



11233  
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO T10**

**INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y  
NEUROCIRUGÍA  
"MANUEL VELASCO SUAREZ"**

**DETERMINACIÓN DE INFECCIONES  
SISTÉMICAS POR MYCOPLASMA EN  
PACIENTES CON ESCLEROSIS LATERAL  
AMIOTRÓFICA CLÍNICAMENTE DEFINIDA**

**TESIS DE POSGRADO**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
NEURÓLOGO**

**PRESENTA:  
DR. LUIS JAVIER FLORES RIO DE LA LOZA**

**TUTOR DE TESIS:  
Dra. Catherine Boll Woehrlen**

**COAUTORES:  
M. en C. Graciela Ordóñez Lozano  
M. en C. Benjamín Pineda Olvera**

México, D. F.

Enero 2003

1-A

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**TESIS  
CON  
FALLA DE  
ORIGEN**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Luis Javier Flores  
De la Loza  
FECHA: 26 - Feb - 2003  
FIRMA: [Signature]

[Signature]  
Dra. Teresa Corona Vázquez  
Jefatura Dirección de Enseñanza

[Signature]  
Dr. Fernando Zermeño Phols  
Jefatura Subdirección Neurología

[Signature]  
SUPERVISIÓN DE INVESTIGACIÓN  
DIVISION DE INVESTIGACIONES POSGRUAS  
FACULTAD DE MEDICINA

[Signature]  
Dra. Catherine Boll Woehrlen  
Tutor de Tesis  
Clínica de Nervio y Músculo



INSTITUTO NACIONAL  
DE NEUROLOGIA Y  
NEUROCIROLOGIA  
DIRECCION DE ENSEÑANZA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## INDICE

I.	Dedicatoria.....	3
II.	Agradecimientos.....	4
III.	Resumen de la investigación.....	5
IV.	Antecedentes.....	6
V.	Introducción.....	7
	a) Esclerosis Lateral Amiotrófica.....	7
	b) Mycoplasmas.....	12
VI.	Justificación.....	15
VII.	Hipótesis.....	16
VIII.	Objetivos y Metas.....	16
IX.	Metodología.....	17
X.	Consideraciones Éticas.....	22
XI.	Resultados.....	23
XII.	Discusión.....	29
XIII.	Anexos.....	31
XIV.	Referencias.....	37

**I. Dedicatoria.**

**A mis padres Oscar y Lourdes.**

**A mis hermanos y amigos.**

**A los pacientes con ELA a quienes admiro  
y llevo en mi mente.**

**Y muy especialmente**

**A mi amada esposa Marcela  
Por su apoyo y amor.**

II. AGRADECIMIENTOS.

A LAS AUTORIDADES DE ESTE INSTITUTO, EL CUAL  
CONSIDERO COMO MI CASA.

A MIS PROFESORES DE NEUROLOGÍA, POR SUS  
ENSEÑANZAS Y PACIENCIA, SIEMPRE LOS RECORDARE CON  
CARIÑO.

A LA DRA. CATHERINE BOLL POR SU VALIOSA  
ASESORIA.

A GRACIELA ORDÓÑEZ Y BENJAMÍN PINEDA DE  
NEUROINMUNOLOGIA POR SU GRAN APOYO Y EXCELENTE  
TRABAJO, SIN EL CUAL NO HUBIERA SIDO POSIBLE  
ESTE PROYECTO.

A LA ENFERMERA BLANCA DE LABORATORIO POR SU  
APOYO INCONDICIONAL.

A MI AMIGO JESÚS RAMÍREZ BERMÚDEZ.

Y A TODA LA GENTE QUE AMABLEMENTE PARTICIPO  
COMO CONTROL SANO.

¡ GR A C I A S !

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### III. RESUMEN DE LA INVESTIGACIÓN.

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo principal, el identificar la presencia de especies de *Mycoplasma* en muestras de sangre de pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) Clínicamente Definida, por medio del método diagnóstico de Reacción en Cadena de Polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR) en comparación con controles sanos.

Lo anterior con base en estudios realizados por el Dr. Garth L. Nicolson en el Institute for Molecular Medicine, Huntington Beach, California, E.U., donde se encontró una elevada frecuencia de infecciones sistémicas por *mycoplasma* en pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), tanto civiles como veteranos de la Guerra del Golfo Pérsico, en comparación con sujetos control pareados por edad y sexo, utilizando precisamente la prueba de PCR. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que algunos agentes infecciosos pueden jugar un papel muy importante tanto en la patogénesis como en la progresión de esta enfermedad.

Realizamos un estudio casos y controles en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS, incluyendo a 75 participantes, 20 pacientes con ELA clínicamente definida y 55 controles sanos. Se tomaron muestras de sangre venosa y se procesaron inmediatamente en el Laboratorio de Neuroinmunología del INNN; se procedió a la extracción del DNA de las muestras y posteriormente se sometieron a la prueba de PCR para *Mycoplasma sp.* con el kit comercial *Mycoplasma-Plus PCR primer set* de Stratagene.

Los pacientes con ELA tuvieron un rango de edad entre 35 y 82 años (media de 52.5); los sujetos control entre 35 y 60 años (media de 44.1). En cuanto al sexo de los participantes, se incluyeron en los casos 12 hombres y 8 mujeres (60 y 40% respectivamente), mientras que en los controles tenemos 29 hombres y 26 mujeres (52.7 y 47.3% respectivamente), no hay diferencia estadísticamente significativa en sexo entre casos y controles ( $p = .576$ ).

Después de realizar la PCR para *Mycoplasma sp.*, se obtuvieron los siguientes resultados: En los pacientes con ELA, 10 pacientes resultaron positivos (50%) y 10 negativos (50%), mientras que en los controles, tenemos 6 pacientes positivos (10.91%) y 49 negativos (89.09%), se obtiene significancia estadística ( $p = .001$ ).

Al calcular el riesgo estimado, se obtiene una OR de 8.167 (95%IC 2.4 - 27.6), lo cual indica que el riesgo a padecer ELA siendo positivo a la prueba de PCR para *Mycoplasma sp.* es 8:1. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la puntuación de la escala ALSFRS, tiempo de evolución de la enfermedad y tipo de presentación de la ELA (espinal o bulbar) y la positividad a la PCR para *Mycoplasma sp.*

En conclusión, existe una fuerte asociación entre padecer una infección crónica por *Mycoplasma sp.* y la ELA, lo cual reafirma los hallazgos de un estudio anterior similar. Sin duda los agentes patógenos intracelulares como lo es *Mycoplasma*, pueden jugar un papel en la génesis de enfermedades degenerativas.

Hacen falta más estudios para dilucidar la relación entre agentes infecciosos y las enfermedades neurológicas crónicas, degenerativas y sin tratamiento efectivo como es el caso de la ELA.



#### IV. ANTECEDENTES:

Estudios realizados por el Institute for Molecular Medicine en Huntington Beach, California, E.U. en pacientes veteranos de la Guerra del Golfo Pérsico y civiles con Esclerosis Lateral Amiotrófica, demostraron una alta frecuencia de infecciones por *Mycoplasma* sp., utilizando la técnica de PCR. Los resultados preliminares demostraron que casi todos los pacientes con ELA (30 de 36 -83%-) tenían evidencia de especies de *Mycoplasma* en sus muestras sanguíneas, en contraste con menos del 9% de infección por *Mycoplasma* en los controles ( $p < 0.001$ ). En los pacientes con ELA positivos a *Mycoplasma*, se investigó la presencia de las diferentes especies tales como *M. fermentans*, *M. pneumoniae*, *M. hominis* y *M. penetrans*.

