

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E
PESQUISA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ABORDAGEM BIOTECNOLÓGICA EM *Proteus mirabilis*

Lessandra Michelim

Caxias do Sul

2008

Lessandra Michelim

ABORDAGEM BIOTECNOLÓGICA EM *Proteus mirabilis*

**Tese apresentada ao Programa
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade de
Caxias do Sul, visando a obtenção
de grau de Doutor em Biotecnologia.**

Orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray

Co-orientadores: Prof. Dr. Sérgio Olavo Pinto da Costa

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Longaray Delamare

Caxias do Sul

2008

Dedico

Aos meus pais, Eva e Vitório, pelo amor incondicional e incentivo permanente para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao meu marido, Nei, pelo carinho e compreensão por tantos momentos suprimidos de nossas vidas em respeito aos meus projetos profissionais. Muitos desafios superamos durante os anos de minha formação na pós-graduação e agora nós compartilhamos essa vitória.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray, por todo o apoio e amizades nesses anos de convívio. Sinceramente, agradeço-lhe por toda a confiança depositada em meu trabalho e por abrir as portas para um novo e estimulante caminho: a pesquisa em microbiologia molecular. Não tenho formas de expressar o quanto o convívio com seus ensinamentos e atitudes modificou minha vida. Sou-lhe muito grata por todo aprendizado proporcionado.

À Prof^a Dr^a. Ana Paula Longaray Delamare, amiga querida e irmã de coração. Foste muito mais que minha co-orientadora: uma grande companheira e incentivadora, mesmo nos momentos mais difíceis. Agradeço por todos os conselhos, pelo carinho e paciência, além do constante apoio na execução desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Sergio Olavo Pinto da Costa, ilustre mestre, pelo apoio e constante incentivo, e por saber transferir com grande entusiasmo seu interesse pela pesquisa microbiológica.

Aos professores do Instituto de Biotecnologia, em especial ao Prof. Dr. Aldo Jose Pinheiro Dillon, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pelo apoio e incentivo.

Aos professores Dagoberto Vanoni Godoy e Diego Bonatto, pelo apoio, incentivo e orientação nos vários encontros para adequação do trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Aplicada e Biotecnologia Vegetal IB/UCS, em especial à Manuela, Luciana, Cristiane e Jucimar, pelo companheirismo e dedicação, além do incansável auxílio na execução deste trabalho.

Ao Juliano Fracasso, médico residente do Programa de Residência em Infectologia do Hospital Geral de Caxias do Sul, pelo auxílio constante e amizade sincera.

Ao Dr. José Atti e ao Dr. Petrônio Oliveira Filho pelo carinho, incentivo e apoio.

Além de amigos de todas as horas, agradeço pela confiança em meu trabalho.

Aos amigos e colegas do Hospital Geral e Universidade de Caxias do Sul, Dr. Celso

Coelho, Dr. Darcy Pinto, Dr. José Mauro Madi, Dr Asbrubal Falavigna e Dr

Mauro Bertelli, pelo apoio nos momentos difíceis e pelo carinho de sempre.

Às colegas de Controle de Infecção Aline Eberle e Roberta Pola do Hospital Geral

de Caxias do Sul, e Andressa Marques da Silva e Luciana de Camargo do

Hospital Unimed, pelo carinho, amizade e apoio nos momentos difíceis.

À diretoria do Hospital Geral de Caxias do Sul, Dr. Raul Balbinot, Dr. Sergio

Freitas e Sr. Sandro Junqueira, pelo incentivo a minha qualificação

profissional.

À diretoria do CECS e à Coordenação do Curso de Medicina, pelo apoio para a

realização desse trabalho.

À Universidade de Caxias do Sul, por ter proporcionado a mais um de seus docentes

aprimorar conhecimentos e crescer profissionalmente.

INDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE QUADROS	xii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL	03
2.1. Gênero <i>Proteus</i>	03
2.1.1 Importância de <i>Proteus spp.</i> como agente patogênico	04
2.1.2 Métodos moleculares na caracterização de <i>P. mirabilis</i>	06
2.1.3 Fatores de patogenicidade de <i>Proteus spp.</i>	08
2.1.3.1 Urease	09
2.1.3.2 Hemolisinas	12
2.1.3.3 Metaloproteases	14
2.2. “Quorum sensing” e fatores de patogenicidade em <i>P. mirabilis</i>	19
2.3. Atividade antimicrobiana de compostos vegetais	22
2.3.1. Óleos Essenciais	31
2.3.2. Terpenos	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
CAPÍTULO 01. COMPARISON OF DIFFERENT PCR BASED MOLECULAR MARKERS FOR THE CHARACTERIZATION OF <i>Proteus mirabilis</i> CLINICAL ISOLATES.	36
Abstract	37
Introduction	38
Material and Methods	39
	vi

Results	42
Discussion	45
References	47
CAPÍTULO 2. THE EFFECT OF MONOTERPENES ON SWARMING DIFFERENTIATION AND HAEMOLYSIN ACTIVITY IN <i>Proteus mirabilis</i>.	55
Abstract	56
Introduction	57
Results and Discussion	58
Experimental	62
References	64
CAPÍTULO 3. THE EXTRACELLULAR METALLOPROTEASE COMPLEX OF <i>PROTEUS MIRABILIS</i>.	74
Abstract	75
Introduction	76
Material and Methods	77
Results and Discussion	78
References	83
4. CONCLUSÕES	91
5. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR	93

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1- (Figure 1) Examples of the profiles obtained using the five PCR methods. A. RAPD OPA11, B. ERIC-PCR, C. ISSR 6, D. BOX-PCR, E. REP-PCR. Samples (from left) IB Pro101 and 102, IB Hal 103, IB Eco 104, IB Pro 105 to IB Pro 107, IB Mor 108, and IB Pro 109 and 110.	53
Figura 2- (Figure 2) Dendrograms obtained for <i>P. mirabilis</i> and outgroup species using different PCR fingerprinting methods. A. BOX, B. REP-PCR, C. RAPD, D. ISSR and E. ERIC-PCR.	54
Figura 3- (Figure 1) Swarming of <i>Proteus mirabilis</i> L68 on LB swarming agar plates without terpenes (a), and with 0.5 mg/L of α -terpineol (b) and 0.3 mg/ml citronellol (c). Incubation period of 24h at 37°C.	69
Figura 4- (Figure 2) Effect of selected monoterpenes on the swarming behavior of <i>Proteus mirabilis</i> (L68 wild strain): ● control (no terpenes), ○ pulegone (0.5 mg/L), ▲ citral (0.5 mg/L), △ geraniol (0.3 mg/L), ■ citronellol (0.3 mg/L), □ α -terpineol (0.5mg/L). The data represent the averages of colony diameter of three independent experiments with standard deviations.	70

Figura 5- (Figure 3) Histogram showing the swarming migration of *P. mirabilis* in the presence of different concentrations of glycerol and selected monoterpenes. Data represent the average of three independent experiments. 71

■ Control ☒ 0.06 mg/L, □ 0.12 mg/L, ▨ 0.25 mg/L, ■ 0.50 mg/L and □ 0.75 mg/L.

Figura 6- (Figure 4) Effect of selected monoterpenes on the cell length of *P. mirabilis* L68. The concentration of monoterpenes added were 0.3 mg/L for citronellol and geraniol, and 0.5 mg/L for citral, pulegone and α -terpineol. Data represent the average of three independent experiments. 72

Figura 7- (Figure 5) Effect of selected monoterpenes on the haemolysin activity of *P. mirabilis* L68. The concentration of monoterpenes added were 0.3 mg/L for citronellol and geraniol, and 0.5 mg/L for citral, pulegone and α -terpineol. Data represent the average of three independent experiments. Vegetative cells (white bars), Swarming cells (gray bars). 73

87

Figura 8 – (Figure 1) Local structure of the metalloproteases coding region in *P. mirabilis* HI4320 (gi:197283915) genome (3723440 e 3739246 pb). (A) Intergenic region downstream Zap operon showing the predicted σ^{28} promoter (-35 and -10 sequences) and the Shine-Dalgarno sequence, and (B) a predicted precocious rho-independent terminator in the intergenic region between zapA and zapB.

Figura 9- (Figure 2) Relationship between some bacterial metalloproteases inferred using the Neighbor-Joining method. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (100 replicates) is shown next to the branches.	88
Figura 10- (Figure 3) Tri-dimensional model of the <i>P. mirabilis</i> mirabilisin (A) and the model metalloprotease (serralysin) of <i>Serratia marcescens</i> .	90
Figura 11- (Figure 4) Conserved zinc binding motif and active site of the mirabilysin of <i>P. mirabilis</i> .	90

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1- (Table 1) List of isolates used, their origin, sample source, and antibiotic resistance.	51
Tabela 2- (Table 2) Primers sequences.	52
Tabela 3- (Table 3) Pearson product-moment correlation coefficient between similarity values obtained with genetic fingerprinting methods.	52
Tabela 4- (Table 1) Minimum inhibitory concentration (MIC) and the effect of 1/10 MIC concentration of monoterpenes on the swimming/swarming behavior of <i>P. mirabilis</i> L68.	68
Tabela 5- (Table 1) Accession numbers of the sequences used in this work.	86
Tabela 6- (Table 2) Alignment and secondary structure of the mirabilysin (ZapA) de <i>P. mirabilis</i> and the serralysin of <i>Serratia marcescens</i> . Calcium-binding repeats of c-terminal domain of serralysin subfamily (yellow) with their characteristic GgxGxD pattern, and the hydrophobic consensus motif HExxHxLGLxHP (gray).	89

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Proteus* é caracterizado pela rápida mobilidade, fenômeno denominado “swarming”. Quanto à homologia de seu DNA, apresenta apenas uma discreta relação com o da *Escherichia coli*. Frequentemente relacionado com infecções urinárias, facilitadas pela sua capacidade em degradar uréia, tem sido encontrado colonizando cateteres e sondas vesicais, principalmente a espécie *Proteus mirabilis*.

Devido a sua crescente importância na prática clínica, tanto como agente infeccioso de difícil erradicação, quanto como microrganismo com possibilidade de produzir β -lactamases de espectro expandido, seu controle no ambiente hospitalar tornou-se essencial. A necessidade da correta identificação dessa bactéria estimulou com que métodos de identificação molecular sejam constantemente estudados e aprimorados para essa finalidade. Métodos baseados em PCR têm se mostrado úteis, mas precisam ser validados para a rotina laboratorial.

Diversos fatores de patogenicidade, ou seja, características biológicas de *Proteus* que favorecem a sua participação em processos infecciosos têm sido identificados, tais como: a capacidade de mobilidade e fixação celular, produção de protease, urease e hemolisina. Diversos autores inferem que a correta co-regulação desses fatores de virulência durante a diferenciação de “swarming” está relacionada com a capacidade de colonizar e invadir o tecido do hospedeiro.

Vários estudos sugerem que extratos vegetais podem ser importantes produtos no controle de *P. mirabilis* ao interferir em sinais de “quorum sensing”, e conseqüentemente, na diferenciação celular e expressão de fatores de virulência. Neste sentido, os terpenos, compostos presentes em óleos essenciais, podem representar uma alternativa viável no controle de infecções por esses microrganismos.

As proteases microbianas vêm se destacando como importantes fatores de virulência devido a ação direta sobre proteínas do hospedeiro, particularmente imunoglobulinas. O estudo em *P. mirabilis* tem sido focalizado na protease ZapA (mirabilisina), enzima capaz de degradar IgA, IgG, entre outras proteínas. Trabalhos relatam que não somente ZapA é regulada durante o “swarming”, mas também hemolisinas, fatores ligados à diferenciação celular e hiperprodução do flagelo.

Assim sendo, na presente tese foram avaliados distintos sistemas via PCR (RAPD, ERIC-PCR, REP-PCR, BOX-PCR e ISSR) para caracterização molecular de isolados clínicos de *P. mirabilis*, o efeito de monoterpenos sobre a diferenciação celular e a produção de fatores de patogenicidade dessas bactérias, e realizado um estudo bioinformático sobre o complexo de metaloproteases com base no recentemente publicado genoma de *P. mirabilis*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL

2.1. Gênero *Proteus*

A primeira descrição do gênero *Proteus* como patogênico data de 1885, tendo sido realizada por Hauser, fato comprovado nas décadas seguintes. Atualmente, os microrganismos desse gênero são considerados bactérias oportunistas capazes de colonizar e infectar seres humanos, principalmente com deficiências anatômicas e fisiológicas (Kozalski et al., 1997).

O gênero *Proteus* é classificado como membro da família *Enterobacteriaceae*, sendo sua característica principal o fenômeno denominado “swarming”: uma migração de células da periferia da colônia que são mais rápidas quanto à mobilidade do que as das colônias centrais, movendo-se até certa distância nas placas de ágar, havendo uma redução da mobilidade e fixação da colônia. Após ocorrer a divisão celular, um novo grupo de colônias da periferia refaz o fenômeno, havendo como resultado uma aparência de colônia em anéis concêntricos, com áreas de altas concentrações de colônias alternando com áreas de baixas concentrações (Allison et al., 1992b; Genera, 2000; Pearson et al., 2008).

Segundo Kozalski et al. (1997), microrganismos desse gênero são comumente encontrados no meio ambiente, principalmente em locais com água poluída e solos com material degradado, participando da decomposição de matéria animal, já que esses

bacilos exibem atividade proteolítica em condições de aerobiose e são anaeróbios facultativos. A deaminação oxidativa dos aminoácidos e a habilidade em hidrolisar uréia em amônia e dióxido de carbono são as propriedades bioquímicas de maior representatividade desses bacilos.

Apesar dessa característica saprofítica do *Proteus* em meio ambiente e no intestino humano e de animais domésticos, em condições favoráveis a sua proliferação pode ser um agente patogênico importante, principalmente em pacientes geriátricos, psiquiátricos, paraplégicos e imunodeprimidos (O'Hara et al., 2000). Autores relatam ser um freqüente agente de infecções nosocomiais, principalmente em pacientes de unidades de terapia intensiva (UTIs), onde tem sido responsável pela autoinfecção através da seleção antimicrobiana, já que faz parte da flora intestinal (Wu et al., 2008); além dos casos de bacteremia e transmissão entre pacientes pela falta de cuidados com lavagens de mãos de profissionais da saúde (Pearson et al., 2008). Esses processos infecciosos estão principalmente associados a três espécies de *Proteus*: *P. vulgaris*, *P. mirabilis* e *P. penneri*.

2.1.1 Importância de *Proteus spp.* como agente patogênico

Atualmente, *Proteus spp.* tem sido descrito como importante agente infeccioso tanto de infecções comunitárias, quanto hospitalares (Tortora et al., 2000). Entre os processos infecciosos causados por esses bacilos, destaca-se a infecção urinária, que segundo Chow et al. (1979), pode ser dividida em duas categorias: infecções sistêmicas (ou hematogênicas) e infecções ascendentes (na qual ocorre a colonização de todo o trato urinário, desde a uretra até o rim). O segundo tipo de infecção é a mais freqüente, principalmente pela espécie *P. mirabilis*, que coloniza cateteres urinários ou pacientes com anormalidades anatômicas, ou mesmo após procedimentos cirúrgicos urológicos

(Li et al, 2002; Pearson et al, 2008). Warren et al. (1996) descreve que *P. mirabilis* é considerado a terceira causa de infecção urinária complicada, após *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, correspondendo a 12% dos processos infecciosos; já em bacteriúria por cateter de longa permanência, é a segundo agente mais freqüente após *Escherichia coli*, ocorrendo em 15% dos casos. Esses dados são confirmados por trabalhos publicados recentemente (Burrall et al, 2004; Himpsl et al, 2008).

As infecções causadas por bacilos do gênero *Proteus* são caracterizadas como de longa permanência e difícil tratamento, podendo muitas vezes levar ao óbito (Penner, 1992). As complicações freqüentes são urolitíase, obstrução de cateteres urinários, litíase vesical, além de complicações renais como pielonefrite (Pearson et al., 2008). Há também a descrição no trabalho de Larsson et al. (1978) de haver uma maior incidência desse tipo de agente em infecções urinárias em crianças do sexo masculino, enquanto a *Escherichia coli* é o principal agente isolado no sexo feminino.

Além das infecções urinárias, *P. vulgaris* e *P. mirabilis* têm sido descritos (Penner, 1992) como agentes de infecções em trato respiratório superior, oftalmite, feridas operatórias, infecções em grandes queimados, bem como gastroenterites e enterocolites (Engler et al., 1990). Deighton et al. (1992) citam a participação desse microrganismo na artrite reumatóide, pois foram encontrados anticorpos anti-*Proteus* em pacientes com exacerbação da doença. Senior et al. (1995) concluíram em seu estudo que pacientes com artrite reumatóide comprovada laboratorialmente (com fator reumatóide positivo) apresentam elevados níveis de anticorpos séricos IgM anti-*P. mirabilis*, mas não de IgG. Também, nesse mesmo trabalho, foram encontrados altos níveis séricos de IgA anti-*P. mirabilis*. Além disso, tanto Senior et al. (1995) quanto Rashid & Ebringer (2007) concluíram que anticorpos anti-*Proteus* foram encontrados

em maior quantidade em pacientes com artrite reumatóide aguda do que anticorpos para outros gêneros bacterianos.

Como já observado, as espécies com maior prevalência em processos infecciosos são *P. vulgaris* e *P. mirabilis*, porém *P. penneri* também tem sido descrito como agente de infecções urinárias e síndromes gastrointestinais. Apresenta os mesmos fatores de virulência que as demais espécies do gênero, mas as propriedades bioquímicas da enzima urease são únicas, distinguindo-se da urease de *Providencia spp.*, *Morganella spp.* e outros *Proteus spp.* (Drechsel et al., 1993; Kosalski et al., 1997). Outra característica dessa espécie de *Proteus* é a sua resistência ao cloranfenicol (Hickman et al., 1982; Fuksa et al., 1984). Muitos trabalhos têm estudado a resistência aos antimicrobianos do *P. penneri*, sendo que Lukomski et al. (1993) descrevem a possibilidade dessa resistência ser mais do tipo cromossômica do que plasmidial.

2.1.2 Métodos moleculares na caracterização de *P. mirabilis*

P. mirabilis tem sido identificado e classificado por métodos microbiológicos diretos e de automação, porém como a sua importância em infecções em imunodeprimidos e o desenvolvimento de resistência a inúmeros antimicrobianos têm crescido nos últimos anos, novos métodos estão sendo estudados para auxílio no diagnóstico (Coenye et al., 2002; Wu et al., 2006). Com o aumento da identificação dessa bactéria como agente patogênico de surtos hospitalares, com um perfil de sensibilidade antimicrobiana restrito devido a produção de β -lactamases de espectro expandido, diversos trabalhos salientam a necessidade de métodos rápidos e práticos de identificação para o controle desse microrganismo no ambiente hospitalar (O'Hara et al., 2000; Pearson et al., 2008; Wu et al., 2008).

A genotipagem bacteriana contribui com novas oportunidades para identificação de clones e sua disseminação, bem como é de grande auxílio em estudos epidemiológicos a fim de desenvolver estratégias de controle de microrganismos, avaliação de interrelação entre cepas e presença de genes de multirresistência (Kim et al., 2004; Wu et al., 2006; Wu et al., 2008). A escolha correta do método a ser utilizado é fundamental.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – polymerase chain reaction) é uma técnica que consiste na amplificação de um grande número de cópias de DNA por meio da utilização de iniciadores e de uma polimerase termoestável (Taq DNA polimerase), que sintetiza cópias do fragmento de DNA a partir de uma única molécula de DNA molde em um termociclador (Coenye et al., 2002). Essa técnica revolucionou o diagnóstico de agentes infecciosos, a tipagem e caracterização, o mapeamento genômico e a vigilância epidemiológica hospitalar (Lu et al, 2000; Sabbuba et al, 2003).

Desde os primeiros relatos de seu uso na década de 80 e 90, sua aplicabilidade na área da saúde tem sido de grande valia (Versalovic et al., 1994). A reação da PCR em testes diagnósticos está baseada na utilização de iniciadores específicos construídos a partir de uma seqüência repetitiva do genoma (seqüência-alvo). Os produtos de amplificação podem ser facilmente visualizados através de técnicas de eletroforese em géis de agarose ou poliacrilamida corados pelo brometo de etídeo ou pela prata, além de sua detecção com o uso de sondas genéticas. Os produtos de amplificação podem ainda ser submetidos à restrição com diferentes endonucleases, clonagem ou ao seqüenciamento genômico (Yang & Rothman, 2004).

Entre os métodos moleculares baseados em PCR utilizados para estudos de discriminação de bactérias estão: RAPD (random amplified polymorphic DNA), um método bastante eficiente para análise de bactérias (Nicolas-Chanoine & Espinasse-

Maes, 1997); enquanto ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence), REP (repetitive extragenic palindromic sequence) e BOX (repetitive intergenic sequence elements of *Streptococcus*) foram desenvolvidos especificamente para análise de procariotos (Szczyka & Kaznowski, 2004).

No caso do gênero *Proteus*, a Ribotipagem e o PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) provaram ser eficazes na identificação das várias espécies (Pignato et al., 1999), principalmente no caso de *P. mirabilis* (Pfaller et al., 2000; Sabbuba et al., 2003). Porém, devido ao custo relacionado a essas técnicas, bem como limitações de aplicação como rotina, métodos moleculares precisam ser validados para *P. mirabilis*. RAPD tem sido usado com sucesso na identificação de *P. mirabilis* (Bingen et al., 1993; Nicolas-Chanoine & Espinasse-Maes, 1997) e *P. penneri* (Hoffmann et al., 1998). Além desse método, recentemente ISSR (intergenic single sequence repeats) se mostrou útil na discriminação de *P. mirabilis* (Cieslikowski et al., 2003). A utilização de métodos moleculares de diagnóstico pode ser muito útil na confirmação de infecção cruzada e no acompanhamento de cepas em programas de vigilância epidemiológica, tanto na comunidade, quanto no hospital.

2.1.3 Fatores de patogenicidade de *Proteus* spp.

Diversos trabalhos, como o de Kozalski et al. (1997), têm abordado fatores de patogenicidade desse gênero de microorganismo. Os fatores de patogenicidade mencionados como a presença de fimbrias, flagelos, enzimas e toxinas aparentam atuar em conjunto, justificando a dificuldade em atingir o sucesso na terapêutica clínica (Hacker & Goebel, 1987; Pearson et al., 2008). Os dois fatores que melhor estão descritos e investigados são urease e o fator ligado ao flagelo, mas os outros fatores como hemolisinas, aderência e proteases são igualmente importantes (Zhao et al., 1999;

Jones et al., 2005). Na verdade, a evidência da correta regulação desses fatores de virulência implica na diferenciação de bacilos dessa espécie com capacidade de “swarm” em colonizar e invadir o tecido do hospedeiro (Mobley et al., 1990; Bahrani et al., 1991; Mobley, 1996; Jansen et al., 2003). A seguir, são relatados alguns fatores relacionados à atividade de urease, hemolisina e proteases.

2.1.3.1 Urease

Uréia representa o principal produto nitrogenado excretado pelo ser humano e pela maioria dos animais. A urease (uréia amidohidrolase), catalisa a hidrólise do composto em amônia e dióxido de carbono, resultando no aumento do pH urinário (Mobley & Belas, 1995; Jones & Mobley, 1988), o que geralmente resulta em precipitação de íons solúveis e, conseqüentemente, a formação de cálculos renais. Segundo McLean et al. (1988), a atividade da urease tem sido descrita em mais de 200 espécies de bactérias gram-positivas e gram-negativas, salientando-se como importante fator de patogenicidade no gênero *Proteus*, e essa atividade tem sido utilizada para distingui-lo de outros membros da família das enterobactérias.

Jones & Mobley (1988), publicaram em seu estudo que a maior parte da urease de *P. mirabilis* está localizada em fração solúvel citoplasmática, apesar de em outro estudo utilizando microscopia eletrônica (McLean et al., 1986) associaram-na ao periplasma e membrana. A atividade da urease do *Proteus* pode ser inibida por análogos estruturais da uréia (hidroxiuréia, tiouréia, metiluréia), acetohidroxiamicina, ácido hipúrico, fosforamidas e ácidos bóricos (Bijlsma et al., 1995). Segundo descrição do trabalho de Rando et al. (1990), um aumento na atividade dessa enzima ocorreu com a inserção pós-translacional de níquel na apourease.

