ao contrário das proteínas fimbriais, Hsf só foi detectada ao décimo dia de formação do biofilme e sua expressão pôde ser detectada durante as demais fases de alta densidade celular. Esse resultado sugere que Hsf apresenta uma possível função de adesão célula a célula, principalmente devido ao aumento de sua expressão na fase em que multicamadas celulares começam a se formar (De Souza *et al.*, 2004). É possível concluir também que Hsf pode estar relacionada à estruturação do biofilme, uma vez que multicamadas celulares só são vistas após os dez dias de crescimento e o aumento do biofilme é dependente da agregação de células. O aumento da expressão de Hsf ao décimo dia corrobora o que foi previamente reportado por De Souza *et al.* (2005) que verificaram um aumento da expressão do gene *hsf* ao quinto e décimo dias de crescimento do biofilme de *X. fastidiosa in vitro*. A expressão do gene *hsf* não foi encontrada nas fases madura e de desagregação celular do biofilme por De Souza *et al.* (2005), contudo, a expressão referente proteína foi detectada por Western blot aos 15, 20 e 30 dias de crescimento, sugerindo que essa proteína apresenta um *turnover* lento e pode ser bastante estável.

Outra adesina afimbrial estudada nesse trabalho é UspA1, que apresenta similaridade com proteínas de bactérias patogênicas de humanos, como UspA1 de *M. catarrhalis* e YadA de *Y. enterocolitica*. Outra estirpe de *X. fastidiosa*, a Temecula que é causadora da doença de Pierce em videiras, apresenta uma proteína denominada XadA que após análises de alinhamento da sequência de aminoácidos também demonstrou alta similaridade com UspA1 de 9a5c. Na estirpe 9a5c de *X. fastidiosa*, o tamanho de UspA1 predito através do site do Projeto Genoma *X. fastidiosa* (www.aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf) é de 98KDa. As proteínas similares a UspA1 apresentam, no caso de todos os microrganismos citados, uma atuação na função de adesão celular. No caso de 9a5c, a expressão de UspA1 em todas as fases de desenvolvimento do biofilme sugere que essa proteína possa também estar envolvida com essa função. O aumento da expressão de UspA1 nas fases de aumento da densidade celular sugere ainda que essa proteína possa estar envolvida com a adesão célula a célula responsável por manter a estruturação do biofilme. Esse não é o primeiro resultado que relaciona a importância de tal proteína para o

biofilme, o gene *uspA1* da estirpe 9a5c já havia sido encontrado super expresso na condição FP (bactérias virulentas re-isoladas de plantas sintomáticas) mas não após sucessivas repicagens, quando a bactéria perde a capacidade de formação do biofilme (De Souza *et al.* 2003). O mesmo grupo demonstrou que o gene *uspA1* apresentava expressão mais significativa ao quinto e décimo dias de crescimento de biofilmes em meio líquido, além de se apresentar altamente expresso após 90 dias de inoculação da bactéria na planta hospedeira, sugerindo que a proteína codificada por ele aparenta uma função de agregação celular (De Souza *et al.*, 2005). Embora De Souza *et al.* (2005) não tenham encontrado expressão do gene *uspA1* aos 20 dias de crescimento do biofilme, os resultados encontrados por Western blot nesse trabalho demonstraram que a expressão de UspA1 parece aumentar de acordo com o aumento da densidade celular ao longo do desenvolvimento do biofilme. esse resultado sugere que UspA1 é uma proteína que apresenta um *turnover* lento e, assim como Hsf, ser bastante estável.

Em *M. catarrhalis*, um patógeno de humanos que apresenta UspA1 similar a *X. fastidiosa*, foi reportado que a estirpe O35E, incapaz de formar biofilme, reverteu tal característica após ser transformada com o gene *uspA1* da estirpe O46E (Pearson *et al.*, 2006). Não somente a função de formação do biofilme, mas a agregação celular é outra característica de UspA1 de *M. catarrhalis* (Hoiczuk *et al.*, 2000). Estudos envolvendo análises de predição da estrutura de uma proteína similar a UspA1 de *M. catarrhalis*, denominada YadA, revelaram que se trata de uma proteína grande, em formato de pirulito, que se agrega através de interações entre os domínios globulares (Hoiczuk *et al.*, 2000).

A estirpe 9a5c de *X. fastidiosa* não apresenta mutantes para a proteína UspA1, entretanto, Feil *et al.* (2007), obtiveram mutantes da estirpe Temecula para XadA, uma proteína similar a UspA1 de 9a5c, porém com um domínio de hemaglutinina a menos (**Fig 36A e C**). Os resultados encontrados pelos autores sugeriram que a função de XadA seria a de adesão inicial da bactéria ao substrato, e não a de agregação celular. Os autores observaram que, na ausência da proteína, os mutantes aderiam como pequenos ou grandes agregados celulares a lamínulas de vidro. Nesse mesmo trabalho os autores analisaram a virulência dos mutantes obtidos por eles e constataram que estes eram menos virulentos (Feil *et al.*, 2007). Os resultados da expressão temporal de UspA1 revelados nesse trabalho por Western blot não concordam com a hipótese apresentada por Feil *et al.* (2007). A proteína foi expressa em todas as fases de desenvolvimento do biofilme,

parecendo aumentar de acordo com o aumento da densidade celular, o que sugere uma possível atividade de agregação celular e estruturação do biofilme desde o início da sua formação. A presença de diversos domínios de hemaglutinina, discutidos posteriormente, na estrutura de UspA1 também reforçam a hipótese de agregação celular dessa proteína.

O tamanho da banda de UspA1 encontrada após Western blot foi bem menor do que o predito na anotação do genoma da *X. fastidiosa* (www.aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf), havendo uma diferença de mais de 20KDa. Na tentativa de explicar essa diferença entre o predito e o observado, foi feita uma busca por peptídeo sinal da proteína utilizando os 150 primeiros aminoácidos da seqüência. Um provável sítio de clivagem foi encontrado entre as posições 22 e 23, que poderia ser alvo de serina proteases. Entretanto, o tamanho da proteína sem o peptídeo sinal é de 95KDa, muito acima do que foi encontrado. A alteração do tamanho observado de UspA1 foi descrito também por Hill *et al.*, (2003) que, trabalhando com UspA1 de *M. catarrhalis* reportaram o mesmo fato. De acordo com esses autores, o tamanho da proteína em análises de Western blot mostrava-se bastante inferior ao predito a medida em que o tempo de fervura da amostra aumentava. Tal observação já havia sido reportada em 1998 por McMichael *et al.* que discutiram que fervuras prolongadas convertem oligômeros de UspA1 de 250KDa para monômeros que migram com uma redução aparente entre 90 a 120KDa. Isso demonstra que se trata de uma proteína bastante sensível a alterações de temperatura, o que pode ser a causa da diferença entre o predito e o observado. Ainda, não se pode descartar a possibilidade dessa proteína sofrer modificações pós traducionais, o que também poderia reduzir seu tamanho e explicar o que foi observado nos resultados de Western blot. Embora a banda encontrada tenha sido menor do que o previsto, o seqüenciamento dos nucleotídeos que geraram a proteína alvo, o seqüenciamento da proteína depois de sua purificação por cromatografia de afinidade e a presença de uma banda única no Western blot asseguram se tratar da proteína alvo.

Até o momento nenhum trabalho reporta a expressão das adesinas citadas acima durante a formação do biofilme de qualquer estirpe de *X. fastidiosa*, embora a expressão de genes relacionados a elas já tenha sido mencionada. Os resultados apresentados pela técnica de Western blot sugerem que as adesinas desempenham um papel muito importante no desenvolvimento do biofilme, uma vez que as quatro proteínas estudadas foram expressas em todas as fases de crescimento, porém com diferenças de expressão nas diferentes fases de formação. Ainda pode-se

inferir que estas proteínas são inerentes ao biofilme, uma vez que, elas não foram expressas na condição planctônica de crescimento.

6.3 Imunomarcção por fluorescência das proteínas alvo no biofilme

Uma vez determinadas as fases em que as adesinas fimbriais e afimbriais são expressas, foi realizada a detecção *in situ* das proteínas alvo nas diferentes fases da formação do biofilme *in vitro*.

A marcação para a adesina fimbrial FimA demonstrou-se mais forte aos três e cinco dias, fases de adesão inicial da bactéria ao substrato. Nessas fases a densidade celular é baixa e a proteína aparenta ser expressa concentrada em algumas regiões. A medida em que a densidade celular do biofilme aumenta, a expressão da proteína parece ser mais difusa apresentando um sinal de fluorescência mais baixo. A expressão dessa proteína volta a ser mais forte aos 30 dias, onde é possível notar que a proteína volta a ser expressa em regiões concentradas, de menor densidade celular. Esses resultados sugerem que FimA é mais expressa quando a colônia apresenta um número menor de células, demonstrando novamente sua possível função de adesão inicial das células ao substrato, como discutido anteriormente. Contudo, a continuidade da expressão dessa proteína, ainda que fraca, durante todas as fases de desenvolvimento do biofilme sugere que ela também é necessária para a manutenção da estrutura.

