

## ANÁLISE DA AÇÃO DA ORGANOTELURANA RF-28 SOBRE A FITOBACTÉRIA *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* (9a5c)

Renata Ozelami Vilas Boas<sup>1</sup>; Daniela Leite Jabes<sup>4</sup>

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: renataozelami@yahoo.com<sup>1</sup>  
Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: danielajabes@umc.br<sup>4</sup>

Área do Conhecimento: Genética Molecular e de Microrganismos

Palavras-chave: *Xylella fastidiosa*; Telurana; Biofilme, qPCR

### INTRODUÇÃO

*Xylella fastidiosa* é uma bactéria gram negativa, que se aglomera no interior do xilema de diversos hospedeiros, bloqueando a passagem de água e nutrientes (CHATTERJEE *et al.*, 2008). A infecção por *X. fastidiosa* 9a5c pode desencadear, nas laranjeiras, uma doença conhecida como Clorose Variiegada dos Citros (CVC) que apresenta sintomas que comprometem o fruto e inviabiliza sua comercialização (ALMEIDA *et al.*, 2005). Apesar da CVC estar controlada no país atualmente, infecções por *X. fastidiosa* vem sendo reportada em regiões da Europa e Ásia afetando pereiras, videiras, amendoeiras e oliveiras (SU *et al.*, 2013, AMANIFAR *et al.*, 2014, MARTELLI *et al.*, 2015). Organoteluranas são compostos derivados de telúrio que causam efeitos tóxicos em vários modelos celulares e animais, incluindo microrganismos como, por exemplo, *Leishmania chagasi* (EL CHAMY MALUF *et al.* 2016). Interessantemente, a telurana OTD (Octa-O-bis-(R,R)-tartarato ditelurano) demonstrou atividade antimicrobiana sobre o biofilme de *Escherichia coli*, inibindo completamente sua formação (YALEW *et al.*, 2013). Torna-se, então, interessante investigar a ação de outros compostos derivados de telúrio sobre *Xylella fastidiosa*, como a organotelurana RF-28. Neste contexto, o presente projeto teve como objetivo estudar os efeitos da telurana RF-28 sobre a fitobactéria *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* (9a5c).

### OBJETIVOS

Investigar o efeito da organotelurana RF-28 sobre a bactéria fitopatogena *Xylella fastidiosa* subsp *pauca* (9a5c), *in vitro*, avaliar o efeito de RF-28 sobre o biofilme estático de *X. fastidiosa* e verificar a modulação de genes envolvidos na síntese de biofilme e exopolissacarídeos no tratamento com RF-28 por meio de PCR quantitativo.

### METODOLOGIA

As bactérias foram crescidas na presença da telurana RF-28 (5 µM, 10 µM e 15 µM) e do antibiótico kanamicina (5 µg/mL, 10 µg/mL e 15 µg/mL), além das réplicas-controle. Ao longo do tratamento, foram retiradas alíquotas de 20 µL e depositadas em placas contendo meio PW sólido para acompanhar o padrão de crescimento. Ao final de cinco dias, o RNA foi extraído utilizando fenol-clorofórmio e purificado com *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) e o cDNA sintetizado usando *Superscript II RT* (200 U/µL – Invitrogen) e posteriormente purificado em *Microcon YM-30* (Millipore). Cada qPCR foi realizada em triplicata, sendo constituída de: 100 ng de cada cDNA, 100 nM de cada primer (*Forward e Reverse*) e 10 µL de *SYBR Green PCR Master Mix 2x*® (Applied Biosystems). A ORF XF1311 foi utilizada como normalizador. As amplificações foram realizadas em aparelho *ABI Prism® 7500 Real time PCR System* (Applied Biosystems®), nas condições indicadas

