



11680 2ej.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIO SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES
INMUNOMODULADORAS DE LOS *Micoplasmas*.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS
(AREA: MICROBIOLOGIA)**

**P R E S E N T A :
ANDRES ROMERO ROJAS**

DIRECTORES:

**DR. JOHN W. HADDEN
DR. SERGIO ESTRADA PARRA
DR. JUAN A. MONTARAZ CRESPO**

ASESORES:

**DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO
DRA. SUSANA E. MENDOZA E.
DR. JORGE REYES ESPARZA**

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

COMITE TUTORIAL:

Dr. Abel Ciprián Carrasco
Dr. Sergio Estrada Parra
Dr. Juan A. Montaraz Crespo
Dr. John W. Hadden
Dr. Federico García Jiménez

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 8 (Biología Molecular) de la Unidad de Posgrado, Coordinación de Estudios de Posgrado, FES-Cuautitlán, U.N.A.M.; los laboratorios del Departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N. y el laboratorio 8 de la Unidad de Investigación del Instituto Nacional de Cancerología. Algunas de las técnicas empleadas fueron estandarizadas en el laboratorio de Inmunofarmacología, Departamento de Inmunofarmacología de la Universidad del Sur de Florida bajo la supervisión de la Dra. Elba Hadden.

Un año de trabajo (1994) de esta investigación se realizó gracias al apoyo financiero de la DGAPA-UNAM, proyecto no. 10003. El resto de los recursos financieros fueron obtenidos por medio de la cátedra "Estudios de Inmunofarmacología e Inmunotoxicología" registrada con la clave 1.25 durante los años 1995, 1996 y 1997 en la FES-C, UNAM y colaboraciones del Dr. John W. Hadden, Dr. Sergio Estrada Parra, Dra. Susana E. Mendoza Elvira y el Dr. Abel Ciprián Carrasco.

El manejo y mantenimiento de las cepas de *Micoplasmas* fue asesorado por el QFB Carlos Ponce Hernández y el Dr. Abel Ciprián Carrasco.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. John W. Hadden, la Dra. Elba Hadden y el Dr. Sergio Estrada Parra por sus enseñanzas y aportaciones económicas al presente proyecto de investigación. Gracias por su confianza.

A la Dra. Susana E. Mendoza Elvira y el Dr. Abel Ciprián Carrasco por el apoyo al presente proyecto.

Al Dr. Jorge Reyes Esparza por el apoyo técnico en el área de citometría de flujo y su amistad sincera.

Al QFB Carlos Ponce Hernández por su amistad y apoyo en todo momento.

Al Dr. Roberto Cervantes Olivares y la Dra. Sara Valdez Martínez por el apoyo moral incondicional que me brindaron.

A todos mis compañeros de trabajo en la Unidad de Posgrado de Campo 1 de la Coordinación de Posgrado de la FES-C, por todo el apoyo brindado.

A mis estudiantes con quienes he formado amistades incondicionales, esperando que este trabajo sea un ejemplo para su preparación.

A mi madre, hermanos y sobrinos a quienes tengo siempre en mi corazón.

**Para ti Ale,
comparto este logro contigo
y con Andrés Herón
por lo tanto
que me has apoyado.**

I. INDICE

PAGINA	
III	Agradecimientos
V	I. Indice
X	II. Indice de Cuadros
XIII	III. Indice de Figuras
XVI	IV. Abreviaturas
XVIII	V. Resumen
XIX	VI. Summary
1	1. INTRODUCCIÓN
1	1.1 Conceptos Generales
2	1.2 Clasificación
3	1.3. Definición
5	1.3.1. Morfología
6	1.3.2. Condiciones de Crecimiento
8	1.3.3. Hospederos
9	1.4. <i>Mycoplasma pulmonis</i> (Mp)
10	1.5. <i>Mycoplasma capricolum</i> (Mc)
11	1.6. Los <i>Micoplasmas</i> Y El Sistema Inmune
15	1.6.1. Los Superantígenos de los <i>Micoplasmas</i>
16	1.6.2. <i>Micoplasmas</i> y Artritis
18	1.6.3. <i>Micoplasmas</i> y SIDA
20	1.6.4. Cáncer y <i>Micoplasmas</i>
21	1.6.5. Otros fenómenos causados por los <i>Micoplasmas</i> .
24	2. OBJETIVOS.
24	2.1. Objetivos Generales
24	2.2. Objetivos Particulares.
25	3.- MATERIALES Y METODOS.
25	3.1. Material
25	3.1.1. Cepas.
25	3.1.1.1. Microorganismos.
25	3.1.1.2. Animales.
25	3.1.2. Reactivos.
25	3.1.3. Equipo.
26	3.1.4. Medios de cultivo
27	3.2. Metodología.
27	3.2.1. Determinación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC).
27	3.2.2. Caracterización Biológica de las Cepas de <i>M. pulmonis</i> y <i>M. capricolum</i> .
27	3.2.2.1. Crecimiento a 34° y 38°C.
27	3.2.2.2. Crecimiento en condiciones aerobias y anaerobias.
27	3.2.2.3. Adsorción de Eritrocitos de Carnero.

- 28 3 2.2.4. Hemólisis.
- 28 3.2.2.5. Sensibilidad a antibióticos
- 29 3.2.2.6. Diseño Experimental.
- 30 3.2.3 Producción de la enfermedad respiratoria crónica en ratones.
- 30 3.2.4. Obtención de suspensiones enriquecidas de membranas de
M. capricolum y *M. pulmonis*