Outra proteína fimbrial, PilC, também pôde ser localizada no biofilme. O acompanhamento da expressão de PilC ao longo do desenvolvimento do biofilme permitiu notar que sua expressão é mais acentuada quando o biofilme ainda é constituído de poucas células. Nessa fase, a adesão ao substrato é primordial e PilC apresenta uma alta intensidade de expressão sugerindo que sua função esteja envolvida com a adesão inicial das células. Uma redução da expressão dessa proteína nas fases de maior densidade celular, 15 e 20 dias, sugere que a adesão célula a célula não é dependente de PilC. Aos 30 dias de crescimento, fase de dispersão celular, é possível observar que PilC se expressa novamente, contudo, ela ocorre em grupos menores de células que parecem se destacar do biofilme maior. A expressão de PilC vista aos trinta dias por imunofluorescência concorda com o observado por Western blot onde foi possível visualizar um possível aumento de expressão aos 30 dias, o que sugere que na fase de dispersão, quando grupos celulares se destacam do biofilme, a função da proteína é novamente requerida, provavelmente

para que as células possam aderir em outros locais da superfície, dando início a formação de um novo biofilme. Esse novo aumento de expressão pode estar associado a uma sinalização celular que ocorre na fase de dispersão e seja responsável pela desagregação de pequenos grupos de células.

Para o caso das proteínas afimbriais, o padrão de expressão foi bastante diferente das fimbriais. A proteína Hsf, que forma pequenas projeções na membrana celular (St. Geme III, *et al.*, 1996), começa a ser detectada somente aos cinco dias de crescimento do biofilme, e apresenta um aumento da expressão aos dez dias. O aumento da densidade populacional do biofilme é acompanhado por um aumento da expressão dessa proteína, que pode ser encontrada bastante evidente mesmo aos 30 dias de crescimento, fase de desagregação de grupos celulares do biofilme. Os resultados da expressão de Hsf ao longo do desenvolvimento do biofilme sugerem que essa proteína é necessária quando a estrutura começa a ter sua densidade populacional aumentada e enquanto essa situação tende a ser mantida a proteína continua presente. Isso sugere que Hsf está possivelmente envolvida na função de adesão célula a célula necessária para a estruturação do biofilme.

Cotter *et al.* (2005), demonstraram que a função de adesividade da proteína Hsf de *H. influenzae* é dada por 2 domínios diferentes, mais especificamente à presença de três aminoácidos conservados nesses domínios que constitui o que os autores denominam de “bolso ácido”. Essa sequência de aminoácidos conservados seria determinante para a função de adesão dos domínios da proteína Hsf. De fato, quando mutados dois aminoácidos da sequência, a função de adesão foi abolida (Cotter *et al.*, 2005).

Interessantemente, quando comparadas as seqüências de Hsf de *X. fastidiosa* versus Hsf de *H. influenzae* através do ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>), Hsf de *X. fastidiosa* mostrou-se bastante similar a Hsf de *H. influenzae*. O alinhamento entre essas duas proteínas revelou que em Hsf de *X. fastidiosa* os aminoácidos identificados por Cotter *et al.* (2005) em Hsf de *H. influenzae* também estão presentes, o que poderia criar um bolso ácido similar ao descrito anteriormente, conferindo adesividade a proteína.

A expressão de Hsf observada por fluorescência ao longo das fases de desenvolvimento do biofilme concorda com o padrão de expressão demonstrado através dos experimentos de

Western blot, onde a proteína Hsf só foi detectada aos dez dias de crescimento do biofilme e se manteve presente até a fase de desagregação celular.

A expressão da proteína UspA1 pôde ser detectada por imunofluorescência desde os primeiros dias de formação do biofilme e aumentou conforme o aumento da densidade populacional. O acompanhamento da expressão de UspA1 ao longo do desenvolvimento do biofilme sugere um possível envolvimento dessa proteína durante as fases de adesão das células à superfície, uma vez que foi detectada já aos três dias de formação do biofilme. Outra função que pode ser atribuída a UspA1, é a de aderir a células adjacentes, embora esta pareça ser mais proeminente. A adesão célula a célula é sugerida como uma das principais funções de UspA1, principalmente pela intensidade e quantidade do sinal emitido pelos anticorpos ligados a ela à medida que o biofilme aumentou sua densidade populacional. Nessas fases, UspA1 se expressou como “ilhas”, reunindo as proteínas em locais determinados. Para entender o porquê dessas agregações protéicas foram feitas análises da sequência de UspA1 buscando-se determinar quais domínios ou regiões poderiam conferir tal caráter observado na fluorescência. Através da ferramenta de bioinformática Pfam foi encontrado que as porções referentes à âncora e a haste de UspA1 em *X. fastidiosa* são constituídas de treze regiões repetitivas (Hep_Hag), quatro delas organizadas em dois blocos. Há ainda cinco domínios de hemaglutinina (HIM) (**Figura 36A**), conferindo a ela um maior comprimento e possibilitando que proteínas próximas se agreguem mais facilmente. Desta forma, os domínios de hemaglutinina poderiam ser responsáveis pela agregação entre as proteínas, resultando em um padrão de expressão em “ilhas”, observado por imunofluorescência. Interações entre proteínas similares a UspA1 foram observadas em *Y. enterocolitica* através de proteínas YadA; imagens obtidas por microscopia eletrônica revelaram que a adesão célula a célula era mediada por essas proteínas (Hoiczyk *et al.*, 2000). Proteínas YadA também apresentam regiões repetitivas Hep_Hag, entretanto existe apenas um domínio hemaglutinina em sua estrutura. No caso da UspA1 de *X. fastidiosa*, uma agregação celular mais proeminente poderia ocorrer devido aos quatro domínios a mais de hemaglutinina apresentados sem sua estrutura (**Figura 36A**), conferindo a característica de “ilhas” protéicas.

Os testes de marcação das proteínas alvo por fluorescência estão de acordo com os resultados obtidos por Western blot e sugerem participação das adesinas fimbriais e afimbriais em quase todas as fases de formação de biofilme, porém com uma tendência de maior expressão

das proteínas fimbriais nas fases iniciais, e uma tendência de maior expressão das proteínas afimbriais durante as fases de estruturação das multicamadas celulares e maturação do biofilme.

6.4 Localização das proteínas alvo em bactérias no xilema de plantas sintomáticas

A fim de determinar se as proteínas de adesão são expressas *in planta*, foi realizada microscopia de transmissão de vasos do xilema de plantas sintomáticas infectadas por *X. fastidiosa*. Foram analisados os hospedeiros citros, vinca e hibisco, onde as proteínas fimbriais e afimbriais foram procuradas através da ligação entre os anticorpos desenvolvidos contra elas e a ligação de um anticorpo secundário conjugado com uma molécula de ouro coloidal.

Para facilitar as posteriores análises da localização celular das proteína alvo, foi realizada uma busca pelos domínios de cada uma das proteínas alvo estudadas no trabalho, utilizando a ferramenta Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/search>). Dessa maneira, seria possível obter algumas informações que auxiliariam na interpretação dos resultados encontrados.

Através da análise da seqüência de aminoácidos da proteína fimbrial FimA, foi demonstrado que ela apresenta um motivo de metilação na região N – terminal (representado por um bloco verde na figura 33) e um domínio Pilina na região C- terminal (representado por uma região em vermelho na figura 33). De acordo com as informações obtidas no Pfam, essas duas regiões são características de proteínas que constituem a subunidade da haste de pili. Esta estrutura é formada nas regiões da parede e membrana celulares.



Figura 33: Predição de domínios de FimA, a subunidade que compõe o pili tipo IV de *X. fastidiosa*. O bloco verde representa o motivo de metilação N – terminal e a região vermelha representa o domínio Pilina.

Nos experimentos de microscopia a marcação para a proteína FimA foi encontrada associada a parede celular das bactérias. Esse resultado concorda com a natureza de FimA, a subunidade do pili tipo IV, que tem sua montagem nas paredes celulares (Hultgren *et al.* 1991). A proteína mostrou-se marcada apenas como um ponto associado à parede celular e não como uma seqüência linear de pontos para o lado de fora das células. Isso pode ter ocorrido porque os

epitopos reconhecidos pelos anticorpos desenvolvidos contra FimA podem estar obstruídos nas outras subunidades em função da montagem do pili, que “empilha” essas proteínas para a formação da estrutura, sendo que estariam disponíveis para o reconhecimento apenas aqueles que estão nas etapas iniciais da montagem do pili (Hultgren *et al.* 1991). Outro fator que poderia explicar essa marcação pontual também está relacionado à montagem do pili, uma vez que as subunidades imaturas da estrutura ficam ancoradas a membrana interna e só após a clivagem do seu peptídeo sinal é que são utilizadas. A marcação vista nas fotos pode ser referente à proteína FimA imatura, que ainda não foi dirigida ao exterior celular (Jones *et al.*, 1997).

