

# Papel de *Mycoplasma fermentans* en patologías gastrointestinales

y su relación con la artritis reactiva

**Palabras clave:** *Mycoplasma fermentans*, modelo animal, sistema digestivo, artritis reactiva.

**Key words:** *Mycoplasma fermentans*, animal model, digestive system, reactive arthritis.

Recibido: 09/06/2006

Aceptado: 20/06/2006

José Antonio Rivera-Tapia,\* Lilia Cedillo-Ramírez,\* Dolores Bermejo-Zapata,\*\* Silvia Giono-Cerezo\*\*\*

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

\*\* Escuela de Biología, BUAP.

\*\*\* Laboratorio de Bacteriología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.

Correspondencia:

M. en C. José Antonio Rivera Tapia

Centro de Investigaciones Microbiológicas

Instituto de Ciencias

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Edificio 76 Complejo de Ciencias

Ciudad Universitaria

72570, Puebla, México.

E-mail: jart70@yahoo.com

134

## Resumen

Los micoplasmas se caracterizan por tener un amplio espectro de hospederos, siendo de interés el estudio de su participación en padecimientos que presenta el hombre. Principalmente en patologías gastrointestinales y su relación con la artritis reactiva en la que recientemente se ha asociado a *Mycoplasma fermentans*. A un grupo de ratas se le administró 0.1 mL de cultivo de *Mycoplasma fermentans* a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL. Se obtuvo suero sanguíneo para la detección de anticuerpos contra *Mycoplasma fermentans*. Se extrajeron estómago, intestino y tejido sinovial para realizar el aislamiento en cultivo, estudio histológico y la detección de *Mycoplasma fermentans* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La prueba de inhibición metabólica mostró la presencia de anticuerpos contra *Mycoplasma fermentans*. Por su parte, el estudio histológico reveló lesión a nivel de la vellosidad intestinal e hiperplasia de las membranas sinoviales. La detección con PCR para *Mycoplasma fermentans* fue negativa.

## Abstract

Mycoplasmas are characterized by a wide host spectrum, resulting interesting the fact that they play an important role in human diseases. Mainly in gastrointestinal pathologies and their relationship with the reactive arthritis, which recently has been associated to *Mycoplasma fermentans*. *Mycoplasma fermentans* culture (0.1 mL),  $1 \times 10^6$  CFU/mL was supplied orally to a group of rats. Blood serum was obtained to detect antibodies against *Mycoplasma fermentans*. Stomach, intestine and synovial tissue were extracted to do the isolate in culture, histological study and *Mycoplasma fermentans* detection by PCR. The metabolic inhibition test showed antibodies against *Mycoplasma fermentans*; whereas histological study showed intestinal damage and inflammation of the synovial membrane. *Mycoplasma fermentans* detection by PCR was negative.

## Introducción

**D**urante los últimos años se han incrementado los reportes referentes a la presencia del ADN de diversas especies de micoplasmas en biopsias de pacientes con enfermedad intestinal inflamatoria. La alta prevalencia de *Mycoplasma pneumoniae* en sujetos con enfermedad intestinal inflamatoria sugiere que este micoplasma es ubicuo y puede persistir en la mucosa intestinal. De tal forma, los estudios epidemiológicos plantean que la adquisición de algunos microorganismos se presenta durante etapas tempranas de la vida, considerándose a los micoplasmas como agentes implicados en la patogenia de la enfermedad intestinal inflamatoria.<sup>1-3</sup>

Se ha establecido que el cáncer gástrico puede ser causado por una infección crónica debida a *Helicobacter pylori*, microorganismo que induce citocinas inflamatorias y estrés oxidativo. Sin embargo, similitudes patogénicas entre micoplasmas y *Helicobacter pylori*, además de diversos factores de riesgo adicionales en la génesis del cáncer gástrico, permiten plantear esta investigación con la finalidad de elucidar el posible papel de *Mycoplasma fermentans* en patologías gastrointestinales y su relación con la artritis reactiva. Por lo anterior, se sugiere que el tracto digestivo puede servir como puerta de entrada a los microorganismos responsables de la artritis reactiva, siendo importante aclarar el mecanismo por el cual los antígenos de los micoplasmas llegan a la articulación, ya que la persistencia de éstos juega un papel importante en la patogenia de la inflamación aguda y crónica.<sup>4-7</sup>

