

# Actividad desoxirribonucleasa (ADNasa) en un aislamiento clínico de *Mycoplasma fermentans*

Palabras clave: ADNasa, muestra clínica, *Mycoplasma fermentans*.

Key words: DNase, clinical sample, *Mycoplasma fermentans*.

Recibido: 28/05/2012  
Aceptado: 05/07/2012

Este artículo puede ser consultado en versión completa en: <http://www.medigraphic.com/patologiaclinica>

José Antonio Rivera-Tapia,\* Edith Chávez-Bravo,\* Nancy Lara-Sánchez,\*\* Fernando Hernández-Aldana,\*\*\* Nadia Rodríguez-Preval\*\*\*\*

\* Laboratorio de micoplasmas, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), México.

\*\* Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP.

\*\*\* Centro de Química del Instituto de Ciencias de la BUAP.

\*\*\*\* Laboratorio Nacional de micoplasmas del Instituto de Medicina Tropical «Pedro Kouri», La Habana, Cuba.

Correspondencia:

Dr. José Antonio Rivera-Tapia

Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Edificio 103-J, Ciudad Universitaria. C.P. 72570, Puebla, México. E-mail: jart70@yahoo.com

202

## Resumen

Los micoplasmas son los microorganismos más pequeños auto-replicables, causan enfermedades respiratorias y urogenitales en el humano y colonizan de forma crónica sin aparente significado clínico. La carencia de pared celular en los micoplasmas les facilita interactuar con las células de mamíferos durante largos periodos de tiempo. Esta interacción puede disminuir la virulencia de los micoplasmas; sin embargo, puede afectar propiedades biológicas de la célula hospedera. Las ADNasas son constituyentes importantes en las membranas de los micoplasmas y se pueden involucrar en la obtención de ácidos nucleicos para su crecimiento a partir de su hospedero. El objetivo del trabajo fue detectar la actividad de ADNasas a partir de un aislamiento clínico de *Mycoplasma fermentans*. Los productos de la digestión se analizaron en gel de agarosa Tris-borato, por absorbancia y en agar para la detección de ADNasas. Se observó actividad de ADNasa en las cepas evaluadas, presentándose variación en los niveles de actividad, siendo *Mycoplasma fermentans* P140 quien presentó mayor actividad. Estos datos sugieren que las ADNasas son esenciales para el crecimiento y supervivencia, siendo un mecanismo para adquirir nucleótidos.

## Abstract

Mycoplasmas are a heterogeneous group of the smallest organisms capable of self replication, some mycoplasmas cause respiratory or urogenital diseases in humans. However, mycoplasmas often chronically colonize our respiratory and urogenital tracts without apparent clinical significance. In this respect, wall free mycoplasmas are among the few prokaryotes that can grow silently in close interaction with mammalian cells for a long period of time. However, prolonged interactions with mycoplasmas of seemingly low virulence could, through a gradual and progressive course, significantly affect many biologic properties of mammalian cells. DNases are important constituents of mycoplasmal membranes and may be involved in the acquisition of host nucleic acids required for growth. The objective was detected DNase activity in clinical *Mycoplasma fermentans* isolate. Digestion products were analyzed by loading a Tris-borato agarose gel, absorbance and medium for DNase test. DNase activity was observed in strains tested and the levels of activity varied, *Mycoplasma fermentans* P140 showing greater activity. Result suggests DNases activities may be essential for growth and survival, this finding suggests that there is a mechanism of nucleotide acquisition.