A) CARACTERIZACION DEL EFECTO INMUNOMODULADOR DE LOS
MICOPLASMAS

- 31 3 2.5 Efecto de la infección por *M. pulmonis* y preparados
membranales de *M. capricolum* y *M. pulmonis* en los valores
hematológicos de ratones
 - 31 3 2.6. Efecto de la infección por *M. pulmonis* y preparados
membranales de *M. capricolum* en el peso del bazo de ratones
 - 32 3 2.7. Efecto de la infección por *M. pulmonis* en la respuesta inmune
contra eritrocitos de certero
 - 32 3.2.8. Efecto de la inoculación de membranas de *M. pulmonis* y *M*
capricolum en la respuesta inmune contra eritrocitos de certero
 - 32 3 2.9. Efecto de la infección por *M. pulmonis* en el porcentaje de
fagocitosis.
 - 33 3 2 10. Efecto de la inoculación de membranas de *M. pulmonis* y *M*
capricolum en el Porcentaje de Fagocitosis
 - 33 3 2.11. Efecto de la infección por *M. pulmonis* en la Eliminación de
Carbón Coloidal
 - 33 3.2.12. Efecto de inoculación de suspensiones membranales en la
Eliminación de Carbón Coloidal
 - 34 3 2.13. Determinación del Titulo de anticuerpos anti-*M. pulmonis*
durante la infección respiratoria crónica de ratones
 - 34 3.2.14. Determinación del Titulo de anticuerpos anti-*M. pulmonis* y
anti-*M. capricolum* después de la inoculación de concentrados de
membranas de *M. pulmonis* y *M. capricolum* en ratones Balb/c
 - 34 3.2.15. Efecto de la infección por *M. pulmonis* en la formación de
rosetas "E".
 - 35 3.2.16. Efecto de la inoculación de concentrados de membranas de
M. pulmonis y *M. capricolum* en la formación de rosetas "E"
- B) DETERMINACION DE LOS POSIBLES MECANISMOS DE
INMUNOMODULACION DE LOS MICOPLASMAS
- 35 3.2.17. Efecto de las membranas de *M. capricolum* sobre la
estimulación linfoblástica de células del bazo de ratones Balb/c
 - 36 3.2.18. Determinación del Porcentaje de subpoblaciones celulares
CD4⁺, CD8⁺ y doble positivas en sangre, bazo y timo
 - 37 3 2.19. Determinación de los niveles de interleucina-4, Interferón- γ e
Interleucina-10.

- 37 3.2.20 Influencia de la infección por *M. pulmonis* en la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) a albumina serica bovina (ASB) inoculada intraplantariamente a ratones
- 37 3.2.21 Eliminación de linfocitos T de suspensiones celulares de bazo usando anti-Thy 1.2 y coM *pulmonis* lemento
- 38 3.2.22 Determinación de los niveles de Interleucinas producidos por preparaciones de linfocitos T de animales sanos y animales infectados separados con el Sistema Dynabeads y estimulados con diferentes mitógenos
- 38 3.2.22.1 Aislamiento de Linfocitos T
- 38 3.2.22.2 Estimulación de Linfocitos T con diferentes mitógenos
- 39 3.2.22.3 Determinación de las concentraciones de Interleucinas en sobrenadante de cultivos de linfocitos
- 39 3.2.23 Determinación de los niveles de Interleucinas producidos por preparaciones de linfocitos T de animales sanos y animales infectados separados con el Sistema Dynabeads estimulados con diferentes mitógenos e incubados con células adherentes provenientes de sangre periférica
- 39 3.2.24 Estudio Histológico de pulmón, timo y bazo de ratones Balb/c en diferentes etapas de infección
- 39 3.3. Análisis Estadístico
- 40 4. RESULTADOS.
- 40 4.1 Caracterización Biológica de las Cepas de *M. pulmonis* y *M. capricolum*.

A) CARACTERIZACION DEL EFECTO INMUNOMODULADOR DE LOS MICOPLASMAS.

- 40 4.2. Efecto de la infección por *M. pulmonis* y preparados membranales de *M. capricolum* y *M. pulmonis* en los valores hematológicos de ratones Balb/c.
- 41 4.3. Efecto de la infección por *M. pulmonis* y preparados membranales de *M. capricolum* en el peso del bazo de ratones Balb/c.
- 43 4.4. Efecto de la infección por *M. pulmonis* en la respuesta inmune contra eritrocitos de carnero.
- 43 4.5. Efecto de la inoculación de membranas de *M. pulmonis* y *M. capricolum* en la respuesta inmune contra eritrocitos de carnero.
- 45 4.6. Efecto de la infección por *M. pulmonis* en el porciento de fagocitosis.
- 45 4.7. Efecto de la inoculación de membranas de *M. pulmonis* y *M. capricolum* en el porciento de fagocitosis.
- 48 4.8. Efecto de la infección por *M. pulmonis* en la eliminación de carbón coloidal.

- 49 4.9. Efecto de la inoculación de suspensiones membranales en la eliminación de carbón coloidal
- 50 4.10 Determinación del título de anticuerpos anti-*M. pulmonis* durante la infección respiratoria crónica de ratones Balb/c
- 50 4.11 Determinación del título de anticuerpos anti-*M. pulmonis* y anti-*M. capricolum* después de la inoculación de concentrados de membranas de *M. pulmonis* y *M. capricolum* en ratones Balb/c
- 51 4.12. Efecto de la infección por *M. pulmonis* y la inoculación de membranas de *M. pulmonis* y *M. capricolum* en la formación de rosetas "E"

B) DETERMINACIÓN DE LOS POSIBLES MECANISMOS DE INMUNOMODULACIÓN DE LOS MICOPLASMAS

- 52 4.13. Efecto de las membranas de *M. capricolum* sobre los linfocitos de bazo de ratón (cuantificadas de acuerdo al contenido de proteínas)
- 53 4.14 Prueba de Hipersensibilidad Retardada (DTH) en ratones infectados y no infectados con *M. pulmonis*
- 54 4.15 Niveles de Interleucina-4 en suero de animales infectados con *M. pulmonis*.
- 55 4.16. Niveles de Interferón- γ en suero de animales infectados con *M. pulmonis*.
- 57 4.17. Nivel de Interleucina 10 en suero de animales con 60 días de infección con *M. pulmonis*
- 57 4.18. Efecto mitogénico de las membranas de *M. pulmonis* en preparaciones de linfocitos de bazo de ratones normales tratados con anti-Thy 1.2 y complemento
- 57 4.19. Efecto mitogénico de la Fitohemaglutinina (PHA) en los linfocitos de bazo de ratones normales tratados con anti-Thy 1.2 y complemento
- 59 4.20. Incorporación de Timidina- H^3 de linfocitos de bazo de animales usando *M. pulmonis* y PHA como mitógenos.
- 60 4.21. Peso del timo de ratones Balb/c en diferentes etapas de la infección con *M. pulmonis*.
- 60 4.22. Porcentaje de células CD8+ en Timo de ratones en diferentes estados de infección determinadas por citometría de Flujo (FACS).
- 62 4.23. Porcentaje de células CD4+ en Timo de ratones a diferentes estados de infección, determinadas por citometría de flujo.
- 63 4.24. Porcentaje de células doble positivas (CD8+ y CD4+) de ratones en diferentes estados de infección, determinadas por citometría de flujo.
- 64 4.25. Porcentaje de células CD4+, CD8+ y doble positivas de ratones en diferentes estados de infección, determinadas por FACS.
- 65 4.26. Porcentaje de células CD8+ en sangre de ratones en diferentes estados de infección, determinadas por citometría de flujo.