Todos los veteranos de guerra fueron positivos para *M. fermentans*, excepto uno que fue positivo para *M. genitalium*, en contraste, los civiles con infecciones por *mycoplasma*, tenían infecciones tanto por *M. fermentans* (59%) así como por otras especies de *Mycoplasma* y dos pacientes civiles con ELA tenían infecciones múltiples (*M. fermentans* más *M. hominis*). De los controles que resultarían positivos a la infección, sólo dos pacientes fueron positivos para *M. fermentans* (2.8%) ( $P < 0.001$ ) (1).

No existen más antecedentes acerca de la asociación de las infecciones por *Mycoplasma* sp. en pacientes con ELA; sin embargo, se ha vinculado a este patógeno con múltiples enfermedades tales como: infecciones respiratorias y urogenitales, Síndrome de fatiga crónica, Encefalomiелitis, Fibromialgia, Artritis Reumatoide, enfermedades autoinmunes, infecciones cardíacas, orales y periodontales, enfermedades de transmisión sexual, infecciones sistémicas, enfermedades con inmunocompromiso tales como SIDA/VIH. (2,3,4).

No obstante, la incidencia de infecciones por *Mycoplasma* en estas enfermedades alcanza un 40 a 60%, lo cual es mucho menor a la hallada en pacientes con ELA (83%). Se están realizando más estudios con el fin de dilucidar el papel que juegan las infecciones por *Mycoplasma* en la neuropatología de la ELA y si el tratamiento de estas infecciones tiene algún valor en el manejo clínico de esta enfermedad neurológica (4).

## V. INTRODUCCIÓN. ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por pérdida de las neuronas motoras superiores e inferiores que sigue un curso progresivo con pérdida de la función motora. La enfermedad es casi siempre fatal y, aproximadamente 50% de los pacientes mueren 3 a 4 años después de la presentación de los síntomas (5, 6). La ELA es más común en el hombre que en la mujer hasta la edad de 70 años, cuando los rangos se igualan y, no obstante que el pico de presentación es en la quinta década de la vida, la enfermedad puede ocurrir a cualquier edad después de la adolescencia (6,7). La incidencia se calcula en 2.4 casos por 100 mil habitantes por año y se conoce una prevalencia de 5 casos por 100 mil habitantes. No se conoce predilección étnica y la prevalencia es la misma alrededor del mundo.

No existe una prueba sanguínea específica que brinde un diagnóstico inequívoco de ELA. El diagnóstico clínico está basado comúnmente en el resultado del examen físico y neurológico con los cuales se identifican los signos y síntomas de la enfermedad. Debido a que los signos de afectación de la Neurona motora superior e inferior pueden estar asociados con otras enfermedades que semejan a la ELA, una parte integral del diagnóstico de ELA incluye el excluir otras posibles causas de la signo-sintomatología del paciente. De esta forma deben usarse algunas pruebas tales como la Electromiografía (EMG), los estudios de neuroimagen, pruebas de sangre y orina y si está indicada, la biopsia de Nervio y Músculo (8).

Tipos de ELA: No obstante que esta enfermedad fue descrita por primera vez en 1869 por Jean Martin Charcot en Francia (9), continúa siendo una enfermedad enigmática. Sin embargo, recientemente como resultado de la intensa investigación durante la década pasada, se han realizado avances significativos que han ayudado a comprender la patogénesis y etiología de la ELA, así como a identificar potenciales estrategias de manejo para esta enfermedad.



Fig. 1-Jean Martin Charcot. (1825 – 1893)

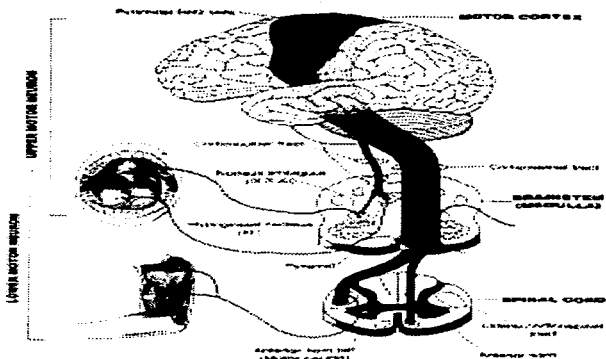
Más del 90% de los casos de ELA son clasificados como "ELA Clásica", un tipo esporádico de la enfermedad que está caracterizado por una combinación de daño a la Neurona motora superior (NMS) y a la Neurona motora inferior (NMI) (6). En el siguiente cuadro se muestran los datos clínicos hallados comúnmente en los pacientes con ELA:

**Síndrome de NMS:**  
Pérdida de la Fuerza Muscular  
Espasticidad, hipertonia.  
Reflejos patológicos  
Hiperreflexia  
Afecto pseudobulbar  
(labilidad emocional)

**Síndrome de NMI:**  
Pérdida de la Fuerza muscular.  
Flacidez, hipotonía.  
Reflejos patológicos ausentes.  
Hiporreflexia.  
Fasciculaciones y calambres musculares.  
Atrofia muscular.



Fig. 2-Atrofia muscular en regiones tenar, hipotenar e interósea y fasciculaciones linguales en ELA.



**Fig. 3 Afeción de Motoneuronas superiores e inferiores en la ELA. En esta enfermedad existe compromiso de los pares craneales bajos y de las astas anteriores de la médula espinal.**

Entre los pacientes con ELA clásica, más de 2/3 inician con los síntomas en las extremidades, 25% tiene una presentación bulbar y en 8 a 10% de los casos predominan los datos de NMI. Del 5 al 10% de los casos son clasificados como ELA familiar (10). Una mutación en el Gen que codifica para la superóxido dismutasa de Cobre-Zinc (SOD1) ha sido identificada en 10 a 15% de los pacientes con ELA familiar (11).

En 1990 se desarrolló El Escorial World Federation of Neurology Criteria for the Diagnosis of Amyotrophic Lateral Sclerosis, como un consenso para documentar de manera precisa el diagnóstico de la ELA y así poder ingresar a los pacientes a estudios clínicos y terapéuticos.

No obstante, estos criterios clínicos son usados también por los clínicos para evaluar a sus pacientes de manera individual, especialmente en aquellos que representan un problema diagnóstico (12) –Anexo 1-.

## DIAGNOSTICO DIFERENCIAL.

Las enfermedades que pueden imitar a la ELA incluyen canal cervical estrecho, tumores cervicales, poliradiculopatía lumbosacra, siringomielia, Esclerosis Múltiple, paraparesia espástica familiar, adrenomieloneuropatía, así como la neuropatía motora multifocal con bloqueo de la conducción, atrofia muscular postpoliomielitis, amiotrofia focal benigna, las fasciculaciones benignas o síndrome de Foley, la enfermedad de Kennedy (atrofia muscular bulboespinal ligada al X), y el EVC de tallo cerebral. Todas estas entidades deberán ser descartadas con los criterios clínicos, electrofisiológicos y de neuroimagen.



Fig. 4-Resonancia magnética de unión cráneo-cervical, necesaria en el diagnóstico diferencial de Esclerosis Lateral Amiotrófica.

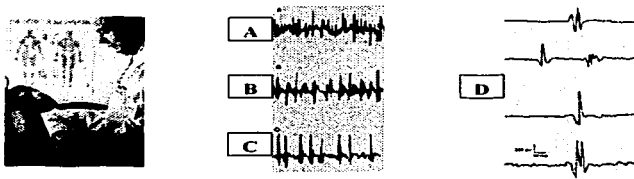
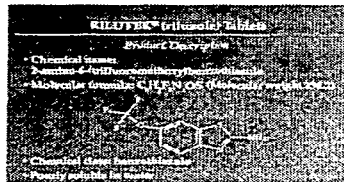


Fig. 5-Electromiografía en ELA, que muestra Reducción de unidades motoras A) no específica, B) moderada y C) severa. En D) vemos fasciculaciones.

El único medicamento aprobado por la FDA para el tratamiento de la ELA, es el Riluzole, cuyo mecanismo de acción parece ser la inhibición de la liberación de Glutamato y que en los ensayos clínicos ha demostrado prolongar la supervivencia de los pacientes con ELA (13).