## Introducción

Los micoplasmas (clase *Mollicutes*) son procariontes representados por nueve géneros y 200 especies descritas. Se distinguen del resto de las bacterias por su reducido tamaño celular, el de su genoma y por la carencia de pared celular. En su membrana celular se localizan determinantes antigénicos proteínicos y glucolípidicos. Para su cultivo en laboratorio requieren esteroides y precursores de aminoácidos y nucleótidos preformados. Distintas especies de micoplasmas colonizan la superficie de la mucosa respiratoria y se han reportado infecciones extrapulmonares en sistema nervioso central, sistema hematopoyético, piel, articulares, cardíacas, renales, tracto genitourinario y gastrointestinales causadas por *Mycoplasma pneumoniae*, y como cofactor en la progresión del desorden inmunológico se relaciona a *Mycoplasma fermentans*.<sup>1-4</sup>

*Mycoplasma fermentans* se aisló por primera vez de tracto genital y ha sido implicado como agente etiológico en diferentes patologías. Este micoplasma interacciona con las células hospederas por medio de sus componentes proteicos de membrana, facilitando la adhesión y consecuente internalización.<sup>1</sup> La ausencia de capacidad biosintética de ácidos nucleicos en estos microorganismos permite proponer el estudio de los mecanismos por los cuales adquieren los precursores necesarios para sintetizar sus ácidos nucleicos. Los procesos de transporte se han identificado y reportado,<sup>5</sup> pero los procesos de degradación aún no son estudiados en especies de interés médico. En este trabajo se evidenció la actividad de ADNasa en *Mycoplasma fermentans* aislado de vía respiratoria de un paciente con asma procedente del Hospital Universitario de Puebla-México.

## Material y métodos

**Micoplasmas y cultivo.** El aislamiento clínico de *Mycoplasma fermentans* P140 proveniente de vía

respiratoria de un paciente con asma procedente del Hospital Universitario de Puebla-México.<sup>6</sup> Se utilizó para estudiar la actividad de ADNasa y *Mycoplasma fermentans* PG18 (ATCC 19989), se incluyó en el estudio como cepa control. Los micoplasmas fueron cultivados en medio estándar para micoplasmas [20 gramos de base para micoplasmas por litro (Difco Laboratories), 0.5% de dextrosa, 0.002% de rojo de fenol, 5% de extracto de levadura, 25% de suero de caballo (GIBCO/BRL), ajustando a pH 7.8]. Los cultivos fueron incubados a 37 °C durante cinco días.

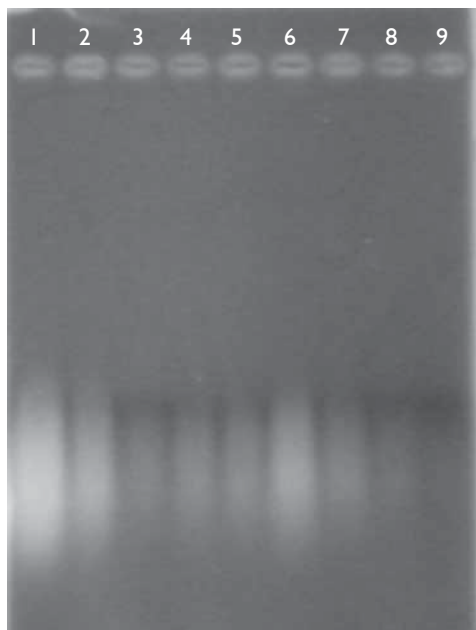
**Ensayos de la actividad ADNasa.** Los cultivos de *Mycoplasma fermentans* P140 y *Mycoplasma fermentans* PG18 fueron cosechados en la fase logarítmica de crecimiento, centrifugándose a 14,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos y lavados con solución de fosfato de sodio 0.01 M y cloruro de sodio 0.14 M pH 7.3 (PBS), resuspendiendo a una concentración de 100 µg de proteínas por mililitro en solución PBS más 1% de dextrosa, 2 mM CaCl<sub>2</sub> y 2 mM MgCl<sub>2</sub> (PBS-CM). Para determinar la actividad ADNasa se colocaron 25 µL de suspensión celular (2.5 µg de proteína) en placas de 96 pozos. Un volumen equivalente de ADN lambda (10 µg/mL de PBS) se adicionó a cada uno de los pozos, incubándose las placas durante 24 horas a 37 °C. La digestión del ADN fue monitoreada cada seis horas y los productos de la digestión fueron analizados en gel de agarosa Tris-borato con 8 µL de muestra por pozo, corriendo el gel a 100 V durante 45 minutos y teñido con bromuro de etidio.