O operon da urease de *P. mirabilis* tem 6.45 kDa e apresenta sete “open reading frames”: da *ureA* ao *ureG*. As proteínas determinadas pelo *ureA*, *ureB* e *ureC* são as subunidades estruturais: α (UreA), β (UreB) e γ (UreC), com as respectivas massas moleculares de 11.0, 12.2 e 61.0 kDa. Os polipeptídeos adicionais UreD, UreE e UreF (com 31.0, 17.9 e 23.0 kDa respectivamente) são codificados por genes acessórios e estão envolvidos na inserção do íon níquel na apoenzima (Jones & Mobley, 1988). Para a realização da atividade enzimática completa do *P. mirabilis*, o polipeptídeo UreG, com 22.4 kDa, também é necessário. A ausência de *ureD*, *ureF* e *ureG* resulta na produção de uma enzima inativa sem o íon níquel, enquanto a ausência de *ureE* apenas diminui a atividade da enzima. Especula-se que o UreD tenha um papel de proteína chaperona urease específica, útil na ativação da proteína urease (Mobley & Belas, 1995).

A transcrição dos genes estruturais *ureA*, *ureB* e *ureC* é reprimida pela proteína codificada pelo *ureR*. Nickolson et al. (1991) relatam que a desrepressão da transcrição, provavelmente devido a ligação da uréia ao *ureR*, libera a expressão dos genes estruturais responsáveis pela síntese da urease. Estudos descrevem a descoberta de que o *ureR* é transcrito do seu próprio promotor na direção oposta a transcrição do restante do operon. Acredita-se que o UreR tenha 33.4 kDa, característica de uma proteína regulatória de ligação ao DNA, com 18 resíduos de Glu e 16 de Lys, que provavelmente atuam na ligação ao DNA. A UreR ativa a transcrição de genes estruturais da urease, *ureD* e *ureA* do promotor “upstream” do *ureD* (Mobley & Chippendale, 1990; Island & Mobley, 1995).

Diversos autores, como Musher et al. (1975), têm estudado e comprovado a importância da urease em processos infecciosos. Johnson et al. (1993) utilizaram um mutante constitutivo urease-negativo de *P. mirabilis* com uma mutação de inserção com

ureC para provar a importância da urease em infecções urinárias ascendentes em experimentos com ratos. Esse mutante apresentava 50% da dose infectante maior que a amostra inicial sem a inserção. O mutante foi eliminado da bexiga, enquanto amostras urease-positivas permaneciam aderidas ao epitélio vesical e renal, e causavam um maior número de lesões.

P. mirabilis e *P. penneri* são as espécies de maior importância implicadas na litíase renal e vesical (Radzilewska-Lebrecht et al., 1993), sendo a urease de grande importância na formação de cristais nesses locais (Clapham et al., 1990). É sabido que a hidrólise da uréia ocasiona o aumento do pH urinário, propiciando a precipitação de componentes como cálcio e magnésio, resultando na formação de estruvita e carbonato de apatita (Mobley & Hausinger, 1989).

Além da atividade da urease, a formação de cristais também é facilitada pela presença de um fluido orgânico semelhante a um gel constituído de exopolissacarídeos, denominado glicocálice, que auxilia na adesão da bactéria à superfície dos tecidos. Como a bactéria consegue se dividir dentro desse glicocálice, ela forma uma rede de colônias ou o que se denomina biofilme, o qual a protege de leucócitos e antimicrobianos, além de facilitar a adesão de íons metálicos que estão próximos. Clapham et al. (1990) demonstraram em seus experimentos “in vitro” o crescimento de cristais de estruvita juntamente com o biofilme de *P. mirabilis*. Já o estudo de McLean et al. (1988) descreve toda a formação do cristal: primeiramente o *P. mirabilis* ascende sobre o trato urinário, coloniza o uroepitélio e então forma colônias envoltas pelo glicocálice, que facilita a adesão das colônias no local; posteriormente a produção de uréia aumenta o pH local, possibilitando a precipitação de cristais de estruvita e carbonato de apatita, os quais se depositam no glicocálice, protegendo as colônias da agressão de antimicrobianos e células de defesa do hospedeiro. Nesse meio protegido,

as bactérias continuam reproduzindo-se e produzindo urease, havendo crescimento nesse microambiente dos cristais de estruvita e apatita, dando aparência final de uma grande colônia bacteriana “fossilizada” (Clapham et al., 1990).

2.1.3.2 Hemolisinas

Hemolisinas secretadas por *P. mirabilis* são extremamente comuns em isolados clínicos, apresentando essa atividade hemolítica tanto na ausência (extracelular), quanto na presença de contato hemácia/bactéria (Hacker & Hughes, 1985; Mobley & Chippendal, 1990).

Em *Escherichia coli*, a secreção da proteína hemolisina ativa depende de translocação através do citoplasma e membrana externa, e já foi evidenciado que esse processo não utiliza a convencional sequência sinal N- terminal na proteína secretada (Felmlee et al., 1985), nem lise celular análoga à que efetua a liberação da colicina E (Jakes & Model, 1979). Essa nova secreção é dependente de duas proteínas: HlyB e HlyD, que são codificadas pelo gene hemolisina *hly* (Mackmann et al., 1986), e a exportação específica é conseguida através de duas proteínas secretoras localizadas entre as duas membranas que promovem o reconhecimento e direcionam a translocação da molécula de hemolisina de 107 kDa (Gray et al., 1986). Como ocorre esse processo ainda permanece obscuro; apesar de estar claro que o carbono terminal da proteína hemolisina HlyA ser essencial (Gray et al., 1986), pouco se sabe sobre as conseqüências imediatas envolvidas no reconhecimento e interação durante a secreção, ou mesmo na coordenação da síntese e secreção. A secreção da proteína HlyB tem pelo menos uma região análoga àquelas responsáveis por associação proteina: ATP nas quinases (Fry et al., 1986) e nas proteínas bacterianas de transporte (Higgins et al., 1986), indicando que este fato é essencial para a ativação da secreção da hemolisina. A organização e

seqüência de nucleotídeos dos quatro genes contínuos da hemolisina (*hlyC*, *hlyA*, *hlyB*, *hlyD*) são conservados nos plasmídios e cromossomos como nas cepas de *E. coli*. Esses genes, apesar de apresentarem G+C contendo cerca de 39% no lugar de 50%, percentagem típica do genoma da *E. coli*, há suspeita de que os genes *hly* não se originaram dessa espécie (Koronakis et al., 1987).

No gênero *Proteus*, a hemolisina HpmA é codificada pelo locus *hpmBA* e sua produção parece estar na dependência da regulação da síntese de flagelo durante a diferenciação em células hiperflageladas capazes de realizar “swarming” (Allison et al., 1992b). Segundo trabalho de Fraser et al. (2002), foi identificado um promotor “upstream” σ^{70} do *hpmB*, cuja regulação está associada ao “swarming”. Este promotor também parece ser necessário para a transcrição imediatamente distal do gene *hpmA*, e a transcrição instável de *hpmBA* gera um mRNA *hpmA* estável e um mRNA *hpmB* instável. A fusão experimental de *luxAB* com a região 5' do DNA dos genes *hpmA* e *hpmB* confirmou que a atividade do promotor *hpmB* σ^{70} aumenta em células que realizam “swarming”, e que não existe um promotor independente do *hpmA*. O aumento da transcrição do operon *hpmBA* em células que realizam “swarming”, segundo Fraser et al. (2002), está na dependência de uma seqüência com 125 pares de bases 5' do promotor σ^{70} . A seqüência expõe sítios de ligação para a proteína reguladora de resposta a leucina (Lrp). A influência da expressão de *hpmBA* em reguladores positivos de “swarming”: FlhD₂C₂ (codificados pelo operon flagelar mestre), Lrp e o regulador do operon mestre localizado na membrana (UmoB) foram estudados por Fraser et al. (2002). Esses autores observaram que uma maior expressão desses fatores aumentava de forma moderada a transcrição de *hpmBA* em *P. mirabilis*. Também foi relatado que o operon *hpmBA* não foi expresso em nenhum mutante de *flhDC*, *lrp* ou *umoB*. A expressão em mutantes não foi recuperada pela complementação cruzada, ou seja, pela

superexpressão de FlhD₂C₂, Lrp ou UmoB. A expressão do gene *zapA*, o qual como o gene *hpmBA* também é regulado em associação com a capacidade de realizar “swarming”, não necessita de Lrp, mas do *flhDC* que é regulado pelo UmoB. Os resultados do trabalho de Fraser et al. (2002) indicam possibilidade de ligações para controle de expressão de genes de virulência e a diferenciação de células que realizam “swarming”.

2.1.3.3 Metaloproteases

Allison et al. (1992a) demonstraram, em seu estudo, que a diferenciação de colônias na forma vegetativa de *P. mirabilis* para a forma flagelada e filamentosa, que possui capacidade de realizar migração, é acompanhada de um significativo aumento da atividade de fatores de virulência como a presença de proteases. Já que a capacidade de invadir o uroepitélio é uma característica das células flageladas, a atividade proteolítica tem sido considerada como um fator importante na diferenciação do potencial de virulência em *P. mirabilis* (Warren et al.; 1982). Estão descritas como proteases: a mirabilisina (codificada pelo gene *zapA*), a proteína ZapE (codificada pelo gene *zapE*), a subunidade alfa da Urease que é uma homóloga não-peptidase da família M38 (codificada pelo gene *ureC*), a proteína ativadora da hemolisina que é uma homóloga não-peptidase da família M19 (codificada pelo gene *hpmB*), a Beta-Lactamase classe C que é homóloga não-peptidase da família S12 (codificada pelo gene *bla* CMY-4) e a protease SMT que é uma peptidase da família U32 (cujo gene codificador não foi descrito até o momento) (Wassif et al., 1995). Recentemente, outras Beta-Lactamases têm sido associadas a *P. mirabilis*, principalmente as de espectro expandido (ESBL), como a CTX-M (codificada pelos genes *bla* CTX-M), relatadas em diversos trabalhos (Rao et al., 1998; Karapavlidou et al., 2005; Wu et al., 2006; Wu et al., 2008).

A IgA, na forma de proteína secretória (*sIgA*), é um dímero de IgA unido por uma cadeia “J” que contém o componente secretório encarregado de transportar a molécula-anticorpo. A IgA é predominante em secreção mucóide e sua função é proteger a membrana mucosa e tecido adjacente de bactérias e seus produtos. A *sIgA* é particularmente resistente à degradação por enzimas proteolíticas, existindo apenas alguns microrganismos capazes de sintetizar enzimas proteolíticas extracelulares que a degradam. Loomes et al. (1990) e Senior et al. (1991), demonstraram que *P. mirabilis*, *P. vulgaris* e *P. penneri* também são capazes de sintetizar proteases contra IgA.

Uma enzima extracelular com capacidade de clivar tanto anticorpos IgA quanto IgG, bem como outras proteínas não-imunoglobulinas como gelatina, caseína e albumina bovina sérica, também foi isolada de *P. mirabilis* de pacientes com infecções urinárias de repetição (Loomes et al., 1990). A atividade enzimática parecia ser devida a um polipeptídeo de 50 kDa, que provavelmente cliva a cadeia α da IgA, principalmente entre os domínios CH2 e CH3, produzindo um fragmento de 47kDa, com quebra do segmento restante de CH3. A clivagem de IgG pela protease ocorre em dois estágios: o primeiro estágio leva à eliminação dos fragmentos F(ab') e pFc, enquanto no segundo ocorre a formação do Fab e Fc (Loomes et al., 1990).

Autores descrevem que durante a infecção, *P. mirabilis* sintetiza urease que degrada a uréia, propiciando condições ótimas de pH local (alcalino) para a ação de proteases anti IgA e IgG (Loomes et al., 1992). Essas imunoglobulinas, IgA e IgG, estão presentes na urina na proporção de 1:3. Senior (1993), descreve em seu trabalho que pacientes com infecção urinária por *P. mirabilis* apresentam fragmentos de cadeia α do mesmo tamanho que os demonstrados em experimentos “in vitro”. Tais fragmentos não são identificados quando as amostras bacterianas não apresentavam atividade proteolítica.

O papel das proteases anti-IgA e anti-IgG como fatores de virulência em infecções urinárias parece ser relevante, porém não são conhecidos todos os anticorpos presentes no trato urinário e pode ocorrer também um processo de opsonização de bactérias mediado por anticorpos, e posterior adesão do fragmento Fc dos anticorpos às células fagocitárias. Esse mecanismo de defesa desempenha, provavelmente, um importante papel, já que anticorpos IgA e IgG podem ser opsônicos e o receptor Fc da IgA tem sido identificado em células polimorfonucleares humanas. Portanto, a síntese e a ação da protease acima descrita que atua no trato urinário deve diminuir, ou mesmo eliminar, a fagocitose devido à hidrólise de anticorpos opsônicos em fragmentos inefetivos (Loomes et al., 1992).

Após diversos estudos que mencionavam a existência dessa metaloprotease extracelular de *P. mirabilis*, Wassif et al. (1995) caracterizaram-na bioquimicamente e geneticamente: Zap A ou mirabilisina. Os autores descreveram que a enzima seria capaz de degradar tanto a forma secretora quanto sérica de IgA1 e IgA2, nos humanos e em ratos, bem como a IgG, tendo sua atividade estimulada pelos cátions de cálcio e magnésio disponíveis no local. A metaloprotease ZapA é muito semelhante às proteases anti-IgA e anti-IgG de *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* e *Erwinia chrysanthemi*. Todas essas proteínas pertencem a família das serralisinas de metaloproteases de zinco, que são membros da superfamília ABC de transportadores procarióticos e eucarióticos. A família das serralisinas é um ramo de um grande grupo de proteínas marcadoras de patogenicidade de bactérias: *Actinobacillus spp*, *Bordetella pertussis*, *E. coli enterohemorrágica*, *Neisseria meningitidis* e *Pseudomonas fluorescens* (Wassif et al., 1995)

A ZapA purificada é estável por longos períodos à 4°C em pH 8.0 e não é afetada pelo calor à 60°C por 5 min. A atividade enzimática é detectada entre pH 6.0 à 10.0, com ótima atividade em pH 8.0. A adição de cátions magnésio e cálcio aumentam sua atividade, enquanto EDTA a inibe. Senior et al. (1988) e Loomes et al. (1992) descrevem que a ausência do aumento da atividade enzimática em 65% com adição dos cátions bivalentes sugere que a proteína purificada já possui ligados a ela íons metálicos bivalentes. Loomes et al. (1992) também relatam que, em adição ao EDTA, 1,10-fenantrolina e α,α' -dipiridil inibem a atividade dessa enzima, enquanto a incubação na presença tanto de DFP ou iodoacetamida não produzem efeito, bem como a fosforamidona, um inibidor de algumas metaloproteases.

O gene *zapA* que codifica a mirabilisina tem sido clonado e superexpressado. A metaloprotease recombinante tem atividade sobre a IgA1 e IgG humanas, bem como a IgA2 sérica, IgA secretória, caseína e azocaseína (Loomes et al., 1993). Por outro lado, não tem atividade contra albumina sérica, citocromo C, flagelina de *P. mirabilis*, ovoalbumina ou fosforilase *b* (Wassif et al., 1995). Ainda há descrição da capacidade dessa enzima clivar outras proteínas encontradas no trato urinário, incluindo proteínas de complemento (C1q e C3) e componentes estruturais do uroepitélio (actina, tubulina, colágeno e laminina).

A seqüência de aminoácidos tem sido deduzida a partir do gene *zapA*. Um “open reading frame” (ORF) de 1473 pares de bases confere evidências de ser o gene estrutural da metaloprotease secretada. A seqüência de aminoácidos sugere uma proteína composta de 491 resíduos com massa molecular total de 54.000 Da. Baseado em análise de eletroforese em gel, a mirabilisina recombinante é composta por uma única proteína de 55 kDa (Belas, 2002). Essa enzima é rica em glicina (11.2 mol%).

A mirabilisina é homóloga as serralisinas da família M10, e as proteases do subgrupo de serralisinas são secretadas pelo cassete ligado ao ATP (ABC) da superfamília de transportadores procarióticos e eucarióticos (Higgin, 1992). Nesse sistema, três proteínas transportadoras provavelmente são combinadas para formar zonas de adesão entre membrana interna e externa, através das quais as proteínas são secretadas (Delepelaire & Wandersman, 1990). Proteínas secretadas por esse sistema não possuem seqüência sinal N-terminal, mas contém a C-terminal que é essencial para sua secreção. Esta seqüência termina com a seqüência de quatro aminoácidos DXXX, que nesse caso é DFIV (Ghigo & Wandersman, 1994). Outra característica desse grupo de proteínas secretadas é conter 4-13 repetições da seqüência GGXXGXD próximo ao sinal de secreção C-terminal. Isso funciona como uma conformação “ β -roll” que serve como um sítio de ligação para cátions cálcio (Baumann, 1994). A mirabilisina tem três sítios desses localizados em Gly343 até Asp348, Gly361 até Asp366 e Gly379 até Asp384. Um quarto sítio pode existir de Gly388 até Asn393, embora haja pouca evidência de que o último resíduo com asparagina substitua o aspartato.

Segundo o trabalho de Wassif et al. (1995), há dois ORFs adicionais “upstream” ao *zapA* contendo seqüências homólogas aos demais membros da porção do transportador dessa família, ou seja, de *S. marcescens* PrtD e PrtE. Um gene codificando a terceira proteína do sistema transportador ABC, homóloga ao PrtF, não foi encontrada, mas sua presença é hipoteticamente mencionada no presente trabalho, já que há descrição de existir espaço suficiente na área delineada pela inserção Tn5 que produzem um fenótipo Prt- para codificar quatro proteínas (ZapA mais as três proteínas do transportador ABC).

Trabalhos como o de Wassif et al. (1995) e Walker et al. (1999) descrevem a completa seqüência do operon de metaloprotease de *P. mirabilis*, contendo os genes

zapE, *zapA*, *zapB*, *zapC* e *zapD*; e o trabalho de Pearson et al. (2008) descreve, além do que o Zap E, mais três genes representados sequencialmente. O estudo de Walker et al. (1999) descreve que ZapB, ZapC e ZapD são homólogos aos transportadores proteicos extracelulares da família ABC, tendo como provável função exportar o ZapA. Já a metaloprotease ZapE apresenta homologia ao ZapA, mas diferente dessa protease, não possui a seqüência sinal C-terminal característica das proteínas transportadas pelo sistema ABC. Assim, os autores concluíram que ZapE é provavelmente uma enzima extracelular, sendo sua função ainda desconhecida.

Quanto à regulação da mirabilisina, há descrição de um mecanismo associado a “quorum sensing”, ou seja, uma comunicação entre células bacterianas pela produção de compostos sinalizadores que, quando presentes em condições apropriadas e quantidades adequadas, geram respostas específicas. Segundo descrito por Belas et al. (1998), a sinalização para a proteólise de IgA do organismo hospedeiro está relacionada a regulação da capacidade de diferenciação celular para realizar “swarming”, a qual é regulada pelo RsbA.

2.2 “Quorum sensing” e fatores de patogenicidade em *P. mirabilis*

As bactérias comunicam-se através de moléculas químicas sinalizadoras, ficando a resposta na dependência do acúmulo dessas moléculas, denominadas autoindutores (Bassler et al., 1997). A detecção desses autoindutores proporciona à bactéria distinguir entre a baixa e alta densidade populacional, e controlar a expressão de genes em resposta a mudança do número de células presentes no local (Bassler et al., 1993). Esse processo denominado “quorum sensing” proporciona a uma população bacteriana controlar a expressão gênica de toda uma comunidade, assim regulando diversos comportamentos como simbiose, patogenicidade, produção de antimicrobianos e

formação de biofilme. Estudos recentes demonstram a existência de uma linguagem específica, bem como outra universal de sinalização de “quorum sensing”, proporcionando a comunicação intra e interespécies bacterianas (Bassler, 1999; Lilley & Bassler, 2000).

A regulação desse sistema foi primeiramente descrita por Engebrecht et al. (1983) e Engebrecht & Silverman (1984, 1987) ao demonstrar a necessidade de dois componentes regulatórios: a proteína LuxI responsável pela produção do autoindutor HSL, e a proteína LuxR responsável pela ligação do HSL (autoindutor homoserina lactona) e ativação da transcrição do operon estrutural luciferase durante a alta densidade celular (Schauder & Bassler, 2001).

A habilidade do *P. mirabilis* em colonizar superfícies de cateteres e o uroepitélio tem sido atribuída à sua capacidade de realizar o “swarming” (Belas & Flaherty, 1994). O processo de diferenciação celular para capacitar a bactéria para o “swarming” ocorre em quatro fases: a) indução da diferenciação celular; b) período lag prévio a mobilidade; c) migração ativa (translocação) e d) consolidação (fase na qual a migração pára e as células retornam a morfologia inicial). O tempo entre a primeira e segunda fase é de aproximadamente 30 a 45min após a inoculação, sendo que a terceira fase (migração) só será observada após 3h (à 37°C) da inoculação. A presença do período lag e a coordenação da migração celular objetivando a formação de colônias denominadas “olho de búfalo” sugerem haver a existência de uma comunicação intercelular do tipo “quorum sensing” (Fuqua et al., 1996; Swift et al., 1996).

Durante essa comunicação, Belas et al. (1998) descrevem a importância do gene *rsbA* como regulador da capacidade de “swarming”, pois em células que apresentam sua mutação demonstraram um aumento da fase lag, a qual constitui-se em um evento dependente da densidade populacional. Esse gene codificaria uma proteína

sinal similar a histidina quinase da superfamília de reguladores de resposta bacterianos com duplo componente.

RsbA parece ter função similar ao LuxQ e BvgS, outras histidina quinases que notificam condições ambientais. Segundo Belas et al. (1998), o RsbA funciona como um sensor de membrana que controla a migração celular ao monitorar um aspecto essencial no ambiente ao redor da célula. A seqüência de aminoácidos similar entre o RsbA e LuxQ sugere que o RsbA pode ser importante no “quorum sensing”. Além disso, RsbA tem homologia com vários domínios funcionais associados com o sensor histidina quinase, que contém o resíduo de aspartato necessário para transferir o fósforo para um desconhecido regulador proteico de resposta (Schauder et al., 2001; Schneider et al., 2002).

O trabalho de Belas et al. (1998) também sugere que, como o fenômeno de “swarming” é dependente da densidade populacional e ocorre comunicação intercelular para regular esse fenômeno, o mesmo deve sofrer influência de autoindutores que não sejam do tipo HSL, já que seus experimentos falharam em demonstrar a presença desse autoindutor, bem como não conseguiram provar uma correlação direta entre a necessidade de HSL na migração celular. O referido estudo, baseado em dados de Coffey & Miller (1997), ainda indica que RsbA deve ter função similar ao BvgS ao controlar duas fases distintas do ciclo de vida do *P. mirabilis* durante a infecção do trato urinário. As duas fases dividem a vida da célula que realiza o “swarming” em dois modos de existência: no primeiro, denominado modo adesivo, a célula é imóvel, apresenta tênues diferenças e expressa fimbrias adesivas, como as Mrp. O modo adesivo corresponde ao período lag, e é durante o mesmo que ocorre o ataque de moléculas de defesa do hospedeiro, principalmente IgA. A célula percebe isso, talvez através da proteólise da IgA do hospedeiro pela metaloprotease ZapA anti-IgA, e responde a esse

sinal iniciando a migração celular, ou modo móvel (Wassif et al., 1995; Anéas et al.; 2001). Esse movimento direcionaria as células para longe da área de resposta imunológica, tendo o RsbA funcionado como um sinalizador ao regular os modos de existência da bactéria, tanto no modo adesivo quanto no móvel (Belas et al., 1998; Miller & Bassler, 2001).

2.3 Atividade antimicrobiana de compostos vegetais

Embora as indústrias químicas e farmacêuticas tenham produzido grande variedade de diferentes antibióticos nas últimas décadas, cada vez mais tem sido observado um aumento da resistência das bactérias a essas drogas usadas para fins terapêuticos (Cohen, 1992). Em geral, bactérias têm a habilidade genética de adquirir e transmitir resistência às drogas utilizadas como agentes terapêuticos, o que está adquirindo proporções preocupantes já que o problema dos micróbios resistentes está crescendo, e a perspectiva para o uso de antibióticos é indefinida. Por isso, medidas devem ser tomadas para resolver este problema como, por exemplo, controlar o uso de antimicrobianos, ampliar pesquisas para melhor entender o mecanismo genético de resistência e continuar estudos para desenvolver novas drogas, sintéticas ou naturais (Amoroso, 2002; Nascimento et. al. 2000). Sendo assim, pesquisas voltadas para o estudo e avaliação de produtos naturais como terapêuticos, e principalmente com atividade antibiótica, devem ser estimulados no intuito de criar novas drogas ou adaptar as já existentes para que voltem a ter atividade. Além disso, a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1998) estima que 65 a 80% da população dos países em desenvolvimento dependem das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde.