66	4.27. Por ciento de células CD4+ en sangre de ratones en diferentes estados de infección, determinadas por citometría de flujo
67	4.28. Por ciento de células CD4+ y CD8+ en sangre de ratones en diferentes estados de infección, determinadas por citometría de flujo
68	4.29. Por ciento de células CD8+ en bazo de ratones en diferentes estados de infección, determinadas por citometría de flujo
69	4.30. Por ciento de células CD4+ en bazo de ratones en diferentes estados de infección, determinadas por citometría de flujo
70	4.31. Por ciento de células CD4+ y CD8+ en bazo de ratones en diferentes estados de infección, determinadas por citometría de flujo
71	4.32. Relación de las células CD4+/CD8+ en Timo, Sangre y Bazo de ratones en diferentes estados de infección, determinadas por citometría de flujo
72	4.33. Estudio del efecto mitogénico de diferentes preparaciones en células B separadas usando el sistema Dynabeads
73	4.34. Estudio del efecto mitogénico de diferentes preparaciones en células T separadas usando el sistema Dynabeads
74	4.35. Estudio del efecto mitogénico de diferentes preparaciones en células T separadas usando el sistema Dynabeads, incubadas con células adherentes
75	4.36. Niveles de IFN- γ e IL-4 producidos por células de bazo de animales sanos, estimuladas por varios productos
76	4.37. Niveles de IFN- γ e IL-4 producidos por células de bazo de animales infectados, estimuladas por varios productos
77	4.38. Observaciones histológicas de muestras de pulmón, bazo y timo de ratones Balb/c infectados con <i>M. pulmonis</i>
81	5. DISCUSIÓN.
97	6. CONCLUSIONES.
98	7. APENDICE
118	8. BIBLIOGRAFIA.

II. LISTA DE CUADROS

PAGINA	
4	Cuadro 1 Los <i>Micoplasmas</i> más comunes y sus enfermedades
11	Cuadro 2 Características Bioquímicas del <i>M. pulmonis</i> (Mp) y <i>M. capricolum</i> (Mc)
13	Cuadro 3 Efecto de algunos <i>Micoplasmas</i> sobre el Sistema Inmune
40	Cuadro 4 Caracterización Biológica de los <i>Micoplasmas</i>
104	Cuadro 5 Valores hematológicos de los animales inoculados con solución salina fisiologica (SSF)
104	Cuadro 6 Valores hematológicos de los animales infectados con <i>Micoplasmas</i> determinados 10 días despues de haber sido infectados
104	Cuadro 7 Valores hematológicos de los animales inoculados con membranas aisladas de <i>M. capricolum</i>
105	Cuadro 8 Valores de peso relativo (g) de bazos de animales infectados con <i>M. pulmonis</i> en diferentes estados de la infección y animales inoculados con preparados de membranas aisladas de <i>M. pulmonis</i> y <i>M. capricolum</i>
105	Cuadro 9 Titulos de anticuerpos aglutinantes contra eritrocitos de carnero en animales inoculados en el día cero con SSF
105	Cuadro 10 Titulos de anticuerpos aglutinantes contra eritrocitos de carnero en animales infectados con <i>M. pulmonis</i>
106	Cuadro 11 Titulos de anticuerpos contra eritrocitos de carnero en animales inoculados con membranas de <i>M. pulmonis</i> al día cero
106	Cuadro 12 Titulos de anticuerpos contra eritrocitos de carnero en animales inoculados con membranas de <i>M. capricolum</i> al día cero
106	Cuadro 13 Valores del por ciento de fagocitosis durante diferentes etapas de la infección con <i>M. pulmonis</i>
107	Cuadro 14 Valores del Por ciento de Fagocitosis de animales infectados con <i>M. pulmonis</i> a los diez días de infección y animales 72hr después de haber sido inoculados con suspensiones enriquecidas de membranas de <i>M. pulmonis</i> y <i>M. capricolum</i>
107	Cuadro 15 Valores de absorbancia a 650 nm de sangre de animales infectados inoculados con Carbón Coloidal. Tiempo cero
107	Cuadro 16. Valores de absorbancia a 650 nm de sangre de animales infectados inoculados con Carbón Coloidal a 3 min después.
108	Cuadro 17. Valores de absorbancia a 650 nm de sangre de animales infectados inoculados con Carbón Coloidal a 7 min después.
108	Cuadro 18. Valores de absorbancia a 650 nm de sangre de animales infectados inoculados con Carbón Coloidal a 10 min después.