Los micoplasmas son microorganismos implicados con diversas afecciones como son: uretritis no gonocócica, parto prematuro, neumonía no intersticial, vaginitis, enfermedad pélvica, pielonefritis, fiebre postparto, rompimiento prematuro de membranas, parto pretérmino y artritis, además de que se han relacionado diversas especies de micoplasmas como cofactores del virus de la inmunodeficiencia adquirida.<sup>8,9</sup> Lo anterior pone en cla-

ro que los micoplasmas tienen afinidad por diversos tejidos, permitiendo sugerir que pueden colonizar y causar daño en el tracto digestivo. Al parecer, los micoplasmas detectados en las muestras de pacientes con gastritis inducen los mismos daños que *Helicobacter pylori*, respecto al papel que tienen en la etiología del cáncer gástrico. Es sabido que los micoplasmas no fermentativos, como son *M. salivarium*, *M. orale*, *M. faucium* y *M. spermophilum*, producen amonio a partir de la arginina, causando daño celular y neutralizando el ácido gástrico. Por su parte, *M. fermentans*, microorganismo que se analiza en este trabajo, tiene capacidad fermentativa y no fermentativa, lo cual lo hace un candidato idóneo para causar daño gastrointestinal.<sup>10-12</sup> El objetivo del presente trabajo fue evaluar la posible participación de *Mycoplasma fermentans* en patologías gastrointestinales y su relación con la artritis reactiva.

## Material y métodos

**Material biológico.** Treinta ratas machos (*Rattus norvegicus*) con un peso promedio de 200 gramos fueron proporcionadas por el Bioterio Claud Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, las cuales se incluyeron en el trabajo experimental. Dichos ejemplares estuvieron bajo las siguientes condiciones: temperatura entre 18 y 26 °C, humedad relativa de 40 a 70%, periodo de luz con 12 horas de requerimiento al día, ventilación con ocho a 10 recambios totales por hora y alimentados con base en nutricubos purina y agua *ad libitum*.

La cepa bacteriana *Mycoplasma fermentans* es parte del cepario del laboratorio de micoplasmas del Centro de Investigaciones Microbiológicas del ICBUAP. *Mycoplasma fermentans* se cultivó en caldo Eaton (65 mL de agua destilada, dos gramos de base para micoplasmas DIFCO Laboratories, 1 mL de rojo de fenol al 0.4%, 10 mL de dializado de levadura, 25 mL de suero de caballo *Hy Clone*, 200 UI/mL de penicilina), incubándose a

37 °C. La concentración del inóculo ( $1 \times 10^6$  UFC/mL) se ajustó por medio de diluciones decimales.

**Administración del cultivo bacteriano y procesamiento de las muestras.** A 20 ratas se les administró vía oral 0.1 mL del cultivo bacteriano a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL de *Mycoplasma fermentans*, cada ocho días durante un mes. Los restantes diez ejemplares no recibieron inóculo (grupo control). Cada ocho días se realizó toma de muestra sanguínea por punción cardíaca (10 mL), de la cual 0.5 mL se resuspendió en 1 mL de caldo Eaton, incubándose a 37 °C con la finalidad de reaislar al micoplasma. El volumen restante de sangre se centrifugó a 5,000 revoluciones por minuto (RPM) durante cinco minutos para la obtención del suero para la detección de anticuerpos contra *Mycoplasma fermentans* por medio de la técnica de inhibición metabólica. Transcurridos los 30 días, los ejemplares fueron sacrificados con la administración de 0.5 mL de pentobarbital sódico vía cardíaca. Después se les realizó disección ventral para obtener estómago e intestino delgado, de los cuales 0.5 g fueron resuspendidos en 1 mL de caldo Eaton e incubaron a 37 °C hasta que se presentó el vire del indicador (tres a cinco días); a continuación se realizó la resiembra de cada muestra (5  $\mu$ L) en agar Eaton incubándose a 37 °C para verificar el reaislamiento de *Mycoplasma fermentans* por medio de microscopia estereoscópica; otra fracción (0.1 g) se utilizó para la detección de *Mycoplasma fermentans* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). También se realizó disección en la cavidad articular de ambas rodillas para extraer el tejido sinovial, del cual una fracción (0.1 g) se resuspendió en 1 mL de caldo Eaton e incubó a 37 °C hasta que se presentó el vire del indicador (tres a cinco días); a continuación se realizó la resiembra de cada muestra (5  $\mu$ L) en agar Eaton e incubándose a 37 °C para verificar el reaislamiento de *Mycoplasma fermentans* por medio de microscopia estereoscópica; otra fracción (0.1 g) se utilizó para la detección