La degradación de ADN también se determinó en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer Lambda 20) en un rango de 200-400 nm. Se corroboró la actividad de ADNasa con el ensayo en agar estándar para micoplasmas [20 gramos de base para micoplasmas por litro (Difco Laboratories), 1.3% de agar bacteriológico, 0.5% de dextrosa, 5% de extracto de levadura, 25% de suero de caballo (GIBCO/BRL) y 0.1 mg/mL de ADN, ajustando a pH 7.8]. El agar fue inoculado con 20 µL de cultivo de cada uno de los micoplasmas evaluados a una concentración

de  $1 \times 10^6$  UFC/mL, incubándose a 37 °C durante siete días. Enseguida, los cultivos fueron cubiertos con 100  $\mu$ L de HCl 1 N. La aparición de una zona clara sobre el crecimiento microbiano se considera reacción positiva a actividad de ADNasa.

## Resultados y discusión

La actividad de ADNAsas se ha propuesto como un mecanismo para adquirir precursores de ácidos nucleicos, ya sean bases libres y/o oligonucleótidos, de tal manera la capacidad de algunas especies de micoplasmas para invadir células sugiere que el ADN de la célula hospedera sirve como sustrato para la actividad de ADNAsas y consecuente obtención de precursores.<sup>7</sup>



**Figura 1.** Productos de la actividad de ADNAsas en gel de agarosa Tris-borato, carril 1 tiempo cero (sin digestión-control); carriles 2, 3, 4 y 5 con los tiempos 6, 12, 18 y 24 horas, respectivamente, en presencia de *Mycoplasma fermentans* PG18; carriles 6, 7, 8 y 9 con los tiempos 6, 12, 18 y 24 horas, respectivamente, en presencia de *Mycoplasma fermentans* PI40. Se observa que a las 24 horas (carril 9) la actividad de ADNAsas de *Mycoplasma fermentans* PI40 degrada en 95% al ADN respecto a PG18 con 45% de degradación (carril 5).

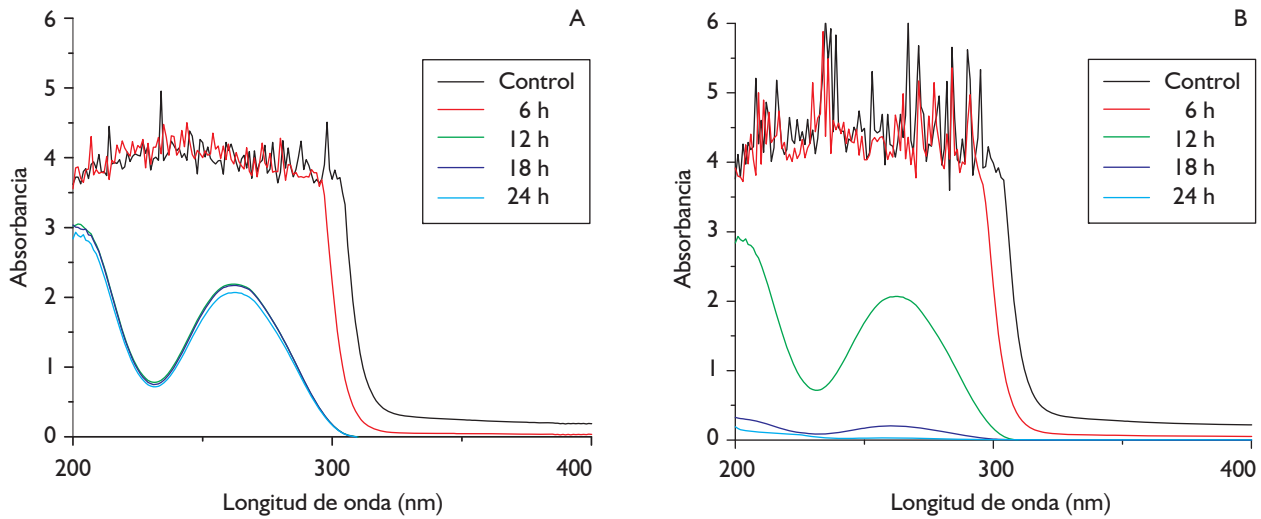
Los ensayos de actividad de ADNasa muestran que la cepa de referencia *Mycoplasma fermentans* PG18 degrada al ADN en menor proporción que el aislamiento clínico de *Mycoplasma fermentans* PI40. A partir de las 12 horas, *Mycoplasma fermentans* PI40 presenta un gradiente de degradación más marcado conforme avanzan las 24 horas (figura 1). La mayor actividad ADNasa por parte de la cepa clínica (PI40) se explica por la interacción reciente que mantenía con su hospedero, situación que condiciona mayor virulencia en algunas muestras clínicas.

