

11261

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PAPEL DE *Mycoplasma pneumoniae* EN LAS
EXACERBACIONES DEL ASMA

TESIS PROFESIONAL QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS (INMUNOLOGIA)

PRESENTA

CONSTANTINO GIL JUAREZ

ASESOR

DR. EN C. EDGAR ZENTENO GALINDO

TUTORES

M. EN C. GUADALUPE MALDONADO MERCADO

DRA. EN C. MARIA LILIA CEDILLO RAMIREZ

MEXICO D.F., OCTUBRE DE 1997

TESIS CON
VALIA 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

INDICE

	Página
Resumen	1
Introducción	2
Marco teórico	4
Marco de referencia	8
Justificación	11
Hipótesis	11
Objetivos	12
Esquema general de trabajo	13
Materiales y métodos	14
Resultados	18
Discusión	31
Conclusión	39
Apéndice I (medios de cultivo)	40
Bibliografía	42

AGRADECIMIENTOS

Al Dr Edgar Zenteno Galindo y a la M. en C. Guadalupe Maldonado Mercado un reconocimiento especial por la valiosa supervisión y constante interés para la realización de este trabajo.

A la Dra. María Lilia Cedillo Ramírez un reconocimiento muy especial por la valiosa asesoría para la realización de este trabajo.

Al Dr. Jorge Antonio Yáñez Santos por su colaboración para la realización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.

Expreso mi agradecimiento a los médicos de los servicios de alergia que colaboraron para la selección de los pacientes.

Dr. Delfino Corona Reyes HUP.

Dr. José Arturo Galindo García HUP.

Dr. David Paz Martínez HUP.

Dr. Luis Morales Lechuga IMSS.

Al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la Universidad Autónoma de Puebla por las facilidades brindadas para la realización de este trabajo.

Un agradecimiento muy especial para toda mi familia y amigos que durante muchos años me han brindado un apoyo invaluable durante los años que he utilizado en el desarrollo de mi carrera.

RESUMEN

El asma es una enfermedad de la parte baja de las vías respiratorias y puede ser desencadenada por diferentes estímulos, entre los cuales se encuentran los agentes infecciosos, siendo los virus los que con mayor frecuencia exacerban el asma, con respecto a las bacterias, *Mycoplasma pneumoniae* ha sido implicado como un posible agente que exacerba el asma. El objetivo del presente trabajo fue relacionar la presencia de micoplasmas aislados del aparato respiratorio superior con la alteración de la respuesta inmune humoral del hospedero durante las exacerbaciones del asma. Se tomó un exudado faríngeo para la búsqueda de micoplasmas y una muestra de sangre para la obtención de suero y determinar las concentraciones de IgM, IgG e IgA, así como la búsqueda de anticuerpos anti-micoplasmas por la técnica de inhibición metabólica y ELISA y para la determinación de aglutininas frías. Se trabajaron un total de 218 pacientes, de los cuales 10 pudieron ser seguidos durante un año. Se identificaron presuntamente 46 cepas de micoplasmas por pruebas bioquímicas y fisiológicas y de estas solo 12 fueron identificadas como *M. fermentans* por PCR. Las concentraciones de IgM estaban incrementadas en los pacientes con cultivo positivo para *M. fermentans* y la IgG estaba incrementada en pacientes asmáticos con y sin *M. fermentans*. Solo se detectaron anticuerpos anti-*M. fermentans* y anti-*M. pneumoniae* en un paciente por la técnica de inhibición metabólica y no fueron detectados anticuerpos anti-*M. pneumoniae* por la técnica de ELISA. En los pacientes con *M. fermentans* se vio que hay una disminución en los títulos de IgM e IgG en la segunda determinación. Las aglutininas frías fueron detectadas en 20 pacientes y 3 de ellos tenían cultivo positivo para *M. fermentans* y en uno de ellos el título estuvo incrementado durante todo el periodo de estudio. Los micoplasmas son microorganismos difíciles de aislar y cultivar, lo que muchas veces ocasiona dificultad para demostrar su presencia en un paciente. *M. pneumoniae* es un patógeno bien definido del aparato respiratorio, se conocen sus mecanismos de patogenicidad, sin embargo para *M. fermentans* no está aún bien definido su papel como patógeno, aunque, se sabe que a nivel de tracto respiratorio de ratas es capaz de producir lesiones en el tejido epitelial parecidas a las causadas por *M. pneumoniae*. Con los resultados obtenidos en el presente trabajo no se puede concluir si los micoplasmas son agentes exacerbantes del asma, aunque tampoco se pueden descartar como tales. Se propone que los micoplasmas pudieran exacerbar el asma debido al daño que causan a las células epiteliales, o bien por mecanismos dependientes e independientes de IgE.

INTRODUCCION

El asma es una enfermedad de la parte baja de las vías respiratorias que se caracteriza por una respuesta aumentada de la tráquea y bronquios a varios estímulos y se manifiesta por un estrechamiento generalizado de las vías aéreas que disminuye en intensidad espontáneamente o con tratamiento (1).

Desde el punto de vista etiológico el asma es una enfermedad heterogénea que ha sido difícil definir en estos términos y se ha clasificado en dos grandes grupos: alérgico e idiosincrásico (1, 2).

Asma alérgico: a este grupo pertenecen los asmáticos cuyos síntomas empeoran con la exposición a ciertos alérgenos. Existen antecedentes alérgicos personales y/o familiares y un incremento en los niveles séricos de Ig E (1, 2).

Asma idiosincrásico o intrínseco: a este grupo pertenecen los asmáticos que tienen antecedentes alérgicos negativos y concentraciones séricas de IgE normales (1, 2).

El asma resulta de interacciones entre células inflamatorias y las células y tejidos propios de las vías aéreas. Posterior a la exposición a un estímulo iniciador, se produce la activación de células cebadas, basófilos y macrófagos; que liberan diversos mediadores de la inflamación y a su vez causan la migración dirigida y la activación de otras células inflamatorias. Estas células producen alteraciones en la integridad epitelial y anomalías en el control nervioso autónomo (fisher) del tono de las vías aéreas, cambios en la función mucociliar y sensibilidad incrementada del músculo liso de las vías aéreas (1,3).

El asma se caracteriza por la hipersensibilidad de las vías aéreas, lo que se manifiesta por una broncoconstricción inducida por cambios físicos, a ciertos agentes químicos o farmacológicos (3).

Los estímulos que incrementan la reactividad de las vías respiratorias e inducen los episodios agudos de asma se pueden agrupar en siete categorías principales: infecciosos, laborales, alérgicos, farmacológicos, ambientales, relacionados con el ejercicio y emocionales (1), los cuales inducen la liberación de histamina por células cebadas y basófilos que interactúan con anticuerpos del tipo IgE a través de un receptor específico, o bien por medio de otros estímulos anafilácticos como el C5a o por estímulos no inmunológicos, los que originan un pico inicial de histamina después de 15 minutos o en un periodo de 3 a 8 h. Aunque la histamina no modula directamente la reacción alérgica, si induce la síntesis de otros mediadores implicados en este proceso (factores quimiotácticos de neutrófilos y eosinófilos, leucotrienos, prostaglandinas, factor activador de plaquetas (4).

Con respecto a los estímulos infecciosos y su relación con la exacerbación de los procedimientos asmáticos, se sabe que los virus son causa importante de la exacerbación del asma, sobre todo en infantes, mientras que con las bacterias, se sabe que algunas pueden estimular directamente la liberación de histamina a partir de células cebadas de amígdalas y pulmón de humanos, así como de basófilos de sangre periférica, también se ha visto que sus productos pueden inducir la liberación de histamina. Dentro de las bacterias que pudieran tener relación con la exacerbación del asma, está *M. pneumoniae*, del cual se han encontrado evidencias serológicas y por cultivo en pacientes asmáticos (5)

MARCO TEORICO

Los miembros del género *Mycoplasma* se encuentran clasificados en la clase *Mollicutes*, orden *Mycoplasmatales*, familia *Mycoplasmataceae* (6).

A los micoplasmas se les considera como los organismos mas pequeños de vida libre, debido a que su tamaño se encuentra comprendido entre 300 - 800 nm lo que les confiere la característica de ser filtrables, se encuentran limitados únicamente por una membrana plasmática y son altamente pleomórficos variando de la forma esférica o de pera a formas filamentosas o helicoidales (7). Son incapaces de sintetizar una peptidoglicana o sus precursores por lo que son resistentes a la penicilina y a sus análogos, pero son sensibles a los antibióticos que actúan a nivel de síntesis de proteínas como son las tetraciclinas y eritromicina, así como a la lisis por choque osmótico, detergentes, alcoholes y anticuerpos específicos más complemento (7,8).

La colonia típica de micoplasma tiene forma de "huevo frito", la cual presenta una zona central densa y una zona periférica delgada y translúcida, las células crecen hacia el interior del medio, la zona periférica presenta crecimiento superficial y no siempre es visible (6). El requerimiento de colesterol es una de las características principales del género *Mycoplasma* y su función es la de mantener la fluidez de la membrana plasmática (7).

Los micoplasmas son exigentes desde el punto de vista nutricional, son difíciles de cultivar y es por ello que a los medios de cultivo se les adiciona suero de caballo o extracto de yema de huevo como fuente de colesterol, extracto o dializado de levadura como fuente de péptidos, glucosa como fuente de carbono y arginina o urea como fuente de nitrógeno. El rango de pH que toleran varia de 5.0 a 6.8 para unos y de 7.2 a 7.8 para otros, dependiendo de sus requerimientos nutricionales, el rango de temperatura es de 30°C y el crecimiento tiene lugar tanto en condiciones aerobias como anaerobias (7).

El genoma de los micoplasmas comprende un DNA circular de doble cadena con un tamaño aproximado de 5×10^8 D y un contenido de guanina mas citocina (G-C) del 23 al 40 %. Su forma de reproducción son por fisión binaria (6).

A la fecha se han descrito mas de 150 especies de micoplasmas, las cuales se han aislado ya sea como comensales o como patógenos en animales (incluyendo insectos), plantas y humanos (9). Actualmente se sabe que los micoplasmas patógenos para el hombre son *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* y posiblemente *Mycoplasma fermentans* (10).

M. hominis está involucrado en algunos casos de enfermedad inflamatoria pélvica, aborto por sepsis, fiebre puerperal y fiebre pos-parto; mientras que *U. urealyticum* se ha asociado a uretritis no gonocócica (8,11).

M. fermentans en años recientes, ha sido relacionado con algunas enfermedades de humanos, sin embargo, su nicho ecológico y su modo de transmisión no se conocen (6). Los primeros aislamientos de *M. fermentans* provenían de pacientes que cursaban con infección del aparato genital (12).

Williams y col. aislaron a partir de muestras de líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide a *M. fermentans* en el 39% de sus casos y también observaron inhibición de la migración de macrófagos en estos pacientes (4, 13).

Lo y col. al estar trabajando con material genético aislado de bazo y de tejido de sarcoma de Kaposi proveniente de dos pacientes con SIDA, lograron transfectar una línea celular de ratón (NIH/3t3) y sugirieron que este agente transformante era un virus no descrito previamente y con características diferentes a las de cualquier otro virus. Posteriormente lo denominaron VLIA (Virus-like infectious agent) es decir , agente infeccioso semejante a un virus (15). En 1989, estos investigadores demostraron que no se trataba de un virus, al hacerlo crecer en medios libres de células utilizando el medio SP4 lo que sugirió que se trataba de un miembro del orden Mycoplasmatales, clase

Mollicute, demostraron que estaba estrechamente relacionado con *M. fermentans* y lo denominaron *M. incognitus* (16).