pelo fabricante. Para verificação do biofilme estático, as células foram coradas com Cristal de Violeta (1%) conforme Yalew e colaboradores (2013). A análise estatística dos dados foi feita no *Software GraphPad Prism 6*, utilizando análise de variância (ANOVA *one way*) seguido de pós teste de Tukey para as curvas de crescimento, sendo estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos mostraram que a telurana RF-28 não foi capaz de inibir significativamente o crescimento de *X. fastidiosa* nas concentrações testadas (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 15  $\mu$ M). Como esperado, a Kanamicina inibiu fortemente o crescimento, sendo letal na maior concentração testada (20  $\mu$ g/mL). Este resultado foi complementado pelos testes em placa, onde foi verificado o mesmo padrão de crescimento. Interessantemente, o tratamento com RF-28 afetou significativamente a formação do biofilme estático em *X. fastidiosa* de maneira dose-dependente. O biofilme é um importante fator de virulência diretamente relacionado ao estabelecimento da CVC e consiste em uma comunidade bacteriana unida por uma matriz extracelular composta por exopolissacarídeos. A aderência confere ao microrganismo maior resistência e adaptabilidade e impede a passagem de água e nutrientes no xilema (KILLINY *et al.*, 2013). Ensaios de qPCR avaliaram a modulação dos seguintes genes aparentemente associados a formação do biofilme: XF 2538 (*pilC*) envolvido na síntese de pilus e na agregação e adesão, XF0889 (adesina afimbrial do tipo hemaglutinina) envolvido no processo de agregação e adesão, XF 2326 (*GumJ*) e XF 0986 (*CgsA*), envolvido na produção exopolissacarídeos (EPS) e transição de um estado móvel para agregado (CASTIBLANCO & SUDIN, 2015). O gene *pilC* apresentou perfil superexpresso em resposta à RF-28, ao contrário do que era esperado. Em contrapartida, conforme previsto, adesinas afimbriais do tipo hemaglutinina apresentaram perfil sub-regulado. Porém, não foi possível detectar RNA mensageiro (mRNA) correspondente aos genes *GumJ* e *CgsA*. É importante destacar que o normalizador utilizado para estes testes: XF1311 (proteína *MreD*) (CIRAULO *et al.*, 2010) não apresentou comportamento estável nas condições experimentais empregadas, tornando o experimento inconsistente. É sabido que RNAs não codificantes, já descritos em microrganismos como *Staphylococcus aureus* (BENITO *et al.*, 2000), exercem papel na regulação da expressão gênica, ligando-se ao mRNA e afetando sua estabilidade ou prejudicando a acessibilidade do ribossomo, podendo atuar em genes envolvidos na virulência e formação de biofilme (GHAZ-JAHANIAN *et al.*, 2013). O fato de determinados genes sofrerem alterações pós-transcricionais poderia explicar a ausência de mRNA correspondentes aos genes *GumJ* e *CgsA*. Dessa maneira, nossos dados podem estar sendo mascarados por mecanismos de controle pós transcricionais. Algumas evidências para a existência desse tipo de controle em *X. fastidiosa* estão sendo avaliadas atualmente pelo nosso grupo pesquisa, em experimentos de RNAseq e análises *in silico*. Portanto, será necessário conduzir novos experimentos para elucidar plenamente esta possibilidade, haja vista que não há estudos que descrevam tal fenômeno para a bactéria em questão.

## CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que, nas concentrações testadas, RF-28 não exerce influência significativa sobre o crescimento celular *in vitro* de *X. fastidiosa* subsp *pauca*. No entanto, observou-se que o composto inibiu a formação de biofilme até mesmo nas menores concentrações testadas. Em conjunto, estes experimentos nos mostram que RF-28 parece ser capaz de inibir a formação de biofilme, sem que este efeito esteja relacionado com a inibição do crescimento. Ao contrário do

que se esperava, os ensaios de qPCR conduzidos a fim de avaliar o efeito da droga sobre determinados genes envolvidos na formação do biofilme apresentaram perfis inesperados de superexpressão e ausência de RNA mensageiro correspondente. Além disso, o normalizador utilizado apresentou comportamento instável nas condições experimentais empregadas, impossibilitando a confirmação da hipótese. Estudos mostram que genes envolvidos no processo de formação do biofilme podem sofrer influências de fatores pós transcricionais, como RNAs não codificantes. Isso poderia explicar a inconsistência dos dados gerados. Não há ainda estudos que descrevam este processo para *Xylella fastidiosa*, sendo interessante conduzir novos experimentos visando elucidar os dados obtidos aqui a respeito da resposta da bactéria frente ao tratamento com a RF-28.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, R.P.P.; BLUA, M. J.; LOPES, J.R.S.; PURCELL, A.H. Vector Transmission of *Xylella fastidiosa*: Applying Fundamental Knowledge to Generate Disease Management Strategies. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 98, n. 6, p. 775-786, 2005.