de *Mycoplasma fermentans* con PCR. El resto de los tejidos (estómago, intestino y tejido sinovial) se fijaron en formol al 10% para realizar cortes histológicos y teñirlos con la técnica de hematoxilina y eosina, con la finalidad de observar posibles alteraciones histopatológicas.

**Extracción de ADN y técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** De cada uno de los tejidos (estómago, intestino y tejido sinovial) se resuspendieron 0.1 g en 1 mL de buffer de lisis que contenía 10 mM de Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM de KCl, 2.5 mM de  $MgCl_2$ , 1% Tween-20, 1% Tritón X-100 y 5 mg/mL de proteinasa K. Incubándose la suspensión celular durante una hora a 60 °C, con dicha suspensión se realizó la técnica de PCR.<sup>13</sup>

Los iniciadores AR1 y AR2 utilizados amplifican un fragmento de 301 pb, reconociendo una secuencia conservada del ARNr en treinta especies de micoplasmas. Y para detectar el género *Mycoplasma fermentans* se utilizaron los iniciadores RW004 y RW005 que amplifican un fragmento de 207 pb.<sup>14</sup>

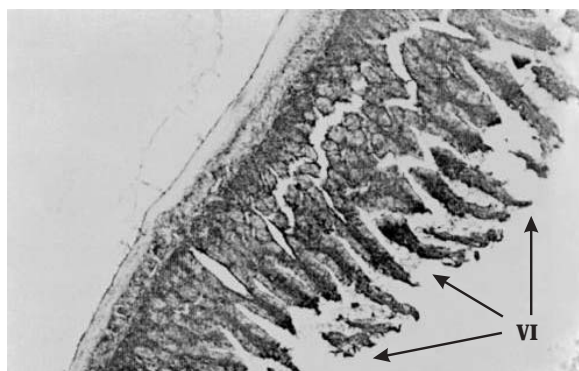
Las muestras se amplificaron en un termociclador programable (Mini Cycler MJ Research, Inc.). La mezcla de reacción contenía 10 mM de Tris-HCl (pH 8.5) 200  $\mu$ M de cada dNTP's, 50 mM de KCl, 3.5 mM de  $MgCl_2$ , 2.5 U de enzima Taq polimerasa, 0.3  $\mu$ M de cada iniciador (Gibco BRL), 4% de dimetilsulfóxido, 5  $\mu$ L de la muestra problema y una gota de aceite mineral estéril, para un volumen final de 50  $\mu$ L de muestra. La amplificación se realizó bajo el siguiente esquema: desnaturalización a 94 °C durante un minuto, alineación a 50 °C un minuto y polimerización a 72 °C por un minuto (40 ciclos), finalmente se da una extensión durante cinco minutos. En seguida se preparó un gel al 2% teñido con bromuro de etidio (10 mg/mL), colocándose 8  $\mu$ L de cada uno de los productos amplificados más 2  $\mu$ L de azul de bromofenol, el corrimiento electroforético fue a 70 voltios durante 90 minutos y los resultados se observaron en un analizador de imágenes (SYNGENE).