Fig. 6 Riluzole. Antagonista de Glutamato, aprobado por la FDA para el tratamiento de la ELA.



Aunque en la actualidad no se conoce la etiología de esta enfermedad se consideran 5 hipótesis principales:

- 1)Excitotoxicidad por Glutamato. (14)
- 2)Reacciones autoinmunitarias vs Motoneuronas. (15)
- 3)Deficiencia de factor de crecimiento nervioso.
- 4)Disfunción de la SOD.
- 5)Infecciones crónicas. (16-20)

Fig. 7 El Glutamato favorece el incremento de Calcio intracelular, lo cual lleva a daño de la Membrana celular. En la figura se muestran niveles elevados de calcio dentro de las células, visto con microscopio láser.



De estas hipótesis, el papel de las infecciones crónicas ha atraído recientemente la atención con el hallazgo de secuencias de enterovirus en 15 de 17 muestras de la médula espinal de pacientes con ELA, detectadas por PCR (19). La posibilidad de que uno o más agentes infecciosos puedan interactuar para causar ELA permanece clara (21).

## MYCOPLASMAS.

Los Mycoplasmas son procariontes sin pared celular de la clase Mollicutes. Estos son pequeños, de vida libre, autorreplicación y algunos de ellos tiene la capacidad de invadir varios tejidos, incluyendo el sistema nervioso central (22,23). No obstante, los Mycoplasmas son encontrados comúnmente en la cavidad oral y como flora simbiótica intestinal; algunas especies patógenas pueden causar daño crónico o agudo cuando penetran en el sistema vascular y sistemáticamente colonizan órganos y tejidos (22,23). Por ejemplo, *M. penetrans*, *M. fermentans*, *M. hominis* y *M. pneumoniae*, pueden entrar en una variedad de tejidos y células, causando signos y síntomas sistémicos. Los Mycoplasmas han mostrado una compleja relación con el sistema inmune, son muy efectivos para evadir la respuesta inmune del hospedero y se ha visto un efecto sinérgico con otros agentes infecciosos (24).

*Mycoplasma sp.* puede permanecer intracelular y evadir la detección por pruebas de laboratorio convencionales y puede escapar al sistema inmune por la variación de la superficie antigénica e imitación molecular. Como la infección sistémica por *Mycoplasma* no eleva el conteo de células blancas y por lo tanto no causa alteraciones en la Biometría hemática, es difícil su identificación. Algunos médicos pueden diagnosticar infecciones mycoplasmáticas como virales y las pruebas con anticuerpos pueden resultar negativas en estadios iniciales de la infección. La respuesta de anticuerpos, puede no ser medible durante una infección sistémica por mycoplasma hasta que el paciente está cerca de la muerte. Los Mycoplasmas interactúan con el sistema linfocitario, como inmunomoduladores patógenos que pueden comprometer la inmunidad celular (linfocitos T). Los índices de linfocitos T-supresores (T8) pueden elevarse durante una infección por *Mycoplasma hominis* y los T-killers (T3) pueden disminuir durante la Mycoplasmosis. La función de las células asesinas naturales se deteriora como resultado de una infección sistémica por *Mycoplasma*.

Los Mycoplasmas requieren medios especiales para ser cultivados; crecen bien en condiciones de gran altitud / baja presión, de otra manera el cultivo puede resultar falso-negativo. Sólo la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) también conocida como amplificación de DNA es lo suficientemente sensible para detectar infecciones por *Mycoplasma*. Una prueba de PCR positiva confirma la presencia del genoma de *Mycoplasma* e infección activa (25-28).

## BIOLOGÍA MOLECULAR DE MYCOPLASMAS.

Los mycoplasmas se distinguen de otros procariontes por la ausencia de pared celular. Los habitats naturales incluyen mamíferos, aves, reptiles, artrópodos, peces y plantas.

Los mycoplasmas poseen dos propiedades inusuales: el tamaño del genoma y la composición de bases. De todos los organismos celulares, los mycoplasmas tienen el genoma más pequeño reportado, en algunos casos menos de 600 kilobases (kb). La composición de bases del DNA de mycoplasmas es también excepcional, ya que el contenido de G + C en algunas especies es tan bajo como 25mol%. Otro aspecto interesante del DNA mycoplasmal es el uso de codones, el TGA es un codón de parada (stop) en la mayoría de los organismos, pero este codifica triptófano en gran parte de los mycoplasmas.

Los mycoplasmas carecen de muchas vías enzimáticas características de la mayoría de las bacterias. Por ejemplo, carecen de vías para la producción de pared celular y biosíntesis de novo de purinas, un ciclo funcional de ácidos tricarbónicos y un sistema de transporte de electrones mediado por citocromo.

Los mycoplasmas comparten un ancestro común con las bacterias gram+, tales como bacilos, clostridios, lactobacilos, estafilococos y estreptococos, de tal manera, que las señales de expresión génica y muchos otros aspectos de la biología molecular son similares a estas.

**Estructura y Organización del Genoma.** Los Mollicutes poseen DNA circular de doble hebra de 600 a 1800 kb. El cromosoma de 580 kb del patógeno humano *Mycoplasma genitalium* es el más pequeño reportado.

**Recombinación Génica.** Quizá el aspecto más remarcable de los mycoplasmas es que, no obstante su limitada capacidad de codificación, producen la maquinaria metabólica necesaria para el crecimiento celular, evadir los mecanismos de defensa del hospedero, y sobrevivir en él por periodos indefinidos. Algunas especies pueden invadir células eucarióticas y sobrevivir intracelularmente.

**Patogénesis Molecular.** El ataque de los mycoplasmas a las células hospederas es pobremente comprendido, no obstante, existe evidencia experimental que soporta la posibilidad de participación de proteínas que juegan un papel en la citoadherencia. Muchas especies de mycoplasmas tienen una alta frecuencia de variaciones en la producción de antígenos de superficie (29).

Una propuesta común es que las variaciones en las proteínas de superficie de los mycoplasmas, contribuyen a la patogénesis de la enfermedad por permitir a la bacteria sobrevivir en diferentes nichos (tropismo tisular) y/o por permitir el escape a los mecanismos de defensa del huésped (evasión inmune). En conclusión, los mycoplasmas poseen cromosomas dinámicos con un complejo sistema de recombinación y grandes familias de genes capaces de generar extraordinarias proporciones de diversidad antigénica.

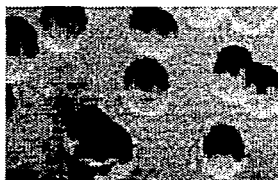
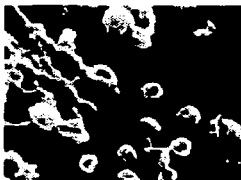


Fig. 8-*Mycoplasma pneumoniae*.



## PCR PARA DETECCIÓN DE MYCOPLASMAS.

Se han realizado diversos estudios que han comprobado la eficacia de la PCR para detección de distintas especies de mycoplasma. Se ha calculado que dicha prueba tiene una sensibilidad (detección de verdaderos positivos) de 86 a 96%, una especificidad (detección de verdaderos negativos) de 93 a 96%, valores predictivos positivos y negativos (probabilidad de resultados correctos) de 73 a 86 y 97 a 99% respectivamente, y una exactitud (detección de verdaderos positivos y verdaderos negativos) de 92 a 96% (30, 31).

Por lo anterior, la PCR se considera actualmente el estándar de oro para la detección de microorganismos como los mycoplasmas, que por su particularidad de poseer un genoma pequeño y ser intracelular escapa a la detección mediante pruebas de reacción con anticuerpos o bien cultivos convencionales.