A busca por domínios da proteína PilC demonstrou que esta apresenta dois domínios GSPII_F (domínio de proteína F do sistema de secreção tipo II), que estão relacionados a formação de uma plataforma para a maquinaria do sistema geral de secreção tipo II, assim como para a montagem de pili tipo IV (<http://pfam.sanger.ac.uk/family>).



Figura 34: Predição de domínios de PilC. Os domínios GSPII_F estão representados em verde.

A marcação observada para a proteína PilC também se encontrou associada a parede das células de *X. fastidiosa*, local em que a montagem de pili tipo IV ocorre. Uma vez que os domínios encontrados para essa proteína sugerem que ela participa do processo de montagem, o local em que ela foi observada concorda com o predito.

Outro tipo de adesinas, as afimbriais também puderam ser localizadas em bactérias nos vasos do xilema dos hospedeiros analisados. Assim como para FimA e PilC, foi realizada busca por domínios dessas proteínas através da ferramenta Pfam. Análises da seqüência de aminoácidos de Hsf, revelaram que se trata de uma proteína com diversas regiões repetitivas Hep_Hag (representadas por blocos verdes na figura 35) e blocos de regiões repetitivas relacionadas a proteínas superfície de *X. fastidiosa* (representadas por blocos amarelos na figura 35), posicionados entre domínios HIM de hemaglutinina (representados por blocos vermelhos na figura 35). A região C terminal, é similar a família de proteínas YadA, uma adesina de *Y.*

enterocolitica (representada em cor de rosa na figura 35), que tem a função de adesão. A figura 35 mostra os resultados da busca por domínios de Hsf.

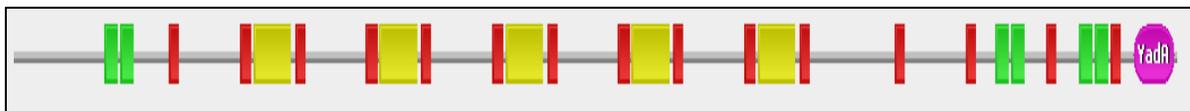


Figura 35: Resultado da busca por domínios de Hsf. Os blocos verdes representam regiões repetitivas Hep_Hag. Em amarelo são representadas regiões repetitivas relacionadas a proteínas de superfície de *X. fastidiosa*. Em vermelho, a representação dos domínios HIM, de hemaglutinina e a região C – terminal em cor de rosa, similar a família de proteínas YadA.

A microscopia de transmissão demonstrou que essa proteína se localiza na parte de fora das células de *X. fastidiosa*, o que concorda com as possíveis funções atribuídas a Hsf. De acordo com os domínios que ela apresenta, Hsf estaria relacionada à adesão celular, função de proteínas que se localizam do lado de fora das células. A localização dessa proteína através da técnica de microscopia de transmissão encontrou uma diferença entre a expressão de Hsf em vasos de xilema que apresentavam uma baixa densidade populacional de *X. fastidiosa* e aqueles que apresentavam uma grande quantidade destas bactérias, sendo que no segundo caso a quantidade de proteínas era maior. Esse resultado reforça a sugestão de sua função como sendo a de agregação celular, o que já foi sugerido segundo os resultados anteriores, obtidos por Western blot e marcação por imunofluorescência, que demonstraram o aumento de sua expressão nas fases maduras do biofilme.

As análises dos domínios encontrados para a outra proteína afimbrial, UspA1, demonstraram que ela apresenta regiões repetitivas, domínios de hemaglutininas e uma região C-terminal similar a família de proteínas YadA. Com o objetivo de saber o grau de similaridade entre UspA1 de *X. fastidiosa* e proteínas de mesma natureza de outros microrganismos, foram realizadas análises de alinhamento de seqüências de proteínas. Os resultados demonstraram que se trata de uma proteína similar a XadA da estirpe Temecula de *X. fastidiosa*, e UspA1, da bactéria *M. catarrhalis*. Esta última apresenta alta similaridade com a proteína YadA de *Y. enterocolitica*, para a qual já foram realizados estudos de caracterização da estrutura, demonstrando que YadA conta com uma âncora, responsável por fixar a proteína na membrana bacteriana, uma haste

helicoidal e uma região C –terminal globular, que lhe dá o formato de pirulito (Hoickzyc *et al.*, 2000). A figura 36A representa os domínios da proteína UspA1 de *X. fastidiosa*, em comparação com aqueles encontrados nas proteínas dos outros microrganismos nas figuras 36B, representando a proteína de *M. catarrhalis* e 36C, representando a de Temecula. No caso de UspA1 de 9a5c de *X. fastidiosa* foram encontradas 13 regiões repetitivas (Hep_Hag) nas porções referentes a âncora e haste da proteína, quatro delas organizadas em dois conjuntos (representados por blocos verdes) delimitadas por domínios HIM de hemaglutinina (representados por blocos vermelhos), em um arranjo bastante similar para as três proteínas. Domínios HIM de hemaglutinina estão fortemente relacionados a patogênese e são associados a presença de regiões Hep_Hag. A similaridade da porção C-terminal também é compartilhada pelas três proteínas, e refere-se a família YadA (**Figura 36A, 36B e 36C**).

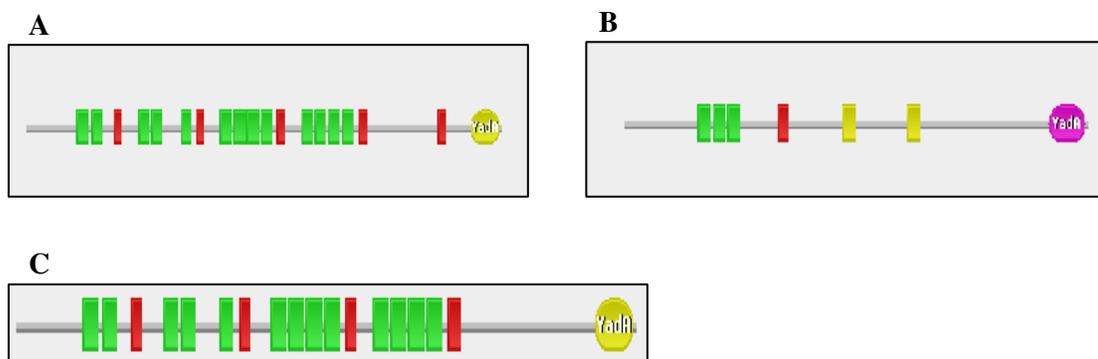


Figura 36: Comparação dos domínios de UspAs de diferentes microrganismos. **A.** UspA1 da estirpe 9a5c de *X. fastidiosa*. **B.** UspA1 de *M. catarrhalis* e **C.** XadA da estirpe Temecula de *X. fastidiosa*. Os blocos verdes representam regiões repetitivas Hep_Hag, os blocos vermelhos representam domínios HIM de hemaglutinina, os blocos amarelos representam regiões repetitivas de função desconhecida e a região C-terminal é similar a proteínas da família de proteínas YadA.

Nos experimentos de microscopia, a proteína UspA1 foi encontrada no exterior das células, o que concorda com a possível função de adesão determinada pelos seus domínios.

Hoickzyc *et al.* (2000) realizaram a marcação da localização das proteínas UspA1 de *M. catarrhalis* por microscopia eletrônica de transmissão e observaram que as proteínas se encontram na parte externa das células, muito próximas a membrana. No presente trabalho, as proteínas UspA1 de *X. fastidiosa* também puderam ser vistas utilizando a mesma técnica,

entretanto, sua localização aparentou ser mais distante da membrana externa das células. Esse fato pode ser explicado pelo tamanho de UspA1 de *X. fastidiosa*, que apresenta mais regiões repetitivas e domínios de hemaglutinina, que poderiam promover um alongamento da região da haste (**Figura 36A**). Hoicyk *et al.* (2000), observaram a marcação para UspA1 na região extracelular da bactéria *M. catarrhalis*, contudo, não reportaram o fenômeno de concentração da proteína em agregados. O padrão concentrado de expressão de UspA1 visto por microscopia de transmissão em *X. fastidiosa* reflete as “ilhas” de agregados protéicos encontrados em fluorescência (**Figura 28J e 28N**).