Devido a sua atividade metabólica secundária, os vegetais superiores são capazes de produzir substâncias antibióticas, utilizadas como mecanismo de defesa contra predação por microrganismos, insetos e herbívoros (Gottlieb & Borin, 2002; Gottlieb, 1981). Alguns pesquisadores preferem dar a essas substâncias inibidoras, de origem vegetal, a denominação de fintocidas ou de substâncias semelhantes a antibióticos: "Antibiotic Like-Substances". Os principais grupos de compostos com propriedades antimicrobianas, extraídos de plantas incluem: terpenóides e óleos essenciais (Torssel, 1989); alcalóides, lectinas e polipeptídios (Terras et al., 1993; Zhang & Lewis, 1997) e substâncias fenólicas e polifenóis, que são: fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas (Stern et al., 1996), flavonas, flavonóis e flavonóides, tanino e cumarinas (Gonçalves et al., 2005). Os compostos isolados de plantas são substâncias cuja estrutura química, com raras exceções, apresenta grandes diferenças estruturais em relação aos antibióticos derivados de microrganismos. Esses agentes antimicrobianos isolados de plantas superiores podem agir como reguladores do metabolismo intermediário, ativando ou bloqueando reações enzimáticas, afetando diretamente uma síntese proteica em nível nuclear ou ribossomal, ou mesmo alterando estruturas de membranas (Singh & Shulka, 1984). Entretanto, a maioria das plantas, normalmente empregadas como fitoterápicos populares, não tiveram suas potencialidades terapêuticas efetivamente comprovadas. Uma parcela significativa destes estudos foi realizada frente a microrganismos de referência sem a utilização de ensaios paralelos utilizando antibióticos comerciais que pudessem fornecer parâmetros mais precisos quanto ao real potencial bactericida destes extratos (Gonçalves et al., 2005).

Os extratos são produtos obtidos pelo tratamento de substâncias vegetais, por um solvente apropriado, o qual é evaporado até a consistência desejada. Um dos principais trabalhos que avaliaram extratos vegetais foi o realizado em 2000 por Avancini e

colaboradores, que avaliaram o potencial antimicrobiano do extrato da carqueja (*Baccharis trimera* Less) D.C., *Compositae* e testaram suas atividades bacteriostáticas e bactericidas sobre bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus uberis*) e gram negativas (*Salmonella gallinarum* e *Escherichia coli*) e concluíram que as bactérias gram-positivas demonstram maior sensibilidade ao extrato em relação às gram-negativas.

O conhecimento sobre o potencial terapêutico dos vegetais tem despertado o interesse científico, buscando, nesse conhecimento, novos caminhos para o controle e tratamento de diversas doenças (Donia et al., 2003) e, baseado nisso, Cechinel Filho (2002) analisou plantas selecionadas a partir da indicação popular e da sua abundância, cujos extratos apresentaram atividade antimicrobiana, como os extratos de *Bauhinia splendens*, onde os mais polares apresentaram eficácia contra bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*. Já os extratos de *Aleurites moluccana* L. Willd (*Euphorbiaceae*), também avaliados, coletados e analisados no Brasil não apresentaram atividade antimicrobiana; porém essa mesma planta, coletada e analisada no Havaí (Estados Unidos da América), apresentou atividades antivirais contra o vírus HIV e contra algumas bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Esse fato sugere, então, a influência de fatores ambientais na síntese dos seus compostos, podendo alterar a composição química das plantas. Também foi avaliado o extrato bruto de *Wedelia paludosa* D.C. (*Compositae*) e observado atividade antibacteriana dentre outras atividades (Cechinel Filho, 2002).

Devido à sua diversidade vegetal, o Brasil é um país conhecido mundialmente pela variedade de produtos vegetais com ação medicinal. Em estudo feito sobre plantas utilizadas na medicina popular brasileira para o tratamento de doenças infecciosas, Holetz e colaboradores (2002) apresentaram uma análise de 13 plantas medicinais

selecionadas pela sua atividade antimicrobiana. O estudo foi feito, a partir dos extratos hidroalcoólicos das folhas das seguintes plantas: *Arcitum lappa* (bardana, orelha-de-gigante), *Tanacetum vulgare* L. (tanaceto, erva dos vermes), *Psidium guajava* (goiabeira), *Mikania glomerata* Spreng (guaco), *Spilanthes acmella* Mart (agrião-do-Brasil), *Lippia alba* (erva-cidreira), *Achillea millefolium* L. (mil-folhas), *Piper regnellii* Miq.(paraipoba, capeva), *Eugenia uniflora* L.(pitanga), *Sambucus canadensis* L. e *Plantago major* L. (tançagem, erva-de-orelha). Os extratos de *Erythrina speciosa* Andrews (mulungu) e de *Punica granatum* L (romã) foram obtidos a partir do caule e da fruta, respectivamente. Os extratos foram testados sobre os seguintes microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e os fungos *Cândida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*, cujo critério utilizado para indicar o nível de atividade dos extratos foi baseado na MIC (Concentração Inibitória Mínima), onde os extratos que possuíam MIC < 100mg/ml apresentavam boa atividade antimicrobiana; MIC entre 100 e 500mg/ml, atividade moderada; MIC entre 500 e 1000mg/ml apresentavam fraca atividade antimicrobiana e extratos com MIC acima de 1000mg/ml foram considerados inativos. A partir da análise dos 13 extratos, pelo menos 8 famílias de plantas diferentes apresentaram alguma atividade antimicrobiana, principalmente sobre bactérias gram-positivas, o que representa 77% dos extratos analisados. Os autores concluem que, apesar de a pesquisa sobre os resultados do uso etnobotânico das 13 espécies de plantas estudadas ter sido realizada *in vitro*, a pesquisa *in vivo* pode ajudar na determinação do potencial de ação dessas plantas para o tratamento de doenças infecciosas.

Outro estudo abordou o efeito microbicida de extratos de plantas conhecidas e largamente utilizadas na medicina popular, a goiabeira *Psidium guajava* LINN. e do mamoeiro *Carica papaya* LINN sobre bactérias entéricas causadoras de diarreias infantis

Escherichia coli e *Staphylococcus aureus*. Dos extratos utilizados, os que obtiveram melhores resultados foram os extratos aquosos e cetônicos, ambos a 50%, das folhas jovens (broto) da goiabeira. Em relação aos extratos de folhas de mamão *Carica papaya* LINN, estes não apresentaram qualquer atividade frente aos microorganismos testados *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. De acordo com a conclusão dos autores, o uso do extrato do broto da goiabeira no tratamento de diarreias causadas por *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* é uma opção viável devido à sua rápida ação, fácil cultivo em países tropicais e seu baixo custo (Vieira et al., 2001).

A *Curcuma longa* L. *Zingiberaceae*, planta distribuída em regiões tropicais e subtropicais do mundo, além de largamente utilizada na medicina popular no tratamento de diversas doenças, é também muito citada na literatura pela variedade de atividades que apresenta. Os principais compostos responsáveis pelas atividades da planta são a curcumina e seus derivados. Testes “in vitro” mostraram atividades antiparasitárias, antiespasmódica, antiinflamatória e também o potencial anticancerígeno da curcumina, mais abundante componente da planta. Os derivados da curcumina que apresentaram atividade foram o curcuminato de sódio (atividade antiinflamatória); ariltumerona, (atividade antiofídica), onde sua ação neutralizou a ação hemorrágica e o efeito fatal do veneno; metil-curcumina (atividade anti-leishmaniótica); o dimetoxi-curcumina e o bisdemetoxi-curcumina (atividade antioxidante) (Holetz et al., 2002). A curcumina também apresentou atividades como antibacteriana, onde o óleo da *Curcuma* inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus typhosus*; e ainda atividade anti- HIV, em que a curcumina é um inibidor da proteína integrase na replicação do HIV-1 (Araújo & Leon, 2001). Diante das atividades relatadas e do potencial apresentado pela curcumina e derivados, é interessante uma contínua

investigação de compostos que possam ser usados na produção de novas drogas e no tratamento de diversas doenças (Holetz et al., 2002) .

Alguns estudos também têm demonstrado que além de atividades antimicrobianas sobre um dado microorganismo, compostos de plantas apresentam também atividade contra linhagens de microorganismos resistentes a antibióticos. Parece haver um efeito sinérgico entre compostos de plantas associados a outros compostos vegetais, ou ainda a antibióticos inativos, potencializando-os na atividade. O potencial de extratos de plantas e fitofármacos em modelos de linhagens de microorganismos multirresistentes a drogas foi avaliado em vários estudos como citados em Holetz et al. (2002), bem como o efeito sinérgico da associação dos extratos com atividade antimicrobiana com antibióticos. No estudo de Nascimento et al. (2000) foram avaliadas as seguintes plantas: *Achilea millefolium* (milfolhas), *Caryophyllus aromaticus* (cravo da índia), *Melissa officinalis* (erva cidreira), *Ocimum basilicum* (alfavaca), *Psidium guajava* (goiabeira), *Punica guanatum* (romã), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Salvia officinalis* (salvia), *Syzygium joabolanum* (jambolão) e *Thymus vulgaris* (tomilho). Foram utilizados os fitofármacos ácido benzóico, ácido cinâmico, eugenol e farnesol sobre os microorganismos: *Candida albicans* (levedura), *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Proteus spp* (essas cinco, sensíveis a antibióticos) e oito bactérias resistentes a antibióticos *Klebsiella pneumoniae* (duas amostras diferentes), *Shigella spp.*, *Proteus spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Obtiveram como resultado da atividade dos extratos de alfavaca, cravo-da-índia, goiaba, jambolão, erva-cidreira, romã, alecrim e tomilho que apresentaram uma atividade mínima contra os microorganismos testados. Os extratos de cravo e jambolão apresentaram maior atividade, inibindo 9 microorganismos (64,2%) e

8 microorganismos (57,1%), respectivamente, apresentando também alta atividade contra bactérias resistentes a antibióticos (83,3%). Os extratos de sálvia e mil folhas não apresentaram nenhum tipo de atividade. A análise, quanto ao efeito sinérgico dos extratos, mostrou que a associação dos extratos de cravo-da-índia, jambolão, romã e tomilho com antibióticos apresentaram atividade contra *P. aeruginosa*. O extrato de alho, quando combinado com ampicilina, produziu efeito contra *Klebsiella pneumoniae*. O crescimento de *Proteus spp.* foi inibido quando se associou extrato de cravo-da-índia com a tetraciclina. Como resultados da avaliação, os autores puderam concluir que os extratos estudados apresentaram atividade antimicrobiana, inclusive sobre microorganismos resistentes a antibióticos, agindo isoladamente ou associados a antibióticos, devido ao efeito sinérgico (Nascimento et al. 2000).

Uma das formas mais comuns do uso de extratos vegetais para fins medicinais é o extrato bruto. Chen et al. (1989) apresentaram uma seleção de extratos brutos de plantas taiwanesas com atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*, bactéria conhecida por ser cariogênica. Verificaram 79 extratos aquosos de diversas plantas, onde desses extratos, 6 apresentaram atividade antibacteriana. Dentre as seis, as espécies *Morus australis*, *Ludwigia octovalis* e *Thuja orientalis* foram as mais efetivas na inibição dos sorotipos C e D do *Streptococcus mutans*. Em Martinez et al. (1996), analisou-se a atividade antimicrobiana de extratos de *Shinus terebentifolius Raddi*, *Anacardiaceae*, em diferentes concentrações contra as bactérias gram-positiva *Bacillus subtilis*, Gram-negativas *P. Aeruginosa* e *Escherichia coli* e a levedura *Candida albicans*. Os resultados obtidos indicaram que os extratos nas concentrações de 50% e 100% apresentaram atividade antimicrobiana frente a todos os microorganismos testados, exceto contra a levedura *Candida albicans*.

Recentemente, Gonçalves e colaboradores (2005) testaram a atividade antibacteriana de 17 plantas da flora brasileira (*A. occidentale*, *P. emarginatus*, *C. langsdorffii*, *A. colubrina*, *M. peruiferum*, *S. adstringens*, *B. orellana*, *E. uniflora*, *P. guajava*, *M. tenuiflora*, *I. paraguariensis*, *O. odorifera*, *H. courbaril*, *S. terebinthifolia*, *G. americana*, *T. avellanadae* e *C. sylvestris*) contra os seguintes microrganismos: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia* spp., *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* spp. Como resultados, observaram não haver atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos das espécies *Anadenanthera colubrina*, *Genipa americana*, *Tabebuia avellanadae* e *Casearia sylvestris*, ao contrário do anteriormente relatado em literatura (Mors et al, 2000; Oliveira et al, 1990; Basile, 1990).

O extrato de *Pterodon emarginatus* apresentou atividade somente contra *Proteus mirabilis*, e os de *Ocotea odorifera* e *Schinus terebinthifolia* apresentaram atividade somente contra *Staphylococcus aureus*. Os extratos destas plantas são conhecidos por apresentarem atividade antimicrobiana também contra *Pseudomonas* (Bandeira & Wanick, 1974), o que não foi confirmado nos resultados de Gonçalves e colaboradores. Dois extratos apresentaram atividade antimicrobiana contra dois microrganismos, o de *Hymenaea courbaril* teve ação contra *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus aureus* e o de *Copaifera langsdorffii* apresentou ação contra *Proteus mirabilis* e *Shigella sonnei*. *Hymenaea courbaril* é conhecida por conter terpenos e compostos fenólicos com comprovada propriedade antimicrobiana (Marsaioli, 1975).

O segundo extrato, o de *Copaifera langsdorffii*, é referido na literatura como tendo ação também contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (El Nunzio, 1985), o que não se confirmou nos resultados desse estudo, onde estes dois últimos

microrganismos mostraram-se resistentes. Alguns extratos apresentaram maior amplitude de atividade bactericida, como é o caso de *Myroxylon peruiferum* que apresentou atividade contra *Streptococcus pyogenes*, *Shigella sonnei* e *Staphylococcus aureus*; e o extrato de *Ilex paraguariensis* que inibiu os microrganismos *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* spp. coagulase; sendo esses resultados inéditos desse trabalho. O extrato de *Bixa orellana* apresentou ação contra *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus aureus*, embora recentes dados da literatura não tenham constatado atividade deste extrato contra estas bactérias (Almeida Alves et al., 2000). Já a atividade do extrato de *Psidium guajava*, citado como sensível para *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* (Holetz et al., 2002; Gnan & Demello, 1999), apresentou sensibilidade frente a *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus aureus*, não sendo constatado ação contra a *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. A ação do extrato de *Anacardium occidentale* confirmou plenamente os dados obtidos na literatura (Lorenzi, 1992), inibindo o crescimento de *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativo.

Alta atividade antimicrobiana foi obtida com o extrato de *Mimosa tenuiflora*. Citado na literatura por apresentar atividade contra *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. (Heinrich et al., 1992), além da confirmação desses resultados, também apresentou inibição do crescimento de *Proteus mirabilis* e *Shigella sonnei*. Comparativamente aos demais extratos, dois mostraram maior atividade, o extrato de *Stryphnodendron adstringens*, que na literatura consultada é referido por apresentar atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* (Almeida Alves et al., 2000), teve os resultados confirmados contra *Escherichia coli*,

bem como contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativo, *Streptococcus pyogenes*, *Providencia* spp., *Proteus mirabilis* e *Shigella sonnei*, porém, não inibiu o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*. Outro extrato que apresentou alta ação bactericida foi o de *Eugenia uniflora*, que também é citado na literatura como tendo atividade contra *Streptococcus*, *Escherichia coli*, e *Bacillus cereus* e resistência a *Pseudomonas aeruginosa* (Almeida Alves et al., 2000).

Os dados dos autores confirmaram resultados com atividade contra *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Providencia* spp., *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativo, referindo também a ausência de inibição de *Pseudomonas aeruginosa*. Em um outro estudo foi demonstrado a atividade da *Eugenia uniflora* contra *Staphylococcus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e inclusive, contra *Pseudomonas aeruginosa* (Holetz et al., 2002). De todos os microrganismos utilizados no trabalho de Gonçalves et al (2005), três mostraram total resistência aos extratos das 17 espécies de plantas estudadas: *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*.

2.3.1 Óleos Essenciais

Presentes na fragrância dos vegetais, os óleos essenciais são metabólitos secundários de plantas altamente enriquecidos em compostos de isopreno, chamados terpenos ou terpenóides quando possuem elementos adicionais, geralmente o oxigênio. Em muitos casos, esses metabólitos secundários produzidos por plantas atuam no seu mecanismo de defesa contra a predação por microrganismos, insetos e herbívoros. Os terpenóides, por exemplo, são ativos contra bactérias, fungos, vírus e protozoários (Cowan, 1999). Um exemplo são as saponinas triterpenóides, as quais são produzidas por diversas espécies de plantas, principalmente dicotiledôneas como *Panax ginseng*

(Kushiro et al., 1988), *Pisum sativum* (Morita et al., 2000), *Olea europaea*, *Taraxacum officinale* (Shibuya et al., 1999), além de *Arabidopsis thaliana* (Herrera et al., 1998; Husseltein-Muller et al., 2001) cujo papel é a defesa contra patógenos e pestes. (Haralampidis et al., 2001; Morrissey & Osburn, 1999; Prince et al., 1987). Em trabalhos sobre a atividade de ácidos anacárdicos, que são compostos fenólicos formados por uma cadeia lateral alquil não isoprenóide, presentes no óleo da casca da castanha de caju, Lima et al., (2000), analisaram a atividade antimicrobiana sobre microorganismos da cavidade oral *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Candida utilis*. A amostra dos ácidos demonstrou ter potente atividade antibacteriana sobre bactérias gram-positivas, principalmente sobre o *Streptococcus mutans*, maior do que em bactérias gram-negativas.

Estudos farmacológicos feitos com óleos essenciais de 15 espécies de plantas aromáticas obtidas no Nordeste do Brasil têm apresentado atividades coerentes com o uso destas plantas na medicina popular. Estudos com o efeito desses óleos na contração muscular e com seus efeitos anticonvulsivo, analgésico, antiinflamatório e antibacteriano (Holetz et al., 2002). Foi relatada a atividade antimicrobiana de óleos essenciais e purificados os compostos ativos de *Ocimum gratissimum*, tradicionalmente usados na medicina popular brasileira para tratar diferentes doenças como infecções no trato respiratório, diarreias, doenças de pele, pneumonias e também febre, tosse e conjuntivite. O composto que apresentou atividade antibacteriana para bactérias gram-positivas e gram-negativas no óleo essencial foi identificado como eugenol (Nakamura et al., 1999).

2.3.2 Terpenos

Os terpenos são originados da via do acetato-mevalonato a partir de uma unidade isopreno. A classificação dos terpenos é feita de acordo com a quantidade de

unidades isopreno em hemiterpenóides, C5; monoterpenóides, C10; sesquiterpenóides, C15; diterpenóides, C20; triterpenóides, C30; e carotenóides, C40. Eles apresentam funções variadas nos vegetais. Os monoterpenos são constituintes dos óleos voláteis, atuando na atração de polinizadores. Os sesquiterpenos, em geral, apresentam funções protetoras contra fungos e bactérias (Holetz et al., 2002), enquanto muitos diterpenóides dão origem aos hormônios de crescimento vegetal. Os triterpenóides e seus derivados, os esteróides, apresentam uma gama de funções. (Morita et al., 2000). Muitos têm funções de proteção contra herbívoros, alguns são antimitóticos, e outros atuam na germinação das sementes e na inibição do crescimento da raiz (Holetz et al., 2002; Younes et al., 2000; Morita et al., 2000; El-Sakhawy et al., 1998).

Estudos relacionados à atividade antimicrobiana de plantas tiveram início no ano de 1940. Sabe-se que as plantas possuem várias vias metabólicas secundárias que dão origem a diversos compostos dentre eles os terpenos. Quanto à atividade bactericida dos terpenos, autores têm sugerido efeitos sobre a parede celular bacteriana ou membrana citoplasmática, agindo sobre compostos lipofílicos e causando a perda de enzimas e nutrientes da membrana celular (Wang et al., 2006).

Mansouri e colaboradores (2005) relatam em seu trabalho a inibição de swarming em isolados de *Proteus spp.*, bem como a atividade bactericida de 25 óleos essenciais ou extratos de plantas. Outros trabalhos, como o de Wang et al. (2006), salientam a atividade bactericida de extratos vegetais em isolados de *P. mirabilis*, com possibilidade de inibir “swarming”. Há também um possível efeito de extratos vegetais em “quorum sensing”, já que estudos sugerem produção de compostos que mimetizam sinalizadores inibitórios (Freeman&Bassler, 1999b).

Assim, com essa atuação em células bacterianas ao influenciar fatores de patogenicidade e alterar a capacidade de infecção, produtos vegetais, entre eles os

terpenos, poderão ser importantes alternativas para manejo desse patógenos em tempo de emergência de bactérias multirresistentes ao antimicrobianos convencionais (Teplitski et al., 2000; Zhang, 2003).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão são apresentados na forma de artigos, correspondentes aos seguintes capítulos:

Capítulo 1- Comparison of different PCR based molecular markers for the characterization of *Proteus mirabilis* clinical isolates.

Capítulo 2- The effect of monoterpenes on swarming differentiation and haemolysin activity in *Proteus mirabilis*.

Capítulo 3- The extracellular metalloprotease complex of *Proteus mirabilis*.

CAPÍTULO 1

COMPARISON OF DIFFERENT PCR BASED MOLECULAR MARKERS FOR THE CHARACTERIZATION OF *Proteus mirabilis* CLINICAL ISOLATES.

Lessandra Michelim¹, Gabriela Muller¹, Jucimar Zacaria¹, Ana Paula Longaray Delamare¹, Sérgio Olavo Pinto da Costa¹ and Sergio Echeverrigaray¹

¹*Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brazil.*

Short title: Molecular Markers for *Proteus mirabilis*

Note: Financial support from the Foundation of the University of Caxias do Sul and CNPq.

(Trabalho aceito para publicação no Brazilian Journal of Infectious Diseases)

Abstract

P. mirabilis is one of the most important pathogens associated with complicated urinary tract infections (acute pyelonephritis, bladder, kidney stones) and bacteremia, affecting patients with anatomical abnormalities, immunodeficiency, and long-term urinary catheterization. For epidemiological purposes, different molecular typing methods, such as pulse-field gel electrophoresis (PFGE) or ribotyping, have been developed for this pathogen. However, these methods are labor-intensive and time-consuming. In this work, we evaluated the discriminatory power of different PCR based fingerprinting methods (RAPD, ISSR, ERIC-PCR, BOX-PCR and rep-PCR) on *P. mirabilis* clinical isolates. Typing patterns and clustering analysis indicated that RAPD, BOX-PCR and ERIC-PCR differentiated *P. mirabilis* strains from *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, and *Morganella morganii*. With the exception of rep-PCR, the other methods showed medium to high discriminatory efficiency in *P. mirabilis*. In general, the results obtained with RAPD, BOX-PCR and ERIC-PCR were in good agreement. Our data indicate that the combination of ERIC-PCR and BOX-PCR results can be considered a rapid and reliable alternative for the discrimination among *P. mirabilis* clinical isolates, contributing to epidemiological studies.

Key-Words: *P. mirabilis*, molecular markers, fingerprinting, PCR.

Introduction

Proteus mirabilis are Gram-negative rods, members of the *Enterobacteriaceae* family, frequently found in soil, water and the intestinal tract of many animals, including humans. This dimorphic bacterium can undergo morphological and physiological changes in response to environmental and growth conditions. These modifications lead to its most peculiar characteristic, the swarming behavior, a process in which short vegetative swimming cells differentiate to long highly flagellated forms referred to as swarmer cells [1].

P. mirabilis is not a common cause of urinary tract infections in normal hosts, involved in only a few cases of uncomplicated cystitis or pyelonephritis. However, *P. mirabilis* is one of the most important pathogens associated with complicated urinary tract infections (acute pyelonephritis, bladder, kidney stones) and bacteremia, affecting patients with anatomical abnormalities, immunodeficiency, and long-term urinary catheterization [1-3]. *P. mirabilis* virulence is associated with several virulence factors including hemolysin, swarming, adhesins, proteases, and ureases [4-6]. The expression of most of these factors is co-ordinately upregulated during swarming [6-8].

Because the increasing clinical relevance of *P. mirabilis* [3], the selection of efficient molecular fingerprinting methods are of great epidemiological importance. Bacterial genotyping opened new opportunities on epidemiological studies by the identification of clinical and environmental isolates, the evaluation of their relationship, the monitoring of clone dissemination, and the characterization of bacterial populations within more or less restricted environments [9]. Among PCR based molecular markers, RAPD (random amplified polymorphic DNA), and repetitive sequence-based PCR genomic fingerprinting have been shown particularly efficient for bacterial analysis [9-13]. The repeated sequences ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus

sequence), REP (repetitive extragenic palindromic sequence), and BOX (repetitive intergenic sequence elements of *Streptococcus*) have been specifically designed for prokaryotic fingerprinting.