Mediante estudios que implicaron la comparación serológica, hibridación de ácidos nucleicos, composición de bases de DNA (contenido de G +C), patrones de corte con enzimas de restricción, patrones electroforéticos de proteínas y estudios serológicos de inhibición metabólica se demostró que era *M. fermentans* (17, 18, 19).

Lo y col., desarrollaron iniciadores para secuencias específicas de *M. fermentans* y mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, detectaron secuencias del genoma de este microorganismo en 7 de 10 pacientes con SIDA (15).

Wang y col., describen la técnica para la detección específica de *M. fermentans* empleando la reacción en cadena de la polimerasa (20). Hawkins utilizando los iniciadores descritos por Wang logró detectar secuencias de *M. fermentans* a partir del DNA extraído de la sangre de 6 pacientes HIV positivos (21).

Lo y col. utilizando anticuerpos monoclonales contra *M. fermentans* variedad *incognitus* y técnicas de hibridación lograron detectar a este microorganismo en timo, hígado, bazo, ganglios, linfáticos y/o cerebro de 22 pacientes con SIDA. Además, el estudio ultraestructural con microscopía electrónica reveló la presencia de este microorganismo, tanto dentro como fuera de las células infectadas y al analizar los tejidos afectados observaron desde la ausencia de cambios histopatológicos hasta la necrosis fulminante con o sin respuesta inflamatoria, por lo que estos autores concluyen que *M. fermentans* variedad *incognitus* es un nuevo micoplasma patógeno, con capacidad citocida y citopática (22).

Lo y col. en 1993, reportaron 3 casos de personas clínicamente sanas que murieron a causa de un síndrome de dificultad respiratorias en el adulto, asociado a una infección causada por *M. fermentans* ya que no encontraron otro agente etiológico, este microorganismo fue detectado por inmunohistoquímica y PCR (23).

M. pneumoniae es un patógeno bien definido del aparato respiratorio humano. Este microorganismo es el agente etiológico de la neumonía atípica primaria y en algunos individuos durante el curso de la enfermedad induce la producción de aglutininas frías, las cuales son anticuerpos de tipo IgM dirigidos contra el determinante antigénico I de los eritrocitos (27, 28).

M. pneumoniae se transmite por contacto directo; se puede diseminar más fácilmente por contacto con las secreciones que por inhalación de aerosoles. Una vez que ha llegado a la mucosa respiratoria se adhiere finalmente al epitelio, iniciándose así la colonización que trae como consecuencia ciertos cambios bioquímicos como son la disminución en: ATP, AMPc, utilización de carbohidratos, transporte de aminoácidos, síntesis molecular y metabolismo oxidativo. Todo esto ocasiona pérdida de cilios y cilioestasis debido a los cambios morfológicos y funcionales que sufre la célula hospedero (6, 26, 29, 30).

La falta de una pared celular, facilita la fusión de las adhesinas de membrana del micoplasma con los receptores específicos presentes en la membrana de la célula hospedera, creándose un microambiente en donde se acumulan ciertos productos tóxicos excretados por las bacterias (por ejemplo: H₂O₂ y NH₃) que pueden dañar la membrana de la célula hospedera (6, 26,31).

Durante la infección en el aparato respiratorio causada por *M. pneumoniae*, algunas veces se observa una neumonitis intersticial acompañada de bronquitis descamativa , bronquiolitis e infiltraciones peribronquiales y de células mononucleares. También pueden presentarse aunque en menor grado algunos de los siguientes síntomas: tos, fiebre, dolor de cabeza, malestar general y rinorrea . De todas las enfermedades causadas por *M pneumoniae* aproximadamente una quinta parte son asintomáticas; la mayoría son enfermedades respiratorias leves incluyendo faringitis y traqueobronquitis y sólo una pequeña fracción son casos de neumonía (32). El curso de la enfermedad es largo ya que se ha demostrado que *M. pneumoniae* puede permanecer en el aparato respiratorio durante 6-8 semanas e incluso después de tratamiento con antimicrobianos (24, 33).

Las tasas de infecciones van de un 2% en periodos endémicos y hasta un 35% en brotes epidémicos. Las epidemias por esta bacterias siguen un patrón ciclico, en el que cada 4 a 6 años se ven aumentados los casos de neumonia por *M. pneumoniae* (27,32).

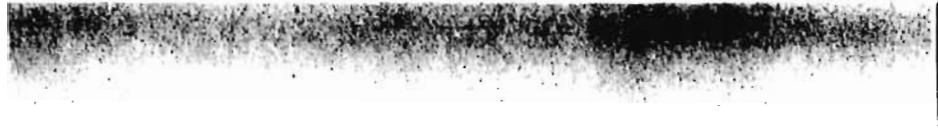
MARCO DE REFERENCIA

Berkovich y col. en 1970, estudiaron 136 niños de 6 meses a 16 años de edad, en el cual relacionaron signos y síntomas de exacerbación del asma. En este estudio, 27 de 84 pacientes presentaron evidencia serológica de infección con *M. pneumoniae* o con virus causantes de infección respiratoria. La alta frecuencia con la que fueron detectados estos agentes hace pensar que éstos fueron los agentes etiológicos directamente relacionados con las exacerbaciones del asma (5).

Huhti y col. en 1974, estudiaron 63 pacientes, todos ellos con obstrucción bronquial reversible con un rango de edad de 15 a 77 años de los cuales 20 eran hombres y 43 eran mujeres, cada uno de los pacientes fue seguido durante el periodo de un año. Estos autores, aunque no dan pruebas concluyentes de la relación causa-efecto sugieren que ciertas infecciones por virus o micoplasma pueden exacerbar el asma bronquial y asocian el 19% de las admisiones hospitalarias a infecciones causadas por virus o por *M. pneumoniae* (34).

Tiperneni y col. en 1980, estudiaron 152 pacientes con asma y otras enfermedades mediadas y no mediadas por IgE, en 5 de estos pacientes detectan títulos elevados de IgE contra *M. pneumoniae* y afirman que la dificultad en el aislamiento del microorganismo, no descarta el hecho de que estos pacientes sean portadores de *M. pneumoniae* (35).

Seggev y col. en 1986, estudiaron 95 pacientes hospitalizados por asma aguda, de las cuales, el 21% tuvieron evidencia de infección por *M. pneumoniae*, la cual fue determinada por la presencia de niveles altos de IgM específicos contra el



FALTA PAGINA

No. 9

microorganismo, sin embargo, no se detectaron en aquellos pacientes no infectados por *M. pneumoniae*, por lo que concluyen que la infección causada por *M. pneumoniae* puede ser significativa en la exacerbación del asma (36).

Elizondo y col. en 1988, evaluaron el papel de *M. pneumoniae* en reactivaciones del asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica, para ello determinaron los niveles de anticuerpos contra *M. pneumoniae* en el suero de las fases aguda y convaleciente de 28 individuos con reactivación del cuadro respiratorio y los compararon con sueros control obtenidos del banco de sangre en el mismo período de estudio y de años anteriores sin encontrar diferencias significativas entre los pacientes y controles del mismo año, sin embargo, la seropositividad en los años previos al estudio es significativamente inferior, por lo que los autores sugieren la presencia de un pico epidémico de infecciones por *M. pneumoniae* en el año del estudio (37)

Gil y col. en 1993, reportaron el 24.7% de aislamientos de *M. pneumoniae* en 77 pacientes asmáticos, en comparación con el 5.8% de aislamientos en 88 testigos. En estos pacientes no se encontraron diferencias significativas en los aislamientos de *M. pneumoniae* con respecto a la edad, sexo, antecedentes heredofamiliares de la enfermedad o con el tiempo de evolución de la misma (38).

Yano y col. en 1994, estudiaron el caso de un paciente de 37 años de edad, el cual ingreso al hospital con síntomas iniciales de asma. El cultivo de exudado faríngeo para *M. pneumoniae* fue negativo, sin embargo, la prueba de fijación de complemento y las aglutininas frías fueron positivas. La infección por micoplasma se diagnosticó por un incremento de 4 veces el título de anticuerpos contra *M. pneumoniae* en el suero de las fases aguda y convalescente. Un año después del inicio de la enfermedad se detectaron anticuerpos IgE específicos para *M. pneumoniae* y al año siguiente utilizando un antígeno específico de *M. pneumoniae* le realizaron una prueba de broncoprovocación y una dermorreacción, las cuales resultaron positivas, lo que demostró una reacción alérgica inmediata a *M. pneumoniae*. Es probable que el paciente llego a ser atópico después de la infección por micoplasmas, ya que estos pueden causar la destrucción de las células de la mucosa respiratoria, facilitando con ello el contacto con alergenos. En

conclusión, los efectos de la infección causada por *M. pneumoniae* son multifactoriales e involucran una interacción compleja de la inflamación de las vías aéreas y una hipersensibilidad mediada por IgE (39).

JUSTIFICACION

En un intento por dilucidar el papel de algunos agentes etiológicos en la exacerbación del asma bronquial, se ha tratado de involucrar a los microorganismos como una de las posibles causas, sin embargo, solo a *M. pneumoniae* se le ha asociado con las exacerbaciones asmáticas, y recientemente se ha empezado a valorar el papel de *M. fermentans* en aparato respiratorio, por lo que es necesario realizar estudios en los que se incluya el aislamiento e identificación de estos microorganismos, así como también la medición de la respuesta inmune del paciente durante las exacerbaciones del asma.

HIPOTESIS

La presencia de micoplasmas influye en la exacerbación del asma bronquial presentándose alteración en la respuesta humoral del paciente.

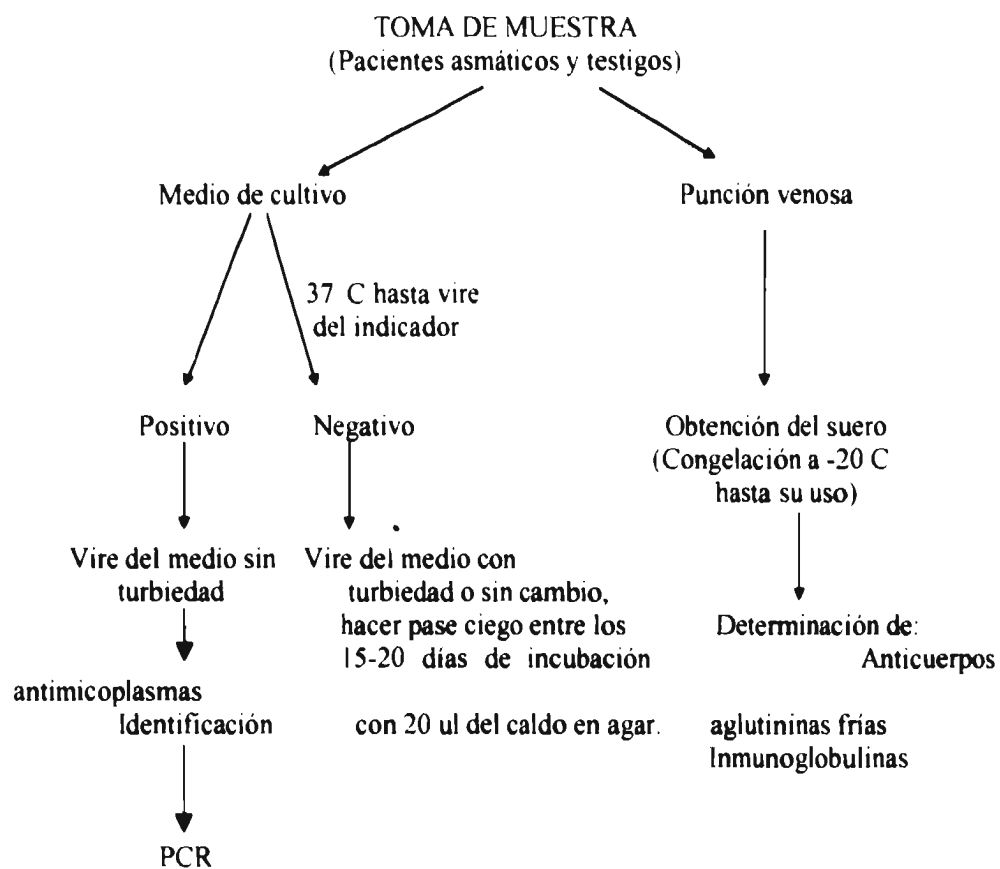
OBJETIVO GENERAL

Relacionar la presencia de micoplasmas aislados del aparato respiratorio superior, con la alteración de la respuesta inmune humoral del hospedero durante las exacerbaciones del asma.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar micoplasmas de pacientes asmáticos.
2. Medir la respuesta de anticuerpos antimicoplasma en cada exacerbación, en aquellos pacientes que acudan regularmente a los servicios de alergia.
3. Medir la concentración de anticuerpos tipo IgG, IgM, e IgA en el suero del paciente.

ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



MATERIAL Y METODOS

PACIENTES: Se les tomó un exudado faríngeo y una muestra de sangre a los pacientes con problemas asmáticos que acudieron al servicio de alergia del Hospital Universitario de Puebla, Urgencias de Pediatría de IMSS San Alejandro y a la Unidad de Alergia "David Paz Martínez". Se incluyeron pacientes de ambos sexos con un rango de edad de 5 meses a 85 años y con diferentes periodos de evolución de la enfermedad y fueron seguidos durante un año aquellos pacientes que acudieron con regularidad a estos servicios. Los pacientes estaban con tratamiento para controlar la enfermedad (antihistaminicos o vacunas contra antígenos a los cuales eran alérgicos).

TESTIGOS: Se incluyeron a personas no asmáticas y sin cuadro clínico de infección respiratoria aguda.

AISLAMIENTO DEL MICROORGANISMO: Cada muestra de exudado faríngeo se depositó en caldo E con azul de metileno y acetato de talio (apéndice II), posteriormente se incubó a 37 C hasta el vire del indicador de rojo a amarillo sin que presentara turbiedad. Para identificar las posibles cepas de micoplasmas se utilizaron las siguientes pruebas: crecimiento en presencia de azul de metileno, fermentación de la glucosa, resistencia al acetato de talio, morfología colonial y hemadsorción de eritrocitos humanos del grupo O. La identificación de especie se realizó por medio de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

TECNICA DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

La técnica de PCR fue realizada utilizando los oligonucleótidos RW04 (GGACTATTGTCTAAACAATTTCCC) y RW05 (GGTTATTCGATTCTAAATCGCCT) que codifican para una región conservada en *M. fermentans* y los oligonucleótidos MP5-1 (GAAGCTTATGGTACAGGTTGG) Y MP5-2 (ATTACCATCCTTGTTGTAAGG) que codifican para la adhesina PI de *M. pneumoniae*. La mezcla de reacción contenía 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl₂, 10 mM de Tris-HCl (pH 8.3), 0.2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato y una unidad de amplitaq polimerasa (Perkin Elmer Cetus, Emerville) en un volumen total de 50 ul. Cinco microlitros de la muestra a ser analizada fue adicionada al final. Un lisado de *M. pneumoniae* y *M. fermentans* que contenía 100 CCU y agua estéril fueron utilizados como controles positivos y negativos respectivamente. Para procesar las muestras se

utilizó un termociclador MJ Research, Watertwon, MA.) para realizar 40 ciclos que incluían un paso de desnaturalización a 95^o C/20 segundos, una alineación del primer a 62^o C/60 segundos y una amplificación a 72^o C/60 segundos. Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% y visualizados con UV después de teñirlos con bromuro de etidio.

DETECCION DE ANTICUERPOS ANTIMICOPLASMA: La detección de anticuerpos antimicoplasma se realizó por medio de la técnica de inhibición metabólica descrita por Velleca (40) y por la técnica de ELISA.

INHIBICION METABOLICA

Procedimiento:

1. Rotular una microplaca estéril de 96 pozos.
2. Depositar 50 y 25 ul de los diferentes sueros problemas en cada uno de los pozos de las hileras 1 y 12 respectivamente.
3. Adicionar 25 ul de caldo glucosa en todos los pozos de las hileras 2-10.
4. Hacer diluciones dobles del suero.
5. Poner 50 ul de la cepa de *M. pneumoniae* o *M. fermentans* que se van a probar en los pozos de las hileras 1-10.
6. Adicionar 100 ul de caldo glucosa.
7. Poner 150 ul de caldo glucosa en la hilera 12 (control del suero).
8. Depositar 175 ul de caldo glucosa en dos pozos (control del diluyente).
9. Hacer diluciones decimales del antígeno y tomar 50 ul de cada dilución mas 125 ul de caldo glucosa (control del antígeno).
10. Sellar los pozos con glicerina líquida estéril.
11. Incubar la placa de microtitulación a 37 C durante 24-48 h.

Interpretación de resultados: El título de anticuerpos se considera como el inverso de la dilución mas alta en la que ya no se manifieste el vire del indicador de rojo a amarillo.

TECNICA DE ELISA PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS ANTIMICOPLASMAS.

Preparación del antígeno.

Se cultivan 250 ml del microorganismo y se centrifugan a 10,000 rpm durante 20 minutos, se resuspende el precipitado en PBS (10 ml) y se vuelve a centrifugar, se repite el procedimiento 3 veces. Se ajusta en un espectrofotómetro la densidad óptica a uno en buffer de carbonatos.

1. Adicionar las placas con 200 ul de antígeno, dejando los pozos de las orillas sin cubrir.
2. Cubrir las placas con su tapa e incubarlas a 37⁰ C en cámara húmeda.
3. Almacenar las placas a 4⁰ C antes de su uso durante cuatro días.
4. Aspirar el antígeno de las placas.
5. Lavar 5 veces con PBS (0.01 M de fosfatos y 0.15 M de NaCl pH 7.2 – 7.4) no adicionar Tween -20. Retirar el exceso de líquido después de cada lavado.
6. Secar las placas.
7. Adicionar 200 ul de BSA al 2% en PBS.
8. Tapar las placas y dejarlas toda la noche a 4⁰ C.
9. Eliminar la BSA, pero no lavar.
10. Adicionar 200 ul de suero por pozo (si se usa suero diluido, diluirlo en BSA 2%/PBS).
11. Adicionar los controles positivos adecuados y BSA 2%/PBS como control negativo.
12. Incubar las placas por 5 h a temperatura ambiente, taparlas con su tapa y cubrirlas con papel aluminio.
13. Eliminar el suero y lavar 5 veces con PBS/Tween (0.05%). Retirar el exceso de líquido después de cada lavado.
14. Adicionar 200 ml del conjugado adecuado. Incubar toda la noche a temperatura ambiente. Cubrir las placas con su tapa y con papel aluminio.
15. Eliminar el conjugado y lavar 5 veces con PBS/Tween (0.05%). Retirar el exceso de líquido después de cada lavado .
16. Adicionar 200 ul del sustrato a cada pozo. Adicionar 200 ul a 8 pozos en una placa no cubierta para utilizarla como blanco.
17. Incubar las placas por 60 minutos a 37⁰ C en una cámara húmeda. Tomar el tiempo tan pronto como se adicione el sustrato.
18. Parar la reacción adicionando 20 ul de NaOH 1N por pozo.
19. Leer las plac a 405 nm.

DETERMINACION DE ANTICUERPOS SERICOS: Los niveles séricos de IgM, IgG e IgA se determinaron por inmunodifusión radial, utilizando anti-inmunoglobulinas comerciales, las determinaciones se realizaron de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Las aglutininas frías se determinaron de acuerdo a la técnica descrita por Velleca (40)(apéndice 1).

INMUNODIFUSION RADIAL (ENDOPLATE)

Para la realización de esta técnica se emplean placas de agarosa con el anticuerpo específico ya incorporado. En cada pozo de la placa se depositan 5 ul de los sueros problema y control, los cuales difunden en forma radial a través del gel formando un anillo de precipitación con el anticuerpo específico. Posteriormente se miden los halos de precipitación hasta el punto en el cual el complejo antígeno-anticuerpo ha alcanzado el punto de equivalencia.

Interpretación de los resultados:

El diámetro del halo de precipitación es proporcional a la concentración del anticuerpo.

AGLUTININAS FRIAS

Procedimiento:

1. Hacer diluciones dobles de los sueros problema y control en solución salina isotónica (0.85 %) de la siguiente forma:

Dilución final

1:8	0.175 ml SSI + 0.025 ml del suero
1:16	0.100 ml SSI + 0.100 ml de 1:8
1:32	0.100 ml SSI + 0.100 ml de 1:16
1:64	0.100 ml SSI + 0.100 ml de 1:32
1:128	0.100 ml SSI + 0.100 ml de 1:64
1:256	0.100 ml SSI + 0.100 ml de 1:128
1:512	0.100 ml SSI + 0.100 ml de 1:256
1:1024	0.100 ml SSI + 0.100 ml de 1:512

2. Adicionar a todos los pozos 0.1 ml de una solución de eritrocitos al 1 %.
3. Colocar las muestras a 4^o C durante 2 h.
4. Se consideran como probables positivas aquellas muestras que presenten en el fondo del tubo un escudo de tipo granular difícil de romper por agitación.
5. Incubar a 37^o C durante 30 minutos.
6. Hacer la lectura considerando como positivas aquellas muestras en las que se observe reversión o ruptura del escudo y como falsas positivas aquellas en las que el escudo permanezca intacto.

Interpretación de resultados:

El título de anticuerpos se considera como el inverso de la dilución mas alta en la que se observe la reversión del escudo.

RESULTADOS

En nuestro estudio participaron 218 pacientes asmáticos, de los cuales 107 fueron hombres y 111 fueron mujeres, cuyas edades comprendieron desde los 5 meses y hasta los 84 años. De éstos, solo 10 pudieron ser seguidos durante un año y a dos de ellos se les aisló *M. fermentans* pero no se les detectaron anticuerpos específicos contra el microorganismo por inhibición metabólica. En cuanto a las concentraciones de inmunoglobulinas, hubo diferencia estadísticamente significativa entre la primera muestra con respecto a la segunda y tercera.

Del total de exudados faríngeos procesados, se identificaron presuntivamente por fermentación de la glucosa, resistencia al acetato de talio y azul de metileno, morfología colonial y hemadsorción 46 cepas de *Mycoplasma sp.* Debido a que no es posible diferenciar a *M. pneumoniae* de *M. fermentans* utilizando pruebas bioquímicas, la identificación definitiva de especie se realiza por PCR (figura 1), también se buscó *M. genitalium*, y *M. salivarium*. De las 46 cepas presuntivas de micoplasmas, sólo 12 de ellas fueron identificadas como *M. fermentans* y ninguna como *M. pneumoniae* (tabla 1).