Las lecturas de absorbancia corroboran los gradientes observados en los geles de agarosa de los productos de la degradación de ADN. La degradación del ADN debida a la actividad de ADNAsas en *Mycoplasma fermentans* PG18 fue 45 y 95% para *Mycoplasma fermentans* PI40 a las 24 horas (figura 2).

En el ensayo de cultivo en agar se presentó una zona clara sobre el desarrollo microbiano, indicativo de la digestión enzimática, siendo más evidente en las muestras del aislamiento clínico de *Mycoplasma fermentans* PI40 (figura 3).

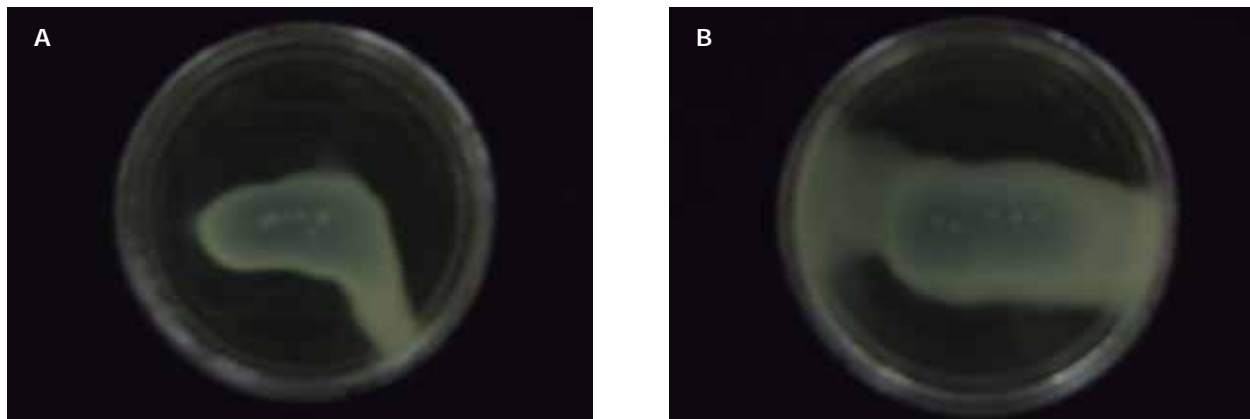
Estos datos sugieren que la actividad de ADNasa es esencial en el crecimiento y supervivencia de *Mycoplasma fermentans*, principalmente en el aislamiento clínico, representando un mecanismo *in vivo* de adquisición de nucleótidos, además de confirmar lo reportado para *Mycoplasma pulmonis*, *Mycoplasma hyorhinis* y *Acholeplasma laidlawii* que no son de importancia médica<sup>8-10</sup>.