Ribotyping and PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) are efficient for *Proteus* characterization at the species level [14], and for identification of individual strains of *P. mirabilis* [15,16]. However, these methods are laborious, expensive, and time consuming, limiting their application on routine clinical laboratories [9]. RAPD, a PCR-based method, has been used with success in the identification of clinical isolates of *P. mirabilis* [17] and *P. penneri* [18]. More recently, the tandem tetramer microsatellites (GACA)₄ and (CAAT)₄, also known as intergenic single sequence repeats (ISSR), showed high discrimination for *P. mirabilis* [19].

The aim of this work was to evaluate and compare the efficiency of five PCR-based molecular markers for the characterization of *P. mirabilis* clinical isolates, in order to select informative markers for epidemiological studies, and monitoring of *P. mirabilis* populations within hospital environments.

Material and Methods

Bacterial isolates. Thirty three clinical isolates, 29 *P. mirabilis*, and representatives of *Escherichia coli*, *Hafnia alvei* and 2 *Morganella morganii*, were obtained from the Hospital Geral de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brazil (Table 1). These clones were isolated by routine procedures for the different sample sources, and identified by conventional microscopical and biochemical tests: Gram staining, motility, swarming behaviour, indole production, phenylalanine dehydrogenase, ornithine decarboxylase, gas production from glucose, H₂S production, urease, tryptophan deaminase, lysine

decarboxylase, and citrate and lactose utilization. Antibiotic resistance was evaluated by the disc-diffusion method and analyzed as described at CLSI document M100-S17 [20].

Bacterial isolates were maintained on Trypticase Soybean Agar (TSA), and permanent stocks were conserved on TSBG (Tryptone Soy Broth with 15% glycerol) at -80°C . For DNA analysis, single colonies were transferred to 1ml of LB (Luria Broth) and incubated at 37°C for 18 h.

PCR fingerprinting. DNA samples were prepared as described by Lu [4] with some modifications. Briefly, single colonies of each isolate were inoculated on LB medium and grew overnight at 37°C . Cells were collected by centrifugation at 13000 xg for 5 min, and resuspended in $100\mu\text{l}$ of extraction buffer (1% Triton-X-100, 100mM Tris-HCl pH 8.3, and 1mM EDTA). Samples were incubated for 20 min in a boiling water bath (100°C), and centrifuged at 13000 xg for 5 min. The supernatant was transferred to a new tube containing $180\mu\text{l}$ of ultrapure Milli-Q (Millipore) water. Samples were aliquoted and conserved at -80°C .

For RAPD, ERIC, BOX and REP analysis, $2\mu\text{l}$ of DNA samples were transferred to $23\mu\text{l}$ of amplification mix containing: 20mM Tris-HCl pH 8.4, 50mM KCl, 7mM MgCl_2 , 0.25% Triton-X-100, 8mM dNTPs, $1\mu\text{M}$ of each primer (ERIC and REP) or $1.5\mu\text{M}$ of the primer for RAPD and BOX, and 1.25U of Taq Polymerase (Invitrogen). DNA amplification was conducted on a MJ Research thermocycler programmed for an initial denaturation step at 92°C (4 min) followed by 40 cycles of denaturation for 1 min at 94°C , annealing for 1 min at the appropriate temperature (RAPD and REP- 40°C , ERIC- 48°C , and BOX- 50°C), extension for 5 min at 72°C , and a final extension for 5 min at 72°C . Samples were maintained at 4°C until electrophoretic separation of amplification products.

The primers used were: ERIC-1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') and ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'), and REP-PCR-1R (5'-IIICGICGICATCIGGC-3'), and REP-PCR-2I (5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3') described by Versalovic et al. [21], BOX-A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') previously used in several bacterial species [11,12,22], and RAPD and ISSR cited in Table 2.

The amplification reaction for ISSR markers included 2 µl of DNA samples and 23 µl of a PCR mix including 20mM Tris-HCl pH 8.4, 50mM KCl, 3mM MgCl₂, 2% formamide, 0.75mM of each dNTP, 1 µM of each primer and 1.5U of Taq Polymerase (Invitrogen). For the DNA amplification, the reaction mixture was denatured for 5 min at 92°C, followed 40 cycles at 94°C (1 min), 48°C to 50°C (45s) and 72°C (2 min) with final extension for 5 min at 72°C.

The amplification products were electrophoresed in 1.5% agarose gels in Tris-borate buffer (0.089M Tris, 0.089M boric acid, 0.002M EDTA). Lambda EcoRI/HindIII was used as molecular size standard. The gels were stained with ethidium bromide (10µg/ml), visualized on a UV light transilluminator, and documented with UVITEC system. Image analyses were carried out using Labimage software.

The amplifications with the five methods were repeated three times (independent cultures and DNA extractions) to evaluate the reproducibility with two replications of each isolate per round. Only well defined and reproducible amplification products (presence and intensity) were scored and used on statistical analyses.

Statistical analyses. Similarity Jaccard's coefficients, Pearson's correlation between distance matrices, and cluster analysis (unweighted pair-group method with average linkage - UPGMA) were performed using the SSCP 10.1 software package. Bootstrap

analysis was done with the Winboot program. Discriminatory index (DI) was determined by the number of relative frequencies of the different profiles obtained by a given primer or method, and was calculated by using Simpson's index of diversity [23] as follow:

$$DI= 1-\{\sum n_j (n_j-1)/[N(N-1)]\}$$

Where N is the total number of isolates and n_j is the number of isolates belonging to the j th type.

Results

RAPD typing. Initially a set of ten decameric RAPD primers (Table 2) were selected from the 60 primers of kits A, X and Z of Operon Techn. based on the number, quality and polymorphism of amplification products using three *P. mirabilis* isolates arbitrarily chosen (IBPro 101, IBPro102 and IBPro120). Applied to all the isolates, the selected primers generated a total of 188 amplification products varying between 300 and 2445 bp. Considering just the 29 *Proteus* isolates, 86 bands were identified of which 51 (59.3%) exhibited some degree of polymorphism. Each decameric primer amplified from 3 to 14 segments, of which 25 to 80% were polymorphic.

Thirty-five *Proteus* specific amplification products were identified which can be used to design *Proteus* specific SCAR primers (Table 2). An example of RAPD profiles showing three *Proteus* specific bands of 2113bp, 831bp and 431bp, and several polymorphic bands is shown in Figure 1. Considering all the amplification products, RAPD markers allowed the discrimination of almost all the isolates, excepting three isolates obtained from patient 10 (IBPro 111, 112 and 116), two isolates (IBPro 121 and IBPro 122) from hemocultures of patient 18, and isolates IBPro 102 and 131 obtained

from foot secretion and skin biopsy of patient 9 (Figure 2). These isolates showed the same antibiotic resistance patterns (Table 1) and Dienes types (data not shown).

As expected, representatives of *E. coli*, *M. morgani*, and *H. alvei* were clearly differentiated from each other and from the *P. mirabilis* isolates (Figure 2).

ISSR fingerprinting. Seven ISSR (intergenic single sequence repeats) primers were evaluated against three isolates of *P. mirabilis* (IBPro 101, IBPro102 and IBPro120). The primers used were (AC)₈T, (AG)₈A, (GA)₈T, (AG)₈YT, (GATA)₄, (GACA)₄, and (GTGC)₄. No amplification was obtained with primer (AG)₈YT, where primers (GATA)₄ and (GTGC)₄ produced smear. The other four primers generated well-defined amplification products (Figure 1). Applied to all the isolates, the selected primers generated a total of 49 scorable bands, varying between 185 and 2715 bp, 38 (77, 5%) of these bands were polymorphic within *P. mirabilis*. The main problem observed with ISSR markers was the low reproducibility.

Considered together, the four ISSR primers allowed discrimination of all the isolates. However, the three outgroup species included in the analysis were clustered together with *Proteus* isolates.

Repetitive-PCR fingerprinting. As can be observed in Table 2 and Figure 1, ERIC-PCR and BOX-PCR allowed detection a total of 10 and 12 amplification products in *Proteus* isolates, respectively. Nine of the ten ERIC markers, and 10 of the 12 BOX markers exhibited some degree of polymorphism, being useful as discriminant markers. Three bands (ERIC-515pb, BOX-1199pb and BOX-402pb) were characteristics of *P. mirabilis*. As occurred with RAPD analysis, the control species (*E. coli*, *M. morgani*, and *H. alvei*) were clearly different from each other, and from the *Proteus* isolates

(Figure 2). Despite the low number of amplification products obtained, ERIC-PCR and BOX markers allowed separating the 29 *Proteus* isolates into several groups (Figure 2). Moreover, these markers confirmed the identity of isolates IBPro 121 and 122 (patient 18), IBPro 102 and IBPro 131 (patient 9), and IBPro 111, 112 and 116 isolated from tracheal and ear secretions of patient 10.

REP-PCR using primers 1R and 2I yielded 14 amplification products that allowed the separation of the four bacterial species included in the analysis. A very low number of bands were obtained in *P. mirabilis* (4 bands) with just two polymorphic products (769pb and 641pb), and a *Proteus* specific product of 1220pb.

Comparison of methods. As can be observed in Table 2, discriminatory index (Simpson's index), which represents the probability that two isolates randomly chosen will be distinguished by a given method, varied between 0.621 for REP-PCR to 1.000 for ISSR, with high values for RAPD, BOX and ERIC. Among RAPD primers, OPZ20, OPX13, OPA11, OPZ08 and OPA19 gave the highest DI values (Table 2). Important variation on the discriminatory indexes was also observed among ISSR primers, where ISSR 1, 2 and 6 (0.829 to 1.000) were more discriminant than ISSR3 (0.458).

Comparison of the similarity values obtained with the five DNA fingerprinting methods employed gave high and significant correlations between RAPD and BOX, RAPD and ERIC, and BOX and ERIC (Table 3). REP similarity values correlated with those obtained using BOX, RAPD, and ERIC, but these correlations should be taken with caution due to the low number of amplification products obtained with REP. No correlation or low significant correlations were observed between ISSR similarity values and those obtained with the other methods.

Most clusters evidenced in the dendrograms obtained by BOX, ERIC, and RAPD fingerprinting techniques were similar (Figure 3). Specifically, bacterial isolates classified as *E. coli*, *H. alvei* and *M. morgani* formed individual clusters with more than 75% confidence, well separated from *P. mirabilis* isolates. Moreover, *P. mirabilis* isolates obtained from the same patient (patients 9, 10 and 18) in different data and/or sample source and exhibiting the same antibiotic resistance and Dienes behavior, were genetically identical or very similar.

Discussion

Studies regarding the molecular epidemiology of infection due to *Proteus* species have employed a variety of methods, including ribotyping, PFGE, RAPD, and tandem repeat microsatellite fingerprinting [14-19].

The present study showed that RAPD markers varied in their discriminatory ability. Some selected primers (OPZ20, OPX13, OPA11, OPZ08 and OPA19) showed high discrimination indices. The use of three primers (OPA11, OPX13 and OPZ8) allowed the characterization of all the *P. mirabilis* isolates. The efficiency of RAPD markers for *Proteus* fingerprinting was previously reported by Binden et al. [17] in an epidemiological investigation of *P. mirabilis* in pregnant women and their neonates, and by Hoffman et al. [18] in a study of clinical isolates of *P. penneri*. In general, the relatively low reproducibility of RAPD typing limits its application to large-scale inter-laboratory studies. However, in the present study RAPD showed high reproducibility between replications (within and between gels), that associated with its high discrimination ability makes this one of the most suitable methods for local *Proteus* epidemiological studies.

Among the primers selected for ISSR analysis, three primers showed high discriminatory power, and allowed discrimination of all the isolates. The present data cor-

roborate those reported by Cieslikowski et al. [19], who showed (GACA)₄ and (CAAT)₄ as informative primers, and indicates that other primers, such as (AC)₈T and (AG)₈A, can be useful in *P. mirabilis* studies. However, despite the large size of the primers, ISSR markers applied to *P. mirabilis* showed low reproducibility, and were not suitable for identification at the genus level.

The repetitive-DNA markers ERIC-PCR, and particularly BOX-PCR, were more informative than rep-PCR that amplified only four bands in *P. mirabilis*. ERIC and BOX-PCR amplified 22 bands in *Proteus* of which 19 were polymorphics. Repetitive-DNA markers have been used with success in the identification of a large number of Gram-negative bacteria, including *Escherichia coli* [12], *Salmonella* [10], *Aeromonas* [13], *Burkholderia* [11], *Vibrio* [24], among others. *P. mirabilis* isolates obtained from the same patient (patients 9, 10 and 18) in different data and/or sample source and exhibiting the same antibiotic resistance and Dienes behavior, exhibited identical or very similar RAPD, ERIC-PCR and BOX-PCR patterns, indicating that these molecular markers can be used to verify self contamination or strain persistence in a given patient.

In summary, the present data showed that RAPD, ERIC-PCR and BOX-PCR markers had high discrimination ability allowing the genetic typing of clinical *P. mirabilis* isolates, which will prove useful for epidemiological studies of this bacteria.

Acknowledgments

The authors thank the financial support from the Foundation of the University of Caxias do Sul, and the studentships provided by CNPq.

References

1. Mobley H.L.T., Belas R. Swarming and pathogenicity of *Proteus mirabilis* in urinary tract. *Trends Microbiol.* **1995**; 3: 280-84.
2. Chow A. W, Taylor R.R., Yoshikawa T.T., Guze, L.B. A nosocomial outbreak of bacteria on struvite crystal habit and its importance in urinary stone formation. *J. Crystal Growth.* **1979**; 104: 475-84.
3. O'Hara C. M., Brenner, F.W., Miller J.M. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Clin. Microbiol. Rev.* **2000**; 13: 534-46.
4. Wassif C., Cheek D., Belas, R. Molecular analysis of metalloproteases from *Proteus mirabilis*. *J. Bacteriol.* **1995**; 177: 5790-8.
5. Rozalski A., Sidorczyk Z., Kotelko K. Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1997**; 61: 65-89.
6. Fraser G. M., Claret L., Furness R., Gupta S., Hugues, C. Swarming-couples expression of the *Proteus mirabilis* *hpmBA* haemolysin operon. *Microbiol.* **2002**; 148: 2191-201.
7. Mobley H. L. T., Island D., Hausinger R.P. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* **1995**; 59: 451-80.
8. Walker K. E., Moghaddame-Jafari S., Lockatell C.V., Johnson D., Belas, R. ZapA, the IgA-degrading metalloprotease of *Proteus mirabilis*, is a virulence factor expressed specifically in swarmer cells. *Molec. Microbiol.* **1999**; 32: 825-36.

9. Olive D.M., Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* **1999**; 37: 1661-9.
10. Tikoo A., Tripathi A.K., Verma S.C., Agrawai N., Nath, G. Application of PCR fingerprinting techniques for identification and discrimination of *Salmonella* isolates. *Curr. Sci.* **2001**; 80: 1049-52.
11. Coenye T., Spilker T., Martin A., LiPuma J.J. Comparative assessment of genotyping methods for epidemiologic study of *Burkholderia cepacia* Genomovar III. *J. Clin. Microbiol.* **2002**; 40: 3300-7.
12. Seurinck S., Verstraete W., Siciliano S.D. Use of 16S-23S rRNA intergenic spacer region PCR and repetitive extragenic palindromic PCR analyses of *Escherichia coli* isolates to identify nonpoint fecal sources. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**; 69: 4942-50.
13. Szczuka E., Kaznowski, A. Typing of clinical and environmental *Aeromonas* sp. strains by random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence PCR. *J. Clin. Microbiol.* **2004**; 42: 220-8.
14. Pignato S., Giammanco G.M., Grimont F., Grimont P.A.D., Giammanco G. Molecular characterization of the genera *Proteus*, *Morganella*, and *Providencia* by ribotyping. *J. Clin. Microbiol.* **1999**; 37: 2840-7.
15. Pfaller M. A., Mujeeb I., Hollis R.J., Jones R.N., Doern G.V. Evaluation of the discriminatory powers of the Dienes test and ribotyping as typing methods for *Proteus mirabilis*. *J. Clin. Microbiol.* **2000**; 38: 1077-80.

16. Sabbuba N.A., Mahenthiralingam E., Stickler D.J. Molecular epidemiology of *Proteus mirabilis* infections of the catheterized urinary tract. *J. Clin. Microbiol.* **2003**; 41: 4961-5.
17. Bingen E., Boissinot C., Desjardins P., Cave H., Lambert-Zechovsky N., Denamur E., Blot P., Elion J. Arbitray primed polymerase chain reaction provides rapid differentiation of *Proteus mirabilis* isolates from pediatric hospital. *J. Clin. Microbiol.* **1993**; 31: 1055-9.
18. Hoffmann G., Gajdos G., Czako M., Kerenyi M., Toht V., Emody L., Tomocsanyi T. Diversity among clinical isolates of *Proteus penneri* detected by random amplified polymorphic DNA analysis. *Zentbl. Bakteriol.* **1998**; 288: 351-60.
19. Cieslikowski T., Gradecka D., Mielczarek M., Kaca, W. Tandem tetramer-based microsatellite fingerprinting for typing of *Proteus mirabilis* strains. *J. Clin. Microbiol.* **2003**; 41: 1673-80.
20. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 17th informational supplement. CLSI/NCCLS document M100-S17. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, **2007**.
21. Versalovic J., Koeuth T., Lupski R.J. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **1991**; 9: 6823-31.
22. Versalovic J., Schneider M., de Bruijn F.J., Lupskin, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell Biol.* **1994**; 5: 25-40.

23. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* **1988**; 26: 2465-2466.
24. Wong H.C., Lin C.H. Evaluation of Typing of *Vibriopara*haemolyticus by Three PCR Methods Using Specific Primers *J. Clin. Microbiol.* **2001**; 39: 4233-4240.

Table 1. List of isolates used, their origin, sample source, and antibiotic resistance.

Identification number*	Patient	Age	Sex	Sample origin**	Date	Sample source	Antibiotic resistance***
IBPro101	01	53	M	C.U. 6°	18/05/04	Pulmonar secretion	n.d.
IBPro102	02	45	M	ICU Adults	17/05/04	Toraxial drain	AMP, CIP, SUT
IBPro105	05	71	F	C.U. 5°	23/05/04	Urine	NIT
IBPro106	06	57	F	ICU Adults	24/05/04	Sputum	AMP
IBPro107	07	66	M	C.U. 5°	09/06/04	Sputum	CIP
IBPro109	09	82	M	C.U. 6°	31/05/04	Foot secretion	n. d.
IBPro110	09	82	M	C.U. 6°	02/06/04	Skin biopsy	AMP, CEF
IBPro111	10	1	M	ICU Pediatric	02/06/04	Traqueal secretion	AMP, GEN, SUT
IBPro112	10	1	M	ICU Pediatric	08/06/04	Traqueal secretion	AMP, GEN, SUT
IBPro113	11	64	M	E.U.	08/06/04	Sputum	n. d.
IBPro114	12	41	F	Chirurgical center	18/05/04	Abdominal hematoma	AMI, AMP, AMS; CEF; CXN.; CRO; CIP; SUT
IBPro115	13	84	M	Community	03/06/04	Urine	AMP, CEF; CXN; GEN, NIT, NOR, SUT
IBPro116	10	1	M	ICU Pediatric	09/06/04	Ear secretion	AMP, GEN, SUT
IBPro118	15	29	F	S.M.T.	30/07/04	Urine	NIT
IBPro119	16	44	M	C.U. 6°	30/06/04	Urine	AMP, NIT, NOR, SUT
IBPro120	17	47	F	O. C.	14/07/04	Urine	AMP, NIT, SUT
IBPro121	18	71	M	E.U.	23/06/04	Blood culture	AMP, SUT
IBPro122	18	71	M	E.U.	17/06/04	Blood culture	AMP, SUT
IBPro123	19	20	F	Community	30/06/04	Urine	NIT
IBPro124	20	79	M	E.U.	14/07/04	Blood culture	AMP, CIP, SUT
IBPro125	21	56	F	Community	29/06/04	Urine	AMP, NIT, NOR, SUT
IBPro126	22	45	F	C.U. 5°	04/07/04	Urine	AMP
IBPro127	23	60	M	C.U. 5°	23/07/04	Urine	NIT
IBPro128	24	60	F	Community	22/07/04	Urine	NIT, SUT
IBPro129	20	79	M	C.U. 5°	23/07/04	Urine	AMP, CEF; NIT, NOR, SUT
IBPro130	25	<1	M	ICU Pediatric	01/07/04	Urine	AMP, NIT
IBPro131	02	45	M	ICU adults	04/07/04	Chirurgic Inf.	AMP, CIP, SUT
IBPro132	26	73	F	C.U. 6°	26/06/04	Wound Inf.	AMP, CIP, SUT.
IBPro133	27	49	M	Community	30/06/04	Urine	AMP, CEF; CXN; NIT, NOR, SUT
IBHal103	03	51	F	C.U. 5°	19/05/04	Bile	AMP, CEF; CXN
IBEsc104	04	<1	F	E.U.	20/05/04	Urine	n. d.
IBMor108	08	73	M	C.U. 5°	11/06/05	Foot abscess	AMP, SUT
IBMor117	14	1	F	Community	15/07/04	Urine	AMP, CEF; CXN, NIT

* IBPro – *Proteus mirabilis*; IBEco- *Escherichia coli*; IBMor- *Morganella morganii* ; IBHal- *Hafnia alvei*.

** C.U. - Care Unit 5° or 6° floor; O.C.- Obstetric center; I.C.U.- Intensive Care Unit; C.C.- Chirurgical center; E.U.- Emergency Unit

*** AMI- Amicacin; AMP- Ampicillin; AMS- ampicillin/sulbactam; CEF= cephalothin; CXN= cefoxitin; CRO.= ceftriaxone; CIP- ciprofloxacin; GEN- gentamicin; NIT- nitrofurantoin; NOR- norfloxacin; SUT- sulfamethoxazol/trimethoprim

Table 2. Primers sequences.

Primer	Primer sequences	Total number of bands	Total number of bands in <i>Proteus</i>	Number of polymorphic bands in <i>Proteus</i>	Simpson's index of diversity (DI)
RAPD- OPA10	5' GTGATCGCAG 3'	23	5	3	0.756
OPA11	5' CAATCGCCGT 3'	31	12	9	0.899
OPD20	5' ACCCGGTCAC 3'	9	3	2	0.333
OPX13	5' ACGGGAGCAA 3'	23	13	9	0.921
OPX15	5' CAGACAAGCC 3'	15	8	2	0.563
OPZ04	5' AGGCTGTGCT 3'	11	7	1	0.335
OPZ08	5' GGGTGGGTAA 3'	15	10	8	0.884
OPZ10	5' CCGACAAACC 3'	16	7	5	0.627
OPZ19	5' GTGCGAGCAA 3'	26	14	7	0.847
OPZ20	5' ACTTTGGCGG 3'	19	7	5	0.945
		188	86	51	0.998
ISSR 1	(AC) ₈ T	15	15	15	0.953
ISSR 2	(AG) ₈ A	12	12	5	0.829
ISSR 3	(GA) ₈ T	6	6	2	0.458
ISSR 6	(GACA) ₄	16	16	16	1.000
		49	49	38	1.000
ERIC-PCR	ERIC 1R and ERIC 2	22	10	9	0.970
BOX- PCR	BOX- A1R	20	12	10	0.980
REP-PCR	REP-PCR 1R and 2I	14	4	2	0.621

Table 3 – Pearson product-moment correlation coefficient between similarity values obtained with genetic fingerprinting methods.

	BOX	REP	RAPD	ISSR	ERIC
BOX	-	0.712**	0.848**	0.054 ^{ns}	0.565**
REP		-	0.817**	0.143*	0.670**
RAPD			-	0.066 ^{ns}	0.693**
ISSR				-	0.161*
ERIC					-

* Significant at P<0.05, ** Significant at P<0.01, ^{ns} Not significant.