AMANIFAR, N.; TAGHAVI, M.; IZADPANAH, K.; BABAEI, G. Isolation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa* from grapevine and almond in Iran. **Phytopathol. Mediterr**, v.53, p. 318-327, 2014

BENITO, Y., KOLB, F. A., ROMBY, P., LINA, G., ETIENNE, J., VANDENESCH, F. Probing the structure of RNAlII, the *Staphylococcus aureus* agr regulatory RNA, and identification of the RNA domain involved in repression of protein A expression. **RNA Society**, p. 668-679, 2000

CASTIBLANCO, L. F. & SUNDIN, G. W. New insights on molecular regulation of biofilm in plant-associated bacteria. **Jour. Integrative Plant Biol**, v.58, p.362-367, 2015.

CHATTERJEE, S.; ALMEIDA, R. P. P.; LINDOW, S. Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. **Annu. Rev. Phytopathol.** v.13, p.243-71, 2008.

CIRAULO, M. B., SANTOS, D. S., RODRIGUES, A. C. F. O., OLIVEIRA, M. V., RODRIGUES, T., COSTA DE OLIVEIRA, R. L., NUNES, L. R. Transcriptome analysis of the phyto bacterium *Xylella fastidiosa* growing under xylem-based chemical conditions. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2010.

EL CHAMY MALUF, S.; MELO, P. M.; VAROTTI, F. P.; GAZARINI, M. L.; CUNHA, R. L.; CARMONA, A. K.; Hypervalent organotellurium compounds as inhibitors of *P. falciparum* calcium-dependent cysteine proteases. **Parasitol Int.** 65(1), 20-22, 2016.

GHAZ-JAHANIAN, M. A., KHODAPARASTAN, F., BERENJIAN, A., JAFARIZADEH-MALMIRI, H. Influence of small RNAs on biofilm formation process in bacteria. **Molecular Biotechnology**, n. 55, p. 288-297, 2013.

KILLINY, N.; MARTINEZ, R. H.; DUMENYO, C. K.; COOKSEY, D. A.; ALMEIDA, P. P. The exopolysaccharide of *Xylella fastidiosa* is essential for biofilm formation, plant virulence, and vector transmission. **Mol. Plant-Microbe Interactions**, v.26, p.1044-1053, 2013.

MARTELLI, G. P.; BOSCIA, D.; PORCELLI, F.; SAPONARI, M. The olive quick decline syndrome in South-East Italy: a threatening phytosanitary emergency. **European Journal of Plant Pathology**, doi: 10.1007/s10658-015-0784-7, 2015.

SU, C. C.; CHANG, C. J.; CHANG, C. M.; SHIH, H. T.; TZENG, K. C.; JAN, F. J.; KAO, C. W.; DENG, W. J. Pierce's Disease of grapevines in Taiwan: isolation, cultivation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*. **Journal of Phytopathology**, v.161, p. 389-396, 2013.

YALEW, R.; KENIGSBUCH-SREDNI, D.; SREDNI ,B.; NITZAN, Y. Antibacterial effects of the tellurium compound OTD on *E. coli* isolates. **Arch Microbiol**, 196(1):51-61, 2013.

#### **AGRADECIMENTOS**

**À UMC PELA BOLSA DE ESTUDOS, À FAEP E À UMC PELA OPORTUNIDADE DA REALIZAÇÃO DO TRABALHO, E AOS COMPANHEIROS DE LABORATÓRIO E ORIENTADORES PELO INCENTIVO E PELO APRENDIZADO.**