## Resultados y discusión

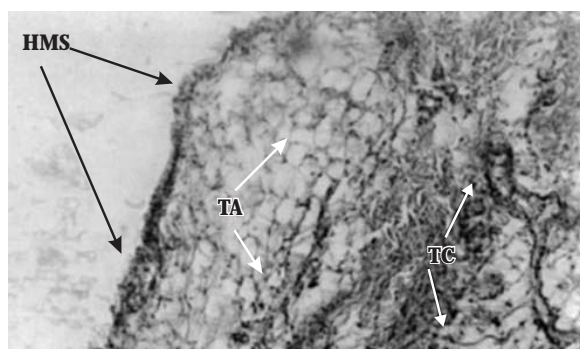
A partir de los sueros obtenidos de los ejemplares incluidos en el trabajo, y por medio de la técnica de inhibición metabólica, se detectaron anticuerpos contra *Mycoplasma fermentans* en las muestras de suero total; en las muestras de suero control la detección de anticuerpos resultó negativa. La detección de anticuerpos en las muestras de suero total se relaciona con la capacidad de variabilidad en la superficie celular de *Mycoplasma fermentans* que contribuye a su supervivencia, particularmente cuando el reconocimiento por parte del sistema inmunológico del hospedero es específico a proteínas de superficie, causando cambios en las reacciones inmunológicas, además hay que considerar la capacidad intracelular de este micoplasma, mimetizándose y evadiendo la respuesta inmunológica.<sup>15-19</sup>

La evaluación microscópica del estómago, intestino y tejido sinovial no reveló alteración alguna. Por su parte, el estudio histológico mostró que las muestras de estómago, tanto control como experimental, no presentaron alteración. Los cortes histológicos de muestras de intestino experimental presentaron cambios en su estructura, principalmente a nivel de la vellosidad intestinal (figura 1). Los tejidos sinoviales de los ejemplares experimentales presentaron hiperplasia de la membrana y zonas con remoción de tejido adiposo por tejido conectivo (figura 2). El daño inducido por *Mycoplasma fermentans* en intestino y tejido sinovial se relaciona con la capacidad de inducir la secreción de interleucina 1-beta y factor de necrosis tumoral en macrófagos, siendo estos eventos cruciales en la expresión de citocinas proinflamatorias.<sup>20</sup>

El reaislamiento en cultivo sólido para *Mycoplasma fermentans* en muestras de estómago, intestino y tejido sinovial resultó negativo, tanto en muestras control como experimentales. Explicándose que el daño fue inducido por la presencia de antígenos propios del microorganismo y/o por la



**Figura 1.** Corte histológico del intestino de una rata experimental. Se observa daño a nivel de la vellosidad intestinal (VI). (Teñido con hematoxilina y eosina, 10X).



**Figura 2.** Corte histológico del tejido sinovial de un ejemplar experimental. Presenta hiperplasia de la membrana sinovial (HMS) e intercambio del tejido adiposo (TA) por tejido conectivo (TC). (Teñido con hematoxilina y eosina, 20X).

formación de complejos inmunes, condicionando una respuesta inmunológica inespecífica.<sup>21-22</sup>

Con la finalidad de confirmar los reaislamientos, se realizó la prueba de PCR específica para la especie de *Mycoplasma fermentans*, no obteniéndose amplificación del fragmento de 207 pb en el total de las muestras. La nula amplificación del material genético se puede condicionar a una baja concentración de ADN en las muestras debido a la capacidad intracelular que presenta *Mycoplasma fermentans*, o también pudo deberse a que el microorganismo ya no se localizaba en dicho sitio anatómico, es decir por su capacidad para migrar

a otros sitios anatómicos por medio de la fusión a linfocitos T.<sup>19,23</sup>

## Conclusión

Es importante señalar que no se había logrado la detección de anticuerpos para *Mycoplasma fermentans*, después de inocularlo a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL por las vías intraperitoneal, articular o intratraqueal en diversos modelos animales. En el presente trabajo sí se detectaron anticuerpos contra *Mycoplasma fermentans* 30 días después de la inoculación vía oral con  $1 \times 10^6$  UFC/mL. Por su parte, la evaluación histológica mostró alteraciones a nivel de la vellosidad intestinal e hiperplasia de la membrana sinovial. El reaislamiento del microorganismo viable y la detección del ADN específico para *Mycoplasma fermentans* resultó negativo en el total de las muestras.

Considerando los antecedentes que mencionan la participación de *Mycoplasma hominis* y *Mycoplasma fermentans* como potenciales agentes etiológicos de la artritis reactiva y en relación a los resultados obtenidos, se plantea que *Mycoplasma fermentans* participa en la etiología de la artritis reactiva.