Las concentraciones de IgM, IgG e IgA de pacientes asmáticos y de testigos se muestran en las gráficas 1, 2 y 3, el análisis de varianza unifactorial realizado mostró que hay diferencias estadísticamente significativas para IgG entre los asmáticos con cultivo positivo y cultivo negativo con respecto a los testigos y para IgM entre los asmáticos con cultivo positivo con respecto a los asmáticos con cultivo negativo y testigos. Para la IgA no se encontró diferencia significativa.

La respuesta inmune humoral de los pacientes asmáticos a los que se les aisló *M. fermentans* se muestran en las gráficas 4, 5 y 6, en las cuales se puede observar que para el paciente 1 hay una disminución en los títulos de IgM e IgG en la segunda y tercera determinación y en la cuarta el título de anticuerpos es igual al inicial, en los pacientes a los que se les realizaron dos determinaciones, también se observa una

disminución en el título de la segunda determinación. Para la IgA no se observaron cambios significativos.

Las características de los pacientes a los que se les aisló *M. fermentans* se muestran en la tabla 2, a un paciente se le detectaron anticuerpos anti-*M. fermentans* (1:2) y anticuerpos anti-*M. pneumoniae* por inhibición metabólica. En éstos pacientes, a 3 de ellos se les detectaron aglutininas frías, en uno de ellos el título estuvo elevado después de 8 meses. Los sueros se probaron por triplicado para cada una de las especies de micoplasmas.

Los anticuerpos de tipo IgM denominados aglutininas frías (tabla 3) se detectaron en 20 de los 218 pacientes que integraron el estudio, de los cuales 3 presentaron cultivo positivo para *M. fermentans*, a 5 se les tomaron 2 o más muestras de sangre, 2 de estos tenían título similar de anticuerpos.

La técnica de ELISA se realizó para detectar anticuerpos anti-*M. pneumoniae* en los sueros de los pacientes, los anticuerpos que se buscaron fueron del tipo IgM e IgG, sin embargo, no fueron detectados anticuerpos específicos contra este microorganismo.

Tabla 1. Aislamiento de *Mycoplasma fermentans* de pacientes asmáticos.

EDAD (años)	Número de Muestras Positivos	
0 - 3	28	3
3 - 10	109	1
11 - 20	22	1
21 - 30	9	1
31 - 40	24	2
41 - 50	8	2
51 - 60	8	2
61	10	0
Total	218	12

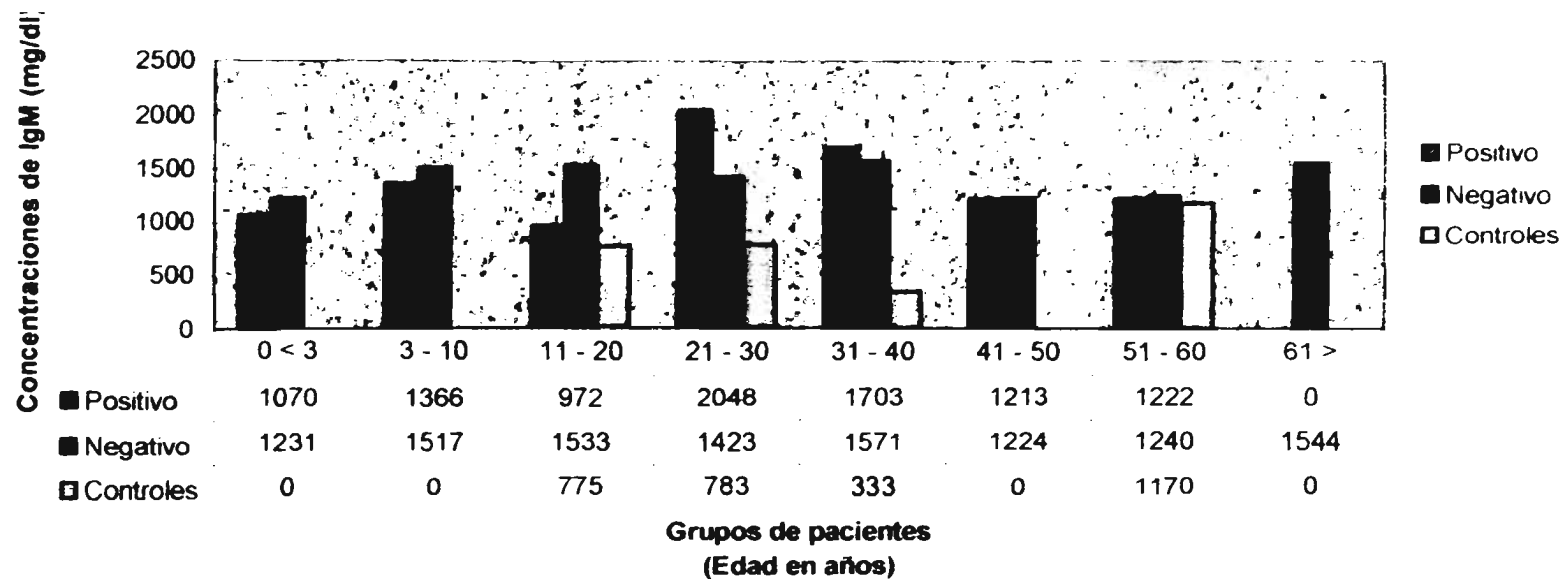
Fuente: Investigación directa CICM.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



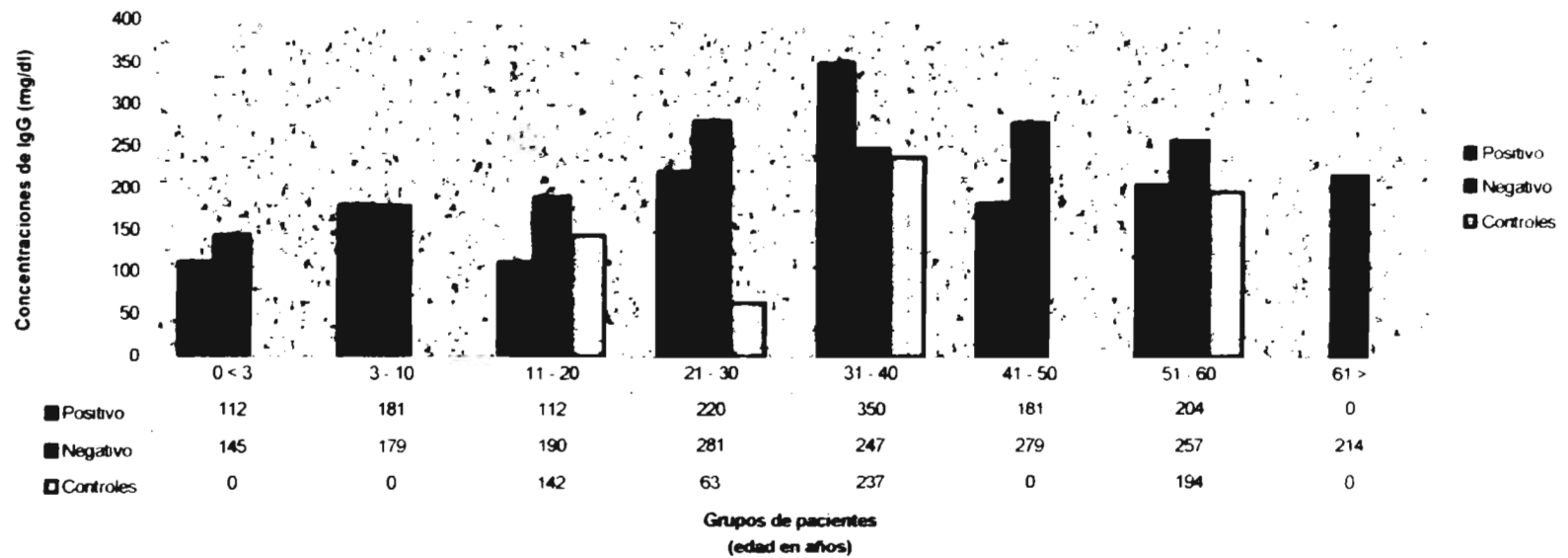
Figura 2. Amplificación para *M. genitalium* utilizando los iniciadores MG1 y MG2 y para *M. hominis* y *M. salivarium* RNAH1 y RNAH2. Línea 1 y 12 marcadores de peso molecular, línea 2 muestra negativa para *M. genitalium*, línea 3 control positivo para *M. genitalium*, línea 4 muestra para *M. pneumoniae*, línea 5 control negativo para *M. hominis*, línea 6 control negativo, línea 7 muestra negativa para *M. hominis* y *M. salivarium*, línea 8 control positivo para *M. hominis*, línea 9 control positivo para *M. salivarium*, línea 10 control negativo para *M. pneumoniae* y línea 11 control negativo.

Gráfica I. Concentraciones de medias IgM por grupo de pacientes asmáticos con y sin *M. fermentans*.



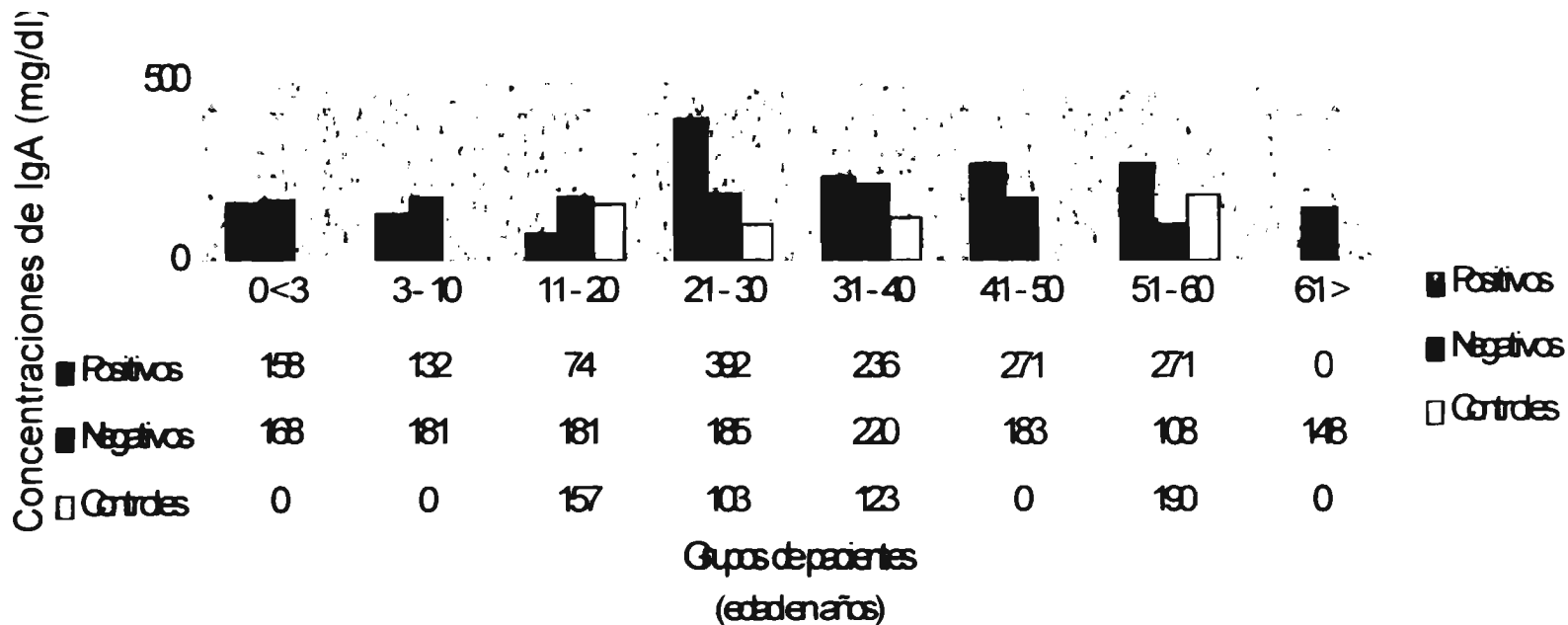
Nota: Los valores graficados son el promedio de las determinaciones individuales en cada grupo de pacientes. Los rangos de edad fueron asignados en los tres primeros grupos de acuerdo a la ocupación del paciente y los otros grupos fueron asignados por décadas.