A marcação encontrada para todas essas proteínas de adesão quando a bactéria se encontra colonizando vasos de xilema de citros é uma evidência da sua participação no processo de colonização e oclusão dos vasos pela formação de um biofilme, sugerindo que podem ser consideradas fatores de virulência. O aumento da marcação de algumas proteínas, como UspA1 e Hsf, quando o vaso do xilema se encontra repleto de bactérias demonstra uma possível relação entre a atuação dessa adesinas e a manutenção e estruturação do biofilme *in planta*.

A detecção da expressão das adesinas estudadas nesse trabalho em todos os hospedeiros testados e em diferentes estirpes da bactéria sugere que essas proteínas são abundantes e requeridas durante a formação do biofilme. Os anticorpos contra as proteínas alvo foram desenvolvidos segundo o genoma da estirpe 9a5c e foram capazes de detectar as proteínas em diferentes estirpes de *X. fastidiosa* em diferentes hospedeiros, sugerindo um elevado grau de similaridade entre as proteínas de adesão de diferentes estirpes. De acordo com Knaust & Frosch (2004), proteínas com tais características são alvos para vacinas no caso de bactérias patogênicas de humanos, por serem amplamente expressas e bastante conservadas. Os resultados demonstraram que as proteínas fimbriais e afimbriais podem ser alvos para possíveis substâncias que interfiram na atividade das proteínas e promovam um possível controle da bactéria, através do impedimento da formação do biofilme.

Os resultados dos testes de Western blot e imunofluorescência apresentados indicam a mesma direção, que sugere a participação de adesinas fimbriais no início da formação do biofilme, quando ocorre a adesão da bactéria a superfície, e a participação de adesinas afimbriais nas etapas de maturação do biofilme, onde multicamadas celulares se agregam para aumentar estrutura. Dentre as adesinas estudadas, UspA1 merece destaque por apresentar-se expressa desde

as fases iniciais, sugerindo que a agregação celular é fundamental ainda durante a adesão da bactéria ao substrato. Além disso, a microscopia de transmissão demonstrou o envolvimento de todas as proteínas alvo no biofilme de diferentes estirpes de *X. fastidiosa* em hospedeiros distintos, sugerindo a importância de sua participação também na colonização *in planta*. A técnica foi eficaz para a detecção da expressão das proteínas alvo, mostrando ser adequada para o objetivo de localizar as proteínas em bactérias obstruindo vasos de xilema de plantas hospedeiras. Essa técnica também manteve os epitopos das proteínas disponíveis, uma vez que foram reconhecidos pelos anticorpos.

7. Considerações finais

Embora a CVC tenha sido detectada no Brasil há mais de 20 anos, os danos econômicos causados pelos altos custos no manejo da doença e pelas perdas de produção ainda são bastante elevados. A causa da doença foi atribuída à bactéria *X. fastidiosa*, que cresce formando agregados no interior dos vasos do xilema da planta, o que ocasiona seu bloqueio dificultando o transporte de água e nutrientes.

Após o seqüenciamento do genoma dessa bactéria, foi observado que ela apresentava uma maneira peculiar de crescimento e um diferenciado mecanismo de patogenicidade. A ausência de genes *avr* e de genes relacionados ao sistema de secreção tipo III, atrelada a abundância de genes que codificam para adesinas e o bloqueio dos vasos do xilema em função do seu crescimento, levaram a hipótese que o principal mecanismo de patogenicidade da bactéria é a formação de biofilme. Essa característica de crescimento como fator de patogenicidade não havia sido reportada anteriormente para nenhum outro fitopatógeno.

Esse mecanismo de patogenicidade distinto passou a ser o foco de muitos estudos envolvendo *X. fastidiosa* e, no caso da estirpe Temecula que causa doença em videiras, muito se avançou acerca da descoberta de proteínas estritamente relacionadas a formação do biofilme. Esse avanço foi devido, principalmente, a uma relativa facilidade na obtenção de mutantes de

linhagens patogênicas para características desejadas. No caso da estirpe 9a5c, causadora da CVC, informações sobre a relação direta da função de adesinas na formação do biofilme são escassas. O maior empecilho para a geração dessas informações decorre da dificuldade em se obter mutantes de linhagens patogênicas.

A necessidade da realização do presente trabalho vem da importância do crescimento em biofilme para *X. fastidiosa*, já que a não formação dessa estrutura impede a aderência da bactéria no interior do hospedeiro, acarretando insucesso na colonização. Sabe-se que proteínas com função de adesão desempenham um papel de suma importância para o processo de adesão da bactéria a superfície e posterior agregação celular que garantem o crescimento do biofilme.

O trabalho apresentado monitorou a expressão de quatro adesinas, duas fimbriais e duas afimbriais, de *X. fastidiosa* durante as fases de formação do biofilme dessa bactéria *in vitro*. As adesinas também foram marcadas *in situ* nos biofilmes de diferentes fases de crescimento, objetivando determinar o local onde se expressam na estrutura formada pela bactéria. Finalmente, foi demonstrado que as proteínas fimbriais e afimbriais também participam do processo de colonização da bactéria em diferentes hospedeiros, através de microscopia eletrônica de transmissão de secções de vasos do xilema obstruídos por *X. fastidiosa*.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que as proteínas de adesão desempenham suas funções em momentos diferentes durante as fases de desenvolvimento do biofilme. Foi observado que, majoritariamente, as proteínas fimbriais são mais expressas nas fases iniciais do biofilme, onde ocorre a adesão da bactéria a superfície. Entretanto, a expressão tanto de FimA quanto de PilC nas demais fases do biofilme não é nula, o que pode sugerir que elas também desempenham um papel de adesão entre as células. No caso de PilC, mais especificamente, foi observado um aumento de expressão na fase de desagregação celular, possivelmente em resposta a algum tipo de sinalização celular que ocorre na fase tardia de formação do biofilme. A síntese *de novo* desta proteína deve ocorrer para proporcionar a adesão de clusters de células em outra região da superfície, dando início a formação de um novo biofilme.

As proteínas afimbriais, por outro lado, demonstraram um aumento de expressão de acordo com a densidade celular do biofilme. Esse resultado sugere que a função de Hsf e UspA1 pode estar relacionada a agregação celular e estruturação do biofilme. Interessantemente, na

imunomarcção por fluorescência das proteínas em biofilme, UspA1 demonstrou um padrão de expressão em ilhas protéicas, que pode ocorrer devido a agregação entre os diversos domínios de hemaglutinina que a proteína possui em sua estrutura.

Foi observado também, através de microscopia eletrônica de transmissão, que as proteínas estudadas estão presentes em diferentes estirpes de *X. fastidiosa* e são abundantemente expressas independentemente do hospedeiro. Essas características, no caso de bactérias patogênicas de humanos, são determinantes na escolha de alvos para vacinas na tentativa de bloqueio da infecção. Sabe-se que biofilmes são estruturas muito resistentes e bactérias nessa condição de crescimento demonstram uma grande dificuldade de controle. Nesse caso, as proteínas apresentadas nesse trabalho poderiam ser alvos de substâncias que interfiram na sua função, dificultando a adesão das bactérias ao substrato ou a agregação celular, atuando em um possível controle do biofilme.

Este é o primeiro relato da expressão e comportamento de proteínas de adesão ao longo da formação do biofilme de *X. fastidiosa*. A atuação dessas proteínas durante todas as fases de desenvolvimento do biofilme demonstra sua importância para a formação do biofilme *X. fastidiosa*, o qual é totalmente dependente da eficiência da adesão das bactérias tanto no substrato quanto no canal alimentar do inseto vetor, ambos locais sujeitos a forte turbulência e pressão. Considerando-se que a formação do biofilme é a única condição em que a bactéria é capaz de colonizar com sucesso o hospedeiro e, por consequência causar a CVC, as adesinas podem ser consideradas fatores de patogenicidade e alvos para substâncias que desestremem o biofilme.

As informações obtidas no presente trabalho agregam novos conhecimentos ao modelo de colonização do xilema por *X. fastidiosa* previamente proposto pelo nosso grupo de pesquisa (De Souza *et al.*, 2006). Neste foi mencionado que nas fases iniciais de adesão haveria a atuação de proteínas fimbriais do tipo I e IV, além de proteínas afimbriais. Nas fases tardias de colonização, ou seja em biofilmes maduros, a produção de goma e mecanismos de resistência a compostos antimicrobianos seriam alguns fatores de importância para a estruturação e continuidade do desenvolvimento da colônia (**Figura 37**).