Methodology	Comparative Sensitivities		Time needed for the completion of the assay
	Number of cells	UNA (picograms)	
PCR	1-5	10-50	1 day
Hybridization	50-100	250-500	2-3 days
Viral pap	100-400	500-2000	2-3 days
Culture	>1,000	5,000	>15 days
Agglutination	>1,000,000	5,000,000	Minutes

Fig.9-Comparación de sensibilidad y tiempo necesario para la identificación de agentes infecciosos por diversos métodos.

**Fig. 10** Reacción en Cadena de Polimerasa.  
-PCR- consiste en la síntesis enzimática in vitro de millones de copias de un segmento específico de ADN.

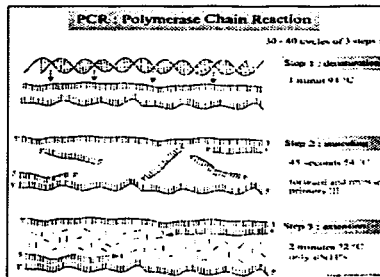
Se muestran los 3 principales pasos:

1) Desnaturalización

2) Alineamiento y

3) Extensión,

determinados por temperaturas y tiempos específicos.



## VI. JUSTIFICACIÓN.

1. La Esclerosis Lateral Amiotrófica es una enfermedad de etiología y fisiopatogenia inciertas, por lo que se requiere realizar investigación básica y clínica que ayude a establecer una asociación con otros fenómenos biológicos.
2. Existen antecedentes claros de asociación entre Esclerosis Lateral Amiotrófica e infecciones causadas por diversos agentes infecciosos entre los que destacan virus y bacterias tales como *Mycoplasma* sp. (1)
3. Las infecciones crónicas por virus o bacterias en ELA, constituyen una de las principales teorías etiológicas actuales de esta enfermedad (16-20).
4. En el único estudio realizado sobre el tema, las características de la muestra son diferentes, ya que se incluyeron pacientes veteranos de guerra y civiles. En este estudio tenemos una población más homogénea al tener sólo civiles, que son pacientes de un Instituto especializado en enfermedades neurológicas.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## VII. HIPÓTESIS.

**\*Los pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica Clínicamente Definida tienen una proporción significativamente mayor de positividad a la prueba de PCR en suero para Mycoplasma sp. en comparación con sujetos sanos.**

## HIPÓTESIS NULA:

**\*Los pacientes con ELA Clínicamente definida No tienen una proporción significativamente mayor de positividad a la prueba de PCR en suero para Mycoplasma sp. en comparación con sujetos sanos.**

## VIII. OBJETIVOS Y METAS.

1. **Objetivo Principal: Determinar si los pacientes con ELA Clínicamente definida muestran una proporción significativamente mayor de positividad a la prueba de PCR en suero para Mycoplasma sp. que los sujetos control.**
2. **Objetivos Secundarios:**
  - a) **Determinar si existe una asociación entre PCR positivo para Mycoplasma sp. y la severidad de la enfermedad, cuantificada mediante la escala ALSFRS.**
  - b) **Determinar si existe una asociación entre PCR positivo y tiempo de evolución de la enfermedad, cuantificada en meses.**
  - c) **Determinar si existe una asociación entre PCR positivo a Mycoplasma sp. y tipo de presentación de la enfermedad (Espinal o Bulbar).**

## IX. METODOLOGÍA.

1) **DISEÑO DEL ESTUDIO:** Se realizó un estudio **CASOS Y CONTROLES** durante el período de **Noviembre 2001 a Noviembre de 2002** en el **Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS**, incluyendo a **75** participantes con las siguientes características:

2) **SUJETOS:**

### A) CRITERIOS DE INCLUSIÓN PARA PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO.

**A1) Pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica Clínicamente Definida** de acuerdo a los criterios diagnósticos de "El Escorial" World Federation of Neurology . -Presencia de signos de Neurona motora superior e inferior en la región bulbar y en al menos dos regiones espinales o en tres regiones espinales-. (12) n= 20 pacientes.

\*Las edades deben fluctuar entre 18 a 65 años.

\*Pacientes diagnosticados con apoyo en estudios de Electrofisiología (EMG y VCN) y Neuroimagen (IRM de unión cráneo-cervical) que descarten la presencia de otros procesos como causantes de los síntomas, de acuerdo al mismo criterio diagnóstico(12).

\*No hay límite en el tiempo de evolución del padecimiento.

**A2) Sujetos Control:** Clínicamente sanos, los cuales serán pareados de acuerdo a edad y sexo, y que se obtuvieron del personal del Instituto (académicos y administrativos). n= 55 controles.

### B) CRITERIOS DE EXCLUSIÓN PARA PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO.

1. Pacientes con **ELA Familiar**.
2. Pacientes con **Complejo ELA-Parkinson-Demencia**.
3. Pacientes con **ELA** de posible origen **paraneoplásico o tóxico (Plomo, Mercurio)**.
4. Pacientes con **infección por VIH, SIDA**.
5. Pacientes con **ELA** clínicamente definida que presenten algún proceso séptico activo, comprobado por clínica y estudios de laboratorio y gabinete, tales como **neumonía intra o extrahospitalaria, IVU, vulvovaginitis, gastroenteritis, etc.**

### 3. MEDICIONES:

Variables:	Tipo de Variable:	Instrumento:
*Mycoplasma sp.	Nominal	PCR
*ELA	Nominal	Criterios Clínicos (12)
*Sexo	Nominal	Cuestionario
*Edad	Númerica	Cuestionario
*Severidad	Cuasinúmerica	ALSFRS
*Tiempo de evolución	Númerica	Expediente
*Tipo de presentación	Nominal	Expediente

### 4. PROCEDIMIENTOS:

*A) Toma de Muestras:* Se extrajeron 5 a 10cc de sangre venosa en cada uno de los pacientes con ELA y controles sanos (previa firma de carta de consentimiento informado) -Anexo 2- los cuales se colocaron en tubos de vidrio con EDTA y se llevaron personalmente al departamento de Neuroinmunología del INNN, donde se procesaron para la realización de la PCR.

*B) Recursos Utilizados:*

1. **Humanos:** Personal de Neurología Clínica del INNN.  
Personal de Neuroinmunología
2. **Físicos:** (Área, Equipo): Se cuenta con las áreas de CE y piso de Neurología Clínica del INNN para la valoración y estudio de los pacientes. Se cuenta además con el laboratorio de Neuroinmunología del INNN para la realización de extracción de DNA de las muestras sanguíneas y prueba de PCR para detección de Mycoplasma sp.

**3. Financieros: (Materiales, Sustancias):  
Mycoplasma Plus PCR Primer Set cve. 302008 Stratagene.  
Distribuidor: Química Valaner, S. A. de C. V.**

Amount	Catalog#	Stock	Price
--------	----------	-------	-------

**Mycoplasma Plus PCR Primer Set**

Primer design permits higher annealing temperatures, reducing spurious bands from contaminants, Contains: Mycoplasma Plus PCR primers, Positive control, Internal control, StrataClean™ resin, Rehydration buffer

100 determinations and 20 positive controls

302008 - N/A

**C) Descripción de la técnica de extracción de DNA y Reacción en Cadena de la Polimerasa.**

**\*Separación de células Mononucleares.**

Las células Mononucleares (CM) se separaron por centrifugación durante 20 minutos a 2000 rpm en gradiente con ficol 2ml por cada 5ml de sangre periférica. Se tomó la interfase, se centrifugo 5 minutos a 10,000 rpm, se colectó el botón, se lavó con PBS y se congeló hasta la extracción de DNA.

**\*Extracción de DNA:**

Se resuspendió el paquete de células mononucleares en 886 µl de NaCl 5mM, se le adicionó 46µl de SDS al 10% y se mezcló fuertemente (vortex) por 5 minutos, se le agregó 308µl de NaCl saturado (7M) y se centrifugo por 20 minutos a 11,000 rpm. Se colectó el sobrenadante y se lavó con: fenol saturado, fenol - cloroformo - alcohol isoamílico y cloroformo alcohol isoamílico independientemente v/v se centrifugo por 10 minutos a 11,000 rpm en cada caso. Se precipitó el DNA con un volumen de isopropanol, se centrifugo 15 minutos a 11,000 rpm y se lavó con etano al 70% dos veces, se dejó secar a temperatura ambiente y se disolvió en 100µl de agua estéril. Se cuantificó por espectrofotometría a 260nm y se corrió en geles de agarosa al 2% para determinar su calidad.