Gráfica 2. Concentraciones medias de IgG por grupo de pacientes asmáticos con y sin *M. fermentans*



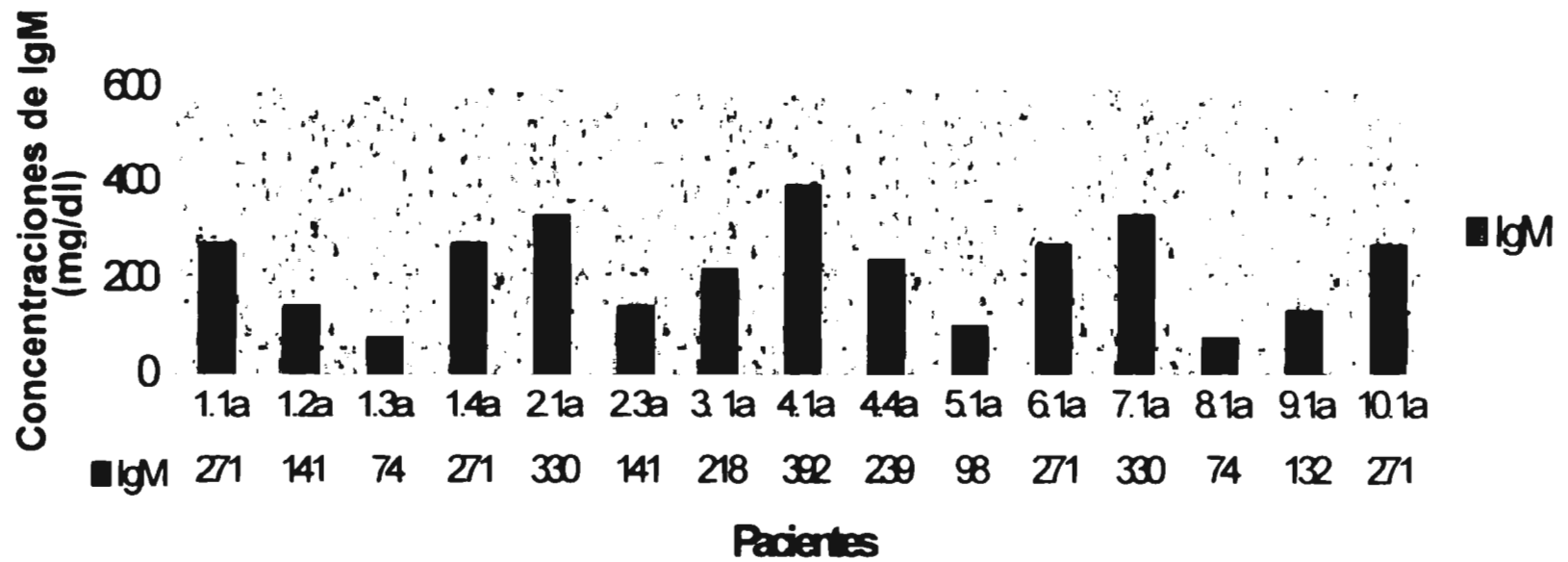
Nota: Los valores graficados son el promedio de las determinaciones individuales en cada grupo de pacientes
 Los rangos de edad fueron asignados en los tres primeros grupos de acuerdo a la ocupación del paciente y los otros grupos fueron asignados por décadas

Gráfica 3. Concentraciones de IgA por grupo de pacientes asmáticos con y sin *M. fermentans*



Nota. Los valores graficados son el promedio de las determinaciones individuales en cada grupo de pacientes.
Los rangos de edad fueron asignados en los tres primeros grupos de acuerdo a la ocupación del paciente y los otros grupos fueron asignados por décadas.

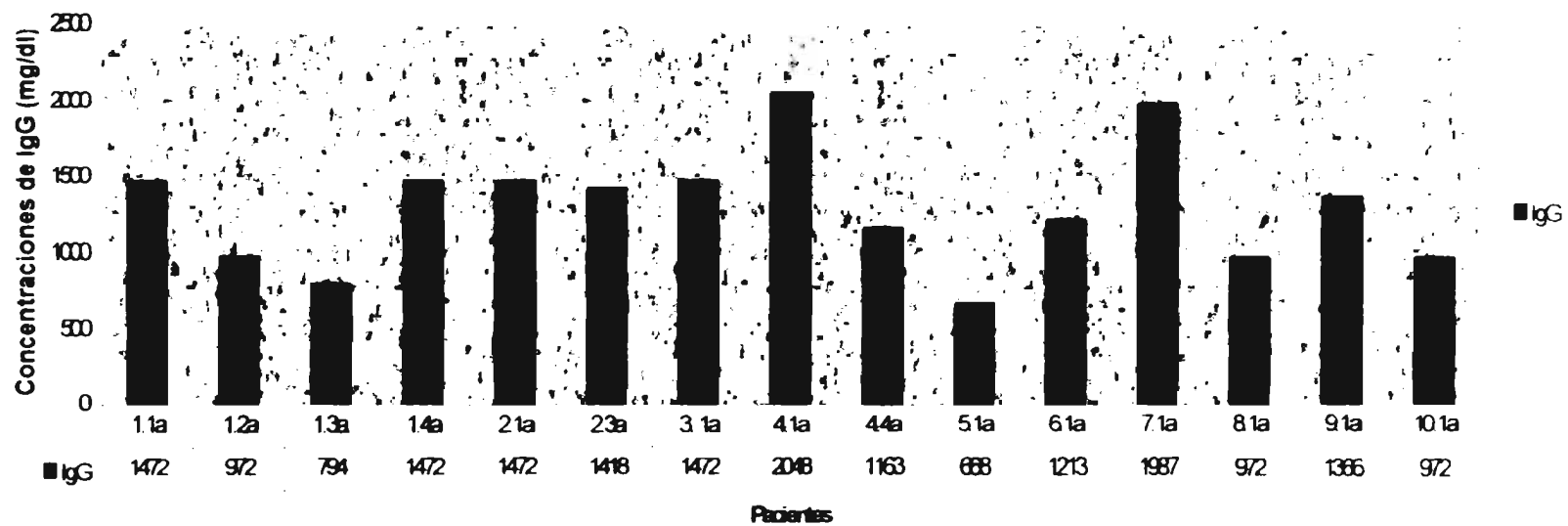
Grafica 4. Concentraciones de IgM en pacientes con *M. fermentans*.



1ª, 2ª, 3ª, 4ª - Veces que asistió el paciente al médico en el periodo del estudio.

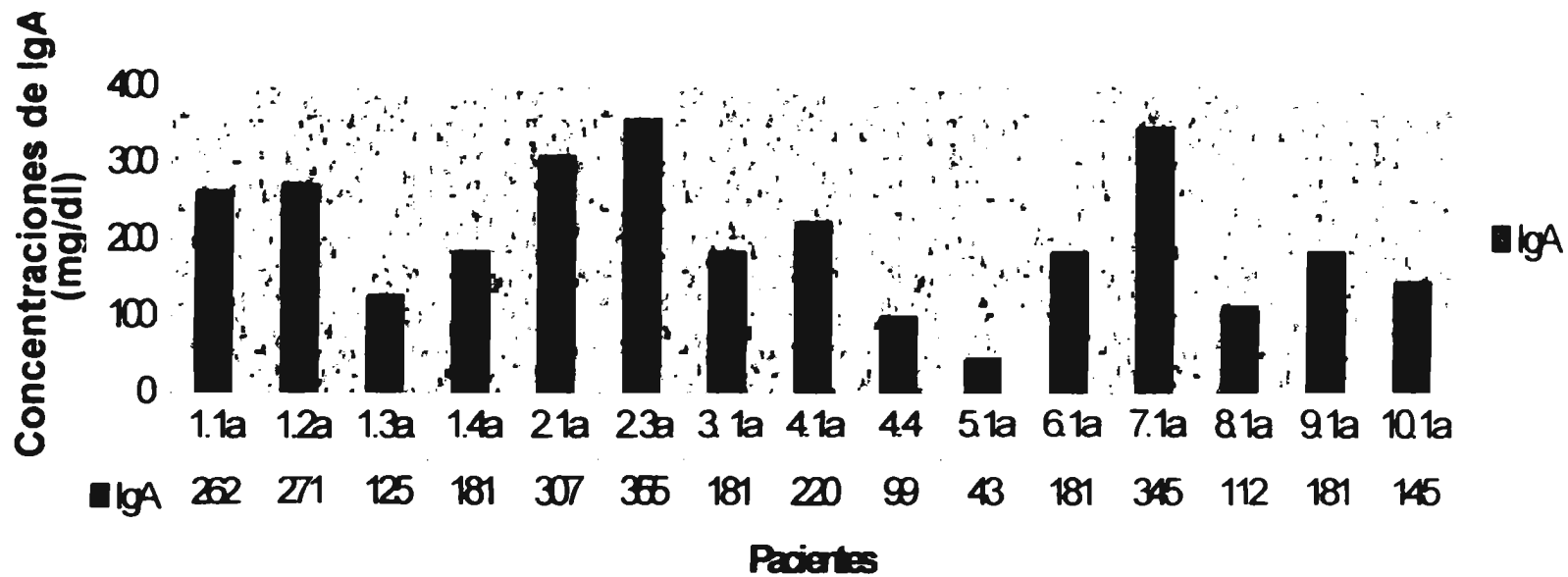


Gráfica 5. Concentraciones de IgG en pacientes asmáticos con *M. fermentans*.



1ª, 2ª, 3ª, 4ª - Veces que asistió el paciente al médico en el periodo del estudio

Grafica 6 Concentraciones de IgA en pacientes asmáticos con *A. fermentans*.



1ª, 2ª, 3ª, 4ª = Veces que asistió el paciente al médico en el periodo del estudio.

Tabla 2. Características de los pacientes con *M. fermentans*.