Entretanto, técnicas de Western blot e microscopia de fluorescência utilizadas no presente trabalho, demonstraram que nas fases iniciais de adesão da bactéria a expressão das adesinas FimA e PilC, representantes de pili tipo IV, foi bastante acentuada. A expressão dessas proteínas

fimbriais não é nula ao longo do desenvolvimento do biofilme e, no caso de PilC, volta a aumentar aos 30 dias crescimento. Isso pode estar associado ao início de um novo biofilme. Foi demonstrado, ainda, que proteínas afimbriais como UspA1, estão presentes nas fases iniciais de adesão da bactéria, contudo, sua expressão é fortemente aumentada de acordo com o aumento da densidade celular do biofilme, sugerindo participação na estruturação e agregação célula a célula. Outra proteína afimbrial, Hsf, parece estar mais estritamente relacionada a alta densidade celular do biofilme, uma vez que só foi encontrada no início dessa fase e se mantém expressa nas demais. Na figura 38 demonstramos um novo modelo de colonização do xilema, reunindo informações já propostas por De Souza *et al.* (2006) (Fig. 37) com aquelas geradas por esse trabalho.

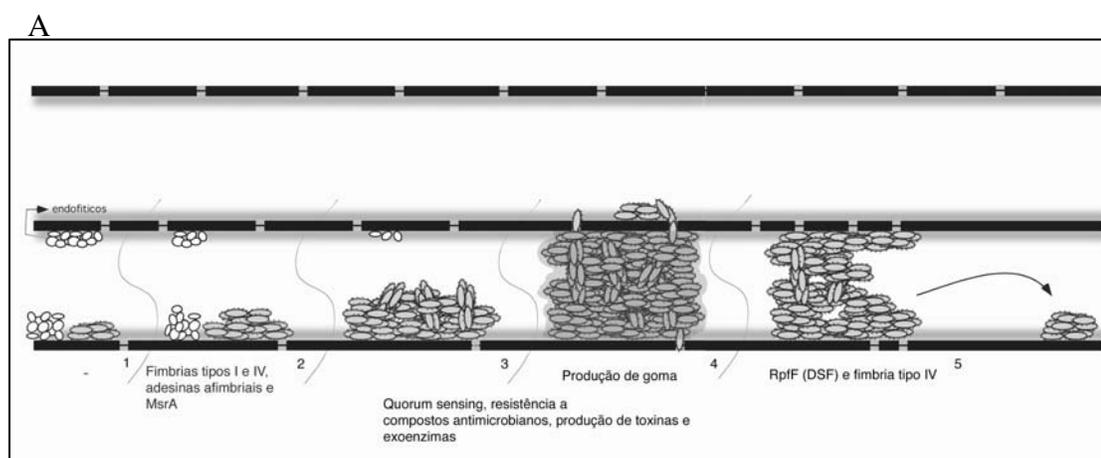
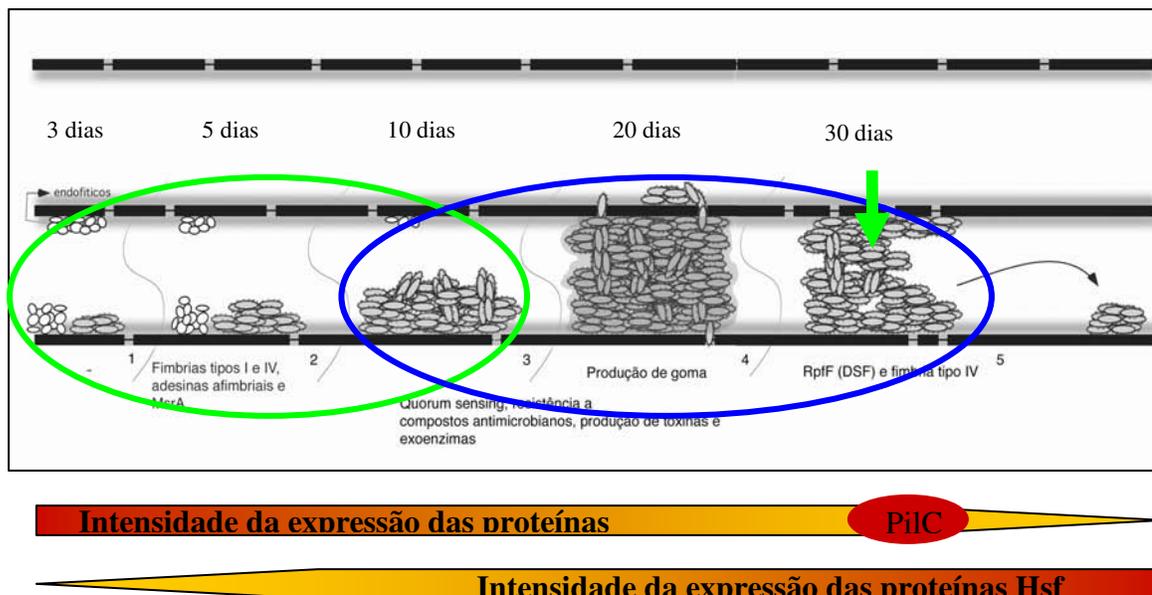


Figura 37: Modelo de interação e formação do biofilme das células de *X. fastidiosa* com a superfície do hospedeiro. Feixe vascular contendo endofíticos e seiva do xilema. 1. As células de *X. fastidiosa* são inoculadas pelo vetor. As células aderem à superfície do xilema devido a atração eletrostática mediada pela carga positiva das adesinas com a carga negativa dos vasos. 2. Multiplicação das células e início da formação do biofilme. aumento da adesão de genes associados a adesão célula a célula e manutenção da adesão pela ação da enzima metionina sulfóxido redutase. 3. Formação de biofilme maduro e ativação de genes que conferem vantagens adaptativas e competitivas para a comunidade microbiana. 4. Aumento do biofilme resultando no bloqueio do feixe vascular e movimento das células através da degradação das pit-membranas. 5. Dispersão celular, possivelmente mediada pela sinalização por pequenas moléculas difusíveis (DSF), movimento dentro do vaso através de fimbrias do tipo IV e início da formação de biofilme em outra região da superfície do xilema. De Souza *et al.* (2006).



- Fases de maior atuação das proteínas FimA e PilC.
- Fases de maior atuação das proteínas Hsf e UspA1.

Figura 38. Novos conhecimentos ao modelo de formação do biofilme proposto por De Souza *et al.* (2006). Os dias de formação do biofilme estão especificados acima das fases de crescimento. O círculo verde reúne as fases de início da formação do biofilme, onde são mais requeridas as atuações das proteínas fimbriais, FimA e PilC, estudadas nesse trabalho. A seta verde indica a fase onde a proteína PilC volta a apresentar um aumento de expressão. O círculo azul reúne as fases de aumento da densidade celular e estruturação do biofilme, onde são mais requeridas as proteínas afimbriais, Hsf e UspA1, estudadas nesse trabalho. A coloração avermelhada das setas indica o sentido do aumento da expressão das proteínas estudadas. No primeiro caso, a expressão de proteínas fimbriais é alta no início da formação do biofilme e decresce com o aumento da densidade celular do biofilme. O aumento da expressão da proteína PilC ao trinta dias, representado na seta pelo círculo em vermelho, pode estar relacionado a formação de um novo biofilme. No segundo caso, a expressão de proteínas afimbriais acompanha o aumento da densidade celular do biofilme.

8. Referências bibliográficas

- Aebi, C.; Lafontaine, E. R.; Cope, L. D.; Latimer, J. L.; Lumbley, S. L.; McCracken Jr., G. H.; Hansen, E. J. 1998. Phenotypic Effect of Isogenic *uspA1* and *uspA2* Mutations on *Moraxella catarrhalis* 035E. *Infect Immun.* **66**(7):3113-3119.
- Allegrucci, M.; Hu, F. Z.; Shen, K.; Hayes, J.; Ehrlich, G. D.; J. Post, C.; Sauer, K. 2006. Phenotypic Characterization of *Streptococcus pneumoniae* Biofilm Development. *J. Bacteriol.* **188**:7.
- Allison, D. G.; Ruiz, B.; San Jose, C.; Jaspe, A.; Gilbert, P. 1998. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* **167**:179-84.
- Anderson, G. G.; Palermo, J. J.; Schilling, J. D.; Roth, R.; Heuser, J.; Hultgren, S. J. 2003. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science* **301**:105-107.
- Barken, K. B.; Pamp, S. J.; Yang, L.; Gjermansen, M.; Bertrand, J. J.; Klausen, M.,1 Givskov, M.; Whitchurch, C. B.; Engel, J. N.; Tolker-Nielsen, T. 2008. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ. Microbiol.* **10** (9): 2331-2343.
- Bové, J. M. & Ayres, A. J. 2007. Etiology of Three Recent Diseases of Citrus in São Paulo State: Sudden Death, Variegated Chlorosis and Huanglongbing. *IUBMB Life.* **59** (4 – 5): 346 – 354.
- Cegelski, L.; Marshall, G. R.; Eldridg, G. R.; Hultgren, S. J. 2008. The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nature.* **6**:17-27.
- Chagas, C. M.; Rosseti, V.; Beretta, M. J. G. 1992. Electron microscopy studies of a xylem-limited bacterium in sweet orange affected with citrus variegated chlorosis disease in Brazil. *J. Phytopathol.* **134** (4):306-312.
- Coletta – Filho, H. D.; Diversidade e estrutura genética de populações de *Xylella fastidiosa* analisadas através de RAPD e VNTR. Campinas, São Paulo, 2002. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Biologia. p 88
- Cope, L. D.; Lafontaine, E. R.; Slaughter, C. A.; Hasemann Jr, C. A.; Aebi, C.; Henderson, F. W.; McCracken Jr, G. H.; Hansen, E. J. 1999. Characterization of the *Moraxella catarrhalis* *uspA1* e *uspA2* genes and their encoded products. *J. Bacteriol.* **181**(13): 4026-4034.
- Costerton, J. W.; Lewandowski, Z.; Caldwell, D. E.; Korber, D. R.; Lappin-Scott, H. M. 1995. Microbial Biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**:711-745.
- Costerton, J. W.; Stewart, P. S.; Greenberg, E. P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**:1318-22.