#### \*Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La amplificación por PCR fue realizada con una mezcla de 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200µM dNTP's, 0.2µM primer, 1 unidad Taq polimerasa y 0.6µg de DNA, fue cubierta con 50µl de aceite vegetal. Los primer para Mycoplasma y el control positivo se obtuvieron del kit comercial *Mycoplasma Plus PCR primer Set N° de catálogo 302008 de Stratagene*. Se utilizó DNA de Mycoplasma purificado como control positivo de amplificación. Las muestras tanto de pacientes como de controles fueron procesadas de manera ciega.

Para corroborar la integridad del DNA se utilizó el gen β-globina cuya secuencia es ACACAAGTGTGTTCACTAGC (nucleótidos 180-199) y GGAAAATAGACCAATAGGCTG (nucleótidos 430-410). Cuarenta ciclos de amplificación fueron realizados en un termociclador (Eppendorf master cycler 5330) en las siguientes temperaturas: 94° C (desnaturalización), 50° C (alineación) y 72° C extensión por 1,1 y 2 minutos respectivamente. Previamente se realizó un ciclo a las mismas temperaturas pero diferentes tiempos (dos minutos para cada uno). Para el gen β-globina fueron 23 ciclos a las condiciones arriba mencionadas excepto la temperatura de alineación que fue de 58° C. Para controlar la contaminación se incluyó agua como control negativo. Los productos de la PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% corrido por 1 hr. a 100 V en TBE 1X y teñido con bromuro de ethidium.

#### Soluciones de trabajo:

1. NaCl mM (0.29 g de NaCl en 100 ml de agua)
2. SDS 10 % (10 g en 100 ml de agua)
3. NaCl saturado 7M (408 g en 1,000 ml)
4. Fenol saturado (300 ml de fenol 200 ml de agua, 2 ml β-mercaptoetanol, 2 ml de tris-HCl 2M pH 8.0 500 mg de 8 hidroxiquinoleína, 292.5 µl de NaOH 10 N)
5. Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1)
6. Cloroformo alcohol isiamílico (24:1)
7. Isopropanol
8. Etanol 70% (70 ml de alcohol y 30 ml de agua)

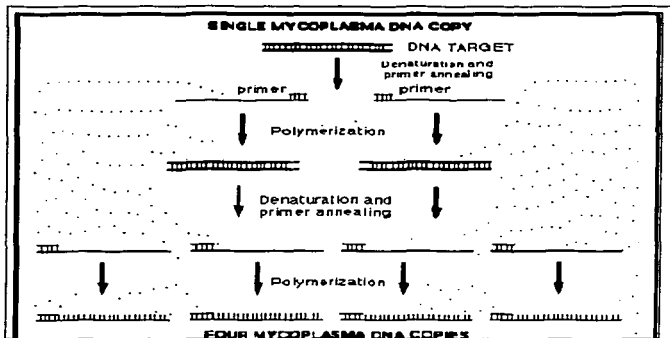


Fig.11-Secuencia en la PCR e incremento exponencial en el número global de copias sintetizadas.

**D) Escala ALSFRS:** A los pacientes con ELA se les aplicó la Escala ALSFRS (The Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale) para conocer su funcionalidad al momento de ser enrolados en el estudio. Esta escala valora actividades de la vida diaria, 10 aspectos con una puntuación del 0 al 4 cada uno, siendo 0 la mayor afectación y 4 normal. -Anexo 3- (32).



## 5. ANÁLISIS DE DATOS:

Para el análisis de datos, se utilizó el programa informático SPSS 10.0, realizando Estadística Descriptiva y se usaron las siguientes pruebas estadísticas:

1. Kolmogorov-Smirnov: Para analizar la distribución de variables.
2. Chi cuadrada de Pearson: Para verificar si existe diferencia significativa en sexo entre casos y controles.
3. Prueba exacta de Fisher: Para medir significancia estadística en positividad a la prueba de PCR para Mycoplasma sp. entre casos y controles, así como para verificar si existe significancia estadística entre tipo de presentación de la enfermedad (espinal o bulbar) y positividad a la prueba de PCR para Mycoplasma sp. en pacientes con ELA.
4. T de student: Para conocer si hay diferencia significativa en edad entre casos y controles y para conocer si existe diferencia significativa entre la puntuación de la escala ALSFRS y positividad a la prueba de PCR para Mycoplasma sp. en pacientes con ELA.
5. Prueba de Mann-Whitney: Para saber si existe diferencia significativa entre el tiempo de evolución de la enfermedad y positividad a la prueba de PCR para Mycoplasma sp.
6. Análisis Estratificado de Mantel-Haenszel: Para controlar el efecto de la variable confusora edad.

## X. CONSIDERACIONES ETICAS.

Tanto en los pacientes con ELA y en los controles sanos, se llevó a cabo la extracción de sangre venosa (5 a 10cc) por medio de técnica estéril, previa firma de carta de consentimiento informado. Se explicó claramente a los pacientes que es un procedimiento de bajo riesgo que sólo tendría como complicación dolor en el sitio de punción; que se trata de un proyecto de investigación sin costo para él y que los resultados que se obtengan podrían no ser útiles para el tratamiento de su enfermedad y que puede negarse a participar sin consecuencias en su atención en este Instituto. – Anexo 2--

## **XI. RESULTADOS.**

### **1. ASOCIACIÓN ENTRE ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA Y MYCOPLASMA.**

#### **A) Características Epidemiológicas:**

Se incluyeron 20 pacientes con ELA con un rango de edad entre 35 y 82 años y una media de 52.5 años; 55 sujetos control con un rango de edad entre 35 y 60 años y una media de 44.1 años. Se realizaron pruebas de normalidad para conocer la distribución de variables. La curva de distribución de las edades de casos y controles es normal. Se realizó la prueba T de student para comparar las edades entre ambos grupos, encontrando una desviación estándar de 11.08 para los casos y 6.28 para los controles, lo cual resulta en una diferencia significativa ( $p=.004$ ).

En cuanto al sexo de los participantes, se incluyeron en los casos 12 hombres y 8 mujeres (60 y 40% respectivamente), mientras que en los controles tenemos 29 hombres y 26 mujeres (52.7 y 47.3% respectivamente). Con la prueba de Chi cuadrada de Pearson, se obtiene que no hay diferencia estadísticamente significativa en sexo entre casos y controles ( $p=.576$ ).

#### **B) Resultado de PCR para Mycoplasma sp. en pacientes con ELA y controles sanos.**

Después de realizar dicha prueba, se obtuvieron los siguientes resultados:

En los pacientes con ELA, 10 pacientes resultaron positivos (50%) y 10 negativos (50%), mientras que en los controles, tenemos 6 pacientes positivos (10.91%) y 49 negativos (89.09%), y al aplicar la prueba exacta de Fisher, se obtiene significancia estadística ( $p=.001$ ).

Al calcular el riesgo estimado, se obtiene una OR de 8.167 (95%IC 2.4 – 27.6), lo cual indica que el riesgo a padecer ELA siendo positivo a la prueba de PCR para Mycoplasma sp. es 8:1 (ver Tabla 1).

En un momento dado, se puede aseverar, que la diferencia significativa en el resultado de PCR para Mycoplasma sp., pudiese estar influenciada por las diferencias de edad entre casos y controles. Para controlar la influencia de la variable -edad-, se realizó un Análisis Estratificado. Calculamos la mediana de edad para los sujetos del estudio, y se obtuvo 45, por lo cual formamos 2 estratos, 1 conformado por sujetos de 45 años o mayores ( $n=40$ ) y otro con sujetos de 44 años ó menores ( $n=35$ ).