Paciente	Sexo	Edad (años)	Cultivo	AF	IM
1 1a	F	54	Positivo	Negativa	Negativa
1 2a			Negativo	Negativa	Negativa
1 3a			Negativo	Negativa	Negativa
1 4a			Negativo	Negativa	Negativa
2 1a	F	35	Positivo	Negativa	Negativa
2 3a			Positivo	1 32	Negativa
3 1a	M	2 9/12	Positivo	Negativa	Negativa
4 1a	F	28	Negativo	1 1024	Negativa
4 4a			Positivo	1 1024	Negativa
5 1a	M	2 6/12	Positivo	ND	ND
6 1a	M	7/12	Positivo	Negativa	Negativa
7 1a	F	41	Positivo	Negativa	Positivo*
8 1a	F	37	Positivo	1 32	ND
9 1a	M	45	Positivo	ND	Negativa
10 1a	F	12	Positivo	Negativa	Negativa
11 1a	F	10	Positivo	Negativa	Negativa
12 1a	F	60	Positivo	Negativa	Negativa

AF = aglutininas frías IM = inhibición metabólica ND = no determinado

Positivo*: se detectaron anticuerpos anti-*M. fermentans* (1:2) y anti-*M. pneumoniae* (1:64)

Tabla 3 Titulo de aglutininas frias en pacientes asmaticos con y sin *M. fermentans*

Paciente	1	2	3	4
12	1 256	ND	ND	ND
28	1 256	ND	ND	ND
34	ND	1 128	ND	ND
37	1 64	1 64	ND	ND
40	1 16	ND	1 16	1 8
48	1 256	ND	ND	ND
49	1 64	ND	ND	ND
66	1 512	ND	ND	ND
73	1 1024	ND	ND	ND
78	1 1024	ND	ND	ND
94*	ND	ND	1 32	ND
105	1 32	ND	ND	ND
112*	1 1024	ND	ND	1 1024
142*	1 32	ND	ND	ND
154	1 128	ND	ND	ND
157	1 64	ND	ND	ND
178	ND	1 64	ND	ND
194	1 32	ND	ND	ND
104	1 512	ND	ND	ND
209	1 128	ND	ND	ND

ND = solamente se tomó exudado faringeo

* = positivo para *M. fermentans*

DISCUSION

Aunque la patogénesis del asma bronquial no está aún definida, la hipersensibilidad de las vías aéreas es el riesgo característico de esta enfermedad respiratoria. Estudios recientes sugieren que el asma es un tipo especial de inflamación caracterizado por una eosinofilia en el aparato respiratorio (39).

Las infecciones respiratorias son estímulos que con frecuencia provocan las exacerbaciones agudas del asma en niños pequeños, en los cuales los agentes infecciosos más importantes son el virus sincicial respiratorio y el virus parainfluenza. En niños mayores y adultos predominan el rinovirus y el virus de la gripe. En cuanto a los agentes bacterianos, solo se ha tratado de relacionar la presencia de *M. pneumoniae* y son pocos los estudios que se han realizado para determinar la presencia de este microorganismo. En una serie de 84 niños asmáticos estudiados por Berkovich y col. , 27 tuvieron evidencia serológica de infección por virus y *M. pneumoniae* durante la exacerbación de la enfermedad. Cuatro de los 27 pacientes desarrollaron infección mixta y 3 cursaron con infección por *M. pneumoniae* (5). Huthi y col. encontraron un total de 27 episodios de infecciones por *M. pneumoniae* y virus en 142 hospitalizaciones de 63 pacientes por asma aguda, de éstos 27 episodios, 3 fueron asociados con *M. pneumoniae* y solo 2 en combinación con un virus. El 77% de las infecciones virales y micoplásmicas las asociaron con las exacerbaciones del asma (34). Seggev y col. en 20 de 95 pacientes hospitalizados por asma aguda detectaron títulos elevados de anticuerpos IgM específicos contra *M. pneumoniae* (36). Tipemeri y col. detectaron títulos elevados de IgE contra *M. pneumoniae* en 5 de 152 pacientes con asma y otras enfermedades mediadas y no mediadas por IgE (35). Gil y col. reportaron el 24.7% de aislamientos de *M. pneumoniae* en pacientes asmáticos, en comparación con el 5.7% de aislamientos en testigos (38). Yano y col. encontraron evidencia serológica de infección por *M. pneumoniae* en un paciente que presentaba síntomas iniciales de asma cuando fue hospitalizado y al siguiente año le detectaron anticuerpos IgE específicos para *M. pneumoniae* (39).

Aún no se ha definido el papel de *M. fermentans* ya que son pocos los reportes que existen sobre su aislamiento. En pacientes con infección de aparato genitourinario se aislaron las primeras cepas de *M. fermentans* (12). Y posteriormente Williams y col. lo aislaron a partir de muestras de líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (14) sin embargo, en estudios realizados por Mardh y col. (41), Middleton y col. (42) y Stewart y col. (43) no lograron aislar a *M. fermentans* y esto lo atribuyen a una mala elección de las técnicas utilizadas, además mencionan que los micoplasmas son contaminantes frecuentes de líneas celulares y que los repetidos pases, así como el tiempo de incubación prolongado pueden incrementar el riesgo de contaminación de los cultivos.

Durante algún tiempo *M. fermentans* quedó en el olvido y fue hasta 1985 cuando Lo y col. tuvieron interés en este microorganismo, sin embargo, la mayoría de estos trabajos se han realizado en pacientes con SIDA (15,44) y existen pocos estudios en los que *M. fermentans* está involucrado en otro tipo de padecimiento, en un estudio realizado por Lo y col. asocian a este microorganismo con un síndrome de dificultad respiratoria en el adulto en personas clínicamente sanas sin presentar algún factor de riesgo para adquirir el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (23). Por otra parte, En el Departamento de Microbiología de la Universidad de Alabama en Birmingham, la Dra. Cassell y col. han aislado a *M. fermentans* de niños con neumonía (45).

En contraste a los estudios que revelan la presencia de infección por *M. pneumoniae* durante las exacerbaciones del asma, en este trabajo no se encontró tal asociación, ya que únicamente se aisló en un 5.5% a *M. fermentans*, estos hallazgos son difíciles de interpretar debido a que no se conoce la prevalencia de este microorganismo en población clínicamente sana y son pocos los trabajos en los que se reporta el aislamiento de este microorganismo de aparato respiratorio; el hecho de que *M. pneumoniae* no se haya aislado puede admitir varias posibilidades:

1. Que el microorganismo no participe como agente desencadenante de estas exacerbaciones, que no esté presente en forma infectiva persistente o bien que los medios de cultivo utilizados fueron inapropiados (34).

2. Únicamente se detectaron anticuerpos anti- *M. fermentans* y anti-*M. pneumoniae* en un paciente, posiblemente porque la cepa de referencia utilizada en la inhibición metabólica no fue la apropiada, ya que a la fecha se ha reportado que existen 4 serotipos para *M. fermentans* y dos para *M. pneumoniae* del microorganismo. Otra razón puede ser el hecho de que los micoplasmas se caracterizan por ser pobres inmunógenos, agentes inmunosupresores y con capacidad de desviar la respuesta inmune del hospedero a antígenos no relacionados y posiblemente a otros agentes infecciosos (48). En el caso de *M. fermentans* se ha reportado que es un agente inmunosupresor, debido a que en infecciones experimentales en monos no se ha logrado detectar la presencia de anticuerpos específicos contra el microorganismo (46).

A pesar del gran número de antígenos presentes en nuestro medio ambiente, el sistema inmune es capaz de producir anticuerpos específicos para cada antígeno (47). En el caso de las enfermedades causadas por micoplasmas, se ha observado que estos microorganismos pueden sobrevivir en el hospedero a pesar de una respuesta humoral vigorosa e incluso después de tratamiento con antimicrobianos (24, 33, 48).

Por medio de estudios *in vitro* se ha demostrado que *M. pneumoniae* puede activar células B para producir anticuerpos específicos a antígenos no relacionados. Esta actividad también ocurre *in vivo* durante la enfermedad causada por *M. pneumoniae* debido a que existe una respuesta de anticuerpos contra sarampión, varicela, rubéola, o contra el virus de las paperas (30, 48).

El papel de los anticuerpos específicos para micoplasmas puede ser el de controlar el desarrollo de estos organismos sobre las mucosas, ya que Hu y col. han demostrado que estos anticuerpos pueden prevenir la adherencia de *M. pneumoniae* al epitelio respiratorio (47).

Por lo anteriormente expuesto y considerando que en los pacientes atópicos la respuesta por IgG e IgM está alterada (37), es importante detectar si existen anticuerpos específicos

contra micoplasmas. Uno de los métodos utilizados es la inhibición metabólica, que es esencialmente una técnica de inhibición del crecimiento en medio líquido. La actividad metabólica de los micoplasmas se manifiesta por la producción de ácido a partir de la fermentación de la glucosa provocando un vire en el pH del medio de cultivo. Los anticuerpos antimicoplasmas inhiben la capacidad de estos para metabolizar la glucosa y por lo tanto, la producción de ácido (9, 27, 49 50).

Dado que la inhibición metabólica es una técnica sensible y específica, correlaciona bien con los resultados obtenidos mediante el uso de otros procedimientos serológicos, utilizados para medir la respuesta inmune inducida por micoplasmas, como puede ser ELISA, que se caracteriza por ser altamente sensible y específica (9), sin embargo, es difícil evaluar el título obtenido de una sola muestra, pues únicamente el aumento de 4 veces o mas en el título de anticuerpos en sueros pareados correlaciona positivamente con la enfermedad, mientras que un título igual nos indica un contacto con el agente (9). Estos criterios también son válidos para la determinación de aglutininas frías, uno de los primeros parámetros patológicos que cambian durante la fase aguda de enfermedades causadas por *M. pneumoniae* (25). A pesar de que existen estudios que demuestran que títulos mas altos y con mayor frecuencia se observan en infección por *M. pneumoniae* que en neumonías por adenovirus estas no son específicas, ya que también pueden detectarse en otras infecciones respiratorias como pueden ser aquellas causadas por el virus sincicial respiratorio, virus de la influenza, virus de las paperas, así como también en enfermedades colágeno-vasculares y mielomas (25).

En pacientes con infección primaria, la IgM puede ser detectada después del séptimo día de iniciados los síntomas y llega a un máximo en 2 ó 3 semanas y en pacientes con reinfección no se detecta. El uso de sueros pareados para demostrar la infección por *M. pneumoniae* es de gran utilidad, ya que un incremento de 4 veces o mas en el título de IgG indica un proceso infeccioso agudo. Las determinaciones de IgA pueden ser utilizadas para el diagnóstico de infección por *M. pneumoniae* primaria y en reinfecciones (51).

La adhesión es un evento íntimo que ocurre entre el micoplasma y las células epiteliales del hospedero, lo que presupone que los micoplasmas son parásitos de membrana. Las células epiteliales son activadas en pacientes asmáticos por un incremento en los marcadores de superficie semejantes a ICAM-1 y HLA-DR, así como en la liberación de mediadores proinflamatorios como la endotelina 1, que influye en el calibre de las vías aéreas y se ha mostrado su expresión en pacientes asmáticos, (pero no en controles) sin embargo las células epiteliales no parecen presentar un incremento en la proliferación, pero si hay un aumento en la producción de c-fos, el cual regula la transcripción de muchos genes que juegan un papel crítico en la diferenciación celular, las células inicialmente dañadas son hábiles para iniciar la reparación del epitelio produciendo factores quimiotácticos y moléculas de adhesión semejantes a la fibronectina. Las células epiteliales pueden ser activadas por diferentes mecanismos, se ha observado que estas en pacientes asmáticos llevan el CD23 o Fc_ε RII y pueden ser activadas directamente por anti-IgE y es posible que también por alérgenos (52).