- 108 Cuadro 19 Valores de absorbancia a 650 nm de sangre de animales infectados inoculados con Carbon Coloidal a tiempo de 30 min.
- 109 Cuadro 20 Valores de absorbancia a 650 nm de sangre de animales inoculados con preparados membranales e inoculados con Carbon Coloidal a tiempo de 0 min
- 109 Cuadro 21 Valores de absorbancia a 650 nm de sangre de animales inoculados con preparados membranales e inoculados con Carbon Coloidal a tiempo de 3 min
- 109 Cuadro 22 Valores de absorbancia a 650 nm de sangre de animales inoculados con preparados membranales e inoculados con Carbon Coloidal a tiempo de 7 min
- 110 Cuadro 23 Valores de absorbancia a 650 nm de sangre de animales inoculados con preparados membranales e inoculados con Carbon Coloidal a tiempo de 10 min
- 110 Cuadro 24 Valores de absorbancia a 650 nm de sangre de animales inoculados con preparados membranales e inoculados con Carbon Coloidal a tiempo de 30 min
- 110 Cuadro 25 Titulo de anticuerpos contra *M. pulmonis* de animales infectados
- 111 Cuadro 26 Titulo de anticuerpos contra *M. pulmonis* y *M. capricolum* de animales inoculados con membranas
- 111 Cuadro 27 Porcentaje de celulas formadoras de rosetas espontaneas en animales infectados con *M. pulmonis* y animales inoculados con membranas.
- 111 Cuadro 28. Mitogenicidad de las membranas de *M. capricolum* sobre linfocitos de bazo de ratón.
- 112 Cuadro 29. Valores de grado de hinchazon de cojinete plantar de ratones infectados y no infectados inoculados con albumina serica bovina (100 µg), para determinar la respuesta de hipersensibilidad retardada
- 112 Cuadro 30. Valores de absorbancia de la prueba de ELISA (Enzyme labeled immunosorbent assay) para detectar los niveles de IL- 4 en suero de ratones infectados y no infectados con *M. pulmonis*.
- 112 Cuadro 31. Valores de absorbancia de la prueba de ELISA (Enzyme labeled immunosorbent assay) para detectar los niveles de IFN-γ en suero de ratones infectados y no infectados con *M. pulmonis*.
- 57 Cuadro 32. Absorbancia de la prueba de ELISA (R&D systems) para detectar la concentración de IL-10 en suero de ratones Balb/c infectados (60 días) y no infectados con *M. pulmonis*.
- 113 Cuadro 33. Incorporación de timidina tritiada de suspensiones de células de bazo de ratones sanos tratadas con anticuerpos anti-Thy 1.2 y complemento y estimuladas con membranas de *M. pulmonis*

- 113 Cuadro 34. Incorporación de timidina tritiada de suspensiones de células de bazo de ratones sanos tratadas con anticuerpos anti-Thy 1.2 y complemento y estimuladas con fitohemaglutinina (PHA)
- 113 Cuadro 35. Incorporación de timidina tritiada de suspensiones de células de bazo de ratones sanos en diferentes etapas de la infección y estimulados con membranas y fitohemaglutinina (PHA)
- 60 Cuadro 36. Peso del timo de ratones Balb/c en diferentes etapas de la infección con *M. pulmonis*
- 114 Cuadro 37. Porcentajes de células CD8+ en timo de animales infectados con *M. pulmonis* en diferentes etapas de la infección, analizados por Citometría de Flujo
- 114 Cuadro 38. Porcentajes de células CD4+ en timo de animales infectados con *M. pulmonis* en diferentes etapas de la infección, analizados por Citometría de Flujo
- 114 Cuadro 39. Porcentajes de células doble positivas (CD8+ y CD4+) en timo de animales infectados con *M. pulmonis* y animales inoculados con solución salina fisiológica (SSF)
- 115 Cuadro 40. Porcentajes CD8+ en sangre de animales infectados con *M. pulmonis* y animales inoculados con solución salina fisiológica (SSF)
- 115 Cuadro 41. Porcentajes CD4+ en sangre de animales infectados con *M. pulmonis* y animales inoculados con solución salina fisiológica (SSF)
- 115 Cuadro 42. Porcentajes CD8+ en bazo de animales infectados con *M. pulmonis* y animales inoculados con solución salina fisiológica (SSF)
- 116 Cuadro 43. Porcentajes CD4+ en bazo de animales infectados con *M. pulmonis* y animales inoculados con solución salina fisiológica (SSF)
- 116 Cuadro 44. Valores de la relación CD4+/CD8+ en timo, sangre y bazo de animales infectados con *M. pulmonis*
- 116 Cuadro 45. Incorporación de Timidina tritiada de preparados de células B separadas por el sistema Dynabeads, utilizando diferentes sustancias como mitógenos.
- 117 Cuadro 46. Incorporación de Timidina tritiada de preparados de células T separadas por el sistema Dynabeads, utilizando diferentes sustancias como mitógenos.
- 117 Cuadro 47. Incorporación de Timidina tritiada de preparados de células T separadas por el sistema Dynabeads incubadas con células adherentes, utilizando diferentes sustancias como mitógenos.
- 117 Cuadro 48. Valores de absorbancia de la prueba de ELISA para determinar los niveles de IFN- γ e IL-4 producidos por células de bazo de animales sanos e inducidos por diferentes productos.
- 117 Cuadro 49. Valores de absorbancia de la prueba de ELISA para determinar los niveles de IFN- γ e IL-4 producidos por células de bazo de animales infectados e inducidos por diferentes productos.

III. LISTA DE FIGURAS

PAGINA

- 41 Figura 1 Histograma que representa los valores hematológicos encontrados en ratones Balb/c sujetos a diferentes tratamientos
- 42 Figura 2 Histograma que representa los valores de peso relativo de bazo (peso de bazo/peso de raton) de animales en diferentes etapas de la infección por *M. pulmonis* y animales inoculados con suspensiones enriquecidas de membranas de *M. pulmonis* y *M. capricolum*
- 44 Figura 3 Niveles de anticuerpos aglutinantes anti-eritrocitos de carnero de animales infectados con *M. pulmonis*, animales inoculados con suspensiones enriquecidas de membranas de *M. pulmonis* y *M. capricolum* y animales controles inoculados con solución salina fisiológica
- 46 Figura 4 Histograma que representa los valores del porcentaje de fagocitosis de animales en diferentes etapas de la infección por *M. pulmonis*
- 47 Figura 5 Histograma que representa los valores de porcentaje de fagocitosis de animales infectados con *M. pulmonis* a los diez días de infección y 72 h después de haber sido inoculados con suspensiones enriquecidas de membranas de *M. pulmonis* y *M. capricolum*
- 48 Figura 6 Gráfica que representa la variación de los valores de absorbancia a 650nm de muestras de sangre de ratones Balb/c en diferentes etapas de la infección por *M. pulmonis* y animales inoculados con solución salina fisiológica (controles)
- 49 Figura 7. Gráfica que representa la variación de los valores de absorbancia a 650nm de muestras de sangre de animales inoculados con suspensiones enriquecidas de membranas de *M. pulmonis* y *M. capricolum*, 72hr antes de realizarse la prueba
- 50 Figura 8. Gráfica que representa las variaciones en los titulos de anticuerpos especificos en ratones Balb/c en diferentes etapas de la infección con *M. pulmonis* y ratones inoculados con suspensiones enriquecidas de membranas de *M. pulmonis* y *M. capricolum*
- 51 Figura 9. Histograma que representa los porcentajes de células formadoras de Rosetas "E" en ratones Balb/c machos con 10 días de infección con *M. pulmonis* y animales inoculados con membranas de *M. pulmonis* y *M. capricolum*.
- 52 Figura 10. Gráfica que representa la transformación blastoide de linfocitos de bazo de ratones Balb/c sanos expuestos a diferentes cantidades de suspensión enriquecida de membranas de *M. capricolum* calculadas de acuerdo a su contenido protéico.