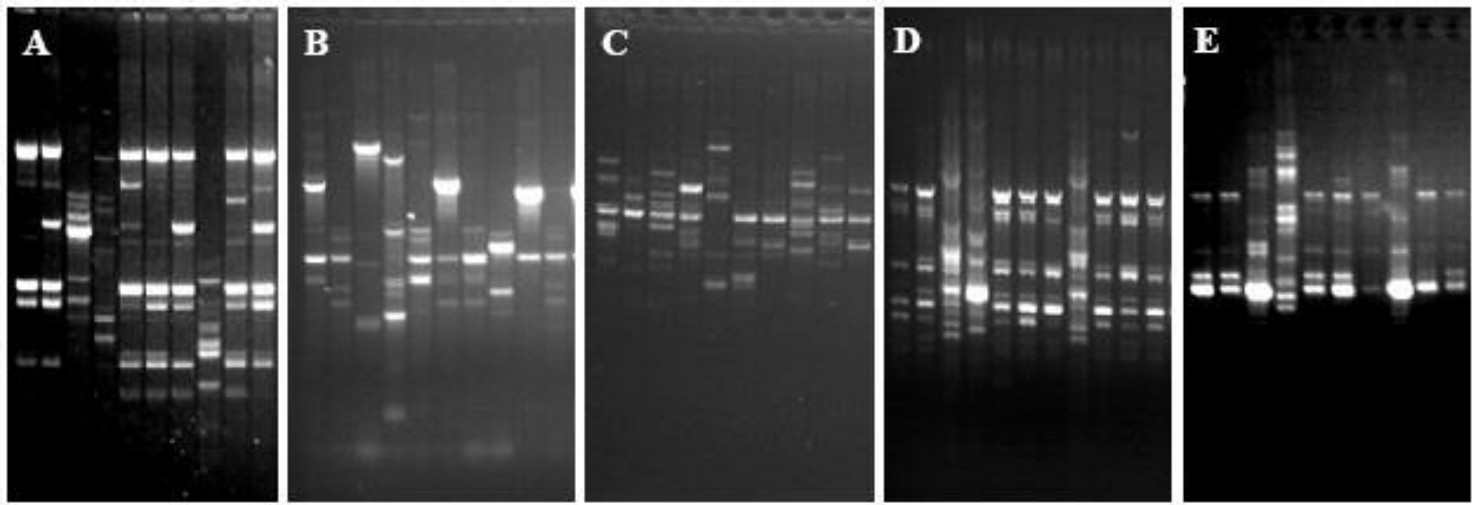


Figure 1. Examples of the profiles obtained using the five PCR methods. A. RAPD OPA11, B. ERIC-PCR, C. ISSR 6, D. BOX-PCR, E. REP-PCR. Samples (from left) IB Pro101 and 102, IB Hal 103, IB Eco 104, IB Pro 105 to IB Pro 107, IB Mor 108, and IB Pro 109 and 110.

CAPÍTULO 2

THE EFFECT OF MONOTERPENES ON SWARMING DIFFERENTIATION AND HAEMOLYSIN ACTIVITY IN *Proteus mirabilis*.

Sergio Echeverrigaray^{1*}, Lessandra Michelim^{1,2}, Ana Paula Longaray Delamare¹,
Cristiane Paim Andrade¹, Sérgio Olavo Pinto da Costa¹ and Jucimar Zacaria¹.

¹Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brazil.

²General Hospital of Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brazil.

(Trabalho aceito para publicação na Molecules)

Abstract: Urinary tract infection by *Proteus mirabilis* depends on several virulence properties that are coordinately regulated with swarming differentiation. Here we report the antibacterial and anti-swarming effect of seventeen terpenoids, and the effect of sub-inhibitory concentrations of five selected terpenoids on swarming, biofilm formation and haemolysin activity. The results showed that all the terpenes evaluated, particularly oxygenated terpenoids, inhibited *P. mirabilis* with MIC values ranging between 3 and 10 mg/L. Moreover, citral, citronellol, and geraniol effectively inhibit *P. mirabilis* swarming in a dose dependent manner, reducing swimming/swarming cell differentiation and haemolysin activity, and enhancing biofilm formation at 1/10 MIC concentration. The inhibition of *P. mirabilis* swarming and virulence factor expression by selected oxygenated terpenoids suggest that essential oils with high concentration of these compounds have the potential to be developed as products for preventing *P. mirabilis* infections.

Keywords: terpenoids, cell differentiation, *Proteus mirabilis*, MIC.

Introduction

Proteus mirabilis is one of the most important pathogens associated with complicated urinary tract infections and bacteremia, affecting patients with anatomical abnormalities, immunodeficiency, and long-term urinary catheterization [1, 2]. Urinary tract infection with *P. mirabilis* start with bladder colonization, causing bacteriuria and cystitis, and can ascend to the kidneys, leading to acute pyelonephritis, chronic inflammation, kidney stones and renal failure.

A prominent feature of *P. mirabilis* is the ability to swarm on agar plates and form highly ordered and terraced colonies with characteristic concentric rings. Swarming is process in which short vegetative swimming cells differentiate to long highly flagellated forms referred to as swarmer cells [1, 3]. Swarmer cell differentiation depends on surface contact, inhibition of flagellar rotation, cell density and cell-cell signaling [4, 5].

Several potential virulence factors including haemolysin, swarming, adhesins, proteases, and ureases, may be responsible for the pathogenicity of *P. mirabilis* [6-8]. The expression of virulence factors, including haemolysin, urease and protease, and the ability to invade human urothelial cells, is coordinately upregulated during swarming [5, 8-10]. Numerous compounds have been reported to prevent *P. mirabilis* swarming “in vitro”. Among these are charcoal and barbitone [11], urea [12], ethanol and sodium azide [13], p-nitrophenylglycerol [12, 14, 15], fatty acids [16], and resveratrol [17].

Terpenes are secondary metabolites, represented by hemiterpenes, monoterpenes, sesquiterpenes and their terpenoid derivatives. These isoprenoid compounds are the main constituents of essential oils, being responsible for their aroma or flavor. Essential oils are obtained from spices, aromatic herbs, fruits, and flowers.

Generally, the oil composition is a balance of various compounds, although in many species one constituent may prevail over all others [18].

Terpenes and terpenoids are active against bacteria, fungi, viruses, and protozoa [18]. The antibacterial action of terpenes is not fully understood but is speculated to involve membrane modifications resulting in alterations of membrane permeability and in leakage of intracellular materials [19]. Classified as Generally Recognized As Safe (GRAS), essential oils are used in food, cosmetics and pharmaceuticals, and have gained special interest because of the resistance to antibiotics that microorganisms have acquired [20, 21].

In this study we evaluated the antimicrobial activity of several monoterpenes, and the effect of sub-inhibitory concentrations of these compounds on swarming, biofilm formation, and haemolysin activity of *Proteus mirabilis*.

Results and Discussion

The anti-bacterial activity of seventeen monoterpenes against *P. mirabilis* L68, as revealed by their MIC values, is summarized in Table 1. The results showed that monoterpenes exhibited anti-bacterial activity with varying magnitudes. Citral, citronellol, geraniol, α -terpineol, terpinene-4-ol, linalool, and pulegone were the most effective monoterpenes against *P. mirabilis* L68, with MIC values between 3 and 5 mg/L. This results were confirmed with other 5 isolates of *P. mirabilis* and 2 isolates of *P. vulgaris* (data not show), indicating that these MIC values are representative of the antimicrobial activity of these monoterpenes against *Proteus*.

MIC values obtained in the present work are in accordance with previous reports in which the antibacterial effects of essential oils extracted from several plants were determined [22]. Moreover, the seven most effective compounds against *P. mirabilis*, as

determined by their MIC values, are oxygenated monoterpenes considered as broad spectrum antibacterial substances [23].

The effect of terpenes on *Proteus* (*P. mirabilis*, *P. vulgaris* and *P. penneri*) swarming behavior was indirectly reported by Mansouri *et al.* [24]. These authors showed that subinhibitory concentrations of the essential oils of *Ferula gumosa*, *Lavandula officinalis*, and *Zataria multiflora* modified or inhibited swarming.

To evaluate the effect of the monoterpenes on *P. mirabilis* swarming behavior, LB swarming agar plates containing 1/10 MIC concentration of each compound were seeded with a drop (5 μ l) of a stationary culture of wild-type L68 strain. These experiments showed that 8 out of 17 compounds tested inhibited swarming significantly (Table 1). Swarming inhibition was evidenced by a reduction on colony diameter, the number of concentric rings, and ring width (Table 1 and Figure 1). The reduction of the number of concentric rings and ring width are first indicatives of the interference of sub-inhibitory concentrations of terpenoids on swimming/swarming cell differentiation and swarming cell motility. The eight compounds that effectively inhibit swarming were oxygenated monoterpenes. Four of them (citronellol, geraniol, α -terpineol, and terpinene-4-ol) are oxygenated compounds with hydroxyl groups, one is a cyclized monoterpenes alcohol (1,8-cineol), and three are monoterpene esters (citronellal, citral and pulegone).

Comparison between the effect of citronellol, citronellal and citronellyl acetate, linalool and linalyl acetate, and geraniol and citral, indicate that hydroxyl group is important in the antibacterial activity and swarming inhibition of *P. mirabilis* by monoterpenes (Table 1). In general, the antimicrobial activity of a compound increases with the presence of an oxygen containing functional group, indicating a relationship between structure and biological activity [25, 26].

For further studies, we selected five terpenoids that exhibited significant reduction of *P. mirabilis* swarming (citral, citronellol, α -terpineol, geraniol, and pulegone). As can be observed in Fig. 2, these terpenoids (0.3 to 0.5 mg/L) reduce colony expansion over time. Moreover, swimming/swarming cyclic differentiation was not observed in the presence of citronellol and geraniol. To test whether swarming inhibition was dose dependent, the selected monoterpenes at 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, and 0.75 mg/L were added to LB swarming agar plates, and colony diameter evaluated after 18 h at 37°C. As shown in Fig. 3, swarming of *P. mirabilis* was inhibited in a dose dependent manner by the five terpenoids. Complete inhibition was observed in plates containing 0.25 and 0.75 mg/L of geraniol, and 0.75 mg/L of citral and citronellol. Similar dose dependent inhibition of swarming behavior on wild-type strains of *P. mirabilis* was previously verified for p-nitrophenylglycerol [14], fatty acids [16], and resveratrol [17].

To test if the inhibitory effect of terpenoids on swarming arise from a toxic effect on the bacteria, we evaluated whether 1/10 MIC concentration of selected terpenoids affected the growth rate of *P. mirabilis* L68. *P. mirabilis* L68 growth was not significantly reduced by citral, citronellol and geraniol, and regardless the presence of the terpenoids, the bacteria reach stationary phase with similar cell density after 16 h (aprox. 10^9 cels/ml), indicating that terpenoids effect on swarming is unlikely to be due to cell growth inhibition.

The swimming/swarming behavior of *P. mirabilis* involves the coordinate differentiation of short, motile, vegetative cells with few peritrichous flagella into long, multi-flagellated, swarm cells [5]. Cell differentiation was evaluated in the presence or absence of terpenoids on LB swarming agar. As can be observed in Fig. 4, in the absence of terpenoids, *P. mirabilis* differentiated into long cell after 4 h, undergoing a

rapid reduction on cell length after this period. Similar behavior was observed in the presence of α -terpineol and pulegone, but elongated cells were detected only 2 h later in media supplemented with citral, citronellol or geraniol. Moreover, although the five selected terpenoids reduced swarming cell length, cells were particularly shorter in the presence of citral, citronellol and geraniol. These data indicate that terpenoids inhibited swarming by interference in swimming/swarming cell differentiation.

Expression of haemolysin, protease, and urease activities in *P. mirabilis*, are regulated coordinately with swarming differentiation [14, 15]. Typical swimming and swarming cells from the cell length experiments (Fig. 4) were collected and evaluated for cell membrane-associated haemolysin activity, an important virulence factor in *P. mirabilis* [9].

As shown in Fig. 5, *P. mirabilis* swarming cells expressed highest haemolysin activities. However, in the presence of monoterpenes, this activity was lower than that of the control. The reduction in haemolysin activity was directly correlated with the reduction in swarming cell length ($R^2=0,72$), indicating that terpenoids affect cell differentiation, and consequently, haemolysin activity. This relation was observed for other compounds, as nitrophenylglycerol [14], fatty acids [16], and resveratrol [17].

A dose dependent increase in biofilm formation was observed for all the terpenes evaluated, corroborating the results obtained with mycotic acids [16]. Treatments with citronellol, citral, and geraniol (>0.3 mg/L) showed a 1.5 fold increase in biofilm formation when compared with the control. In this sense, motile deficient mutants of *Salmonella* [27], and *Pseudomonas* [28] are more proficient in biofilm formation than wild-type strains.

Terpenes and their oxygenated products are relatively inexpensive, stable, abundant, and considered as Generally Recognized As Safe (GRAS) [18]. The

inhibition of swarming and virulence factor expression suggest that selected terpenoids or essential oils with high concentration these compounds have the potential to be developed as products for preventing *P. mirabilis* infections.

Experimental

Bacterial strain and growth conditions

The bacterial strain used in this study was the wild-type *Proteus mirabilis* L68, isolated from a patient with chronic urinary tract infection [29]. Bacteria were routinely cultured at 37°C in Luria-Bertani (LB) medium.

Terpenes and terpenoids

The seven teen monoterpenes (Table 1) used were purchased from Fuska *et al.* [30].

MIC assay

The Minimal Inhibitory Concentration assay of terpenes was performed by the broth microdilution [31]. Briefly, serial dilutions of monoterpenes, previously diluted in dimethylsulfoxide (DMSO), were prepared in sterile LB medium in 96-well microtiter plates. Freshly grown bacterial suspensions in LB were standardized to 10^8 CFU/ml, and added to the wells (10 μ l). The last row containing only the serial dilution of essential oils without bacteria was used as negative control. After incubation at 37°C for 24 h the first well without turbidity was determined as the minimum inhibitory concentration (MIC). Controls without and with DMSO at the same concentration used to dilute the terpenes were included.

Swarming behavior assay

The swarming migration distance assay was performed as described by Liaw *et al.* [15,16]. Briefly, an overnight *P. mirabilis* L68 culture (5µl) was inoculated centrally onto the surface of dried LB swarming agar (1.5%) plates without or with different monoterpenes. The plates were incubated at 37°C, and the swarming migration distance was assayed by measuring the swarm fronts of the bacterial cells and recording progress at 60 min intervals. Controls plates without and with DMSO at the same concentration used to dilute the terpenes were included.

Biofilm formation assay

Biofilm assay was performed in 96-well microtiter polystyrene dishes (TPP, Switzerland) following the procedure described by Heilmann *et al.* [32].

Measurement of cell length

Measurement of cell length was performed as described by Liaw *et al.* [16], with modifications. Briefly, 200 µl of stationary-phase LB cultures were spread onto LB agar plates without and with appropriate terpenes (1/10 MIC concentration) and incubated at 37°C. Cell from the entire surface of agar plates were harvested with 2ml of saline at 1h intervals. Bacterial cells were fixed and stained with 0.18% safranin solution (Merck, Germany), examined by light microscopy (Bioval, China) at a magnification of 1000x, and digitalized using a Samsung digital camera. The lengths of 100 cells in each sample were determined, and the average was calculated. Controls plates without and with DMSO at the same concentration used to dilute the terpenes were included.

Membrane-associated haemolysin

Swimming and swarming cells collected from agar plates were washed with saline and adjusted to a $DO_{600} = 0.7$. Cell membrane-associated *haemolysin* activity was assayed as previously described by Liaw *et al.* [16]. Relative activities (%) were calculated considering the values obtained with swarming cells in the absence of terpenes as 100%.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the CNPq, CAPES, and FAPERGS.

References

1. Mobley, H.L.; Belas, R. Swarming and pathogenicity of *Proteus mirabilis* in the urinary tract. *Trends Microbiol* **1995**, 3, 280-284.
2. Senior, B.W. *Proteus morgani* is less frequently associated with urinary tract infections than *Proteus mirabilis*- an explanation. *J Med Microbiol* **1983**, 35, 203-207.
3. Fraser, G.M.; Hughes, C. Swarming motility. *Curr Opin Microbiol* **1999**, 2, 630-635.
4. Sturgill, G.; Rather, P.N. Evidence that putrescine acts as an extracellular signal required for swarming in *Proteus mirabilis*. *Mol Microbiol* **2004**, 51, 437-446.
5. Rather, P.N. Swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. *Environ Microbiol*. **2005**, 7, 1065-1073.
6. Wassif, C.; Cheek, D.; Belas, R. Molecular analysis of a metalloprotease from *Proteus mirabilis*. *J Bacteriol* **1995**, 177, 5790-5798.

7. Rozalski, A.; Sidorczyk, Z.; Katelko, K. Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. *Microbiol. Mol Biol Rev* **1997**, 61, 65-89.
8. Fraser, G.M.; Claret, L.; Furness, R.; Gupa, S.; Hughes, C. Swarming-coupled expression of the *Proteus mirabilis* hpmBA haemolysin operon. *Microbiology* **2002**, 148, 2191-2201.
9. Mobley, H.L.; Belas, R.; Lockatell, V.; Chippendale, G.; Trifillis, A.L.; Johnson, D.E.; Warren, J.W. Construction of a flagellum negative mutant of *Proteus mirabilis*: effect on internalization by human renal epithelial cells and virulence in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Infect Immun* **1996**, 64, 5332-5340.
10. Walker, K.E.; Moghaddame-Jafari, S.; Locktell, C.V.; Johnson, D.; Belas, R. ZapA, the IgA-degradin metalloprotease of *Proteus mirabilis*, is a virulence factor expressed specifically in swarmer cells. *Mol Microbiol* **1999**, 32, 825-836.
11. Alwen, J.; Smith, D.G. A medium to suppress the swarming of *Proteus* species. *J Appl Bacteriol* **1967**, 30, 389-394.
12. William, F.D. Abolition of swarming of *Proteus* by p-nitrophenyl glycerin: general properties. *Appl Microbiol* **1973**, 25, 745-750.
13. Hernandez, E.; Ramisse, F.; Carvalho, J.D. Abolition of swarming of *Proteus*. *J Clin Microbiol* **1999**, 37, 3435.
14. Liaw, S.J.; Lai, H.C.; Ho, S.W.; Luh, K.T.; Wang, W.B. Inhibition of virulence factor expression and swarming differentiation in *Proteus mirabilis* by p-nitrophenylglycerol. *J Med Microbiol* **2000**, 49, 725-731.
15. Liaw, S.J.; Lai, H.C.; Ho, S.W.; Luh, K.T.; Wang, W.B. Characterization of p-nitrophenylglycerol-resistant *Proteus mirabilis* super-swarmer mutants. *J Med Microbiol* **2001**, 50, 1039-1048.

16. Liaw, S.J.; Lai, H.C.; Wang, W.B. Modulation of swarming and virulence by fatty acids through the RsbA protein in *Proteus mirabilis*. *Infect Immun* **2004**, *72*, 6836-6845.
17. Wang, W.B.; Lai, H.C.; Hsueh, P.R.; Chiou, R.Y.; Lin, S.B.; Liaw, S.J. Inhibition of swarming and virulence factor expression in *Proteus mirabilis* by resveratrol. *J Med Microbiol* **2006**, *55*, 1313-1321.
18. Cowan, M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* **1999**, *12*, 564-582.
19. Trombetta, D.; Castelli, F.; Sarpietro, M.G.; Venuti, V.; Cristani, M.; Daniele, C.; Saija, A.; Mazzanti, G.; Bisignano, G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**, *49*, 2474-2478.
20. Hammer, K.A.; Carson, C.F.; Riley, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol* **1999**, *86*, 985-990.
21. Essawi, T.; Srour, M. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharm* **2000**, *70*, 343-349.
22. Burt, S.A. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *Inter J Food Microbiol* **2004**, *94*, 223-253.
23. Kotan, R.; Kordali, S.; Cakir, A. Screening of antibacterial activities of twenty-one oxygenated monoterpenes. *Z Naturforsch* **2007**, *62*, 507-513.
24. Mansouri, S.; Amari, A.; Asad, A.G. Inhibitory effect of some medicinal plants from Iran on swarming motility of *Proteus* rods. *J Med Sci* **2005**, *5*, 216-221.
25. Naigre, R.; Kalck, P.; Roques, C.; Rocux, I.; Michel, G. Comparison of antimicrobial properties of monoterpenes and their carbonylated products. *Planta Med* **1996**, *62*, 275-277.

26. Dahr, P.; Ayala, U.; Andarge, E.; Morisseau, S.; Snyder-Leiby, T. Study of the structural changes on the antimicrobial activity of [3.1.1.]-bicyclics. *J Essent Oil Res* **2004**, 16, 612-616.
27. Mireles, J.R.; Toguchi, A.; Harshey, R.M. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfacting inhibits biofilm formation. *J Bacteriol* **2001**, 183, 5848-5854.
28. Déziet, E.; Conneau, Y.; Villemur, R. Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpilliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J Bacteriol* **2001**, 183, 1195-1204.
29. Costa, S.O.P.; Bianco, M.; Bonato M.C. Instability of protease (gelatinase) trait in *Proteus mirabilis*. *Rev Microbiol* **1982**, 13, 35-45.
30. Fuksa, M.; Krajden, S.; Lee, A. Susceptibility of 45 clinical isolates of *Proteus penneri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1984**, 26, 419–420.
31. Mann, C.M.; Markham, J.L. A new method for determining the of minimum inhibitory concentration of essential oils. *J Appl Microbiol* **1998**, 84, 538-544.
32. Heilmann, C.; Schweitzer, O.; Gerke, C.; Vanittanakom, N.; Mack, D.; Gotz, F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol* **1996**, 20, 1083–1091.

Table 1- Minimum inhibitory concentration (MIC) and the effect of 1/10 MIC concentration of monoterpenes on the swimming/swarming behavior of *P. mirabilis* L68.

Treatments	MIC (mg/L)	Colony diameter (mm)* ¹	N° of concentric rings	Second ring width (mm) ¹
pulegone	5	53.2 ± 1.5 ^e	5-6	3.8 ± 1.4 ^{bc}
citronellol	3	23.7 ± 1.5 ^f	5-6	1.0 ± 0.5 ^d
citronellal	6	68.0 ± 0.6 ^b	6	4.3 ± 0.3 ^b
citronellyl acetate	>10	79.2 ± 3.5 ^b	6	4.5 ± 0.9 ^b
geraniol	3	22.5 ± 0.6 ^f	3-4	0.8 ± 0.3 ^d
bornyl acetate	10	71.3 ± 1.5 ^b	6	4.3 ± 0.3 ^b
α-terpinene	7.5	79.3 ± 3.5 ^{ab}	5-6	6.1 ± 2.2 ^a
α -terpineol	5	49.6 ± 1.0 ^d	4-5	4.2 ± 0.4 ^b
terpinene-4-ol	5	62.5 ± 1.0 ^c	5-6	4.5 ± 1.3 ^b
linalool	6	72.8 ± 1.7 ^b	5-6	6.2 ± 1.2 ^a
linallyl acetate	>10	82.1 ± 3.0 ^a	6	4.5 ± 0.1 ^b
limonene	10	82.0 ± 2.7 ^a	6	5.4 ± 1.3 ^{ab}
citral	5	41.0 ± 1.5 ^d	4-5	2.8 ± 1.0 ^c
mentone	>10	66.7 ± 1.7 ^c	5-6	4.7 ± 1.7 ^b
β-pineno	>10	79.5 ± 4.7 ^{ab}	6	7.0 ± 3.6 ^a
1,8-cineol	7.5	74.6 ± 2.5 ^b	6	3.0 ± 0.9 ^c
carveol	10	83.2 ± 1.7 ^a	5-6	7.0 ± 2.3 ^a
Control	-	84.2 ± 3.5 ^a	6	6.5 ± 2.2 ^a

* Colony diameter in LB swarming plates with 1/10 MIC concentration (0.3 to 1 mg/L). Data were obtained after 24h at 37°C.

¹Means followed by the same letter are not significantly different according to Tukey's test (p=0.05).

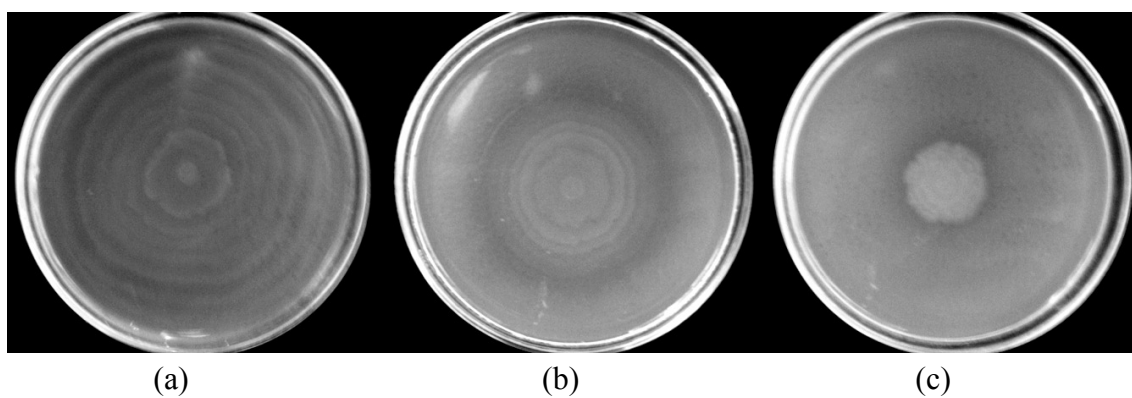


Figure 1- Swarming of *Proteus mirabilis* L68 on LB swarming agar plates without terpenes (a), and with 0.5 mg/L of α -terpineol (b) and 0.3 mg/ml citronellol (c).