- Cotter, S. E.; Yeo, H. J.; Juehne, T.; St Geme III, J. W. 2005. Architecture and adhesive activity of the *Haemophilus influenzae* Hsf adhesin. *J. Bacteriol.* **187**(13): 4656-4664.
- da Silva, F. R.; Al Vettore, L.; Kemper, E. L.; Leite, A.; Arruda, P. 2001. Fastidious gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. *FEMS Microbiol. Lett.* **203**:165–171.
- Dalton, H. M.; Goodman, A. E.; Marshall, K. C. 1996. Diversity in surface colonization behavior in marine bacteria. *Journ. Ind. Microbiol.* **17**:228–34.
- Danese, P. N.; Pratt, L. A.; Kolter, R. 2000. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J. Bacteriol.* **182**(12): 3593–3596.
- de Souza, A. A.; Takita, M. A.; Coletta-Filho, H. D.; Caldana, C.; Goldman, G. H.; Yanai, G. M.; Muto, N. H.; Oliveira, R. C.; Nunes, L. R.; Machado, M. A. 2003 Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. *MPMI* **16**(10):867–875.
- de Souza, A. A.; Takita, M. A.; Coletta-Filho, H. D.; Caldana, C.; Yanai, G. M.; Muto, N. H.; Oliveira, R. C.; Nunes, L. R.; Machado, M. A. 2004. Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation in vitro. *FEMS Microbiol Lett.* **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. *Current Microbiol.* **50**:223–228.
- de Souza, A. A.; Takita, M. A.; Coletta-Filho, H. D.; Barata, R. M.; Camargo, L. E. A.; Machado, M. A. 2006. Genômica Funcional de Bactérias Fitopatogênicas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas RAPP* **14**:1-58.
- Defoirdt, T.; Boon, N.; Sorgeloos, P. W.; Bossier, V.; Bossier, P. 2008. Quorum sensing and quorum quenching in *Vibrio harveyi*: lessons learned from in vivo work. *The ISME Journal* **2**: 19–26.
- Feil, H.; Feil, W. S.; Detter, J. C.; Purcel, A. H.; Lindow, S. E. 2003. Site-Directed Disruption of the *fimA* and *fimF* Fimbrial Genes of *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology* **93**(6):675-682.
- Feil, H.; Feil, W. S.; Lindow, S. E. 2007. Contribution of fimbrial and afimbrial adhesins of *Xylella fastidiosa* to attachment to surfaces and virulence to grape. *Phytopathology* **97**: 3.
- Fernandes JR., W. B. 2003. "Analyses of the World Processed Orange Industry." 108 p. Ph.D. Dissertation. Gainesville, FL: University of Florida, August.

Flemming, H. C.; Thomas R. N.; Wozniak, D. 2007. The EPS Matrix: the house of biofilm cells. doi:10.1128/JB.00858-07. J. Bacteriol.

Gordon, C. A.; Hodges, N. A.; Marriott, C. 1988. Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic fibrosis-derived *Pseudomonas aeruginosa*. Journ. Antimicrob. Chemother. **22**: 667–74.

Guilhabert, M. R. & Kirkpatrick, C. B. 2005. Identification of *Xylella fastidiosa* antivirulence genes: hemagglutinin adhesins contribute to *X. fastidiosa* biofilm maturation and colonization and attenuate virulence. MPMI **18** (8):856–868.

He, C. X.; Li, W. B.; Ayres, A. J.; Hartung, J. S.; Miranda, V. S.; D. C. Teixeira 2000. Distribution of *Xylella fastidiosa* in Citrus Rootstocks and Transmission of Citrus Variegated Chlorosis Between Sweet Orange Plants Through Natural Root Grafts. Plant Disease **84**(6):622-626.

Henderson, I. R.; Navarro-Garcia, F.; Nataro, J. P. 1998. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. Trends Microbiol. **6**:370-378

Heydorn, A.; Nielsen, A. T.; Hentzer, M.; Sternberg, C.; Givskov, M. 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. Microbiology **146**:2395–407.

Hill, D. J. & Virji, M. 2003. A novel cell-binding mechanism of *Moraxella catarrhalis* ubiquitous surface protein UspA: specific targeting of the N-domain of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules by UspA1. Molecular microbiology. **48**(1):117-129.

Hill, B. L. & Purcell, A. H. 1995. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grape and four other plants. Phytopathology **85**(11):1368-1372.

Hoicyck, E.; Roggenkamp, A.; Reichenbecher, M.; Lupas, A.; Heeseman, J. 2000. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. The EMBO Journal **19** (22):5989-5999.

Hopkins, D. L. 1985. Physiological and pathological characteristics of virulent and avirulent strains of the bacterium that causes Pierce's Disease of grapevines. Phytopathology. **75**:713-717.

Hultgren, S. J.; Normark, S.; Abraham, S. N. 1991. Chaperone-assisted assembly and molecular architecture of adhesive pili. Annu. Rev. Microbiol. **45**:383-415.

Hultgren, S. J.; Abraham, S.; Caparon, M.; Falk, P.; St. Geme III, J. W.; Normark, S. 1993. Pilus and nonpilus bacterial adhesins: Assembly and function in cell recognition. Cell **73**(5):887-901.

Jones, C. H.; Danese, P.; Pinkner, J.; Silhavy, T.; Hultgren, S. J. 1997. Chaperone-assisted membrane release and folding pathway sensed by two signal transduction systems. EMBO J. **16**: 6394–6406.

- Justice, S.S.; Lauer, S. R.; Hultgren, S. J.; Hunstad, D. A. 2006. Maturation of intracellular *Escherichia coli* communities requires SurA. *Infect Immun* **74**:4793–4800.
- Knaust, A. & Frosch, M. 2004. Genome-based vaccines. *International Journal of Medical Microbiology* **294**: 295-301.
- Korber, D. R.; Lawrence, J. R.; Lappin-Scott, H. M.; Costerton, J. W. 1995. Growth of microorganisms on surfaces. In *Microbial Biofilms*, ed. HM Lappin-Scott, JW Costerton, pp. 15–45. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press.
- Körstgens, V.; Flemming, H-C; Wingender, J.; Borchard, W. 2001. Uniaxial compression measurement device for investigation of the mechanical stability of biofilms. *J. Microbiol. Methods* **46**:9–17.
- Kurz, S.; Hübner, C.; Aepinus, C.; Theiss, S.; Guckenberger, M.; Panzner, U.; Weber, J.; Frosch, M.; Dietrich, G. 2003. Transcriptome-based antigen identification for *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* **21**:768–775.
- Lafontaine, E. R.; Cope, L. D.; Aebi, C.; Latimer, J. L.; McCracken Jr., G. H.; Hansen, E. J. 2000. The UspA1 Protein and a Second Type of UspA2 Protein Mediate Adherence of *Moraxella catarrhalis* to Human Epithelial Cells In Vitro. *J. Bacteriol.* **182** (5):1364-1373.
- Lamed, R. & Bayer, E. A. 1986. Contact and cellulolysis in *Clostridium thermocellum* via extensive surface organelles. *Experientia* **42**:72–73.
- Laranjeira, F. F.; Amorin, L.; Bergamin Filho, A.; Aguilar – Vildoso, C. I.; Coletta Filho, H. D.; Fungos, Procaríotos e doenças abióticas. P511-566. Editores Mattos Junior, D.; De Negri, J. D.; Pio, R. M.; Pompeu Junior, J. 2005. Citros. Ed Makro Color. 929 páginas.
- Lawrence, J. R.; Korber, D. R.; Hoyle, B. D.; Costerton, J. W.; Caldwell, D. E. 1991. Optical sectioning of microbial biofilms. *J. Bacteriol.* **173**:6558–67.
- 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*. *Brazilian Journ of Medical and Biological Research* **35**: 645-650.
- Leite Jr, R.P. & Leite, R.M.V.B.C. 1991. Associação de *Xylella fastidiosa* com a clorose variegada dos citros. *Summa Phytopathol.* **17**:7.
- Li, Y.; Hao, G.; Galvani, C. D.; Meng, Y.; De La Fuente, L.; Hoch, H. C. and Burr, T. J. 2007. Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation and cell-cell aggregation. *Microbiology* **153**:719–726.