La fase aguda de la infección por *M. pneumoniae* se caracteriza por un incremento de leucocitos polimorfonucleares no específicos en el lumen bronqueoalveolar, este reclutamiento correlaciona con un incremento de IL-6, TNF α e IFN γ (55), los cuales son mediadores de la inflamación, además se ha visto que en las áreas inflamadas del tejido respiratorio los complejos entre los oligosacáridos de la membrana del hospedero y la membrana rica en lípidos de los micoplasmas, pueden servir para disparar una autoinmunización y la predominancia de anticuerpos anti-I, preferentemente que anti-II. Después de la infección puede reflejar una gran abundancia de receptores de carbohidratos ramificados tipo I sobre la superficie de la célula del hospedero, con lo cual los micoplasmas forman complejos inmunes. Las secuencias reconocidas por *M. pneumoniae* de sialil-N-acetil-lactosamina están presentes en las células ciliadas bronquiales a lo largo del cilio y microvelocidades, además de encontrarse en eritrocitos y células inflamatorias incluyendo linfocitos, monocitos y granulocitos. La interacción con linfocitos B y T tiene diferentes efectos, sobre linfocitos T dispara una respuesta mitogénica, mientras que en linfocitos B hay síntesis de IgM sin mitogenesis, esto parece ser influido por las secuencias sialil-II presente en los linfocitos B, en los cuales se encuentra una familia de glicoproteínas

de elevado peso molecular conocidas como T200(CD45) y en linfocitos T las secuencias sialil se encuentran en una sialoglicoproteína (CD43). Se sugiere que el agente infeccioso o sus adhesinas sirven no solamente como acarreadores y adjuvantes para los carbohidratos, sino también como mediadores de la interacción entre células B y T, así como en células accesorias a través de oligosacáridos y favorecer la respuesta de anticuerpos, aunque también se ha observado que puede presentarse inmunosupresión (53).

¿Como los micoplasmas pudieran exacerbar el asma?

Los micoplasmas (*M. pneumoniae* y *M. fermentans*) tienen como blanco las células epiteliales del aparato respiratorio, se sabe que estas células al ser dañadas liberan diversas sustancias, entre ellas unos péptidos llamados endotelinas 1, 2 y 3, de los cuales se sabe que la endotelina 1 es un potente inductor de la liberación de histamina (54), por lo que suponemos que el daño a la célula epiteliales pudiera ser un mecanismo de exacerbación del asma (figura 3).

Otro mecanismo podría ser a través de IgE, ya que se ha reportado la presencia de estos anticuerpos en pacientes asmáticos, se sabe que el enlace de estos anticuerpos con el antígeno específico, inducen la liberación de mediadores de la célula cebada (figura 4). Los micoplasmas también pueden interaccionar directamente con las células a través de sialoglicoproteínas, por lo que una interacción directa con la célula cebada induciría la liberación de mediadores (figura 4). La interacción de los micoplasmas con las células cebadas a través de mecanismos dependientes e independientes de IgE, también puede llevar a la secreción de IL-4, la cual interviene en la producción de IgE y además, se ha demostrado que las células cebadas presentan antígenos a los linfocitos B (figura 4).

Figura 3 Interacción de los micoplasmas con las células epiteliales como posible mecanismo de exacerbación del asma

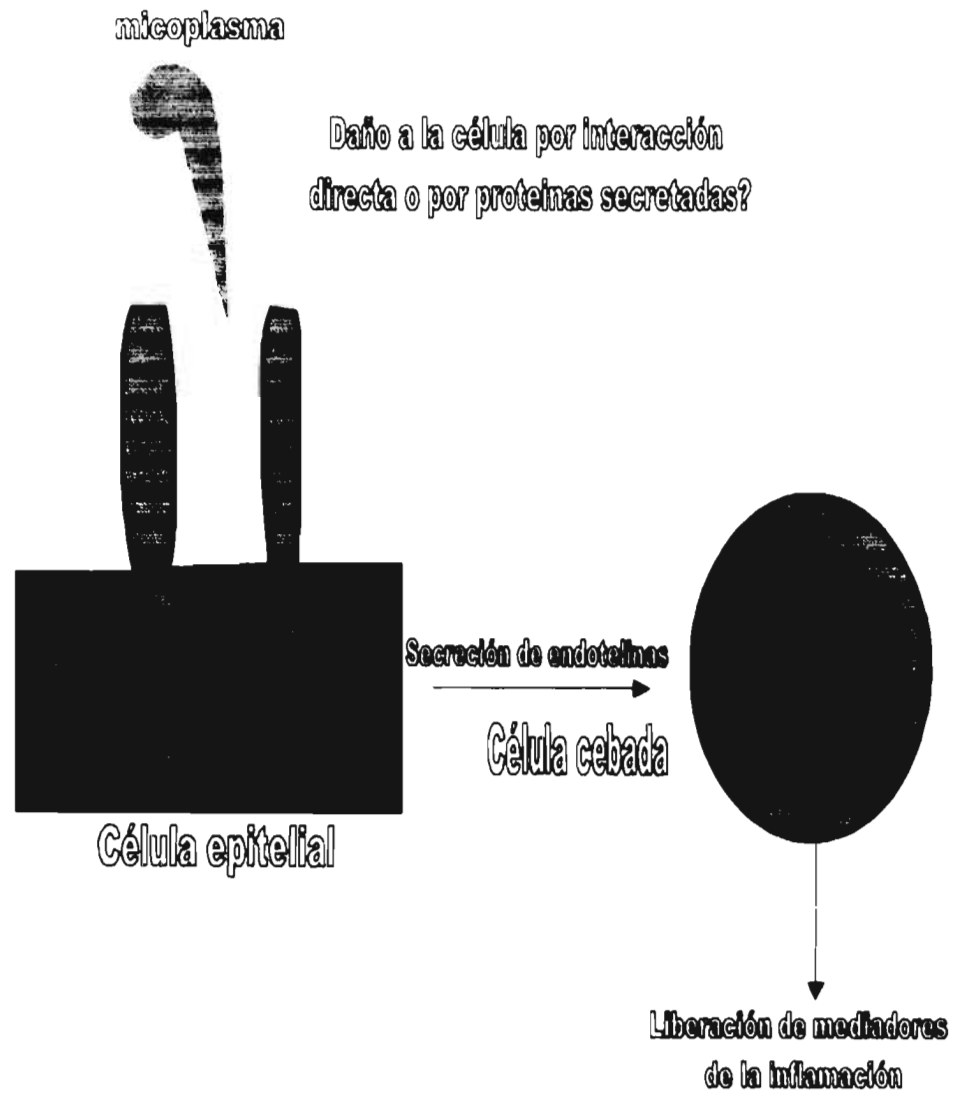
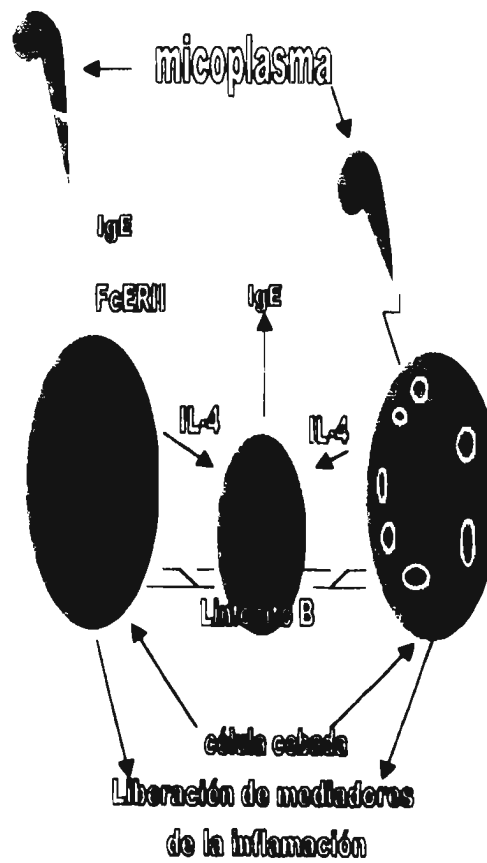


Figura 4 Probable mecanismo dependientes e independientes de IgE del asma bronquial inducidos por micoplasmas



CONCLUSION

Los niveles séricos de IgM se encontraron elevados en los pacientes con cultivo positivo para *M. fermentans* , sólo en uno de éstos pacientes se detectaron anticuerpos anti-*M. fermentans* , por lo que con los resultados obtenidos es difícil concluir si los micoplasmas participan en la exacerbación del asma bronquial, sin embargo no se descarta que los micoplasmas exacerben el asma bronquial, debido a que los mecanismos de patogenicidad de estos microorganismos son muy similares a los observados en la exacerbación del asma, por lo que se propone que los micoplasmas pudieran exacerbar el asma por una interacción directa con las células epiteliales, o bien a través de mecanismos dependientes e independientes de IgE.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

APENDICE I

AGAR E

Agar exento de inhibidores	1.3 g
Caldo para micoplasmas	1.3 g
Rojo de fenol	0.5 ml

Disolver en 65 ml de agua desionizada y llevar a ebullición durante un minuto.
Ajustar el pH a 7.8 con NaOH 1N.
Esterilizar a 15 lb/15 minutos.

Dejar enfriar y adicionar:

Suero de caballo	25 ml
Dializado de levadura	10ml
Glucosa	2.5 ml
Penicilina	0.06 g

Vertir en cajas de Petri estériles y almacenar a 2^o C.

CALDO E

Caldo micoplasmas	5 g
Rojo de fenol	0.5 ml
Azul de metileno	0.025 ml
Acetato de talio	0.5 ml

Disolver en 162.5 ml de agua desionizada .
Ajustar el pH a 7.8 con NaOH 1N.
Esterilizar 15/15 minutos.

Dejar enfriar y adicionar:

Glucosa	2.5 ml
Extracto de yema de huevo	25 ml
Extracto de levadura	8.75 ml
Penicilina	0.12 g

Verter en tubos estériles alicuotas de 1 ml y almacenar a 2^o C.

DIALIZADO DE LEVADURA

Levadura seca activa	120 g
Agua destilada	260 ml

Mezclar y esterilizar a 10 lb/10 minutos.

Verter en bolsas de diálisis.

Adicionar agua destilada y dejar a 2^o C durante 48 h.

El dializado obtenido se esteriliza a 15 lb/15 minutos.

Almacenar en alicuotas de 10 ml a 2^o C.

EXTRACTO DE YEMA DE HUEVO

Yema de huevo estéril 20 ml

Regulador de fosfatos estéril pH 7.2 0.015M 80 ml

Mezclar y verter en botellas estériles.

Centrifugar a 12,000 rpm/40 minutos a 2^o C.

Adicionar al sobrenadante 0.06 g de penicilina.

Verter en tubos estériles alicuotas de 25 ml y almacenar a 2^o C.