En el grupo 1 se encontró una p significativa de .029 (Pba. exacta de Fisher) y un OR de 5.5 (IC 95% 1.2 – 24.5). En el grupo 2, se encontró una p significativa de .026 y un OR de 13.5 (IC 95% 1.5 – 115.9). Finalmente, calculamos el OR ponderado mediante el método de Mantel – Haenszel y lo encontramos en 7.08, por lo cual esta es nuestra medida final de asociación entre ELA y PCR+.

Con esto se demuestra que en ambos grupos de edad, se conserva la significancia estadística y por lo tanto que la diferencia de edades entre casos y controles no anula la asociación encontrada entre ELA y PCR+.

**TABLA I**

**VARIABLES EPIDEMIOLOGICAS EN  
PACIENTES CON ELA Y SUJETOS  
CONTROL**

VARIABLE	CASOS n (%)	CONTROLES n (%)	P*	OR	IC 95% <sup>b</sup>
SEXO	10 (50%)	10 (50%)	.80*	8.167	2.4-27.6
EDAD	10 (50%)	10 (50%)	-----	-----	-----
EDAD adulta (SI)	52.5 (11.0%)	44 (10.2%)	.04*	-----	-----
SEXO Masculino n (%)	12 (60)	29 (52.7%)	.57*	7.44	2.0-2.103
SEXO Femenino n (%)	8 (40)	26 (47.2%)	-----	-----	-----

\* = Prueba exacta de Fisher

b = Prueba T de student

c = Prueba Chi cuadrada de Pearson.

## 2. RELACION ENTRE MYCOPLASMA Y SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD.

A todos los pacientes con ELA, se les aplicó la escala funcional ALSFRS, que mide el grado de afectación, tomando en cuenta actividades de la vida cotidiana, 10 ítems, graduados del 0 al 4, siendo 0 la mayor afectación y 4 normal. Dividimos a los pacientes en 2 grupos, los positivos y los negativos a la prueba de PCR para *Mycoplasma sp.*, con el fin de encontrar una relación entre severidad de la enfermedad y la presencia de *Mycoplasma sp.* En el grupo negativo a la prueba (10 pacientes -50%-), se obtuvo una media de puntuación de la ALSFRS de 21.7, mientras que en el grupo positivo, la media es de 19.2. Al aplicar la prueba de Kolmogorov-Smirnov, hallamos que la distribución de ambas poblaciones es normal. Al aplicar la prueba T de student, encontramos que no hay diferencia significativa entre ambos grupos ( $p=0.512$ ). Lo anterior, nos muestra que la severidad de la enfermedad no influye en el resultado de positividad a la prueba de PCR para *Mycoplasma sp.* (ver Tabla 2).

## 3. RELACION ENTRE MYCOPLASMA Y TIEMPO DE EVOLUCION DE LA ENFERMEDAD.

También se tomaron en consideración los dos grupos anteriores, positivos y negativos a la prueba de PCR para *Mycoplasma sp.*, analizando el tiempo de evolución de la enfermedad. Los negativos a la prueba, tuvieron una media de 27.7 meses, mientras que los positivos observaron una media de 34.0 meses. El test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, mostró una distribución anormal ( $p=0.032$  para los negativos y  $p=0.001$  para los positivos). Por lo anterior, se realizó la prueba de Mann-Whitney, obteniendo una  $p=0.684$ , lo que indica que no hay significancia estadística y que el tiempo de evolución de la enfermedad no determina la positividad a PCR para *Mycoplasma sp.* (ver Tabla 2).

#### 4. RELACION ENTRE MYCOPLASMA Y TIPO DE PRESENTACIÓN DE LA ENFERMEDAD.

Al considerar también los 2 grupos, positivos y negativos, se trató de relacionar este resultado a la prueba con el tipo de presentación o inicio de la enfermedad, en dos categorías, inicio Espinal e inicio Bulbar. De los 20 pacientes, 15 tuvieron inicio espinal (75%), 8 negativos y 7 positivos a PCR; y 5 inicio bulbar (25%), 2 negativos y 3 positivos a PCR. Con la prueba exacta de Fisher, no se obtuvo significancia estadística ( $p=1.0$ ), lo cual muestra que no existe relación entre el tipo de presentación de la enfermedad y positividad a la prueba de PCR para *Mycoplasma sp.* (ver Tabla 2).

Resultado de PCR para <i>Mycoplasma sp.</i>	NEGATIVO	POSITIVO	P
* ALSFIS -media- (puntos)	21.7	19.2	.512 <sup>a</sup>
Tiempo de Evol. -media- (meses)	27.7	34.0	.684 <sup>b</sup>
Presentacion Espinal, N (%)	8 (40%)	7 (35%)	1.0 <sup>c</sup>
Presentacion Bulbar, N (%)	2 (10%)	3 (15%)	1.0 <sup>c</sup>

\* Americanic Literat System Functional Rating Scale

- <sup>a</sup> = Prueba T de student.  
<sup>b</sup> = Mann-Whitney U.  
<sup>c</sup> = Prueba exacta de Fisher.

## PRODUCTOS DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERA SA

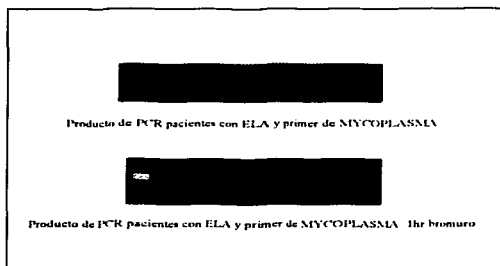


Fig. 12 Producto de PCR para *Mycoplasma sp.* en pacientes con ELA

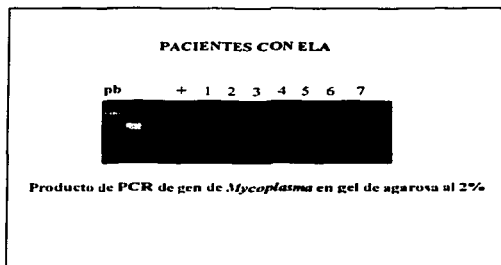
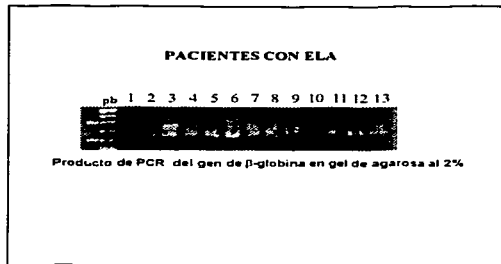
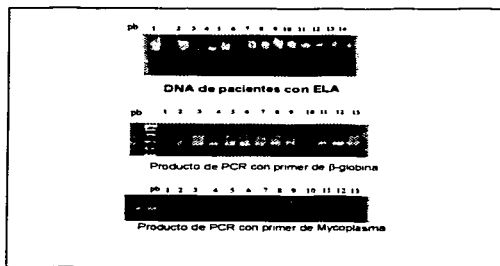


Fig. 13 En gel de agarosa se visualiza el producto de PCR del gen de *Mycoplasma sp.*



**Fig. 14** Se muestra el producto de PCR del gen de  $\beta$ -globina en pacientes con ELA.



**Fig. 15** Se demuestra la correcta extracción de DNA de las muestras de pacientes con ELA, el producto de PCR con primer de  $\beta$ -globina y el producto de PCR con primer de *Mycoplasma* sp.

## XII. DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos con este estudio de casos y controles son ampliamente demostrativos de que existe una asociación entre la infección crónica por *Mycoplasma* sp. y la Esclerosis Lateral Amiotrófica. Al igual que en otras enfermedades crónicas y degenerativas como la Artritis reumatoide, el Síndrome de fatiga crónica, fibromialgia, etc. (28), en la ELA parece haber una relación estrecha con la coexistencia de patógenos tales como *Mycoplasma* sp.