Luke, N. R.; Jurcisek, J. A.; Bakaletz, L. O.; Campagnari, A. A. 2007. Contribution of *Moraxella catarrhalis* type IV pili to nasopharyngeal colonization and biofilm formation. *Infect. and Immun.* **75** (12):5559–5564.

Machado, E. C.; Quaggio, J. A.; Lagôa, A. M. M. A.; Ticelli, M.; Furlani, P. R. 1994. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com clorose variegada dos citros. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* **6** (1):53-57.

Machado, M. A.; Coletta-Filho, H. D.; Souza, A. A. de; Takita, M. A.; Kuramae-Izioka, E. E. 2001. O Projeto Genoma da *Xylella fastidiosa*. *Revisão Anual de Patologia de Plantas RAPP*, **9** (1):63-77.

Mah, T. F. C. & O’Toole, G. A. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* **9**:34–39.

Mah, Thien-Fah; Pitts, B.; Pellock, B.; Walker, G. C.; Stewart, P. S.; O’Toole, G. A. 2003. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* **426**: 306-310.

Marques, L. L. R.; Ceri, H.; Manfio, G. P.; Reid, D. M.; Olson, M. E. 2002. Characterization of biofilm formation by *Xylella fastidiosa* in vitro. *Plant Disease* **86**(6): 633-638.

Meng, Y.; Li, Y.; Galvani, C. D.; Hão, G.; Turner, J. N.; Burr, T. J.; Hoch, H. C. 2005. Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus-driven twitching motility. *J. Bacteriol.* **187**(16): 5560–5567.

McMichael, J. C.; Fiske, M. J.; Fredenburg, R. A., Chakravarti, D. N., VanDerMeid, K. R., Barniak, V.; Caplan, J.; Bortell, E.; Baker, S.; Arumugham, R.; Chen, D. 1998. Isolation and characterization of two proteins from *Moraxella catarrhalis* that bear a common epitope. *Infection and Immunity.* **66**(9):4374-4381.

McMichael, J. C. 2001. Vaccines for *Moraxella catarrhalis*. *Vaccine* **19** S101–S107.

McMichael, J. C.; Fiske, M. J.; Fredenburg, R. A.; Chakravarti, D. N.; VanDerMeid, K. R.; Barniak, V.; Caplan, J.; Bortell, E.; Baker, S.; Arumugham, R.; Chen, D. 1998. Isolation and characterization of two proteins from *Moraxella catarrhalis* that bear a common epitope. *Infect. Immun.* **66**:4374–81.

Michelmore, R. 2000. Genomic approaches to plant disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: p125-31.

Moreira, L. M.; de Souza, R. F.; Almeida Jr, N. F.; Setubal, J. C.; Oliveira, J. C. F.; Furlan, J. A. F.; da Silva, A. C. R. 2004. Comparative genomics analyses os citrus – associated bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* **42**: 163-84.

Mulvey, M. A.; Lopez-Boado, Y. S.; Wilson, C. L.; Roth, R.; Parks, W. C.; Heuser, J.; Hultgren, S. J. 1998. Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **282** (5393):1494-1497.

Neves, M. & Boteon, E. M. Citricultura brasileira: aspectos econômicos. P21-36. Editores Mattos Junior, D.; De Negri, J. D.; Pio, R. M.; Pompeu Junior, J. 2005. Citros. Ed Makro Color. 929 páginas.

Newman K. L.; Almeida, R. P. P.; Purcell, A. H.; Lindow, S. E. 2003. Use of a Green Fluorescent Strain for Analysis of *Xylella fastidiosa* Colonization of *Vitis vinifera*. *Applied and Environ. Microbiol.* **69** (12):7319–7327.

Newton, J. A. & Fray, R. G. 2004. Integration of environmental and host-derived signals with quorum sensing during plant-microbe interactions. *Cell. Microbiol.* **6**:213–224.

Nichols, W. W.; Dorrington, S. M.; Slack, M. P. E.; Walmsley, H. L. 1988. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**: 518–23.

Nunn, D. 1999. Bacterial Type II protein export and pilus biogenesis: more than just homologies? *Trends in Cell Biology* **Vol19**.

Osiro, D.; Muniz, J. R. C.; Coleta Filho, H. D.; de Sousa, A. A.; Machado, M. A.; Garratt, R. C. Colnago, L. A. 2004. Fatty acid synthesis in *Xylella fastidiosa*: correlations between genome studies, ¹³C NMR data, and molecular models. *Biochem. and Biophys. Research Commun.* **323**(3): 987-995.

Ojanen-Reuhs, T.; Kalkkinen, N.; Westerlund-Wikstrom, B.; van Doorn, J.; Haahtela, K.; Nurmiaho-Lassila, E. L.; Wengelnik, K.; Bonas, U.; Korhonen T. K. 1997. Characterization of the fimA gene encoding bundle-forming fimbriae of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. *J. Bacteriol.* **179** (4):1280-1290.

O’Toole, G. A.; Kaplan, H. B.; Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:49–79.

O’Toole, G. A. & Kolter, R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **30**:295–304.

Pearson, M. M.; Laurence, C. A.; Guinn, S. E.; Hansen, E. J. 2006. Biofilm formation by *Moraxella catarrhalis* in vitro: roles of the UspA1 adhesin and the Hag hemagglutinin. *Infect. and Immu.* **74**:3.

Pinkner, J. S. 2006. Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uropathogenic bacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**:17897–17902.

Prakash, B.; Krishnappa, G.; Muniyappa, L.; Reddy, M. K. 2005. *In vitro* phase variation studies of *Salmonella* Gallinarum in biofilm Formation. Current Science **89**: 4.

Purcell, A. H.; Hopkins, D. L. 1996. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. Ann. Rev. Phytopathol. **34**:131-151.

Rigano, L. A.; Siciliano, F.; Enrique, R.; Sendín, L.; Filippone, P.; Torres, P. S.; Qüesta, J.; Dow, J. M.; Castagnaro, A. P.; Vojnov, A. A. and Marano, M. R. 2007. Biofilm Formation, Epiphytic Fitness, and Canker Development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri* MPMI **20** (10):1222–1230.

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**:1145-1157.

Rojas, M. C.; Ham, J. H.; Wen-Ling, D.; Doyle, J. J.; Collmer, A. 2002. HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings. PNAS **99**:20.

Roper, M. C.; Greve, L. C.; Labavitch, M. J.; Kirkpatrick, C. B. 2007. Detection and visualization of an exopolysaccharide produced by *Xylella fastidiosa* in vitro and in planta. Appl and Environ. Microbiol. **73** (22):7252–7258.

Saad, M. M.; Staehelin, C.; Broughton, W. J.; Deakin, W. J. 2008. Protein-protein interactions within type III secretion system-dependent pili of *Rhizobium* sp. strain NGR234. J. Bacteriol. **190** (2):750–754.

Samukawa. T.; Yamanaka, N.; Hollingshead, S.; Klingman, K.; Faden, H. 2000. Immune responses to specific antigens of *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* in the respiratory tract. Infect. Immun. **68**:1569–73.

Sauer, K.; Camper, A. K.; Ehrlich, G. D.; Costerton, J. W.; Davies, D. G. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. J. Bacteriol. **184**:1140–54.

Schaad, N. W. 2004. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. *piercei*, subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. nov. Syst. Appl. Microbiol. **27**:290-300.

Simpson, *et al.* 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. Nature **406**: 151-157.

Souza, L. C.; Wulf, N. A.; Gaurivaud, P.; Mariano, A. G., Virgílio, A. C.; Azevedo, J. L.; Monteriro, P. B. 2006. Disruption of *Xylella fastidiosa* CVC gumB e GumF genes affects biofilm

formation without a detectable influence on exopolysaccharide production. FEMS Microbiol Lett. **257** (2):236-42.

Soto, G. E. & Hultgren, S. J. 1999. Bacterial Adhesins: Common Themes and Variations in Architecture and Assembly. J. Bacteriol. **181** (4):1059–1071.