- 53 Figura 11 Gráfica que representa los valores obtenidos en la prueba de hipersensibilidad retardada (DTH) realizada en cojinetes plantar de ratones Balb/c
- 54 Figura 12 Gráfica que representa las variaciones de la concentración en suero de IL-4 en diferentes etapas durante la infección de ratones Balb/c con *M. pulmonis*
- 55 Figura 13 Gráfica que representa las variaciones de la concentración en suero de IFN- γ en diferentes etapas durante la infección de ratones Balb/c con *M. pulmonis*
- 56 Figura 14 Gráfica que representa la comparación en las variaciones de la concentración de IL-4 e IFN- γ en suero de animales en diferentes etapas de la infección con *M. pulmonis*
- 58 Figura 15 Histograma que representa los valores de la transformación blastoide de suspensiones de células
- 59 Figura 16 Gráfica que representa las variaciones en la incorporación de timidina tritiada de células de bazo de ratones Balb/c en diferentes etapas de la infección con *M. pulmonis*. Los mitógenos utilizados fueron una suspensión enriquecida de membrana (medidas por su contenido proteico) y la PHA (1 μ g/pozo)
- 61 Figura 17 Gráfica que muestra las variaciones en los porcentajes de las células CD8+ en timo, calculadas utilizando citometría de flujo y anticuerpos anti-CD4 fluoresceinado y anti-CD8 rodaminado
- 62 Figura 18 Gráfica que muestra las variaciones en los porcentajes de las células CD4+ en timo, calculadas utilizando citometría de flujo y anticuerpos anti-CD4 fluoresceinado y anti-CD8 rodaminado
- 63 Figura 19 Gráfica que muestra las variaciones en los porcentajes de las células doble positivas (CD8+ y CD4+) en timo calculadas utilizando citometría de flujo y anticuerpos anti-CD4 fluoresceinado y anti-CD8 rodaminado
- 64 Figura 20 Valores de porcentajes de células CD4+ y CD8+ en timo de animales en diferentes etapas de la infección con *M. pulmonis*
- 65 Figura 21 Gráfica que muestra las variaciones en los porcentajes de las células CD8+ en sangre calculadas utilizando citometría de flujo y anticuerpos anti-CD4 fluoresceinado y anti-CD8 rodaminado
- 66 Figura 22 Gráfica que muestra las variaciones en los porcentajes de las células CD4+ en sangre calculadas utilizando citometría de flujo y anticuerpos anti-CD4 fluoresceinado y anti-CD8 rodaminado
- 67 Figura 23 Comparación en las variaciones de los porcentajes de células CD4+ y CD8+ en sangre de animales en diferentes etapas de la infección con *M. pulmonis*
- 68 Figura 24 Gráfica que muestra las variaciones en los porcentajes de las células CD8+ en bazo calculadas utilizando citometría de flujo y anticuerpos anti-CD4 fluoresceinado y anti-CD8 rodaminado.

- 69 Figura 25. Gráfica que muestra las variaciones en los porcentajes de las células CD4+ en bazo calculadas utilizando citometría de flujo y anticuerpos anti-CD4 fluoresceinado y anti-CD8 rodaminado
- 70 Figura 26. Comparación en las variaciones de los porcentajes de células CD4+ y CD8+ en bazo de animales en diferentes etapas de la infección con *M. pulmonis*.
- 71 Figura 27. Valores de la relación entre células CD4+/CD8+ en timo, sangre periférica y bazo de animales infectados con *M. pulmonis*, en diferentes etapas de la infección
- 72 Figura 28. Histograma que representa la incorporación de timidina tritjada de suspensiones enriquecidas de linfocitos B estimulados con diferentes productos
- 73 Figura 29. Histograma que representa la incorporación de Timidina tritjada de suspensiones enriquecidas de linfocitos T estimulados con diferentes productos
- 74 Figura 30. Histograma que representa la incorporación de Timidina tritjada de suspensiones enriquecidas de linfocitos T incubados con células adherentes y estimulados con diferentes productos
- 75 Figura 31. Histograma que representa los valores de IL-4 e IFN- γ de sobrenadantes de cultivo de células de bazo de animales sanos estimuladas con diferentes productos
- 76 Figura 32. Histograma que representa los valores de IL-4 e IFN- γ de sobrenadantes de cultivo de células de bazo de animales infectados estimuladas con diferentes productos
- 78 Figura 33. Fotografía que muestra un corte de pulmón de ratones Balb/c sanos teñido con hematoxilina-eosina (100x)
- 78 Figura 34. Fotografías que muestran corte de pulmón de ratones Balb/c infectados teñido con hematoxilina-eosina (100x);
- 79 Figura 35. Fotografía que muestra un corte de bazo de ratones Balb/c sanos teñido con hematoxilina-eosina (100x)
- 79 Figura 36. Fotografías que muestran corte de bazo de ratones Balb/c infectados teñido con hematoxilina-eosina (100x)
- 80 Figura 37. Fotografía que muestra un corte de timo de ratones Balb/c sanos teñido con hematoxilina-eosina (100x)
- 80 Figura 38. Fotografías que muestran corte de timo de ratones Balb/c infectados teñido con hematoxilina-eosina (100x).