Note: Incubation period of 24h at 37°C.

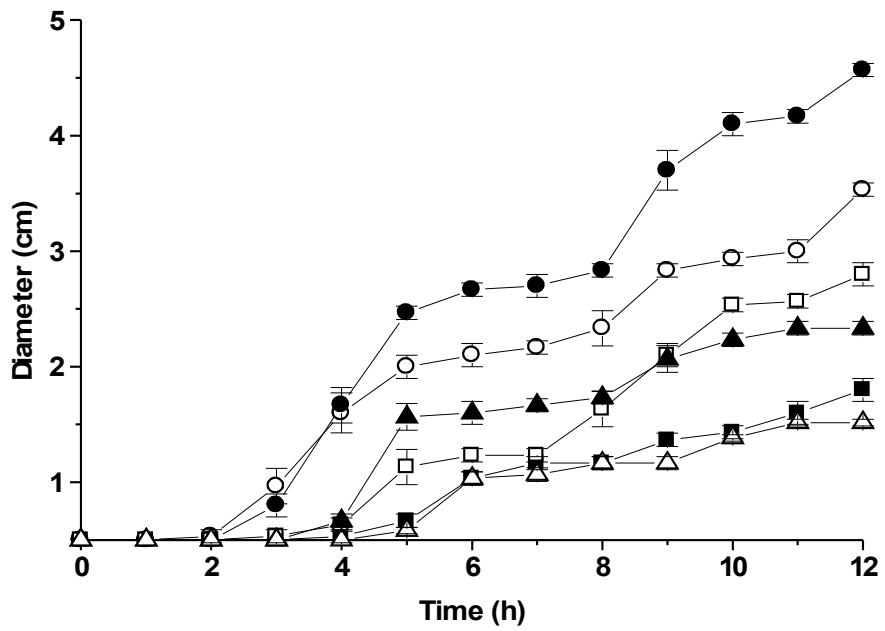


Figure 2. Effect of selected monoterpenes on the swarming behavior of *Proteus mirabilis* (L68 wild strain): ● control (no terpenes), ○ pulegone (0.5 mg/L), ▲ citral (0.5 mg/L), △ geraniol (0.3 mg/L), ■ citronellol (0.3 mg/L), □ α -terpineol (0.5mg/L). The data represent the averages of colony diameter of three independent experiments with standard deviations.

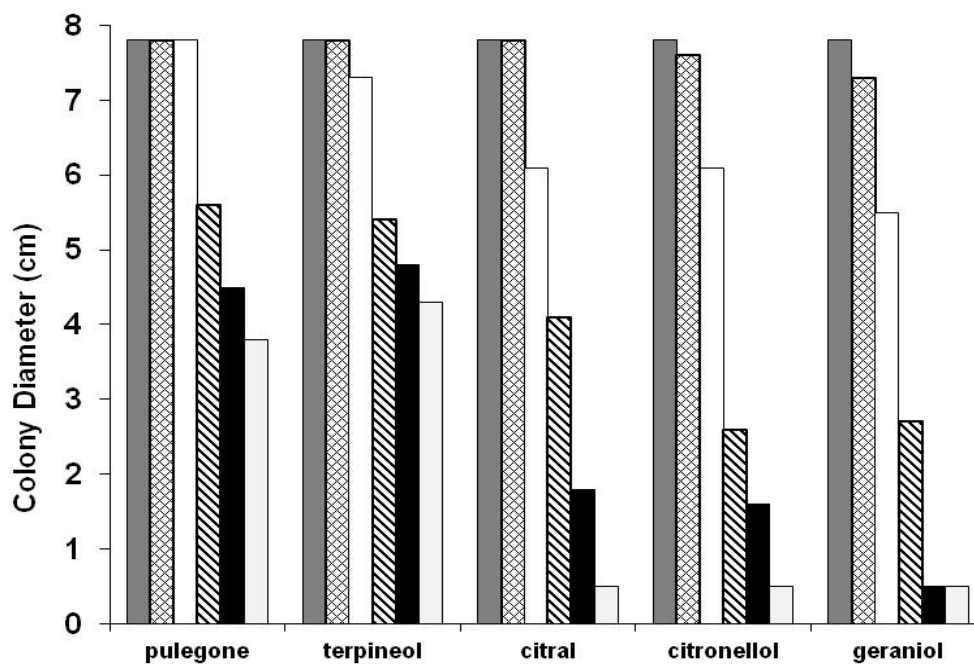


Figure 3- Histogram showing the swarming migration of *P. mirabilis* in the presence of different concentrations of glycerol and selected monoterpenes. Data represent the average of three independent experiments.

■Control , ▨0.06 mg/L, □0.12 mg/L, ▩0.25 mg/L, ■0.50 mg/L and □0.75 mg/L.

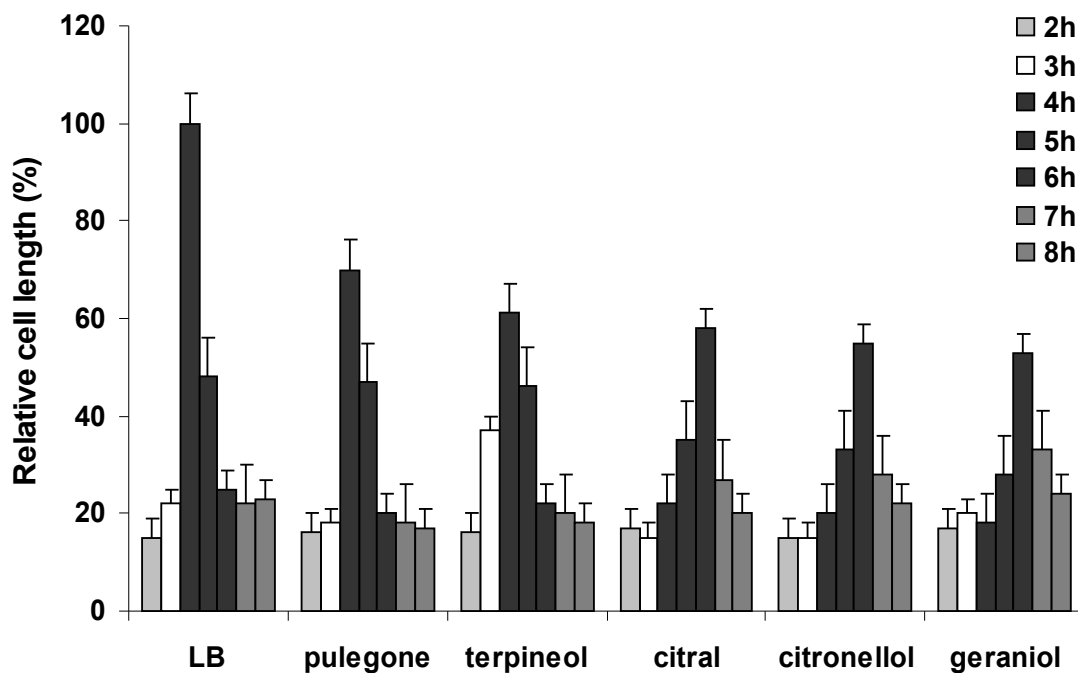


Figure 4- Effect of selected monoterpenes on the cell length of *P. mirabilis* L68. The concentration of monoterpenes added were 0.3 mg/L for citronellol and geraniol, and 0.5 mg/L for citral, pulegone and α -terpineol. Data represent the average of three independent experiments.

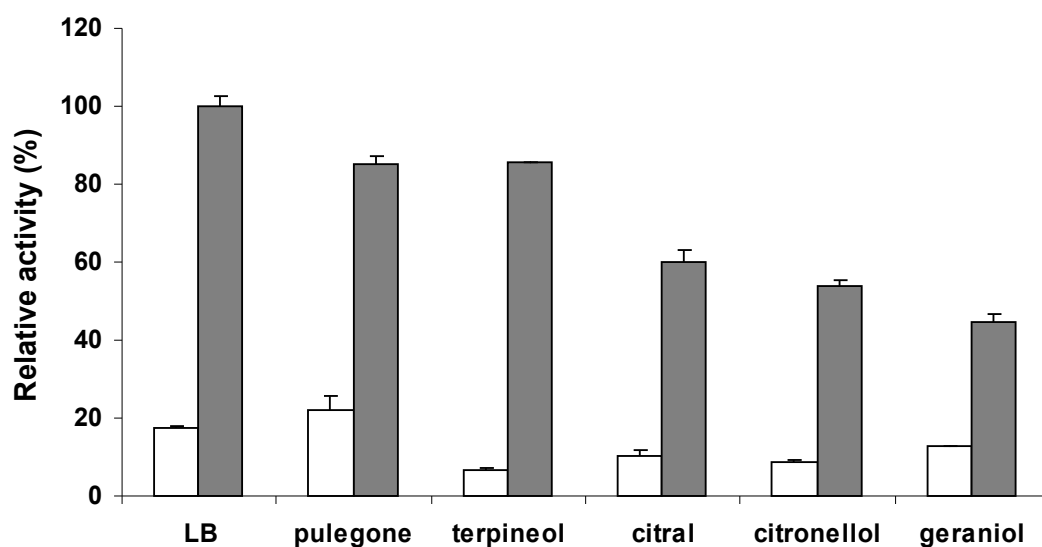


Figure 5- Effect of selected monoterpenes on the haemolysin activity of *P. mirabilis* L68. The concentration of monoterpenes added were 0.3 mg/L for citronellol and geraniol, and 0.5 mg/L for citral, pulegone and α -terpineol. Data represent the average of three independent experiments. Vegetative cells (white bars), Swarming cells (gray bars).

CAPÍTULO 3

THE EXTRACELLULAR METALLOPROTEASE COMPLEX OF *PROTEUS MIRABILIS*.

Lessandra Michelim¹, Ana Paula Longaray Delamare¹ and Sergio Echeverrigaray¹

¹ *Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brazil.*

(Trabalho em preparação para publicação em BMC Microbiology)

Address for correspondence: Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada. Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul. R. Francisco G. Vargas 1130, Petrópolis. Zip code: 95001-970. Caxias do Sul, RS, Brazil. Phone: (54) 32146750. Fax: (54) 32187237. Cellphone: (54) 991229469. E-mail: lessandra@gmail.com

Note: Financial support from the Foundation of the University of Caxias do Sul and CNPq.

Abstract

Metalloproteases, particularly mirabilysin (ZapA), are considered important virulence factors of *Proteus mirabilis*. Mirabilysin is active against a broad range of proteins including IgA and IgG. In this study we report a bioinformatic study of the metalloprotease complex of *P. mirabilis*, as well as a structural analysis of mirabilysin. The results showed the presence of: (1) five metalloprotease genes located in a contiguous region within bacterial genome; (2) two different structural and functional proteases in *P. mirabilis*, one represented by four highly similar Zn-metalloproteases with a long C-terminal Peptidase M10 calcium-binding domain, and a typical serralyisin Zn-metalloprotease represented by mirabilysin (ZapA); (3) a sigma 28 promoter controlling the Zap operon transcription; and (4) a precocious rho-independent terminator within Zap operon. The structure of mirabilysin exhibited the typical N-terminus ZnMc serralyisin domain, characterized by an α/β structure with a HExGHxxGLxH motif, and the C-terminus peptidase M10 domain formed by nine β -rolls with calcium binding G-rich nonapeptides.

Keywords: *Proteus mirabilis*, metalloproteases, promoter, 3-D structure.

Introduction

Proteus mirabilis are Gram-negative rods, members of the *Enterobacteriaceae* family, frequently found in soil, water and the intestinal tract of many animals. Although not considered as a common cause of urinary tract infections in normal hosts, *P. mirabilis* is one of the most important pathogens associated with complicated urinary tract diseases (acute pyelonephritis, bladder, kidney stones) and bacteremia in patients with anatomical abnormalities, immunodeficiency, and long-term urinary catheterization (Chow et al., 1979; Mobley and Belas, 1995; O'Hara et al., 2000).

Several potential virulence factors including haemolysin, swarming, adhesins, proteases, and ureases, may be responsible for the pathogenicity of *P. mirabilis* (Wassif et al., 1995; Rozalski et al., 1997; Fraser et al., 2002). The expression of virulence factors, including haemolysin, urease and protease, and the ability to invade human urothelial cells, is coordinately upregulated during swarming (Mobley et al., 1996; Walker et al., 1999; Fraser et al., 2002; Rather, 2005).

The extracellular protease of *P. mirabilis*, mirabilysin is considered one of the main virulence factors. This EDTA sensitive metalloprotease, referred as an immunoglobulin A (IgA) protease differed from other enzymes of this group in that it cleaves the IgA heavy chain outside the hinge region (Loomes et al., 1990; Wassif et al., 1995). Early electrophoretic analysis of purified mirabilysin showed the presence of three bands with proteolytic activity against IgA1, IgA2 and IgG (Loomes et al., 1990). Mirabilysin is a 50kDa protein codified by a single gene *zapA*, that makes part of approximately 5-kb operon (Wassif et al., 1995). Zap operon includes four genes, *zapA* metalloprotease structural gene, *zapB* permease component of the ABC-type protease/lipase transport system gene, *zapC* HlyD family secretion protein gene, and

zapD outer membrane efflux protein gene (Wassif et al., 1995; Walker et al., 1999). Recently, Pearson et al. (2008) deposited the complete genome of *P. mirabilis*, opening new opportunities for the study of these important pathogenic bacteria.

In this study we used a bioinformatic approach to analyze the metalloprotease complex of *P. mirabilis*, and a molecular modelling of ZapA based on structural protein homology.

Material and Methods

The nucleotidic and aminoacid sequences of ZapA gene and Zap operon of *P. mirabilis*, as well as the orthologous sequences present in other bacterial species were obtained from NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The sequences used are listed in Table 1.

Promoters prediction was carried out using BPPROM (<http://linux1.softberry.com>) and PPP (<http://bioinformatics.biol.rug.nl>), and rho-independent terminators and RNA secondary structure were analyzed using FindTerm (<http://linux1.softberry.com>) and RNAfold (<http://rna.tbi-univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>), respectively.

The comparison of mirabilysin sequence with other proteins was carried out using BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Orthologous protein sequences from different genera were aligned using Clustal X (Thompson et al., 1997), and a dendrogram was generated by the Mega 4.0.1 program (Tamura et al., 2004) using the Neighbor-joining algorithm (Saitou e Nei, 1987).

The parameters of ZapA protein were calculated using several tools of the Expaty Molecular Biology Server (<http://www.expasy.org>). ZapA conserved domains

were identified by the Conserved Domain Architecture Retrieval Tool (CDART) of NCBI.

Sequence alignment was carried out using the ClustalX program (Thompson et al., 1997) and the results were edited in the BioEdit environment (Hall, 1999).

The structural model of ZapA protein of *P. mirabilis* was determined using the Swiss-model Workspace (<http://swissmodel.expasy.org>), an integrated on-line service for the structural modeling of proteins based on homology with previously deposited 3-D structures obtained by X-ray and/or NMR analysis. The 3-D protein model used to predict ZapA structure was the serralysin of *Serratia marcescens* (1sat.chainA). The structure of the serralysin 1sat was obtained by X-ray analysis of the crystallized protein with a resolution of 1,75 Å (Baumann, 1994). The 3-D structures were visualized and analyzed using the Deep-View program (www.expasy.org/spdbv/).

To confirm the model, the atomic coordinates of 1 sat were used as model to predict the tridimensional structure of ZapA using the Modeller 6.v2 program (Sali e Blundel, 1993). Ten structural models of the ZapA protein were generated and their quality evaluated using the method of variable function in the Modeller program (Fiser et al., 2000). The stereochemical quality of the ZapA protein model was evaluated by Procheck (Laskowski et al., 1993) and Ramachandran plot (Ramachandran e Sasisekharan, 1968).

Results and discussion

A BLAST analysis of the translated products on the recently published *P. mirabilis* HI4320 (NC 010554) allowed identifying six metalloproteases. These proteases are codified by a group of genes that are present in a contiguous region between the positions 3723440 and 37344650. As can be observed in Figure 1, four

metalloproteases are codified by monocistronic operons, while the last metalloprotease (ZapA) makes part of a polycistronic operon. As previously reported by Wassif et al. (1995) and Walker et al. (1999), the Zap operon includes four genes, *zapA* metalloprotease structural gene, *zapB* permease component of the ABC-type protease/lipase transport system gene, *zapC* HlyD family secretion protein gene, and *zapD* outer membrane efflux protein gene.

The alignment and analysis of the intergenic region (~610pb) situated between *zapE* (PMI 0179) and the zap operon, using the sequence deposited by Wassif et al. (1995) and the corresponding region in *P. mirabilis* genome (Pearson et al., 2008), showed some interesting features (Figure 1A). First, these region have a repetitive sequence (CAAACAT)_n with 11 copies in the Zap operon of *P. mirabilis* isolate BB2000 and 18 copies in HI4320. A nBLAST analysis showed that this repetitive sequence was not present in other regions of *P. mirabilis* HI4320 and in other bacteria. Although the function of this region is not clear, the variation in the number of repetitions and its positions before the predicted promoter, may influence the transcription efficiency of zap operon. Second, a promoter region similar to that recognized by sigma 28 (or sigma F) in *E. coli* and *Chlamydia* was identified. The position of this -35 (TAATGTCT) and -10 (GCCAGATAA) sequences, as well as the presence of a Shino-Dalgarno sequence (GAGGA), indicates that transcription initiate approximately 40pb before the first codon. The identification of a sigma 28 promoter is particularly significant considering that this alternative sigma factor is involved in *Salmonella* (Schaubach and Dombroski, 1999), and *E. coli* (Yu et al., 2006) flagellin production, and flagellin and protease expression are co-regulated during *P. mirabilis* swarming (Allison et al., 1992; Rozalski et al., 1997). Moreover, a typical sigma 28 gene (FliA) was identified in *P. mirabilis* genome (Pearson et al., 2008), and a promoter

analysis showed that the most important flagellin gene (FliC1) is also controlled by this sigma factor. An analysis of the promoter regions of the other metalloproteases of *P. mirabilis* showed that their transcription is mediated by sigma 70.

Walker et al. (1999) showed that ZapA metalloprotease is expressed specifically in swarmer cells. These authors identified a 1.4b mRNA in swarmer cells, which correspond to the ZapA transcript, but they did not find the polycistronic mRNA (~6.0 nucleotides), a fact that can indicate the presence of an intracistronic terminator. Considering these results, the transcript of intergenic region between ZapA and ZapB was searched for RNA structures compatible with rho-independent terminators using FindTerm and RNAfolder programs. As shown in Figure 1B, a mRNA stem-loop structure with a free energy of 19.7 kcal/mol formed by 10 nucleotide pair, and followed by a typical poly-U region was detected. Precocious intracistronic terminators have been previously detected in different operons and bacteria (Gupta et al., 2005).

BLASTp analysis using *P. mirabilis* ZapA predicted protein sequence showed that this metalloprotease belongs to the Zinc-dependent metalloprotease, serralyisin_like subfamily, a group of enzymes that are considered important virulence factors in several pathogenic bacteria. As can be observed in Figure 2, a cluster analysis based on the primary sequences of *P. mirabilis* and other metalloproteases, showed that these proteases form two clusters. The first cluster showed that the mirabilysin (ZapA) is closely related with extracellular metalloproteases of other enterobacteria like *Yersinia*, *Serratia*, *Photobacterium* and *Erwinia*, as well as the enzymes codified by *Caulobacter*, an α -proteobacteria, and *Pseudomonas* (γ -proteobacteria). The other metalloproteases of *P. mirabilis*, including ZapE, formed a separate group. These metalloprotease differed from the first group by the presence of a N-terminal portion of approximately 270

residues of unknown function, and a long peptidase M10C domain with 11 hemolysin-like calcium-binding repeats (Pearson et al., 2008).

An initial structural analysis of mirabilysin sequence showed that this metalloprotease is formed by two conserved domains: a ZnMc serralysin like domain, and a peptidase M10C domain, and that like other serralysin family proteases do not have N-terminal signal sequence, as determined by SignalP analysis, but requires a specific secretion mechanism that involves the products of *zapB*, *zapC* and *zapD* genes (Lory, 1992).

In this terms, its is interesting to note that while *P. mirabilis* Zap operon, as well as those of *Pseudomonas*, *Erwinia* and *Photorhabdus*, include the structural metalloprotease gene and the secretion related genes, the operon of *Serratia proteamaculans* (2607072-2608544) and *Yersinia pestis* (4472443-4473780), are formed just by the metalloprotease gene. Genes related to protease secretion and orthologous to *zapB-zapD*, are present in *Serratia proteamaculans* (1746330-1750864) and *Yersinia pestis* (4401611-4404823) genomes, distant form the serralysin genes.

Moreover, *Pseudomonas*, *Erwinia* and *Photorhabdus* operons include a *inh* gene that codify a Inh inhibitor that is secreted into the periplasm where its presumed physiological function is to protect periplasmic proteins against the action of secreted proteases. Inh gene are not found in *P. mirabilis*, *Serratia* and *Yersinia* serralysin operons. However, orthologs of this inhibitory proteins are present in *Yersinia* and *Serratia* genomes, but not in *P. mirabilis* genome (Pearson et al., 2008). The protease inhibitory protein of *Serratia marcescens* (SmaPI) was characterized by Kim et al. (1995).

As can be observed in Table 2, ZapA sequence exhibited the typical HExGHxxGLxH motif of the N-terminal ZnMc serralysin domain, and a conserved

methionine, which is located on a turn near the catalytic site, 39 residues toward the C terminus. This conserved motif corresponds to the zinc binding region and the active site of the metalloprotease. Moreover, seven repetitive glycine-rich nonapeptide that folds in a β -roll are present in ZapA sequence within its C-terminal peptidase M10 domain. These sequence repeats have been found in a variety of toxins (RTX toxins) and appears to be involved also in the secretion process (Welch , 1991).

The secondary predicted structure of ZapA is formed by five α -helix, four of which within the ZnMc serralyisin domain, and 34 β -sheets or strands, 24 of which are present in the N-terminus M10 domain, characterizing α/β and a β structures, respectively (Table 2).

The three-dimensional model of ZapA of *P. mirabilis* (Figure 3 A) and the determined structure of the serralyisin 1sat of *Serratia marcescens* (Figure 3B) clearly shows the high similarity between these proteins, that was confirmed by a low RMS value of 2.4. The M10 domain of both enzymes exhibits nine β -rolls formed by two antiparallel β -sheets linked by short turns. These rolls, in 1sat serralyisin model, are stabilized by calcium ions. Considering the presence of G-rich sequences within the M10 domain and the stimulating effect of calcium on mirabilysin activity, calcium ions may play also a stabilizing roll on mirabilysin. Moreover, an extra β -sheet formed by three aminoacids located between residues 371 and 378 is present in mirabilysin.

As can be observed in Figure 4, the histidine residues (His176, His180 and His186) within the conserved HExGHxxGLxH motif, as well as Tyr216 and Met224, link with a zinc atom forming the active site of the metalloprotease.

In conclusion, the bioinformatic analysis of the metalloprotease complex of *P. mirabilis* indicated the presence of: (1) five metalloprotease genes located in a contiguous region within bacterial genome; (2) two different structural and functional

proteases in *P. mirabilis*, one represented by four highly similar Zn-metalloproteases with a long C-terminal Peptidase M10 calcium-binding domain, and a typical serralysin Zn-metalloprotease represented by mirabilysin (ZapA); (3) a sigma 28 promoter controlling the Zap operon transcription; and (4) a precocious rho-independent terminator within Zap operon.