BIBLIOGRAFIA

1. McFaden, F. R. 1991. Asma. En: Petersdorf, R. G., Adams, R. D., Braunwald, E., Isselbacher, K. J., Martin, J. B. & Wilson, J. D. eds. Harrison Principios de medicina interna. 12 ed. Interamericana McGraw-hill. p.1212-1218.
2. Fauci, A. S. 1989. Asma y neumonitis por hipersensibilidad. En: Braunwald, E., Isselbacher, K.J., Petersdorf, R.G. Wilson, J.D., Martin, J.B. & Fauci, A.S. eds. Manual Harrison. Principios de medicina interna. 11 ed. Interamericana McGraw-Hill. p. 269-272.
3. Sheff, A.L. 1991. Asthma. Definition and diagnosis. J Clin Immunol. 83(3):427-436.
4. Delneste, Y., Lassalle, P., Jeannin, P., Joseph, M. Tonnel, B. & Gasset P. 1994. Histamine induce IL-6 production by human endotelial cells. Clin Exp Immunol. 98:344-349.
5. Berkovich, S., Millan, S. J. & Snyder, R. D. 1970. The association of viral and mycoplasmal infections with recurrence of weezing in the asthmatic child. Annals of Allergy. 28(2):43-49.
6. Razin, S. & Freundt, A. F. 1984. The mycoplasma . En: Krieg, R. N. & Hoit,, G. J. Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams & Wilkins Co. Baltimore London. 1:740-747.
7. Cedillo, R. M. L. 1986. Complicaciones extrapulmonares producidas por *Mycoplasma pneumoniae* . Revisión predoctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN. p. 1-12.
8. Lo, S.C., Dawson, M. S., Wong, D.M., Newton, P. B. Sonoda, M.A., Engler, W. F., Wang, R. Y.H., Shih, J.W.K., Alter, H. J. & Wear, D. J. 1989. Identification of *Mycoplasma incognitus* infection in patients with AIDS: an immunohistochemical, in situ hibridization and ultrastructural study. Am J Trop Med Hyg. 41(5):601-616.
9. Tully, J.G., Shih, J.W.K., Wang, R.H., Rose, D.L. & Lo, S.C. 1993. Titers of antibody to Mycoplasma in sera of patients infected with human deficiency virus. Clin Infect Dis. 17(suppl):254-258.
10. Stadlander, C.T., Watson H.L., Simecka, J.K. & Cassell H.G. 1993. Citopatogenicity of *Mycoplasma fermentans* (including incognitus strain). . Clin Infect Dis. 17(suppl 1):289-301.
11. Taylor R. 1985. Mycoplasmal and mixed infections of the human male urogenital tract and their possible complications. In Razin, S. & Barile, M.F. eds. The mycoplasmas. New York Academic Press. S4S:28-47.
12. Moller, B. R., Freundt, E. A., Black, F. T. & Melsen, F. 1980. Experimental infections of the upper genital tract female grivet monkeys with *Mycoplasma fermentans* . J Med Microbiol 13:145-149.
13. Brostoff, J., Freedman, A. & Roit, I. M. 1973. Leukocyte migration inhibition to *Mycoplasma fermentans* in patients with rheumatoid arthritis. Int Arch Allergy. 45:690-696.
14. Williams , M.H., Brostoff, J. & Roitt, I. M. 1970. Possible role of *Mycoplasma fermentans* in rheumatoid arthritis. Lancet. 11:277-280.
15. Lo, S.C., Shih, J. W.K., Yang, N. Y., Ou, C. Y. & Wang, R. Y. H. 1989. A novel virus like infectious agent in patients with AIDS. Am J Trop Med Hyg. 40(2):213-226-

16. Lo, S.C., Shih, J. W.K., Newton, P.B., Wong, D.N., Hayes, M.M., Benish, J.R., Wear, D. J. & Wang, R. Y. H. 1989. Virus-like infectious agent (VLIA) is a novel pathogenic mycoplasma: *Mycoplasma incognitus*. Am J Trop Med Hyg. 41(5):586-600.
17. Saillard, P., Carle, P., Bove, J.M., Bébéar, C., Lo, S.C., Shih, J.W.K., Wang, R., Rose, D.L. & Tully, J.G. 1990. Genetic and serologic relatedness between *Mycoplasma fermentans* strains and a mycoplasma recently identified in tissues of AIDS patients. Res Virol. 141:17-27.
18. Sasaki, S.J., Sasaki, Y., Kita, M., Suski, K., Watanabe, H. & Honda M. 1992. Evidence that Lo's Mycoplasma (*Mycoplasma fermentans incognitus*) is not a unique strain among *Mycoplasma fermentans* strains. J Clin Microbiol. 30:2435-2440.
19. Stadtlander, C.T., Zuhua, C. Watson H.L. & Cassell H.G. 1991. Protein and antigen heterogeneity among strains of *Mycoplasma fermentans*. Infect Immunol. 59(9):3319-3322.
20. Wang, R., Hu, W.S., Dawson, M.S., Shih, J.W-K. & Lo, S-C. 1992. Selective detection of *Mycoplasma fermentans* by polymerase chain reaction and by using a nucleotide sequence within the insertion sequence-like element. J Clin Microbiol. S30S(1):245-248.
21. Hawkins, R. E., Rickman, L.S. Vermund, S.H. & Carl, M. 1992. Association of mycoplasma and human immunodeficiency virus infection: Detection of amplified *Mycoplasma fermentans* DNA in blood. J Infect Dis. 65:581-585.
22. Lo, S-C. et al. 1989. Identification of *Mycoplasma incognitus* infection in patients with AIDS: an immunohistochemical, in situ hybridization and ultrastructural study. Am J Trop Med. S41S(5):601-616.
23. Lo, S. C., Wear, D. J., Green, S. L., Jones, P.G. & Legier, J. F. 1993. Adult respiratory distress syndrome with or without systemic disease associated with infections due to *Mycoplasma fermentans*. Clin Infect Dis. 17(suppl 1):259-263.
24. de Barbeyrac, B., Bernet, C., Febrer, F., Renaudin, H., Dupon, M. / Bébéar, C. 1993. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium* in clinical samples by polymerase chain reaction. Clin Infect Dis. 17(suppl 1):83-89.
25. Jacobs, E. 1993. Serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections: a critical review of current procedures. Clin Infect Dis. 17(suppl 1):79-82.
26. Razin, S. & Jacobs, E. 1992. Mycoplasma adhesion. J Clin Microbiol. 138:407-422.
27. Barile, M. F., Grabowsky, M. W., Kapatala-Zoumbos, K., Brown, B., Hu, P. C. & Chandler, D. K. F. 1994. Protection of immunized and previously infected chimpanzees challenged with *M. pneumoniae*. Vaccine 12(8):707-711 14
28. Felzi, T. 1993. Carbohydrates and the pathogenesis of *Mycoplasma pneumoniae* infection and AIDS- some observations and speculations. Clin Infect Dis. 17(suppl 1):63-65.
29. Foy, H. M. 1993. Infections caused by *Mycoplasma pneumoniae* and possible carrier state in different populations of patients. Clin Infect Dis. 17(suppl 1):37-46.
30. Ruuth, E. & Praz, F. 1989. Interactions between mycoplasmas and the immune system. Immunol Rev. 112:133-160.
31. Pollack, J. D., Jones, M. A. & Williams, M. V. 1993. The metabolism of AIDS-associated mycoplasmas. Clin Infect Dis. 17(suppl 1):267-271.
32. Clyde, W. A. 1993. Clinical overview of typical *Mycoplasma pneumoniae* infections. Clin Infect Dis. 17(suppl 1):32-36.
33. McCormack, W. M. 1993. Susceptibility of mycoplasmas to antimicrobial agents: clinical implications. Clin Infect Dis. 17(suppl 1):200-201.

34. Huthi, F., Moka, T., Nikoskelainen, J. & Halonen, P. 1974. Association of viral and mycoplasma infections with exacerbations of asthma. *Annals of Allergy*. 33:145-149.
35. Tiperneni, P., Moore, S.B., Hayde, S.J. & Schaud, V. 1980. IgE antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* in asthma and others atopic diseases. *Annals of Allergy*. 45:1-7.
36. Seggev, S.J., Lis, T., Siman-Tov, R., Abu-samara, H., Schey, G. & Naot, Y. 1986. *Mycoplasma pneumoniae* is a frequent cause of exacerbation of bronchial asthma in adults. *Annals of Allergy*. 57:263-265.
37. Elizondo, J. A., Jacobs, E., Bolaños, Y., Sánchez, O. E. & Sánchez, I. M. 1988. El papel de *Mycoplasma pneumoniae* en la exacerbación del asma bronquial y enfermedad pulmonar obstructiva crónica del adulto. *Rev Cos Cs Med*. 9(2):165-171.
38. Gil, J.C., Cedillo, R.M.L., Mayagoitia, B. G. & Paz M. D. 1993. Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from asthmatic patients. *Annals of Allergy*. 70(1):23-25.
39. Yano, T., Ichikawa, Y., Komatu, S., Arai, S. & Oizumi, K. 1994. Association of *Mycoplasma pneumoniae* antigen with initial onset of bronchial asthma. *Amer J Resp Crit Care Med*. 149:1348-1353.
40. Vellecca, M.W., Bird, R.B. & Forrester, T. F. 1980. Laboratory diagnosis of mycoplasma infections. U.S. Department of Health and human services. Center for Diseases Control. Atlanta, Ga. USA. P 1-37.
41. Mardh, P. A., Nilsson, F. J. & Bjelle, A. 1973. Mycoplasmas and bacteria in synovial fluid from patients with arthritis. *Ann Rheum Dis*. 32:319-325.
42. Middleton, P. J. & Highton, T. C. 1975. Failure to show mycoplasmas and cytopathogenic virus in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 34:369-372.
43. Stewart, S.M., Duthie, J.J., Mackay, J.M., Marmion, P. & Alexander, W.R.M. 1974. Mycoplasma and rheumatoid arthritis. *Anna Rheum Dis*. 33:346-362.
44. Lo, S. C., 1986. Isolation and identification of a novel virus from patients with AIDS. *Am J Trop Med Hyg*. 35(4):675-676.
45. Cassell, G., Yañez, A., Duffy, L.B., Moyer, J., Cedillo, L., Hammerschlag, M.R. & Rank, R.G. 1993. Detection of *Mycoplasma fermentans* in the respiratory tract of children with pneumonia. Abstracts. 33rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Pag. 372.
46. Lo, S.C., Douglas, J., James, W.K., Wang, R., Newton III, B. P. & Rodriguez, F, J. 1993. Fatal systemic infections of nonhuman primates by *Mycoplasma fermentans* (Incognitus strain). *Clin Infect Dis*. 17(suppl 1):s283-288.
47. Gelfand, F. W. 1993. Unique susceptibility of patients with antibody deficiency to *Mycoplasma* infection. *Clin Infect Dis*. 17(suppl 1):250-253.
48. Simecka, J.K., Ross, S.E., Cassell, H.G. & Davis, J.K. 1993. Interactions of Mycoplasmas with B cells: Antibody production and nonspecific effects. *Clin Infect Dis*. 17(suppl 1):176-182.
49. Kenny, G. E. 1979. Antigenic determinants. En: Barile, M., Razin, S. eds. *The mycoplasmas I*. New York Academic Press. p. 351-381.
50. Taylor R.D. 1983. Metabolism inhibition test. In Barile, M.F. & Razin, S. Eds. *Methods in mycoplasmatology*. New York Academic Press. 1:411-418.
51. Tjhie, T.H.J., vonKuppueled, M.J.F., et al. 1994. Direct PCR enables detection of *Mycoplasma pneumoniae* in patient with respiratory tract infections. *J Clin Microbiol*. 32(1):11-16.

52. Bousquet, J., Chavez, P., Campbell, A.M., Vignola, A.M. & Codard, P. 1995. Cellular inflammation in asthma. 25suppl 2:39-42.
53. Felzi, T. & Loveless, W. 1996. Carbohydrate recognition by *Mycoplasma pneumoniae* and pathologic. Am J Resp Crit Care Med. 154:S133-136.
54. Yamamura, H., Nabe, T., Kohno, S. & Ohata, K. 1995. Histamine release by endothelin I distinct from that by antigen in mouse bone marrow derived mast cell. Eur J Pharmacol. 288:269-275.
55. Pretsch, K., Ehlers, S. & Jacobs, E. 1994. Cytokine gene expression in the lungs of BALB/C mice during primary and secondary infection with *Mycoplasma pneumoniae*. Microbiology. 140:2043-2048.