IV. ABREVIATURAS

Albúmina sérica bovina	ASB
Anticuerpos anti-CD4	anti-CD4
Anticuerpos anti-CD8	anti-CD8
Factor estimulante de colonias de granulocitos/monocitos	GM-CSF
Enterotoxina E de <i>Stafilococo</i>	EES
Eritrocitos de carnero	EC
Hormona adenocorticotrópica	ACTH
Inmunodeficiencia común variable	CVID
Interferón- γ	IFN- γ
Interleucina-10	IL-10
Interleucina-2	IL-2
Interleucina-4	IL-4
Interleucina-6	IL-6
Lipopolisacárido	LPS
<i>M. mycoides</i> ssp. <i>mycoides</i> colonia pequeña	MMSC
Medio de Edward	ME
Medio mínimo esencial	MEM
MicroCuries	μ ci
<i>Mycoplasma capricolum</i> ATCC 27343	Mc
<i>Mycoplasma pulmonis</i> ATCC 19612	Mp
Neumonía primaria atípica	NPA
Oxido nítrico	NO
Pleuropneumonía contagiosa bovina	CBPP
Prostaglandina E ₂	PGE ₂
Reacción de hipersensibilidad retardada	DTH
Síndrome de inmunodeficiencia adquirida	SIDA
Síndrome Guillain-Barre	GBS
Solución amortiguadora de fosfatos	PBS
Solución amortiguadora de Trietanolamina-NaCl	TBS
Solución salina fisiológica	SSF
Subcutáneamente	SC
Suero fetal de bovino	FCS
Virus de la inmunodeficiencia humana	HIV

V. RESUMEN

Desde hace muchos años es reconocida la capacidad que tienen los *Micoplasmas* de afectar en diferentes formas al Sistema Inmune (SI) del hospedero. En el presente trabajo se realizaron experimentos con el fin de entender los mecanismos de estos efectos sobre el SI. El análisis general de los resultados de la primera parte del trabajo mostró una infección persistente que no se resolvió en un período de tiempo corto, evidenciando una disfunción general del sistema inmune, con variación muy notable en todos los fenómenos evaluados. En la segunda parte se encontró que aproximadamente a partir del día 38 de infección se presentaron cambios importantes en los porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos T, coincidentemente los niveles de interleucinas cambiaron en el día 10 para el IFN- γ y en el día 15 para la IL-4, en el primer caso a partir del día 15 se produjo un descenso en su concentración en suero que se mantuvo por debajo de los controles durante el tiempo que duró la infección. La prueba de DTH mostró una reacción menor en los animales tratados que los controles durante todo el período de infección, observándose una recuperación en el día 30, pero disminuyendo aún más para el día 40. En cuanto a las membranas, estas mostraron ser mitogénicas para células B y aparentemente en mucho menor proporción para T, y los niveles de interleucinas secretadas por linfocitos de bajo de animales infectados y no infectados estimulados con preparados membranales de *Mycoplasma* presentaron un aumento en los niveles de IL-4, y en el caso de los linfocitos de animales infectados, aún estimulados con fitohemaglutinina mostraron niveles aumentados de IL-4. En los estudios histológicos realizados a los animales infectados, se encontraron en pulmón lesiones características de *Micoplasmas*, en bajo se observó una disminución aparente de la cantidad de folículos presentes y en timo, la médula ocupó un 50% del espacio observado. Bajo estos hechos es posible establecer que hay claros indicios de que los *Micoplasmas* modulan la respuesta inmune de los ratones controlando de alguna manera la actividad de las subpoblaciones Th₁ y Th₂, llevando al animal a un estado de descontrol inmunológico, que le permite al microorganismo sobrevivir, sin embargo los resultados que aquí se presentan muestran que este fenómeno (que tiende a ser inmunosupresor) no es sostenido, y el animal se recupera durante una etapa de la infección para después volver a ser inmunosuprimido, en una secuencia de eventos de tipo recurrente que da una explicación al fenómeno de cronicidad que es característico de la enfermedad causada por este microorganismo.

VI. SUMMARY

Experiments were performed to understand the mechanisms of the *Mycoplasma* effects on the immune system. The general analysis of the results on the first part of this work showed a chronic infection with evidence of a general dysfunction of the immune system. The second part showed important changes on the percentages of T cells subpopulations from different organs (thymus, blood and spleen) of infected animals, at the same time there were changes on interleukin-4, interleukin-10 and γ -interferon. Delayed type hypersensitivity test showed a minor reaction in infected animals than the non-infected controls on different stages of the infection, following the changes of the cytokines tested in serum. Membranes preparations from *M. pulmonis* and *M. capricolum* showed mitogenic activity for B cells and in less degree for T cells, *in vitro* stimulation of T cells with these membranes lead to the production of high levels of IL-4. With the information of this work, it is possible to establish that *Mycoplasma* infection modulates the immune response, controlling the activity of T_H1 and T_H2 cells subpopulations, these effects allow the microorganisms to survive. Evidence shows that the animal's immune system recovers and fall again into supression. This could be the explanation of the chronicity of this disease.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1. CONCEPTOS GENERALES.

Los *Mycoplasmas* son agentes infecciosos conocidos desde hace mucho tiempo bajo la denominación de grupo de "pleuropneumonia-like-organisms" (PPLO), organismos semejantes a los que provocan la pleuroneumonía, y capaces de originar enfermedades en el hombre y animales. Se consideran ante todo como agentes causales de neumonía atípica primaria en el humano, de una faringitis exudativa en el hombre; así como de la pleuroneumonía infecciosa de los bovinos, de la agalactia infecciosa de la oveja y cabra, de neumonía, serositis y artritis del cerdo, enfermedad respiratoria crónica y sinovitis infecciosa de las aves, y neumonía de los roedores y recientemente en infecciones renales de pacientes con HIV de los cuales han se han aislado nuevas especies con crecimiento intracelular (Lo, 1989). Es característico de los *Mycoplasmas* según varios investigadores (Barile y col., 1979), que las copas patógenas que se hallan latentes en hospederos sólo sean capaces de provocar la aparición de enfermedad cuando la resistencia del hospedero resulta disminuida por la acción de factores de diversa naturaleza. Los *Mycoplasmas* pueden encontrarse en estado saprófito en el suelo y en las aguas residuales.

Los *Mycoplasmas* se diferencian claramente de otras bacterias y los virus por las siguientes características:

1. Capacidad de reproducción en medios exentos de células y con determinadas sustancias nutricionales
2. Tamaño entre 125 y 250 nm.
3. Crecimiento en colonias de forma y tamaño característico sobre medios sólidos.
4. Multiplicación en red de filamentos por medio de corpúsculos elementales cocoides.
5. Multiplicidad de formas, como consecuencia de la falta de una sustancia consistente que forme la pared celular.
6. Facultad de atravesar los filtros con poro de 0.45 μm y mantener su capacidad de reproducción.
7. Resistencia a la penicilina y acetato de talio.
8. Carecen de pared celular y contienen colesterol en su membrana en la misma proporción que las células eucariotes.