References

- Allison, C., Lai, H, and Hugues, C. 1992. Co-ordinate expression of virulence genes during swarm cell differentiation and population migration of *Proteus mirabilis*. *Mol. Microbiol.* 6: 1583-1591.
- Baumann, U. 1994. Crystal structure of the 50 kDa metallo protease from *Serratia marcescens*. *J Mol Biol*, **242**, 244-251.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Fiser, A.; Do, R.K. and Sali, A. 2000. Modeling of loops in protein structures. *Protein Sci.* 9:1753-1773.
- Gupta, A., Maranas, C.D. and Albert, R. 2005. Elucidation of directionality for co-expressed genes: predicting intra-operon termination sites. *Bioinformatics* 22: 209-214.
- Kim, K.S., Kim, T.U., Kim, I.J., Byun, S.M., Shin, Y.C. 1995. Characterization of a metalloprotease inhibitor protein (SmaPI) of *Serratia marcescens*. *Appl Environ Microbiol.* 61: 3035–3041.
- Laskowski, R.A.; MacArthur, M.W.; Moss, D.S. and Thornton, J.M. 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26: 283-291

- Loomes, L. M., B. W. Senior, and M. A. Kerr. 1990. A proteolytic enzyme secreted by *Proteus mirabilis* degrades immunoglobulins of the immunoglobulin A1 (IgA1), IgA2, and IgG isotypes. *Infect. Immun.* 58:1979–1985.
- Lory, S. 1992. Determinants of Extracellular Protein Secretion in Gram-Negative Bacteria. *J. Bacteriol.* 174: 3423-3428.
- Pearson, M.M., Sebahia, M., Churcher, C., Quail, M.A., Seshasayee, A.S., Luscombe, N.M., Abdellah, Z., Arrosmith, C., Atkin, B., Chillingworth, T., Hauser, H., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Norbertczak, H., Rabinowitsch, E., Walker, D., Whithead, S., Thomson, N.R., Rather, P.N., Parkhill, J. and Mobley, H.L. 2008. Complete genome sequence of uropathogenic *Proteus mirabilis*, a master of both adherence and motility. *J. Bacteriol.* 190: 4027-4037.
- Ramachandran, G.N. and Sasisekharan, V. 1968. Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Prot. Chem.* 23: 283-437.
- Rozalski, A., Sidorczyk, Z., and Kotelko, K. 1997. Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 65-89.
- Sali, A. and Blundell, T.L. 1993. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234: 779-815.
- Schaubach, O.L. and Dombroski, A.J. 1999. Transcription initiation at the flagellin promoter by RNA polymerase carrying σ^{28} from *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 274: 8757-8763.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S 2007. *MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.

- Thompson J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. 1997. The ClustalX Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 4876–4882.
- Walker, K.E., Moghaddame-Jafari, S., Lockett, C.V., Johnson, D., Belas, R. ZapA, the IgA-degrading metalloprotease of *Proteus mirabilis*, is a virulence factor expressed specifically in swarmer cells *Mol. Microbiol.* 32 (4), 825-836 (1999)
- Wassif C, Cheek D, Bela R. 1995. Molecular analysis of metalloprotease from *Proteus mirabilis*. *J. Bacteriol.* 177: 5790–5798.
- Welch, R.A. 1991. Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 5: 521-528.
- Yu, H.H.Y., Kibler, D., and Tan, M. 2006. In silico prediction and functional validation of σ^{28} -regulated genes in *Chlamydia* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188: 8206-8212.

Table 1- Accession numbers of the sequences used in this work.

<i>Definition</i>	<i>Access</i>
<i>P. mirabilis</i> HI4320 Complete genome	gi 197283915 NC_010554
<i>Operon Zap de P. mirabilis</i>	gi 3493594 gb AF064762.1 AF064762[3493594]
<i>Mirabilysin ZapA de P. mirabilis</i>	gi 3493596 gb AAC33449.1 [3493596]
<i>Metalloprotease - Yersinia pestis CO92</i>	gi 16124100 ref NP_407413.1
<i>RTX toxin – Yersinia intermedia</i>	gi 77978978 ref ZP_00834400.1
<i>Metalloprotease – Yersinia enterocolitica</i>	Gi 123444226 ref YP_001008194.1
<i>Metalloprotease P1 – Yersinia ruckeri</i>	Gi 14161134 emb CAC39217.1
<i>Metalloprotease – Erwinia amylovora</i>	Gi 4826415 emb CAB42873.1
<i>Metalloprotease – Erwinia carotovora</i>	Gi 50121709 ref YP_050876.1
<i>Metalloprotease PRTX – Erwinia chrysantemi</i>	Gi 131089 sp P19144.1
<i>Insecticidal protein – Serratia marcescens</i>	Gi 199583196 gb ACH90152.1
<i>Serralysin – Serratia proteamaculans</i>	Gi 157370627 ref YP_001478616.1
<i>Metalloprotease – Phenylobacterium zucineum</i>	Gi 197106755 ref YP_002132132.1
<i>Metalloproteinase – Pseudomonas aeruginosa</i>	Gi 15596446 ref NP_249940.1
<i>Protease PrtA – Pseudomonas fluorescens</i>	Gi 4063015 gb AAD09851.1

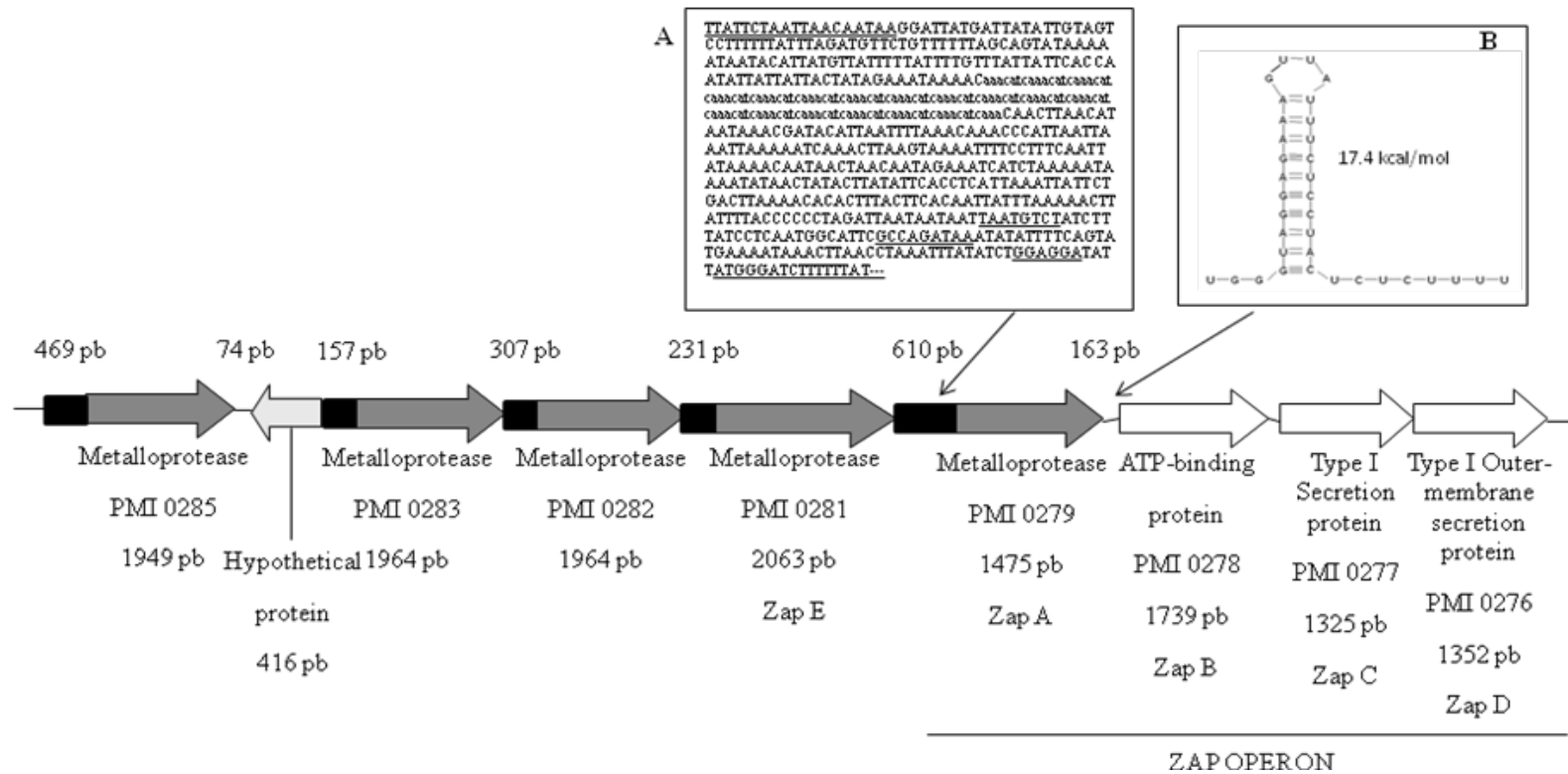


Figure 1- Local structure of the metalloproteases coding region in *P. mirabilis* HI4320 (gi:197283915) genome (3723440 e 3739246 pb). (A) Intergenic region downstream Zap operon showing the predicted σ^{28} promoter (-35 and -10 sequences) and the Shine-Dalgarno sequence, and (B) a predicted precocious rho-independent terminator in the intergenic region between zapA and zapB.

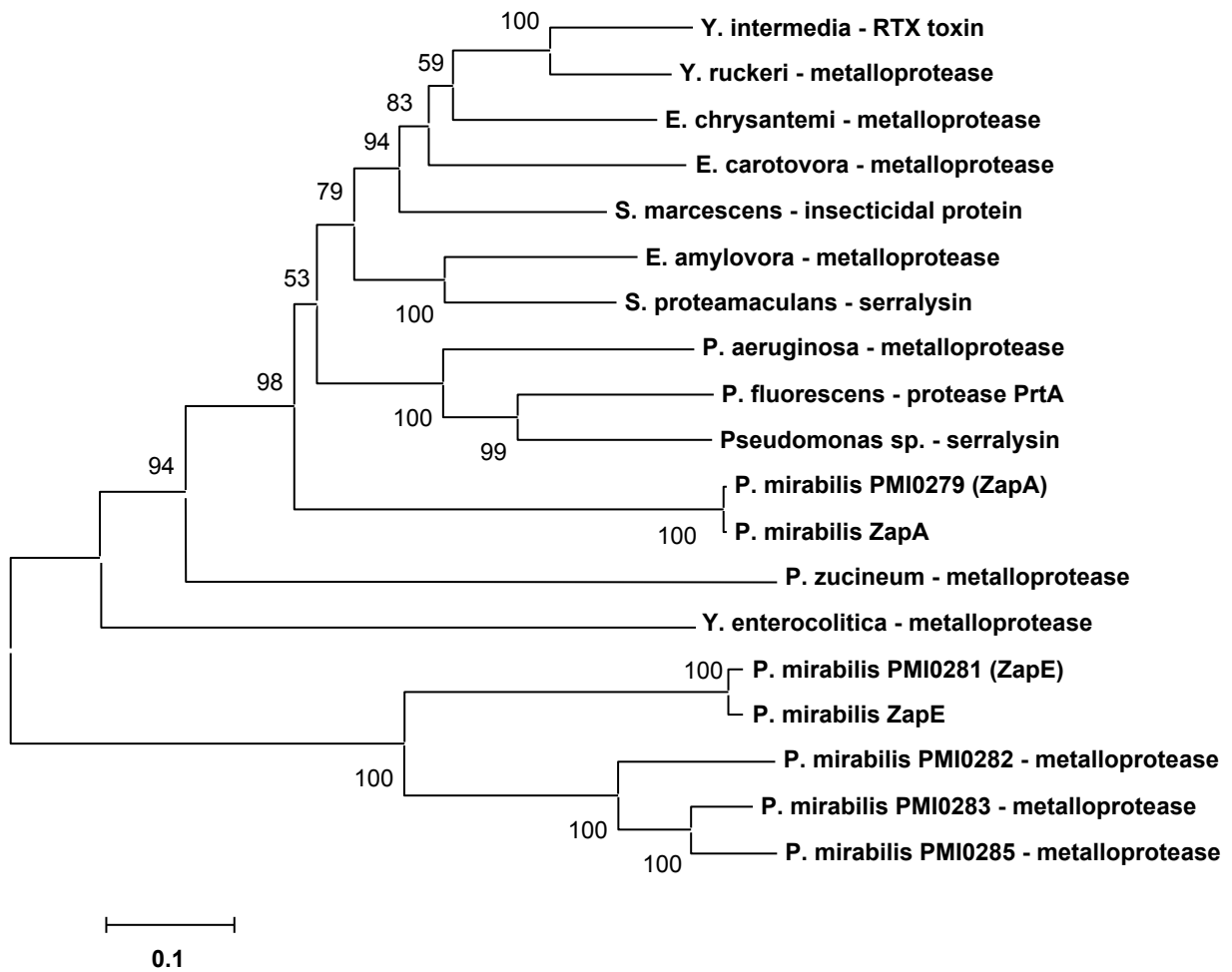


Figure 2- Relationship between some bacterial metalloproteases inferred using the Neighbor-Joining method. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (100 replicates) is shown next to the branches.

Table 2- Alignment and secondary structure of the mirabilysin (ZapA) de *P. mirabilis* and the serralysin of *Serratia marcescens*. Calcium-binding repeats of c-terminal domain of serralysin subfamily (yellow) with their characteristic GgxGxD pattern, and the hydrophobic consensus motif HExxHxLGLxHP (gray).

ZapA	35				SFD	YDTAGKHIAR	EDSTWNGKYV
lsat	4	tgydavddll	hyhergngiq	ingkd--sfs		neqaglfitr	enqtwngykv
		hhhhhhhh		ss s ss s		hhhhhhh	sss sss
ZapA	58	IGQPAEVTYS	FPKWEG-KFN	QFGNKNPYEF	NELQKEHARK	SLDAWSDIAN	
lsat	52	fgqpvkltfs	fpdykfsstn	vagdtglskf	saeqqqqakl	slqswadvan	
		sssss		ssss	hhhhhhhhh	hhhhhhsss	
		sssss		ssss	hhhhhhhhh	hhhhhhsss	
ZapA	107	IKFTEVAVGN	VDGMKASDVK	TDITFGNIYD	PNGTFQAYAT	LPNTYAYGKD	
lsat	102	itftevaagq	kanitfgnys	qdrp-gh-yd	-ygt-qayaf	lpntiwggqd	
		sssss	sssss	s	sssss	sss ss	
		sssss	sssss	ss s ss	sssss	sss ss	
ZapA	157	LSGQAWFSDY	HYAGNTPEL	GNYGRLTIIH	EIGHTLGLMH	PGDYNAGQNV	
lsat	148	lggqtwynvn	q-snvkhp	edygrqtfth	eighalglsh	pgdynagegd	
		s sssssss		hhhhhhhh	hhhhh		
		s sssssss	hhh	hhhhhhhh	hhhhh		
ZapA	207	PGYLKSDYAE	DSRQYTVMSY	WDEYETGAHF	QGAYAGAPLL	HDISAMQYLY	
lsat	197	ptyadvtyae	dtrqfslmsy	wsetntggdn	gghyaaapll	ddiaaiqhly	
						h hhhhhhhh	
						h hhhhhhhh	
ZapA	257	GANTTT RTGD	D VYGFNSNTG	IDYYTATDSN	DKLIFSVWDS	GGNDTFDFSG	
lsat	247	ganlstrtgd	tvvygfnsntg	rdflsttsns	qkvifaawda	ggndtfdfsq	
		sss sss	sssss		sss s ss	sssss	
		sss sss	sssss		sss s ss	sssss	
ZapA	307	FHQDQLIDLR	AGNFSDV GGL	QKNV SIAQNV	TIENAI GGFG	NDIIHGNDAD	
lsat	297	ytanqrinln	eksfsdvvggl	kgnvsiaagv	tienaiggsg	ndvivgnaan	
		sssss	sss s	sssssss	sss	sssss	
		sssss	sss s	sssssss	sss	sssss	
ZapA	357	N TLI GGEGDD	I IYGHSGNNT	I Y GGRGQ DTL	H GGTGSNTFI	YKEIADSLVT	
lsat	347	nvlkggagnd	vlf-----	--gg-gadel	wggagkdifv	fsaadsapq	
		sssss s	sss sss	sss sss	s ssss s		
		sssss s	sss	sss	sss s	sssss s	
ZapA	407	AADKIMDFKT	GIDKIDLSTL	IQDTFSSKIL	NFVDNFTGNA	GEATLSYNEV	
lsat	388	asdwardfjk	gidkidslff	dkeanssfi	hfvdhfsgta	geallsynas	
		ssss	ssss hh	hhhh	sss	sssssss	
		ssss	ssss hh	hhhh	sss	sssssss	
ZapA	457	TNASELAINA	YGYNYNPDFK	IDIVGFVNYE	TDFIV		
lsat	438	snvtdlsvni	ggha-apdf	vkivggvdva	tdfiv-		
		sssssss	ss	sssss	sss		
		sssssss	ss	sssss	sss		



Figure 3- Tri-dimensional model of the *P. mirabilis* mirabilisin (A) and the model metalloprotease (serralyisin) of *Serratia marcescens*.

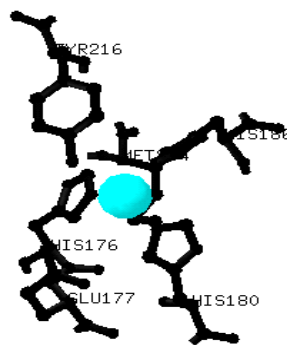


Figure 4- Conserved zinc binding motif and active site of the mirabilysin of *P. mirabilis*.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos é possível tecer as seguintes conclusões.

- 1- Entre os métodos de PCR avaliados para caracterização de isolados clínicos de *P. mirabilis* (RAPD, ISSR, ERIC-PCR, BOX-PCR e rep-PCR), os padrões de tipificação e a análise de agrupamentos mostraram que RAPD, BOX-PCR e ERIC-PCR são capazes de diferenciar *P. mirabilis* de *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, e *Morganella morganii*, com elevado poder discriminatório entre isolados de *P. mirabilis*. Em geral, os marcadores moleculares ERIC-PCR e BOX-PCR podem ser considerados como um sistema rápido e eficiente de discriminação entre isolados clínicos *P. mirabilis* clinical isolates para fins de estudos epidemiológicos.
- 2- Alguns monoterpenos, particularmente citral, citronelol, geraniol, terpineol, terpineno-4-ol e pulegona, apresentaram efeito inibitório sobre o isolado L68 de *P. mirabilis*, com MIC da ordem de 3 a 5 mg/L, indicando que o uso de óleos essenciais com esses componentes podem ser efetivos no controle clínico deste microrganismo.

- 3- Dosagem subinibitórias de citral, citronelol e geraniol reduzem, de forma dose dependente, a diferenciação “swimming/swarming” e a atividade hemolítica em *P. mirabilis*, mas aumentam significativamente a formação de biofilme.
- 4- Foram identificados cinco genes de metaloproteases localizados em uma região contínua do genoma de *P.mirabilis*, sendo que duas proteases diferentes funcional e estruturalmente foram observadas, uma representada por quatro Zn-metaloproteases semelhantes entre si, com uma longa região C-terminal do tipo Peptidase M10, e uma serralisina Zn-metaloprotease representada pela mirabilisin (ZapA).
- 5- O operon Zap está sob controle do um promotor sigma-28 e apresenta um terminador rho-indepedente precoce entre os genes ZapA e ZapB, indicando co-regulação com “swarming” e elevada síntese de mirabilisina.
- 6- A estrutura da mirabilisina (zapA) exhibe um domínio N-terminal típico de serralisina, caracterizado por uma estrutura α/β com o motivo HExGHxxGLxH, e uma região C-terminal do tipo Peptidase M10 formada por nove folhas β com nonapeptídeos ricos em G que representam ligações de cálcio.

5. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR

Allison, C.N.; Coleman, P.L.J.; Hughes, C. (1992a). Ability of *Proteus mirabilis* to invade human urothelial cells is coupled to motility and swarming differentiation. **Infect. Immun.** 60: 4740–4746.

Allison, C.; Lai, H.C.; Huges C. (1992b). Co-ordinate expression of virulence genes during swarm-cell differentiation and population migration of *Proteus mirabilis*. **Mol. Microbiol.** 6: 1583-1591.

Almeida Alves, T.M.; Silva, A.F.; Brandão, M.; Grandi, T.S.M.; Smânia, E.F.; Smânia Jr, A.; Zani, C.L. (2000). Biological screening of brasilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 95 (3): 367-373.

Amoroso, M.C.M. (2002). Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 16: 189-203.

Anéas, M.A.F; Portaro, F.C.V.; Lebrun, I.; Juliano, L.; Palma, M.S.; Fernandes, B.L. (2001). ZapA, a possible virulence factor from *Proteus mirabilis* exhibits broad protease substrate specificity. **Braz. J. Med. Biol. Res** 34: 1397-1403.

Araújo, C.A.C.; Leon L.L. (2001). Biological activities of *Curcuma longa* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 96: 723-728.

Avancini, C.A.M.; Wiest, J.M.; Mundstock, E. (2000). Atividade bacteriostática e bactericida do decocto de *Baccharis trimera* (Less.) D.C. - Compositae, carqueja, como desinfetante ou antisséptico. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia** 52(3): 230-234.

Bandeira, J.A.; Wanick, M.C. (1974). Ação antiinflamatória e cicatrizante de *Schinus aroeira* Vell, em pacientes com cervicite e cervicovaginite. **Revista do Instituto de Antibióticos** 14: 05-106.

Bahrani, F.K.; Johnson, D.E.; Robbins, D.; Mobley, H.L.T. (1991). *Proteus mirabilis* flagella and MR/P fimbriae: isolation, purification, N-terminal analysis, and serum antibody response following experimental urinary tract infection. **Infect. Immun.** 59: 3574–3580.

Basile, A.C. (1990). Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **Journal of Ethnopharmacology** 30: 187-197.

Bassler, B.L.; Wright, M.; Showalter, R.E.; Silverman, M.R. (1993). Intercellular signaling in *Vibrio harveyi*: Sequence and function of genes regulating expression of luminescence. **Mol. Microbiol.** 9: 773–786.

Bassler, B.L.; Greenberg, E.P.; Stevens, A.M. (1997). Cross species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. **J. Bacteriol.** 179: 4043–4045.

Bassler, B.L. (1999). How bacteria talk to each other: Regulation of gene expression by quorum sensing. **Curr. Opin. Microbiol.** 2: 582–587.

Baumann, U. (1994). Crystal structure of 50kDa metalloprotease from *Serratia marcescens*. **J. Mol. Biol.** 242: 244-251.

Belas, R.; Flaherty, D. (1994). Sequence and genetic analysis of multiple flagellin-encoding genes from *Proteus mirabilis*. **Gene** 148: 33–41.

Belas, R.; Schneider, R; Melch, M. (1998). Characterization of *Proteus mirabilis* precocious swarming mutants: identification of *rsbA*, encoding a regulator of swarming behavior. **J. Bacteriol.** 180: 6126-6139.

Belas, R. (2002). Mirabilysin. In: Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF (eds.) **Handbook of Proteolytic Enzymes**. 2nd ed. Academic Press London. In Press.

Bijlsma, I.G.W.; van Dijk, L.; Kusters, J.G.; Gaastra, W. (1995). Nucleotide sequence of two fimbrial major subunit genes, *pmpA* and *ucaA* from canine-uropathogenic *Proteus mirabilis* strains. **Microbiol.** 141:1349–1357.

Bingen, E.; Boissinot, C.; Desjardins, P.; Cave, H.; Lambert-Zechovsky, N.; Denamur, E.; Blot, P.; Elion, J.(1993) Arbitray primed polymerase chain reaction provides rapid differentiation of *Proteus mirabilis* isolates from pediatric hospital. **J. Clin. Microbiol.** 31: 1055-1059.

Burrall, L.S.; Harro, J.M.; Li X.; Lockatell, V.C.; Himpsl, S.D.; Henbel, R.; Johnson, D.E.; Mobley, H.L.T. (2004). *Proteus mirabilis* genes that contribute to pathogenesis of urinary tract infection: identification of 25 signature-tagged mutants attenuated at least 100-fold. **Infect. Immun.** 72(5):2922-2938.

Cechinel filho, V. (1999). Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. **Química Nova** 23 (5): 680-685.

Chen, C. P.; Lin, C.C.; Namba, T. (1989). Screening of Taiwanese crude drugs for antibacterial activity against *Streptococcus mutans*. **Journal of Ethnopharmacology** 27: 285-295.

Chow, A.W.; Taylor, P.R.; Yoshikawa, T.T.; Guze, L.B. (1979). A nosocomial outbreak of infection due to multiply resistant *Proteus mirabilis*: role of intestinal colonization as a major reservoir. **J. Infect. Dis.** 130: 621– 627.

Clapham, L.; McLean, R.J.C.; Nickel, J.C.; Downey, J.; Costerton, J.W. (1990). The influence of bacteria on struvite crystal habit and its importance in urinary stone formation. **J. Crystal Growth** 104: 475–484.

Cieslikowski, T.; Gradecka, D.; Mielczarek, M.; Kaca, W. (2003). Tandem tetramer based microsatellite fingerprinting for typing of *Proteus mirabilis* strains. **J. Clin. Microbiol.** 41: 1673-1680.

Coffer, P.A.; Miller, J.F. (1997). A mutation in the *Bordetella bronchiseptica* *bvgS* gene results in reduced virulence and increased resistance to starvation, and identifies a new class of Bvg-regulated antigens. **Mol. Microbiol.** 24: 671-685.

Coenye, T.; Spilker, T.; Martin, A.; LiPuma, J.J. (2002). Comparative assessment of genotyping methods for epidemiologic study of *Burkholderia cepacia* Genomovar III. **J. Clin. Microbiol.** 40: 3300-3307.