El aislamiento de *Mycoplasma fermentans* a partir de diferentes tejidos y su implicación en la patogénesis del virus de la inmunodeficiencia humana permite darle la importancia clínica, ya que su participación en diferentes patologías aún no se estudia ampliamente. Estos datos son una contribución en la comprensión de algunos de los mecanismos que permiten a *Mycoplasma fermentans* ser un parásito exitoso, además de representar un dato relevante para llevar a cabo el diagnóstico etiológico y en la determinación de virulencia de la cepa bacteriana aislada en el laboratorio.



**Figura 2.** Valores de absorbancia de los productos de la degradación del ADN por actividad de ADNasas. **A:** actividad de *Mycoplasma fermentans* PG18 con 45% de degradación a las 24 horas. **B:** *Mycoplasma fermentans* P140 con 95% de degradación de ADN a las 24 horas.

Imágenes en color en: [www.medigraphic.com/patologiaclinica](http://www.medigraphic.com/patologiaclinica)



**Figura 3.** El ensayo de actividad de ADNasa en agar mostró una zona clara sobre el crecimiento microbiano, considerándose reacción positiva. **A:** *Mycoplasma fermentans* PG18. **B:** *Mycoplasma fermentans* P140.

Imágenes en color en: [www.medigraphic.com/patologiaclinica](http://www.medigraphic.com/patologiaclinica)

## Conclusiones

Los datos presentados permiten considerar a *Mycoplasma fermentans* como un microorganismo más con actividad de ADNasas, lo cual ayuda a entender mejor y ampliar el conocimiento de los mecanismos con los que cuenta este micoplasma, y también para comprender cómo sobrevive en diferentes tejidos humanos donde ha sido aislado y relacionado como agente etiológico. De tal ma-

nera, se están estudiando otras especies de interés médico para establecer su importancia clínica y se sugiere que sea solicitado con mayor frecuencia su diagnóstico de laboratorio.

## Agradecimientos

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por el financiamiento al proyecto (RIT)-

NAT I 2-I) y la beca otorgada a Nancy Lara-Sánchez para realizar su estancia de investigación.

## Referencias

1. Rottem S. Interaction of mycoplasma with host cells. *Physiol Rev* 2003; 83: 417-432.
2. Sánchez HJA, Rivera TJA, Cortés MA, Tlecuil MN, Méndez VF. Afecciones genitourinarias y micoplasmas. *Rev Mex Patol Clin* 2003; 50: 71-76.
3. Chowdhury IH, Munakata T, Koyanagi Y, Kobayashi S, Arai S, Yamamoto N. Mycoplasma can enhance HIV replication *in vitro*: A possible cofactor responsible for the progression of AIDS. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 170: 1365-1370.
4. Campo L, Larocque P, La Malfa T, Blackburn WD, Watson HL. Genotypic and phenotypic análisis of *Mycoplasma fermentans* strains isolated from different host tissues. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1371-1377.
5. Razin S. The mycoplasmas. *Microbiol Rev* 1978; 42: 414-470.
6. Gil C, Maldonado MG, Zenteno E, Yáñez A, Paz D, Cedillo L. Detección de micoplasmas en pacientes con asma. *Rev Inst Nac Enf Resp Mex* 1999; 12: 113-119.
7. 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: 4456-4462.
8. Minion FC, Coguen JD. Identification and preliminary characterization of a membrane-bound endonuclease in *Mycoplasma pulmonis*. *Infect Immun* 1986; 51: 352-354.
9. Roganti FS, Rosenthal AL. DNase of *Acholeplasma* spp. *J Bacteriol* 1983; 155: 802-805.
10. Paddenberg R, Weber A, Wulf S, Mannherz HG. Mycoplasma nucleases able to induce internucleosomal DNA degradation in cultured cells possess many characteristics of eukaryotic apoptotic nucleases. *Cell Death Differ* 1998; 5: 517-528.