Estos gérmenes son inmóviles, carentes de esporas, por lo general aerobios gramnegativos y que se colorean bastante bien con el Giemsa; tienen especiales

necesidades nutricionales (colesterol, esteroides, etc.). En lo referente a sus propiedades bioquímicas y serológicas, se registran notables diferencias entre miembros de la misma especie. La denominación de "*Mycoplasmas*" aplicada a estos microorganismos obedece a las formas de crecimiento y a micelios observadas en ocasiones y a su marcado pleomorfismo (Krieg y Hott, 1984).

1.2. CLASIFICACIÓN

Edward y Freundt establecieron en 1956 la clasificación sistemática de todos los *Mycoplasmas* según su especie y origen.

Otros nombres utilizados fueron los de *Asterococcus mycoides* (Borrel y col., 1910), *Coccobacillus* (Martzinowski, 1911), *Micromyces* (Frosch, 1923), *Mycoplasma* (Nowak, 1929) como primera denominación genérica correcta, *Asteromyces* (Wroblewski, 1931), *Borrelomyces* (Turner, 1935), *Bovimyces* (Sabin, 1941), etc. hasta que, con motivo de la Conferencia de Melbourne sobre Pleuroneumonía (1960), se recomendó denominar "*Mycoplasma mycoides*" al agente productor de la pleuroneumonía contagiosa. Como prototipo de este grupo está el agente causal de la pleuroneumonía contagiosa de los bovinos, que fue reconocida por vez primera por Pasteur como enfermedad microbiana (Krieg y Hott, 1984). Nocard y col. (1898) aislaron y describieron estos gérmenes orgánicos, que más tarde constituyeron con otros microorganismos semejantes el grupo "pleuro-pneumonia-organisms" (PPO). Otros agentes patógenos que exhibían ciertas coincidencias con las propiedades de los gérmenes de la pleuroneumonía recibieron la denominación de "pleuro-pneumonia like organisms" (PPLO), en este grupo se colocaron a los gérmenes que, entre otras afecciones, producen la agalactia de la oveja y de la cabra, conocidas desde largo tiempo atrás, así como la enfermedad respiratoria crónica de las aves, tan estudiada actualmente. La designación de PPLO para estos microorganismos resulta conceptualmente inexacta, ya que con ella sólo se hace referencia al relativamente raro cuadro clínico que producen en éstas especies, pero no a los agentes causales en sí. Este viejo término técnico PPLO ha sido desechado tras la introducción de una nomenclatura y clasificación nuevas. De acuerdo con las reglas de la taxonomía, la designación de las familias de estos microorganismos pudo derivarse del nombre de las especies. La ordenación unificada de estos gérmenes se llevó a efecto teniendo en cuenta las siguientes características: 1) ciclo reproductor; 2) resistencia frente a altas dosis de penicilina, telurito potásico y cristal

violeta; 3) favorecimiento del crecimiento mediante colesterol y esteroides y 4) inhibición del crecimiento por sueros específicos

La clasificación de estos microorganismos se halla contenida en el Manual de Bergey (Krieg y Hott, 1984); en la Cuadro 1 se mencionan las principales especies y las enfermedades que causan.

1.3. Definición

DIVISION TENERICUTES

CLASE I MOLLICUTES (Mol li cu tes or Mol li qu tes. L. adj. *mollis* blando, pegable. L. fem. n. *cutis* piel. M.L. fem. pl. n. clase *Mollicutes* con límites celulares plegables)

FAMILIA I MYCOPLASMATACEAE My co plas má ta'ce ae. M.L. neut. n. *Mycoplasma* type genus of the family, -aceae para denotar una familia, M.L. fem. pl. n. Mycoplasmataceae la familia *Mycoplasma* (Krieg y Hott, 1984)

GÉNERO MYCOPLASMA,

My co plas'ma Gr. masc. n. myces un l. hongo. Gr. neut. n. plasma algo formado o moldeado, una forma. M.L. neut. n. *Mycoplasma*

Se aceptan actualmente 5 grupos de la clase Mollicutes: 1) grupo pneumoniae, 2) grupo hominis; 3) grupo espiroplasma; 4) grupo anaeroplasmata y 5) grupo asteroplasmata (Weisburg y col., 1989).

Cuadro 1. Los *Micoplasmas* más comunes y las enfermedades que producen (Krieg y Hott, 1984).

NOMBRE	ESPECIE ORIGINAL	ENFERMEDAD
<i>M. agalactiae</i>	Cabra/oveja	Agalactia contagiosa
<i>M. agalactiae</i> var <i>bovis</i>	Bovinos	Mastitis, agalactia, infección genital
<i>M. anatis</i>	Patos	Sinusitis
<i>M. arthritis</i>	Rata/raton	Poliartritis
<i>M. bovigenitalum</i>	Bovinos	Mastitis
<i>M. canis</i>	Perro	-
<i>M. felis</i>	Gato	Conjuntivitis, rinitis
<i>M. fermentans</i>	Hombre	-
<i>M. gallinarum</i>	Aves (gallinas)	-
<i>M. gallisepticum</i>	Aves (gallinas, pavos)	CRD, sinusitis infecciosa, sinovitis infecciosa
<i>M. galatae</i>	Gato	Conjuntivitis, rinitis
<i>M. granularum</i>	Cerdo	Artritis
<i>M. hyarthritis</i>	Cerdo	Artritis
<i>M. hyogentialum</i>	Cerdo	Mastitis, metritis, agalactia
<i>M. hyopneumoniae</i>	Cerdo	Neumonía enzootica
<i>M. hyorhinis</i>	Cerdo	Neumonía enzootica, poliserositis y poliartrosis, rinitis atrofica, enfermedad de Glasser
<i>M. hominis</i>	Hombre	-
<i>M. iners</i>	Aves	-
<i>M. innocuum</i>	Aves	-
<i>M. maculosum</i>	Perro	-
<i>M. mycoides</i> var <i>mycoides</i>	Bovinos	Pleuroneumonía contagiosa
<i>M. mycoides</i> var <i>capri</i>	Cabra/oveja	Pleuroneumonía contagiosa
<i>M. meleagridis</i>	Pavos	Inflamación de sacos aéreos, infección genital
<i>M. neurolyticum</i>	Raton	Enfermedad "Giradona"
<i>M. pneumoniae</i>	Hombre	Neumonía humana atípica
<i>M. pulmonis</i>	Raton/rata	Catarro contagioso, afecciones pulmonares crónicas
<i>M. salivarum</i>	Hombre	-
<i>M. spumans</i>	Perro	-
<i>M. synoviae</i>	Gallinas	Sinovitis infecciosa