Cohen, M.L. (1992). Epidemiology of drug resistance: implications for a post antimicrobial era. **Science** 257: 1050.

Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews** 12: 564-582.

Deighton, C.H.; Gray, J.W.; Bint, A.M.; Walker, D.J. (1992). Anti-*Proteus* antibodies in rheumatoid arthritis same-sexed sibships. **Br. J. Rheumatol.** 31: 241-245.

Delepelaire, P.; Wandersman, C. (1990). Protein secretion in gram-negative bacteria. The extracellular metalloprotease B from *Erwinia chrysanthemi* contains a C-terminal secretion signal analogous to that of *Escherichia coli* α -hemolysin. **J. Biol. Chem.** 265: 17118-17125.

Drechsel, H.; Thieken, A.; Reissbrodt, R.; Jung, G.; Winkelmann, G. (1993). α -Keto acids are novel siderophores in the genera *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella* and are produced by amino acid deaminases. **J. Bacteriol.** 175: 2727–2733.

Donia, M.; Hamann, M. T. (2003). Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. **The Lancet Infectious Diseases** 3 (6): 338-349.

El Nunzio, M.J. (1985). Óleo de copaíba e seu emprego cosmético. **Aerosol e Cosméticos** 7 (41): 7-9.

El-Sakhawy, F.S.; El-Tantawy, M.E.; Ross, S.A.; El-Sohly, M.A. (1998). Composition and microbial activity of the essential oil of *Murraya exotica*. **Flavour and Fragrance Journal** 13(1): 59-62.

Engbrecht, J.; Neelson, K.; Silverman, M. (1983). Bacterial bioluminescence: Isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. **Cell** 32: 773–781.

Engbrecht, J.; Silverman, M. (1984). Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 81: 4154–4158.

Engbrecht, J.; Silverman, M. (1987). Nucleotide sequence of the regulatory locus controlling expression of bacterial genes for bioluminescence. **Nucleic Acids Res.** 15: 10455–10467.

Engler, H.D.; Troy, K.; Bottone, E.J. (1990). Bacteremia and subcutaneous abscess caused by *Proteus penneri* in a neutropenic host. **J. Clin. Microbiol.** 28:1645–1646.

Freeman, J.A.; Bassler, B.L. (1999b). Sequence and function of LuxU: A two-component phosphorelay protein that regulates quorum sensing in *Vibrio harveyi*. **J. Bacteriol.** 181: 899–906.

Felmlee, T.; Pellet, S.; Lee, E.Y.; Welch, R.A. (1985). *Escherichia coli* hemolysin is released extracellularly without cleavage of a signal peptide. **J. Bacteriol.** 163: 88-93.

Fraser, G.M.; Claret, L.; Furness, R.; Gupta, S.; Hugues, C. (2002). Swarming-couples expression of the *Proteus mirabilis* *hpmBA* haemolysin operon. **Microbiol.** 148: 2191-2201.

Fry, D.C.; Kuby, S.A.; Mildvan, A.S. (1986). ATP-binding site of adenylate kinase: mechanistic implications of its homology with ras-encoded p21, F1-ATPase, and other nucleotide-binding proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 83: 907-911.

Fuksa, M.; Krajden, S.; Lee, A. (1984). Susceptibility of 45 clinical isolates of *Proteus penneri*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 26: 419–420.

Fuqua, C.; Winans, S.C.; Greenberg, E.P. (1996). Census and consensus in bacterial ecosystems: The LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. **Ann. Rev. Microbiol.** 50: 727–751.

Genera, K. (2000). Enteric bacteria. In Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock **Biology of Microorganisms**. 9th ed. Prentice Hall, NJ-USA. p. 481-482.

Gnan, S.O.; Demello, M.T. (1999). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by aqueous goiaba extracts. **Journal of Ethnopharmacology** 68: 103-108.

Ghigo, J.M.; Wandersman, C. (1994). A carboxyl-terminal four-amino acid motif is required for secretion of the metalloprotease PrtG through the *Erwinia chrysanthemi* protease secretion pathway. **J. Biol. Chem.** 269: 8979-8985.

Gonçalves, A.L.; Alves Filho, A.; Menezes H. (2005). Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arq. Inst. Biol.** 72 (3): 353-358.

Gottlieb, O. (1981). New and underutilized plants in the Americas: solution to problems of inventory through systematics. **Interciência** 6 (1): 22-29.

Gottlieb, O. R.; Borin, M. R. DE M.B. (2002). Quantitative Chemobiology: A Guide into the Understanding of Plant Bioactivity. **Journal of Brazilian Chemical Society** 13 (6): 772 -776.

Gray, L.; Mackmann, J.; Nicaud, M.; Hollnad, I.B. (1986). The carboxy-terminal region of haemolysin 2001 is required for secretion of the toxin from *Escherichia coli*. **Mol. Gen. Genet.** 205: 127-133.

Hacker, J.; Hughes, C. (1985). Genetic analysis of bacterial hemolysin production. **Bull Inst Pasteur** 83: 149-165.

Hacker, J.; Goebel, W. (1987). Mechanism and methods for analyzing pathogenicity. **Swiss Biotechnol.** 5: 21–31.

Haralampidis, K.; Brian, G.; Qi, X. et al. (2001). Of antimicrobial phytoprotectants in monocots. **Proc.Nat. Acad. of Sci. USA** 98 (23): 13431-13436.

Herrera, J.B.R.; Bartel, B.; Wilson, W.K. et al. (1998). Cloning and characterization of the *Arabidopsis thaliana* cupEol synthase gene. **Phytochemistry** 49 (7): 1905-1911.

Heinrich, M.M.; Kuhnt, M.; Wright, C.W.; Rimpler, H.; Phillipson, J.D.; Schandelmaier, A.; Warhurst, D.C. (1992). Parasitological and microbiological evaluation of mixed Indian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology** 36: 81-85.

Hickman, F.W.; Steigerwalt, A.G.; Farmer III, J.J.; Brenner, D.J. (1982). Identification of *Proteus penneri* sp. nov., formerly known as *Proteus vulgaris* indole negative or as *Proteus vulgaris* biogroup 1. **J. Clin. Microbiol.** 15:1097–1102.

Higgins C. (1992). ABC-transporters: from microorganisms to man. **Ann. Rev. Cell Biol.** 8: 67-113.

Himpsl, S.D.; Lockatell, C.V.; Hebel, J.R.; Jonhson, D.E.; Mobley, H.L.T. (2008). Identification of virulence determinants in uropathogenic *Proteus mirabilis* using signature-tagged mutagenesis. **J. Med. Microbiol.** 57: 1068-1078.

Hoffmann, G.; Gajdos, G., Czako, M.; Kerenyi, M.; Toht, V.; Emody, L.; Tomocsanyi, T. (1998). Diversity among clinical isolates of *Proteus penneri* detected by random amplified polymorphic DNA analysis. **Zentbl. Bakteriol.** 288: 351-60.

Holetz, F.B.; Pessini, G.L.; Sanches, N.R.; Cortez, D.A.G.; Nakamura, C.V.; Dias Filho, B.P. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 97 (7): 1027-1031.

Husselstein-Muller, T.; Schaller, H.; Benveniste, P. (2001). Molecular cloning and expression in yeast of 2,3-oxidosqualene-triterpenoid cyclases from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology** 45 (1): 75-72.

Island, M.D.; Mobley, H.L.T. (1995). *Proteus mirabilis* urease: operon fusion and linker insertion analysis of *ure* gene organization, regulation, and function. **J. Bacteriol.** 177: 5653–5660.

Jakes, K.S.; Model, P. (1979). Mechanism of export of colicin E1 and colicin E3. **J. Bacteriol.** 138: 770-778.

Jansen, A. M.; Lockatell, C. V.; Johnson, D. E.; Mobley, H.L.T. (2003). Visualization of *Proteus mirabilis* morphotypes in the urinary tract: the elongated swarmer cell is rarely observed in ascending urinary tract infection. **Infect. Immun.** 71:3607-3613.

Jones, B. D.; Mobley, H.L.T. (1988). *Proteus mirabilis* urease: genetic organization, regulation, and expression of structural genes. **J. Bacteriol.** 170:3342-3349.

Jones, B. V.; Mahenthiralingam, E.; Sabbuba, N.A.; Stickler, D. J. (2005). Role of swarming in the formation of crystalline *Proteus mirabilis* biofilms on urinary catheters. **J. Med. Microbiol.** 54:807-813.

Johnson, D.E.; Russell, R.G.; Lockatell, C.V.; Zulty, J.C.; Warren, J.W.; Mobley, H.L.T. (1993). Contribution of *Proteus mirabilis* urease to persistent urolithiasis and acute pyelonephritis in a mouse model of ascending urinary tract infection. **Infect. Immun.** 61: 2748–2754.

Karapavlidou, P.; Sofianou, D.; Manolis, E.N.; Pournaras, S.; Tsakris, A. (2005). CTX-M-1 Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Proteus mirabilis* in Greece. **Microbial Drug Resistance** 11(4): 351-354.

Kim, J.Y.; Park, Y.J.; Kim, S.I.; Kang, M.W.; Lee, S.O.; Lee, K.Y. (2004). Nosocomial outbreak by *Proteus mirabilis* producing extended-spectrum beta-lactamase VEB-1 in a Korean university hospital. **J Antimicrob Chemother** 54(6):1144-1147.

Koronakis, V.; Cross, M.; Senior, B.; Koronakis, E.; Hughes C. (1987). The secreted hemolysins of *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* and *Morganella morganii* are genetically related to each other and to the alpha- hemolysin of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 169: 1509-1515.

Kozalski, A.; Sidorczyk, Z.; Kotelko, K. (1997). Potential virulence factor of *Proteus* bacilli. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 61: 65-89.

Kushiro, T.; Shibuya, M.; Masuda, K. (1998). Beta-amyrinsynthase-cloning of oxidoscalene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants. **European Journal of Biochemistry** 256: 238-244.

Larsson, P.; Fath, A.; Jodal, U.; Sohl Akerlund, A.; Svanborg Eden, C. (1978). Urinary tract infections caused by *Proteus mirabilis* in children. The antibody response to O and H antigens and Tamm Horsfall protein and bacterial adherence to uroepithelium. **Acta Paediatr. Scand.** 67: 591–596.

Lilley, B.N.; Bassler, B.L. (2000). Regulation of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by LuxO and sigma-54. **Mol. Microbiol.** 36: 940–954.

Li, X.; Zhao, H.; Lockett, C. V.; Drachenberg, C. B.; Johnson, D. E.; Mobley, H. L.T. (2002). Visualization of *Proteus mirabilis* within the matrix of urease-induced bladder stones during experimental urinary tract infection. **Infect. Immun.** 70: 389-394.

Lima, C.A.A.; Pastore, G.M.; Lima, E.D.P.A. (2000). Estudo da atividade dos ácidos anacárdicos do óleo da castanha de caju (CNSL) dos clones de Cajueiro-anão-precoce CCP – 76 e CCP – 09 em cinco estágios e maturação sobre microorganismos da cavidade bucal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 20 (3): 358-362.

Loomes, L.M.; Senior, B.W.; Kerr, M.A. (1990). A proteolytic enzyme secreted by *Proteus mirabilis* degrades immunoglobulins of the immunoglobulin IgA1 (IgA1), IgA2, and IgG isotypes. **Infect. Immun.** 58:1979–1985.

Loomes, L.M.; Senior, B.W.; Kerr, M.A. (1992). Proteinases of *Proteus*: purification, properties and detection in urine of infected patients. **Infect Immun** 60: 2267-2273.

Lorenzi, H. (1992). Árvores brasileiras. **Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas no Brasil**. Nova Odessa: Ed. Plantarum. p360.

Lu, J.J.; Perng, C.L.; Lee, S.Y.; Wan, C.C. (2000). Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. **J. Clin. Microbiol.** 38: 2076–2080.

Lukomski, S.; Pytlos, M.; Serwecinska, L.; Sidorczyk, Z.; Jaworski, A. (1993). Analysis of antibiotic resistance determinants in *Proteus penneri*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 12: 467–470.

Mackmann, N.; Nicaud, J.M.; Gray, L.; Holland, I.B. (1986). Secretion of haemolysin by *Escherichia coli*. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** 125: 159-181.

Mansouri, S.; Amari, A.; Asad, A.G. (2005). Inhibitory effect of some medical plants from Iran on swarming motility of *Proteus* rods. **J Med Sci** 5(3): 216-221.

Marsaioli, A.J. (1975). Diterpenes in the bark of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry** 14:1882-1883.

Martinez, M.J.; Gonzalez, N.A.; Babel, J.B. (1996). Actividad antimicrobiana del *Schinus terebenthifolius* Raddi (*COPAL*). **Revista Cubana de Plantas Medicinails** 1: 37-39.

McLean, R.J.C.; Cheng, K.J.; Gould, W.D.; Costerton, J.W. (1986). Histochemical and biochemical urease localization in the periplasm and outer membrane of two *Proteus mirabilis* strains. **Can. J. Microbiol.** 32: 772–778.

McLean, R.J.C.; Nickel, J.C.; Cheng, K.J.; Costerton, J.W. (1988). The ecology and pathogenicity of urease-producing bacteria in the urinary tract. **Crit. Rev. Microbiol.** 16: 37–79.

Miller, M.B.; Bassler, B.L. (2001). Quorum Sensing in Bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.** 55: 165–199.

Mobley, H.L.T.; Hausinger, R.P. (1989). Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. **Microbiol. Rev.** 53: 85–108.

Mobley, H.L.; Chippendale, G.R. (1990). Hemagglutinin, urease, and hemolysin production by *Proteus mirabilis* from clinical sources. **J. Infect. Dis.** 161:525-530.

Mobley, H.L.T.; Belas, R. (1995). Swarming and pathogenicity of *Proteus mirabilis* in the urinary tract. **Trends Microbiol.** 3: 280–284.

Mobley, H.L.T. (1996). Virulence of *Proteus mirabilis*. In: Mobley HLT and Warren JW (ed.), Urinary tract infections. **Molecular pathogenesis and clinical management.** ASM Press, Washington, D.C. p. 245–269.

Morita, M.; Shibuya, M.; Kushiro, T.; Masuda, K.; Yutaka, E. (2000). Molecular cloning and functional expression of triterpene synthases from pea (*Pisum sativum*). **European Journal of Biochemistry** 267: 3453-3460.

Morrisey, J.P.; Osburn, A. E. (1999). Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. **Microbiol. Mol. Biol. Review** 63 (3): 708-724.

Mors, W.B.; Rizzini, C.T.; Pereira, N.A. (2000). **Medicinal plants of Brazil.** Michigan: Reference Publications. 372p.

Musher, D.M.; Griffith, D.P.; Yawn, D.; Rossen, R.D. (1975). Role of urease in pyelonephritis resulting from urinary tract infection with *Proteus*. **J. Infect. Dis.** 131:177–181.

Nakamura, C.V.; Ueda-Nakamura,T.; Bando, E. (1999). Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L.essential oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 94: 675-678.

Nascimento, G.G.F.; Locatelli, J.; Freitas, P.C. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic – resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology** 31: 247-256.

Nickolson, E.B.; Concaugh, E.A.; Mobley, H.L.T. (1991). *Proteus mirabilis* urease: use of a UreA-LacZ fusion demonstrates that induction is highly specific for urea. **Infect. Immun.** 59: 3360–3365.

Nicolas-Chanoine, M.H.; Espinasse-Maes, F. (1997). Evaluation of clonal relatedness of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Proteus mirabilis* isolates by quantitative antibiogram and RAPD typing. **Clin. Microbiol. Infect.** 3(1): 45-52.

O'Hara, C.M.; Brenner, F.W.; Miller, J.M. (2000). Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. **Clin. Microbiol. Rev.** 13: 534-546.

Oliveira, A.B.; Almeida, E.R.; Silva Filho, A.A. (1990). Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de Bigniaceas brasileiras. **Quimica Nova** 13 (4): 302-307.

Pearson, M.; Sebahia, M.; Churcher, C.; Quail, A.A.; Seshasayee, A. S.; Luscombe, N. M.; Abdellah, Z.; , Arrosmith, C.; Atkin, B.; Chillingworth, T.; Hauser, H.; Jagels, K.;

Moule, S.; Mungall, S.; Norbertczak, H.; Rabbinowitsch, E.; Walker, D.; Whithead, S.; Thomson, N.R.; 2Rather, P.N.; Parkhill, J.; Mobley, H.L.T. (2008). Complete Genome Sequence of Uropathogenic *Proteus mirabilis*, a Master of both Adherence and Motility. **J. Bacteriol.** 190(11): 4027–4037.

Penner, J.L. (1992). The genera *Proteus*, *Providencia* and *Morganella*, In: A. Balows, H. G. Truper, W. Harder, and K. H. Schleifer (ed.). **The prokaryotes, vol. III.** Springer-Verlag KG, Berlin, Germany. p. 2849–2853.

Pfaller, M.A.; Mujeeb, I.; Hollis, R.J.; Jones, R.N.; Doern, G.V. (2000). Evaluation of the discriminatory powers of the Dienes test and ribotyping as typing methods for *Proteus mirabilis*. **J. Clin. Microbiol.** 38: 1077-1080.

Pignato, S.; Giammanco, G.M.; Grimont, F.; Grimont, P.A.D.; Giammanco, G. (1999). Molecular characterization of the genera *Proteus*, *Morganella*, and *Providencia* by ribotyping. **J. Clin. Microbiol.** 37: 2840-2847.

Prince, K.R.; Johnson, I.T.; Fenwick, G.R. (1987). The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedingstuffs. **Critical Review in Food Science and Nutrition** 26 (1): 127-135.

Radzilejewska-Lebrecht, J.; Zych, K.; Lipin'ska, M.; Sidorczyk, Z. (1993). Further core types of *Proteus* lipopolysaccharides. **Med. Dos'w. Mikrobiol.** 45: 65–68.

Rando, D.; Steglitz, U.; Morsdorf, G.; Kaltwasser, H. (1990). Nickel availability and urease expression in *Proteus mirabilis*. **Arch. Microbiol.** 154: 428–432.

Rao, M.B.; Tanksale, Q.M.; Ghatge, M.S.; Deshpande, V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 62: 597-635.

Rashid, T.; Ebringer, A. (2007). Rheumatoid arthritis is linked to *Proteus*-the evidence. **Clin. Rheumatol.** 26:1036-1043.

Sabbuba, N.A.; Mahenthalingam, E.; Stickler, D.J. (2003). Molecular epidemiology of *Proteus mirabilis* infections of the catheterized urinary tract. **J. Clin. Microbiol.** 41: 4961- 4965.

Schauder, S.; Bassler, B.L. (2001). The languages of bacteria. **Genes & Development** 15: 1468-1480.

Schauder, S.; Shokat, K.; Surette, M.G.; Bassler, B.L. (2001). The LuxS-family of bacterial autoinducers: Biosynthesis of a novel quorum sensing signal molecule. **Mol. Microbiol.** 41: 463-476.

Schneider, R.; Lockatell, C.V.; Johnson, D.; Belas, R. (2002). Detection and mutation of a luxS- encoded autoinducer in *Proteus mirabilis*. **Microbiol** 148: 773-782.

Senior, B.W.; Loomes, I.M.; Kerr, M.A. (1991). The production and activity *in vivo* of *Proteus mirabilis* IgA protease in infections of the urinary tract. **J. Med. Microbiol.** 35: 203–207.

Senior, B.W. (1993). The production of HlyA toxin by *Proteus penneri* strains. **J. Med. Microbiol.** 39: 282–289.

Senior, B.W.; McBride, P.D.P.; Morley, K.D.; Ker, M.A. (1995). The detection of raised levels of IgM to *Proteus mirabilis* in sera from patients with rheumatoid arthritis. **J. Med. Microbiol.** 43: 176–184.

Shibuya, M.; Zhang, H.; Endo, A.; Shishikura, K.; Kushiro, T.; Ebizuka, Y. (1999). Two branches of the lupeol synthase gene in the molecular evolution of plant oxidoscalene cyclases. **European Journal of Biochemistry** 266: 302-307.

Singh, K.V.; Shukla, N.P. (1984). Activity on multiple resistant bacteria of garlic (*Allium sativum*) extract. **Fitoterapia** 55: 313-315.

Stern, J.L.; Hagerman A.E.; Steinberg, P.D.; Mason, P.K. (1996). Phlorotannin-protein interactions. **Journal of Chemical Ecology** 22: 1887-1899.

Swift, S.; Throup, J.; Willians, P.; Salmond, G.; Stewart, G. (1996). Quorum sensing: a population-density component in the determination of bacterial phenotype. **Trends Biochem. Sci.** 21: 214-219.

Szczuka, E.; Kaznowski, A. (2004). Typing of clinical and environmental *Aeromonas* *sp.* strains by random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence PCR. **J. Clin. Microbiol.** 42: 220-228.

Teplitski, M.; Robinson, J.B.; Bauer, W.D. (2000). Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. **Mol. Plant Microbe Interact.** 13, 637–648.

Terras, F.R.G.; Schoofs, H.M.E.; Thevissen, H.M.E.; Broekaert, W.F. (1993) Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors. **Plant Physiology** 103: 1311-1319.

Torssel, B.G. (1989). Natural product chemistry. **A mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism.** New York: John Willey. 401p.

Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C.L. (2000). Proteus. **Microbiologia.** 6^a ed. Artes Médicas, Porto Alegre. p 303.

Versalovic, J.; Schneider, M.; de Bruijn, F.J.; Lupskin, J.R. (1994.) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods Mol. Cell Biol.** 5: 25-40.

Vieira, R.H.S.F.; Rodrigues, D.P.; Gonçalves, F.A. (2001). Microbicidal effect of medicinal plants extracts (*Psidium guajava* LINN. AND *Carica papaya* LINN.) upon bacteria isolated from fish muscle and known to induce diarrhea in children. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 43 (3): 145-148.

Walker, K. E.; Moghaddame-Jafari, S.; Lockatell, C.V.; Johnson, D.; Belas, R. (1999). ZapA, the IgA-degrading metalloprotease of *Proteus mirabilis*, is a virulence factor expressed specifically in swarmer cells. **Molec. Microbiol.** 32: 825-836.

Wang, W.B.; Lai, H.C.; Hsueh, P.R., Chiou R.Y.Y., Lin S.B., Liaw S.J. (2006). Inhibition of swarming and virulence factor expression in *Proteus mirabilis* by resveratrol. **J. Med. Microbiol.** 55: 1313–1321.

Warren, J.W.; Tenney, J.H.; Hoopes, J.M; Muncie, H.J.; Anthony, W.C. (1982). A prospective microbiologic study of bacteriuria in patients with chronic indwelling urethral catheters. **J. Infect. Dis.** 146: 719–723.

Warren, J.W. (1996). Clinical presentations and epidemiology of urinary tract infections. In Mobley HLT and Warren JW (ed.), Urinary tract infections. **Molecular pathogenesis and clinical management.** ASM Press, Washington, D.C., p. 3–27.

Wassif, C.; Cheek, D.; Bela, R. (1995). Molecular analysis of metalloprotease from *Proteus mirabilis*. **J. Bacteriol.** 177: 5790–5798.

World Health Organization (1998). *Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review*. Geneva: **W.H.O.**45p.

Wu, L.T.; Wu, H.J.; Chung, J.G.; Chuang, Y.; Cheng, K.; Yu, W. (2006). Dissemination of *Proteus mirabilis* isolates harboring CTX-M-14 and CTX-M-3 beta-lactamases at 2 hospitals in Taiwan. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 54: 89-94.

Wu, J.J.; Chen, H.M.; Ko, W.C.; Wu, H.; Tsai, S.; Yan, J. (2008). Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in *Proteus mirabilis* in a Taiwanese university hospital, 1999 to 2005: identification of a novel CTX-M enzyme (CTX-M-66). **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 60: 169-175.

Yang, S.; Rothman, R.E. (2004). PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in the acute-care settings. **The Lancet Infect. Dis.** 4: 337-348.

Younes, R.N.; Varella, A.D.; Suffredini, I.B. (2000). Extração e rastreamento de novas drogas em plantas brasileiras. **Acta Oncológica Brasileira** 20: 15-19.

Zhang, Y.; Lewis, K. (1997). Fabatins: new antimicrobial plant peptides. **FEMS Microbiological Letters** 149: 59-64.

Zhang, L. H. (2003). Quorum sensing and proactive host defense. **Trends Plant Sci.** 8: 238–244.

Zhao, H.; Li, X.; Johnson, D.; Mobley, H.L.T. (1999). Identification of protease and *rpoN*-associated genes of uropathogenic *Proteus mirabilis* by negative selection in a mouse model of ascending urinary tract infection. **Microbiol.** 145: 185-195.