En un estudio piloto realizado con anterioridad en Huntington Beach, California por Nicolson y cols. (1) se mostró dicha asociación, sin embargo existen varias diferencias con nuestro estudio. En primer lugar, en el estudio de Nicolson se tomaron 2 poblaciones diferentes de pacientes con ELA, civiles y veteranos de guerra (guerra del Golfo Pérsico), siendo la exposición a otras regiones del mundo y en condiciones adversas de supervivencia como lo es un conflicto bélico, un antecedente epidemiológico de consideración y posible factor de sesgo. En segundo lugar, aunque los resultados de ambos estudios son muy similares, difieren en porcentajes, ya que en el estudio mencionado 83% de los pacientes con ELA y <9% de los controles fueron positivos a la PCR para *Mycoplasma*, mientras que nosotros obtuvimos un 50% en los pacientes y 10.9% en los controles. En ambos estudios se obtuvo la misma significancia estadística ( $p = .001$ ).

Una limitante de nuestro estudio, fue la falta de diferenciación entre especies de *Mycoplasma*. Sabemos que las principales especies de *Mycoplasma* patógenas para el hombre son: *M. pneumoniae*, *fermentans*, *hominis* y *genitalium* (29). El factor que limitó nuestro estudio fue el no contar con la enzima de restricción *Sau3A1*, una enzima capaz de diferenciar entre el DNA de las distintas especies de *Mycoplasma*. Hubiera sido interesante conocer la predominancia entre especies de *Mycoplasma* en nuestra población de sujetos positivos y hacer una comparación entre los casos de ELA y los controles.

Son importantes los siguientes fenómenos analizados en este estudio. La relación entre positividad a la prueba de PCR para *Mycoplasma* sp. y el estado funcional de los pacientes, que se cuantificó por medio de la escala ALSFRS; el tiempo de evolución de la enfermedad cuantificado en meses y el tipo de presentación de la enfermedad (espinal o bulbar).

En cuanto al primer punto, no hallamos relación estadísticamente significativa entre la puntuación obtenida en la escala y la positividad a la PCR, lo cual indica que el grado de afectación del paciente no determina el presentar o no el fenómeno *Mycoplasma* y por lo tanto no afecta la asociación hallada.

De forma análoga, no se encontró diferencia significativa entre tiempo de evolución de la enfermedad y positividad a la PCR para *Mycoplasma* sp., por lo que concluimos que tanto los pacientes con corta y larga evolución están expuestos por igual a presentar la asociación con la infección crónica de *Mycoplasma*.



Por último, tampoco influye el tipo de presentación de la enfermedad, el 75% de nuestros pacientes con ELA tuvieron presentación espinal y el 25% restante, presentación bulbar, tal y como se describe en la literatura mundial (6,7, 8). No se halló diferencia significativa entre positividad a la PCR y tipo de presentación.

Todo lo anterior, sugiere que la asociación hallada entre *Mycoplasma* sp. y la Esclerosis Lateral Amiotrófica, no distingue al variable comportamiento que pudiera tener la enfermedad, es decir, no discrimina la heterogeneidad clínica bien conocida en la ELA. Por ello, debemos de catalogar el fenómeno *Mycoplasma*-ELA como una asociación homogénea digna de investigarse más a fondo. Por otro lado, cabe mencionar que no se puede atribuir la presencia de *Mycoplasma* en mayor proporción en los enfermos de ELA que en los controles por cuestiones estacionales o de tiempo, ya que la toma de muestras se realizó en las mismas épocas del año en ambos grupos. El factor lugar también debe tomarse en cuenta, pero prácticamente todos los participantes del estudio pertenecen a comunidades urbanas, por lo tanto dichos factores no influncian los resultados del estudio.

Los *Mycoplasmas* pueden causar daño al sistema nervioso central por varios posibles mecanismos, como producción de superantígenos, estimulación anormal de citocinas como la interleucina-2, generación de radicales tóxicos de oxígeno, lesión de diversos órganos e inducción de apoptosis -muerte celular programada- (1). Todos los mecanismos anteriores, serían favorecidos por la muy efectiva evasión de la respuesta inmune del hospedero y el sinergismo con otros agentes infecciosos. Por tal motivo, es menester realizar más investigación básica para conocer en sus aspectos más íntimos tales mecanismos y fenómenos.

No se puede determinar con este tipo de diseño si existe una relación causa - efecto, sólo podemos probar, como ya se mencionó, una asociación. Hacen falta más estudios, de seguimiento y de investigación básica para conocer el papel exacto de los patógenos intracelulares y las respuestas inmunitarias que despiertan en el hospedero para la producción de enfermedades degenerativas.

-ANEXO I-

**EL ESCORIAL. FEDERACIÓN MUNDIAL DE NEUROLOGÍA  
CRITERIOS DIAGNOSTICOS PARA ELA (12).**

**El Escorial World Federation of  
Neurology Diagnostic Criteria for  
MS.**

- El diagnóstico de ELA requiere la presencia de:
- Signos de la SMI por clínica, electrofisiología o examen neuropatológico.
- Signos clínicos de la SMI.
- Evidencia por resonancia de otros procesos.
- Evidencia por electrofisiología de otros procesos.
- Evidencia por neuropatología de otros procesos.

**El Escorial World Federation of  
Neurology Diagnostic Criteria for  
MS.**

- ELA DEFINITIVA. Presencia de SMI y SMI en 2 o más regiones o en al menos 2 regiones y paradas o en 2 o más regiones separadas.
- ELA PROBABLE. SMI y SMI en al menos 2 regiones o al menos 2 SMI de la misma región o al menos 2 SMI de la misma región o al menos 2 SMI de 2 o más regiones.
- ELA POSIBLE. SMI y SMI en una sola región o SMI en 2 o más regiones o signos de SMI en 2 o más regiones.
- ELA SOSPITOSA. Solo SMI en 2 o más regiones.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO  
PROTOCOLO No. 23/01  
DETERMINACIÓN DE INFECCIONES SISTÉMICAS POR MYCOPLASMA EN  
PACIENTES CON ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA.  
EXTRACCIÓN DE SANGRE VENOSA.**

Por medio de la presente, acepto participar en este proyecto de investigación y autorizo a los investigadores a extraerme 5 a 10cc de sangre venosa, con el previo conocimiento de los riesgos del procedimiento, así como los fines de la investigación y uso de las muestras. Estoy conciente que los resultados de dichos estudios podrían no ser útiles para el tratamiento de mi enfermedad.

Nombre y Edad del Participante:

Dirección y teléfono:

Fecha de toma de la muestra:

Firma del participante:

Firma del investigador:

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Cedarbaum J. *Archives of Neurology*. 1996 Feb 53(2):141-7.

## The Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale (ALSFRS)

Assessment of activities of daily living in patients with amyotrophic lateral sclerosis. The ALS CNTF treatment study (ACTS) phase I-II Study Group.