St. Geme III, J. W.; Cutter, D.; Barenkamp, S. J. 1996. Characterization of the genetic locus encoding *Haemophilus influenzae* type b surface fibrils. J. Bacteriol. **178** (21):6281-6287.

Stewart, P. S. 1998. A review of experimental measurements of effective diffusive permeabilities and effective diffusion coefficients in biofilms. Biotechnol Bioeng. **59**: 261–72.

Stewart, P. S. & Costerton, J. W. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet. **358**:135–38.

Stoodley, P.; Sauer, K.; Davies, D. G.; Costerton, J. W. 2002. Biofilms as Complex Differentiated Communities. Annu. Rev. Microbiol. **56**:187–209.

Strom, M. S.; Nunn, D. N.; Lory, S. 1991. Multiple roles of the pilus biogenesis protein pilD: involvement of *pilD* in excretion of enzymes from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. **173**:1175–1180.

Taga, M. E. & Bassler, B. L. 2003. Chemical communication among bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**:14549– 14554.

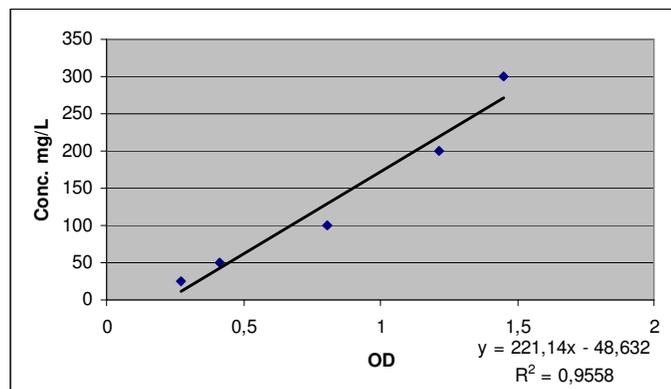
Tolker-Nielson, T.; Brinch, U. C.; Ragas, P. C.; Andersen, J. B.; Jacobsen, C. S.; Molin, S. 2000. Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. J. Bacteriol. **182**:6482–89.

Wright, K. J.; Seed, P. C. ; Hultgren, S. J. 2007. Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. Cellular Microbiology **9**(9):2230–2241.

Zobel CE. 1943. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. J. Bacteriol. **46**:39–56.

Anexo 1

Curva de BSA utilizada para comparação das concentrações das proteínas obtidas após a extração das fases de crescimento em biofilme e planctônico de *X. fastidiosa*.



Anexo 2. Produção científica durante o desenvolvimento do mestrado

1. Resumos publicados em congressos

1. STUDY OF TIME ADHESIN EXPRESSION INVOLVED IN BIOFILM FORMATION IN VITRO BY *XYLELLA FASTIDIOSA*. **Caserta, R.**; Takita, M. A.; Rosseli, L. K.; Souza, A. P.; Peroni, L.; Stach-Machado, D. R.; Andrade, A.; Labate, C. A.; Machado, M. A.; Souza, A. A. 11^o International Citrus Congress. 26 a 30 de Outubro 2008, Wuhan, China.
2. EXPRESSÃO TEMPORAL DE ADESINAS FIMBRIAIS E AFIMBRIAIS DURANTE A FORMAÇÃO DO BIOFILME DE *XYLELLA FASTIDIOSA IN VITRO* E DETECÇÃO *IN PLANTA*. **Caserta, R.**; Takita, M. A.; Targon, M. L.; Rosseli, L. K.; Souza, A. P.; Peroni, L.; Stach-Machado, D. R.; Andrade, A.; Labate, C. A.; Kitajima, E. W.; Machado, M. A.; Souza, A. A. 54^o Congresso Brasileiro de Genética. 16 a 19 de Setembro, Salvador, Bahia.
3. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA PROTEÍNA FIMBRIAL DE *Xylella fastidiosa*. **Caserta, R.**, Takita, M. A., Targon, M. L. P. N., Rosselli, L. K., Souza, A. P., Peroni, L. A., Stach-Machado, D. R., Machado, M. A., Souza A. A. 53^o Congresso Brasileiro de Genética, 2007, Águas de Lindóia/SP.
4. EXPRESSION OF GENES POTENCIALLY INVOLVED WITH 'QUORUM SENSING' IN BIOFILM OF *Xylella fastidiosa*. **Caserta, R.**; Souza, A A; Takita, M. A; Rodrigues, C. M.; Machado, M. A International Workshop on *Xylella fastidiosa*. Agosto, 2007, Campinas/SP.
5. COPPER RESISTANCE OF BIOFILM CELLS OF THE PLANT PATHOGEN *Xylella fastidiosa*. Rodrigues, C. M.; Takita, M. A.; Coletta Filho, H. D.; Olivato, J. C.; **Caserta, R.**; Machado, M. A.; Souza, A. A.. International Workshop on *Xylella fastidiosa*, Campinas/SP, 2007.
6. RESISTÊNCIA DE *Xylella fastidiosa* A Cu^{2+} E Zn^{2+} EM CRESCIMENTO PLANCTÔNICO E EM BIOFILME. Rodrigues, C. M.; Souza, A. A.; Takita, M. A.; **Caserta, R.**; Olivato, J. C.; Coletta Filho, H. D.; Machado, M. A.. In: XL Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2007, Maringá/PR.
7. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA CONTRA A TOXIDADE DE METAIS DAS CÉLULAS EM BIOFILME DE *Xylella fastidiosa*. Rodrigues, C. M.; Takita, M. A.; **Caserta, R.**; Olivato, J. C.; Coletta Filho, H. D.; Machado, M. A.; Souza, A. A. In: 53^o Congresso Brasileiro de Genética, 2007, Águas de Lindóia/SP.
8. EXPRESSÃO DE GENES POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS COM 'QUORUM SENSING' NO BIOFILME DE *Xylella fastidiosa*. **Caserta, R.**; Souza, A A; Takita, M.

A; Rodrigues, C. M.; Machado, M. A. 52^o Congresso Brasileiro de Genética, 2006, Foz do Iguaçu/RS.

9. IDENTIFICAÇÃO DO GENE *rpjH* EM DIFERENTES ESPÉCIES DE *Xanthomonas* E PATOVARES DE *Xanthomonas campestris*. **Caserta, R.**; Souza, A. A.; Takita, M. A.; Machado, M. A. 25^o Reunião de Genética de Microrganismos, 2006, São Pedro/SP.

2. Cursos

1. 23^o Curso Introdutório de Microscopia Eletrônica de Transmissão. Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, 2007, Piracicaba/SP.

2. 38^o Curso Introdutório de Microscopia Eletrônica de Varredura. Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, 2007, Piracicaba/SP.

3. Aspectos Fundamentais de Espectrometria de Massas em Análise Proteômica. 2^o Congresso Brasileiro de Espectrometria de massas, 2007, Campinas/SP

3. Publicação

COPPER RESISTANCE OF BIOFILM OF THE PLANT PATHOGEN *Xylella fastidiosa*. Rodrigues, C. M.; Takita, M. A.; Coletta Filho, H. D. ; Olivato, J. C. ; **Caserta, R.** ; Machado, M. A.; Souza, A. A. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 9, p. 1432-0614, 2007.

4. Prêmio

Prêmio pós-graduação de melhor trabalho na área de Genética de Microrganismos. EXPRESSÃO TEMPORAL DE ADESINAS FIMBRIAIS E AFIMBRIAIS DURANTE A FORMAÇÃO DO BIOFILME DE *XYLELLA FASTIDIOSA IN VITRO* E DETECÇÃO *IN PLANTA*. **Caserta, R.**; Takita, M. A.; Targon, M. L.; Rosseli, L. K.; Souza, A. P.; Peroni, L.; Stach-Machado, D. R.; Andrade, A.; Labate, C. A.; Kitajima, E. W.; Machado, M. A.; Souza, A. A. 54^o Congresso Brasileiro de Genética. 16 a 19 de Setembro, Salvador, Bahia.



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

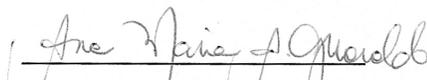
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1238-1, sobre "Expressão, purificação e caracterização de adesinas envolvidas na formação do biofilme de *Xylella fastidiosa*", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado / Luís Antonio Peroni, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 28 de março de 2007.

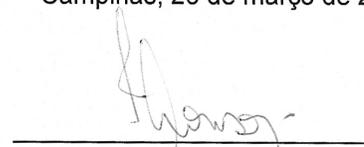
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1238-1, entitled "Expression, purification and characterization on adesins in biofilm formation *Xylella fastidiosa*", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on March 28, 2007.

Campinas, 28 de março de 2007.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva