

Degradación de ADN por micoplasmas en exudados faríngeos y vaginales, México

DNA Depletion Byclinical Isolated Mycoplasmas, México

Rivera Antonio¹, Munguia Ricardo¹, Chavez Edith¹, Sánchez José Antonio², Santamaria Susana³, Giono Silvia⁴

1 Profesor-Investigador Titular, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). jart70@yahoo.com

2 Profesor-Investigador Titular de la Facultad de Medicina de la BUAP. drjash2004@msn.com

3 Alumna de la Escuela de Biología de la BUAP. rivera702003@yahoo.com.mx

4 Profesor-Investigador Titular del Laboratorio de Bacteriología Médica, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. México D.F. sgiono@yahoo.com

Recibido: 24 abril 2013 Aceptado: 22 julio 2013

RESUMEN

La limitada capacidad de biosíntesis de precursores esenciales en micoplasmas les ha permitido desarrollar mecanismos moleculares para su adquisición a partir de sus hospederos.

Objetivo: Determinar la capacidad de degradación de ADN en micoplasmas aislados de exudados faríngeos y vaginales.

Métodos: De las muestras clínicas de exudados faríngeos y vaginales se aislaron micoplasmas por método microbiológico y validaron por PCR. Las que resultaron positivas fueron evaluadas para determinar su capacidad de degradar ADN por método de formación de halo en agar.

Resultados: La capacidad de degradar ADN a partir de los aislamientos clínicos de micoplasmas fue evidente y presentó diferencia significativa ($P < 0,05$) respecto a la cepa de referencia.

Conclusiones: Los aislamientos clínicos de micoplasmas tienen actividad de ADNasas, implicando un papel importante para la adquisición de precursores de ácidos nucleicos, y condicionando alteración en las células hospederas.

Palabras clave: Mycoplasmas, Faringe, Frotis Vaginal, Fragmentación del ADN (fuente: DeCS, BIREME)

ABSTRACT

The limited capacity of essential biosynthetic precursors mycoplasma enabled them to develop molecular mechanisms for acquisition from their hosts.

Objective: To determine the ability of DNA degradation in mycoplasma isolated from clinical samples.

Methods: From clinical samples of throat and vaginal swabs mycoplasmas were isolated by microbiological method and validated by PCR. The positive samples were evaluated for their ability to degrade DNA halo formation method on agar.

Results: the ability to degrade DNA from clinical isolates of mycoplasma was evident and showed a significant difference ($P < 0.05$) compared to the reference strain.

Conclusions: Mycoplasma in clinical isolates have DNase activity, implying a role for the acquisition of nucleic acid precursors, and conditioning the host cells' alteration.

Key words: Mycoplasmas, Pharynx, Vaginal Smears, DNA Fragmentation (source: MeSH, NLM)

Los micoplasmas representan a los procariontes más pequeños descritos en la actualidad, carecen de pared celular y presentan un genoma reducido en comparación con otras bacterias. Diversas especies de micoplasmas se han aislado de humanos a partir de tracto urogenital, tracto respiratorio, líquido sinovial, en sangre de pacientes con leucemia y en sangre de pacientes positivos al VIH, algunas especies se asocian a condiciones patológicas y otras como parte de la microflora normal (1-3). Estos microorganismos colonizan la superficie de mucosas y presentan actividad inmunomoduladora, además la característica de presentar un genoma reducido se asocia con la mínima capacidad para sintetizar diversos precursores esenciales en su metabolismo, como es el caso de aminoácidos, colesterol, fosfolípidos y nucleótidos. De tal forma, se sugiere que los precursores los obtienen de su hospedero, sin embargo los mecanismos por los cuales los adquieren aún no están bien definidos (4, 5). Se ha documentado que diferentes especies de micoplasmas tienden a obtener arginina a partir de las histonas asociadas al ADN de su hospedero, condicionando con esto alteraciones cromosómicas e incluso degradando ADN (6). En relación a lo expuesto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la capacidad de degradación de ADN en micoplasmas aislados de muestras clínicas.

METODOLOGÍA

Laboratorios clínicos del Estado de Puebla remitieron al laboratorio de micoplasmas del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla durante el periodo de agosto-diciembre de 2012 un total de 186 muestras clínicas, siendo 90 de exudados faríngeos y 96 de exudados vaginales, para la detección de micoplasmas y evaluar su capacidad de degradar ADN. Las muestras de cada exudado se inocularon en 1ml de caldo SP-4 e incubaron a 37° C durante siete días, cada 24 horas a partir de la toma de muestra se sembraron 5 µl de cada una de las muestras en agar SP-4 e incubaron a 37 ° C durante siete días.

El total de las muestras de caldo SP-4 se sometieron a extracción de ADN con el kit ZR Fungal/Bacterial

DNA MiniPrep (ZIMO Research D6005) para el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la finalidad de corroborar las muestras que resultaron positivas en el estudio microbiológico y para descartar falsos positivos y falsos negativos. Para la técnica de PCR se utilizaron los primers AR1 y AR2 que amplifican fragmento de 301 pb de una secuencia del gen ARNr 16S en treinta especies del género micoplasma (7).

La mezcla de reacción para un volumen de 50 µl por cada muestra contenían 10 µl de PyroStart™, Fast PCR Master Mix (2x), 32 µl de agua, 1,5 µl del primer AR1, 1,5 µl del primer AR2 y 5µl del ADN problema. Las condiciones de amplificación se realizaron en un termociclador Techne TC-412 y fueron las siguientes (95° C/1 minuto, seguido de 40 ciclos 95 ° C/1 minuto, 50 ° C/1 minuto, 72 ° C/1 minuto y un paso final de 72° C/5 minutos. Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 2 % 870 voltios/ 60 minutos), teñido con bromuro de etidio y visualizado en un fotodocumentador (SYNGENE Bio Imaging System).

Las muestras positivas a crecimiento colonial de micoplasmas y que se reaislaron se sometieron a la prueba de ADNAsas bajo el siguiente esquema: se utilizó agar SP-4 enriquecido con 0,1 mg/ml de AND, ajustando a pH 7,8. El agar fue inoculado con 20 µl de cultivo de cada uno de los aislamientos de micoplasmas a una concentración de 1X10⁶ UFC/ml, incubándose a 37 ° C/7 días. Enseguida, los cultivos fueron cubiertos con 100 µl de HCl 1 N, la aparición de una zona clara sobre el crecimiento microbiano se considera reacción positiva a degradación a ADN. *Mycoplasma fermentans* PG18 (ATCC 19989) se incluyó en el trabajo como cepa control.

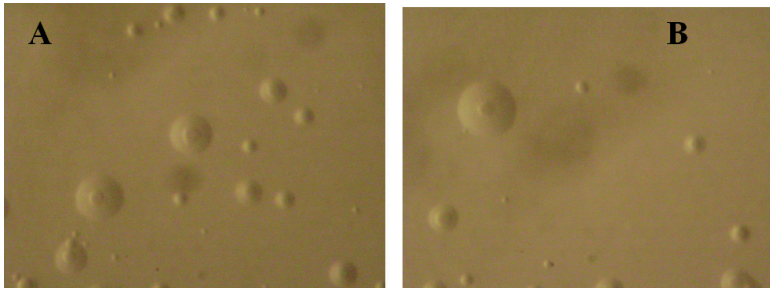
Se utilizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) con su comparación múltiple de Tukey-Kramer para comparar las diferencias entre la formación de halos por la degradación de ADN entre las muestras de exudados faríngeos, exudados vaginales y cepa control, con un nivel de significancia < 0,05.

RESULTADOS

Del total de las muestras recibidas (n= 186) para la detección de micoplasma por el método microbiológico (fase líquida-sólida) a partir de los exudados faríngeos se presentó que en 48/90

(43,2 %) de las muestras resultaron positivas a micoplasmas, y a partir de los exudados vaginales se detectó positividad a micoplasmas en 51/96 (48,9 %) de las muestras (Figura 1).

Figura 1. Muestras positivas a crecimiento colonial característico de micoplasmas en agar SP-4.

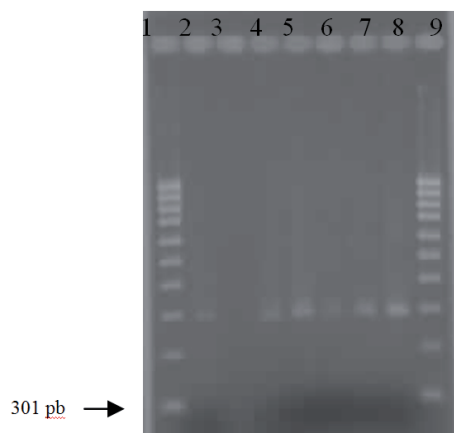


A) aislamiento a partir de exudado faríngeo y (B) aislamiento a partir de exudado vaginal, microscopía estereoscópica (4X).

Fuente: Muestras analizadas

El total de las muestras (n=186) se sometieron a extracción de ADN y subsecuente técnica de PCR, obteniéndose una positividad para la amplificación del fragmento de 301 pb en 53/90 (47,7 %) de las muestras faríngeas y en 55/96 (52,8 %) de las muestras vaginales, datos que se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2 % (Figura 2).

Figura 2. Productos amplificados por PCR para el género micoplasma.



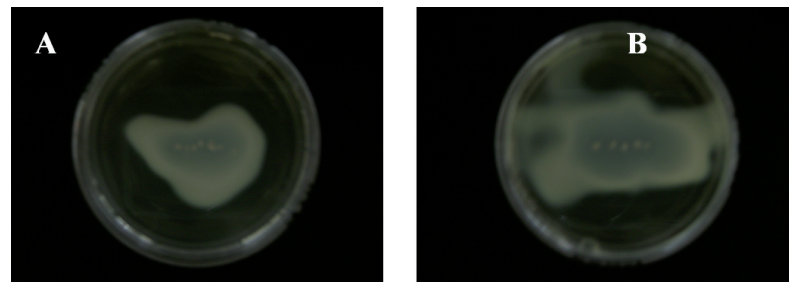
Fuente: Muestras analizadas

En el carril 1 y 9, se observa el marcador de peso molecular (1kb), carril 2 control positivo (*Mycoplasma fermentans* ATCC 19989) que

muestra el fragmento amplificado de 301 pb, carril 3 control negativo, carriles 4-6 muestras de aislados a partir de exudados faríngeos positivos al género micoplasma, carriles 7 y 8 muestras positivas a partir de exudados vaginales.

Las 99 muestras positivas por el método microbiológico a crecimiento colonial de micoplasmas en agar SP-4 se sometieron a la prueba de ADNasas para verificar la actividad de degradación de ADN, obteniéndose la formación de halos al retar los cultivos con solución de HCl 1 N después de cinco días de incubación (Figura 3).

Figura 3. Prueba positivas a la degradación de ADN en agar SP-4.

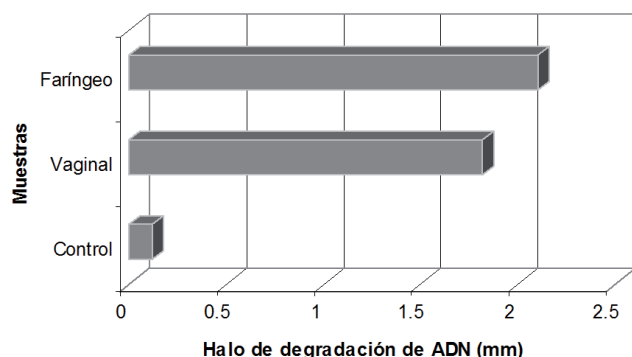


(A y B) presentan zonas claras "halos" alrededor del crecimiento del inoculo de micoplasmas, aislados de exudados faríngeos y vaginales, respectivamente.

Fuente: Muestras analizadas

En el caso de la cepa control de *Mycoplasma fermentans* PG18 (ATCC 19989) se observó nula formación del halo de degradación de ADN, y al comparar su actividad con las muestras clínicas se presentó diferencia significativa con un valor de $P < 0,05$ (Gráfico 1).

Gráfico 1. Valores promedio en la actividad de degradación de ADN por parte de los aislamientos clínicos de micoplasmas.



Fuente: Muestras analizadas

DISCUSIÓN

Los sitios primarios de colonización de los micoplasmas son las mucosas del tracto respiratorio y urogenital, y usualmente estos microorganismos exhiben estructuras proteinitas en su superficie celular que les ayudan al anclaje con sus célula hospedera. De tal forma, el monitorear micoplasmas a partir de exudados faríngeos y vaginales ha permitido contar con aislamientos frecuentes, tanto en poblaciones sanas y patológicas, como es el caso del número de muestras positivas que se presentan en este trabajo y su relación con trabajos previos (8, 9).

Siendo importante resaltar que la implementación de la prueba de PCR permitió corroborar que en el estudio microbiológico no se detectan la totalidad de muestras positivas, siendo el caso para los exudados faríngeos que pasaron de 48/90 a 53/90 con la detección por PCR en positividad, por su parte los exudados vaginales mostraron positividad a micoplasmas en el microbiológico en 51/96 y por PCR en 55/96. Estos datos permiten sugerir que el manejo y diagnóstico para micoplasmas por método microbiológico debe ser reforzado con otras técnicas para tener mayor certeza, esto debido al lento crecimiento que presentan (10, 11).

La capacidad de los aislamientos clínicos de micoplasmas para degradar ADN con respecto a la cepa de referencia fue mayor y estadísticamente significativa, esto en relación a que se trata de microorganismos que provienen de microecosistemas donde las condiciones son adversas por la respuesta inmunológica del propio

hospedero y la competencia por sustratos con otros microorganismos, principalmente.

Los análisis genómicos en micoplasmas han revelado su limitada capacidad biosintética y que dependen de sus hospederos para adquirir los precursores bioquímicos requeridos para la biosíntesis de macromoléculas (12). La competencia por estos precursores biosintéticos condiciona la integridad y altera las funciones de la célula hospedera. Tal es el caso de las especies de micoplasmas no fermentadoras que utilizan la vía arginina hidrolasa para la generación de ATP, degradando las reservas de arginina en el hospedero y afectando la síntesis de proteínas, la división y el crecimiento celular. Además de inducir aberraciones cromosómicas debido a que las histonas son ricas en arginina (1). La actividad para degradar ADN por parte de los micoplasmas aislados de los exudados faríngeos y vaginales les permite asimilar los precursores necesarios para su división y crecimiento, tal es lo reportado para *Mycoplasma penetrans* que presenta la endonucleasa P40 que degrada a la cromatina y causa la muerte celular, siendo un importante factor de virulencia y que puede ser utilizado para el diagnóstico clínico (2). En conclusión, el presente trabajo muestra que los aislamientos clínicos de micoplasmas tienen actividad de ADNasas, implicando un papel importante para la adquisición de precursores de ácidos nucleicos, y condicionando alteración en las células hospederas.

AGRADECIMIENTOS

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el financiamiento otorgado al presente proyecto y la beca asignada a la alumna Susana Santamaría de la Escuela de Biología de la BUAP.

REFERENCIAS

1. Rottem S. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiol Rev* 2003; 83(2):417-432.
2. Bendjennat M, Blanchard A, Loutfi M, Montagnier L, Bahraoui E. Role of *Mycoplasma penetrans* endonuclease P40 as a potential pathogenic determinant. *Infect Immun* 1999; 67(9):4456-4462.
3. Campo L, Larocque P, La Malfa T, Blackburn WD, Watso HL. Genotypic and phenotypic analysis of *Mycoplasma fermentans* strains isolated from different host tissues. *J Clin Microbiol* 1998; 36(6):1371-1377.

4. Minio FC, Jarrill-Taylor KJ, Billings DE, Tigges E. Membrane-associated nuclease activities in mycoplasmas. *J Bacteriol* 1993; 175(24):7842-7847.
5. Pollack JD, Hoffmann PJ. Properties of the nucleases of mollicutes. *J Bacteriol* 1982; 152(1):538-541.
6. Zhang S, Tsai S, Wu TT, Li B, Shih JWK, Lo SC. *Mycoplasma fermentans* infection promotes immortalization of human peripheral blood mononuclear cell in culture. *Blood* 2004; 104(13):4252-4259.
7. Sidhu MK, Rashidbaigi A, Testa D, Liao MJ. Competitor internal standards for quantitative detection of mycoplasma DNA. *FEMS Microbiology Letters* 1995; 128(2):207-212.
8. Rivera A, Rivera E, Gil C, Perez-Terron R, Giono S, Cedillo L. Mycoplasmas sp detected in the airways of normal healthy subjects. *Res J Biol Sci* 2010; 5(1):61-63.
9. Mayo CDM, Barrios VE, Ruiz AR, Cedillo RL, Rivera TJA. Aislamiento de mollicutes en faringe y tracto urogenital. *Enf Inf Microbiol* 2009; 29(1):6-10.
10. Rätty R, Rönkkö E, Kleemola M. Sample type in crucial the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* by PCR. *J Med Microbiol* 2005; 54(3):287-291.
11. Sung H, Kang SH, Bae YJ, Hong JT, Chung YB, Lee CK, Song S. PCR-based detection of mycoplasma species *J Microbiol* 2006; 44(1):42-49.
12. Himmerreich RH, Plagnes H, Hilbert H, Reiner B, Herrman R. Comparative analysis of the genomes of the bacteria *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(4):701-712.