- 
- I. Comparisons are made with the patient's status prior to the onset of the disease, not with status of the last visit.
- II. Patient's response (on a 5-point scale) is recorded in relation to the question "How are you doing at (...)?" for each of 10 functions listed in the ALSFRS.
- 

### a. Speech

4	Normal speech processes
3	Detectable speech disturbances
2	Intelligible with repeating
1	Speech combined with nonvocal communication
0	Loss of useful speech

### b. Salivation

4	Normal
3	Slight but definite excess of saliva in mouth; may have nighttime drooling
2	Moderately excessive saliva; may have minimal drooling
1	Marked excess of saliva with some drooling
0	Marked drooling; requires constant tissue or handkerchief

### c. Swallowing

4	Normal eating habits
3	Early eating problems - occasional choking
2	Dietary consistency changes
1	Needs supplemental tube feeding
0	NPO (exclusively parenteral or enteral feeding)

### d. Handwriting

4	Normal
3	Slow or sloppy; all words are legible
2	Not all words are legible
1	Able to grip pen but unable to write
0	Unable to grip pen

### e. Cutting Food and Handling Utensils (patients without gastrostomy)

4	Normal
3	Somewhat slow and clumsy, but no help needed
2	Can cut most foods, although clumsy and slow; some help needed
1	Food must be cut by someone, but can still feed slowly
0	Needs to be fed

**Cutting Food and Handling Utensils (alternate scale for patients with gastrostomy)**

4	Normal
3	Clumsy but able to perform all manipulations independently
2	Some help needed with closures and fasteners
1	Provides minimal assistance to caregiver
0	Unable to perform any aspect of task

**f. Dressing and Hygiene**

4	Normal function
3	Independent and complete self-care with effort of decreased efficiency
2	Intermittent assistance or substitute methods
1	Needs attendant for self-care
0	Total dependence

**g. Turning in Bed and Adjusting Bed Clothes**

4	Normal
3	Somewhat slow and clumsy, but no help needed
2	Can turn alone or adjust sheets, but with great difficulty
1	Can initiate, but not turn or adjust sheets alone
0	Helpless

### **h. Walking**

4	Normal
3	Early ambulation difficulties
2	Walks with assistance
1	Nonambulatory functional movement
0	No purposeful leg movement

### **i. Climbing Stairs**

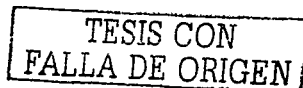
4	Normal
3	Slow
2	Mild unsteadiness or fatigue
1	Needs assistance
0	Cannot do

### **j. Breathing**

4	Normal
3	Shortness of breath with minimal exertion (e.g. walking, talking)
2	Shortness of breath at rest
1	Intermittent (e.g. nocturnal) ventilatory assistance
0	Ventilator dependent

## REFERENCIAS:

1. Garth L. Nicolson, Marwan Y. Nasralla, Joerg Haier. High Frequency of Systemic Mycoplasmal Infections in Gulf War Veterans and Civilians with Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *J Clin Neurosci*. 2002 Sep; 9(5): 525-529.
2. Nicolson GL, Nasralla M, Nicolson N. The patogénesis and treatment of Mycoplasmal infections. *Antimicrob Infect Dis Newsl* 1999; 17: 81-88.
3. Nicolson GL, Nasralla M, Haier J. Mycoplasmal infections in Chronic illnesses: Fibromyalgia and Chronic Fatigue Syndromes. *Gulf War Illness, HIV-AIDS and Rheumatoid Arthritis. Med Sentinel* 1999; 4: 172-176.
4. Nicolson GL, Nasralla M, Franco AR. J. Mycoplasmal infections in chronic diseases. *J Chron Fatigue Syndr* 2000; 6: in press.
5. Lee RJJ, Annegers JF, Appel SH. Prognosis of amyotrophic lateral sclerosis and the effect of referral selection. *J Neurol Sci* 1995;132:207-215.
6. Mitsumoto H. Classification and clinical features of amyotrophic lateral sclerosis. In: Mitsumoto H, Norris FH, eds. *Amyotrophic lateral sclerosis: a comprehensive guide to management*. New York: Demos Publications, 1994:1-19.
7. Rosen AD. Amyotrophic lateral sclerosis. Clinical features and prognosis. *Arch Neurol* 1978;35:638-642.
8. Mitsumoto H. Diagnosis and progression of ALS. *Neurology* 1997;48(Suppl 4):S2-S8.
9. Charcot JM. De la sclérose latérale amyotrophique. *Prog Med* 1874;2:325-327, 341-342, 453-455.
10. Mulder DW, Kurland LT, Offord KP, Beard CM. Familial adult motor neuron disease: amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 1986;36:511-517.
11. Siddique T, Nijhawan D, Hentati A. Molecular genetic basis of familial ALS. *Neurology* 1996;47(suppl 2):S27-S35.
12. World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases. El Escorial World Federation of Neurology Criteria for the Diagnosis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neurol Sci* 1994;124(suppl):96-107.





13. Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V, and the ALS/Riluzole Study Group. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 1994;330:585-591.
14. Shaw PJ, Ince PG. Glutamate, excitotoxicity and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neurol* 1997;244(suppl 2): S3-S14.
15. Offen D, Halevi S, Orion D, et al. Antibodies from ALS patients inhibit dopamine release mediated by L-type calcium channels. *Neurology* 1998;51:1100-1103.
16. Woodall CJ, Riding MH, Graham DI, Clements GB. Sequences specific for enterovirus detected in spinal cord from patients with motor neuron disease. *Br Med J* 1994;308:1541-1543.
17. Brahic M, Smith RA, Gibbs CJ Jr. Detection of picornavirus sequences in nervous tissue of Amyotrophic Lateral Sclerosis and control patients. *Ann Neurol* 1985;18:337-343.
18. Swanson NR, Fox SA, Mastaglia FL. Search for persistent infection with poliovirus or other enteroviruses in Amyotrophic Lateral Sclerosis-motor neuron disease. *Neuromuscul Disord* 1995;5:457-465.
19. Berger MM, Kopp N, Vital C. Detection and cellular localization of enterovirus RNA sequences in spinal cord of patients with ALS. *Neurology* 2000;54:20-25.
20. Muir P, Nicholson F, Spencer GT, et al. Enterovirus infection of the central nervous system of humans: lack of association with chronic neurological disease. *J Gen Virol* 1996;77:1469-1476.
21. Anderson GW, Plamer GA, Rowland RR, Even C. Infection of central nervous system cells by ecotropic murine leukemia virus in C58 and AKR mice and in in utero-infected CE/J mice predisposes mice to paralytic infection by lactate dehydrogenase-elevating virus. *J Virol* 1995;69:308-319.
22. Baseman J, Tully J. Mycoplasmas: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. *Emerg Infect Dis* 1997;3:21-32.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

23. Lo SC, Dawson MS, Newton III PB. Association of the virus-like infectious agent originally reported in patients with AIDS with acute fatal disease in previously healthy non-AIDS patients. *Am J Trop Med Hyg* 1989;40:399-409.
24. Rawadi FA, Roman S, Castredo M. Effects of *Mycoplasma fermentans* on the myelomonocytic lineage. *J Immunol* 1996;156:670-680.
25. Van Kuppeveld FJM, Van der logt JTM, Angulo AF. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl Environ Microbiol* 1992;58:2606-2615.
26. Berg S, Lueneberg E, Frosch M. Development of an amplification and hybridization assay for the specific and sensitive detection of *Mycoplasma fermentans* DNA. *Mol Cell Probes* 1996 (10):7-14.
27. Bernet C, Garret M, de Marbeyrac B, Bebear C. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by using the polymerase chain reaction. *J Clinical Microbiol* 1989;27:2492-2496.
28. Vojdani A, Franco AR. Multiplex PCR for the detection of *Mycoplasma fermentans*, *M. hominis* and *M. penetrans* in patients with Chronic Fatigue Syndrome, Fibromyalgia, Rheumatoid Arthritis and Gulf War Illness. *J Chronic Fatigue Syndr* 1999;5:187-197.
29. Dybvig K, Voelker L. Molecular Biology of Mycoplasmas. *Annu. Rev. Microbiol* 1996 50: 25-57.
30. Uphoff C, Drexler H. Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2002 Feb;38(2):79-85.
31. Uphoff C, Drexler H. Detection of mycoplasma in leukemia-lymphoma cell lines using polymerase chain reaction. *Leukemia* 2002 Feb;16(2):289-93.
32. The ALS CNTF Treatment Study (ACTS) Phase I-II Study Group. The Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale. *Arch Neurol* 1996;53:141-147.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO DEBE  
 SER REPRODUCIDA