## Referencias

1. Chen W, Li D, Paulus E. High prevalence of *Mycoplasma pneumoniae* in intestinal mucosal biopsies from patients with inflammatory bowel disease and controls. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 2529-2535.
2. Huang S, Li JY, Wu J, Meng L, Shou CC. Mycoplasma infections and different human carcinomas. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 266-269.
3. Huang S, Li JY, Wu J, Meng L, Shou CC. Mycoplasma infection in human gastrointestinal carcinoma tissue. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2001; 81: 601-604.
4. Lee SG, Kim B, Choin W, Lee I, Choin J, Song K. Lack of association between proinflammatory genotypes of the interleukin-1 and gastric cancer/duodenal ulcer in Korean population. *Cytokine* 2003; 21: 167-171.
5. Kwon HJ, Kang JO, Cho SH. Presence of human mycoplasma DNA in gastric tissue samples from Korean Chronic gastritis patients. *Cancer Sci* 2004; 95: 311-315.
6. Barth WF, Segal K. Reactive arthritis (Reiter's Syndrome). *Am Fam Physician* 1999; 60: 499-507.
7. Keat A. Reiter's Syndrome and reactive arthritis in perspective. *N Engl J Med* 1983; 309: 1606-1615.
8. Sánchez HA, Rivera TJA, Cortés MA, Tlecuil MN, Méndez VF. Afecciones genitourinarias y micoplasmas. *Rev Mex Patol Clin* 2003; 50: 71-76.
9. Rivera-Tapia JA. Diagnóstico de *Mycoplasma fermentans* en pacientes con artritis. *Gac Med Mex* 2003; 139: 85-86.
10. Benítez-Bribiesca L. Las estrategias de *Helicobacter pylori*. *Acta Med* 2004; 1: 49-50.
11. Rivera-Tapia JA, Rodríguez PN. *Helicobacter pylori*, micoplasmas y patologías gástricas. *Sal Pub Mex* 2005; 47: 105-106.
12. Rottem S. Interaction of mycoplasma with host cells. *Physiol Rev* 2003; 83: 417-432.
13. Wong-Lee JG, Lovett M. Rapid and sensitive PCR method for identification of *Mycoplasma* species in tissue culture. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds). *Diagnostic molecular microbiology principles and applications*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1993; 257-260.
14. Shidu K, Rashidbaigi A, Testa D, Liao MJ. Competitor internal standards for quantitative detection of mycoplasma DNA. *FEMS Microbiol Lett* 1995; 128: 207-212.
15. Rosengarten R, Citti C, Glew M, Lischewski A, Droege M, Much P. Host-pathogen interactions in mycoplasma pathogenesis: virulence and survival strategies of minimal prokaryotes. *Int J Med Microbiol* 2000; 290: 15-25.
16. Theiss PM, Kim MF, Wise KS. Differential protein expression and surface presentation generates high-frequency antigenic variation in *Mycoplasma fermentans*. *Infect Immun* 1993; 61: 5123-5128.
17. Granfors K. Do bacterial antigens cause reactive arthritis? *Rheum Dis Clin North Am* 1992; 18: 37-48.
18. Toivanen A, Toivanen P. Reactive arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1996; 8: 334-340.
19. Wuorela M, Granfors K. Infection agents as triggers of reactive arthritis. *Am J Med Sci* 1998; 316: 264-270.
20. García J, Lemerrier B, Roman-Roman S, Rawadi G. A *Mycoplasma fermentans*-derived synthetic lipopeptide induces AP-1 and NK-kappa B activity and cytokine secretion in macrophages via the activation of mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 1998; 273: 3491-3498.
21. Sibilia J, Limbach F-X. Reactive arthritis or chronic infectious arthritis. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 580-587.
22. Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 1094-1156.
23. Dimitrov DS, Franzoso G, Salman M, Blumenthal R, Tarshis M, Barile MF, Rottem S. *Mycoplasma fermentans* (Incognitus strain) cells are able to fuse with T lymphocytes. *Clin Infect Dis* 1993; 17 (suppl 1): S305-308.