En este genero se encuentran unos microorganismos pleomórficos, que varían en formas desde la esférica o ligeramente ovoides (forma de pera) con aproximadamente 0,3-0,8 μm de diámetro hasta filamentosos (ramificados) de diámetro uniforme, variando en longitud desde 5 hasta 150 μm . Las células carecen de pared celular y están rodeadas solamente por una membrana plasmática Gram negativo. Usualmente no móviles, pero se ha probado un desplazamiento en algunas especies Anaerobio facultativo. Las colonias son muy pequeñas (usualmente menor de 1 mm de diámetro). La colonia típica bajo condiciones de cultivo adecuadas tiene una apariencia de huevo frito, son catalasa negativos. Quimorgano tropicos, utilizando azúcares o arginina como la principal fuente de energía. Requieren colesterol o esteroides relacionados para crecer. Parásitos y patógenos de una amplia variedad de hospederos mamíferos y aves. El % G+C del DNA varía de 23/40 (Tm y Bd) y el tamaño del genoma de las especies examinadas es de aprox 5×10^8 daltons. Especie tipo *Mycoplasma mycoides* (Krieg y Holt, 1984).

1.3.1. Morfología

La forma celular de los *Micoplasmas* parece depender de las cualidades nutricionales y la presión osmótica del medio de crecimiento así como la fase de crecimiento del cultivo. El crecimiento filamentosos está asociado usualmente con cultivos logarítmicos jóvenes creciendo en condiciones óptimas. No obstante, la fase filamentosos es transitoria y los filamentos se transforman en cadenas de cocos los cuales al final se separan (Bredt y col., 1973). Muchas de las diminutas y flexibles células de *Mycoplasma* en cultivo pueden atravesar apretadamente filtros con poro de 450 nm de diámetro, de hecho, el paso a través de dichos filtros constituye una de las propiedades usadas para definir un aislado de *Mycoplasma* nuevo. Datos experimentales más recientes así como las consideraciones teóricas han llevado a la conclusión de que las células de *Mycoplasma* más pequeñas capaces de reproducción tienen cerca de 0,3 μm de diámetro (Razin, 1978).

La observación al microscopio de contraste de fases o de campo oscuro de los cultivos jóvenes en caldo son los procedimientos recomendados para la examinación microscópica de los *Micoplasmas*, ya que introduce distorsiones mínimas en la forma de las células. Además, permite la observación de la motilidad que caracteriza a muchas especies de *Micoplasmas*. El examen de organismos fijados con metanol y teñidos con Giemsa, es preferible a la tinción de Gram. Para microscopía electrónica debe ponerse

atención especial en la osmolaridad de los fijadores y en los amortiguadores ya que estos pueden alterar drásticamente el tamaño y la forma real de los organismos. La membrana de los *Mycoplasmas* esta constituida de lípidos anfipáticos (fosfolípidos, glicolípidos, esteroides) y proteínas. La facilidad de su aislamiento en una forma pura y la habilidad para introducir alteraciones controladas en su composición lipídica, han hecho de esta membrana la herramienta mas útil en estudios de membranas (Razin y Rottem, 1976, Razin, 1981). En muchas especies de *Mycoplasmas* la superficie celular esta cubierta por un material capsular, que en algunos casos pueden teñirse con rojo de ruthenium una tinción general para polianiones usada para demostrar los glicocalices (polisacáridos de células eucariotas). En el *M. mycoides* subsp. *mycoides* esta capa esta hecha de galactana (Plackett y Bulterey, 1964, Gourlay y Thrower, 1968). Secciones delgadas de *Mycoplasmas* revelan que las células estan constituidas de 3 organelos solamente: la membrana celular, los ribosomas y el genoma procaríote característico. No hay evidencia de alguna estructura membranosa intracelular, como los mesosomas. En muchas especies se han observado estructuras especializadas en forma de punta. Estas estructuras parecen jugar un papel en la adherencia de los *Mycoplasmas* al hospedero y en el movimiento de algunos de estos organismos (Bredt, 1979). El tratamiento breve del *M. pneumoniae* con Triton X-100, indica que el centro en forma de bastón de este organismo consiste de un cúmulo de fibrilas que podrían extenderse a toda la célula formando un citoesqueleto (Bredt y col., 1973).

1.3.2. Condiciones de Crecimiento

El crecimiento de los *Mycoplasmas* en medio líquido produce usualmente una opacidad ligeramente visible. La absorbancia de los cultivos a 640 nm raramente excede 0.3 y es usualmente mucho más baja. Las colonias de casi todas las especies de *Mycoplasmas* muestran la típica forma de "huevo frito", que consiste de una zona opaca granular central inmersa en el agar y una periferia plana translúcida en su superficie. La apariencia de la colonia depende mucho de las condiciones de crecimiento, edad del cultivo, concentración del agar, etc. Por lo tanto, en un medio pobre en nutrientes o con pH inadecuado, condiciones atmosféricas diferentes o cuando la superficie del medio este demasiado seca el crecimiento central hacia abajo (penetrando al medio), puede llevarse inicialmente a cabo sin la formación del crecimiento periférico superficial (Razin y Oliver, 1961). Se debe establecer también que una minoría muy pequeña ha mostrado no tener colonias en forma de "huevo frito" bajo cualquier condición de cultivo. La forma de

reproducción de los *Micoplasmas* ha sido materia de disputa. No obstante, estudios de la biología molecular de estos organismos muestran claramente que la replicación de su genoma, el cual debe preceder la división celular, sigue el mismo patrón que la división por fisión binaria en otros procariontes (Morowitz y Wallace, 1973). Para que la fisión binaria ocurra, sin embargo, la división citoplasmática debe estar completamente sincronizada con la replicación genómica lo cual no es siempre el caso con los *Micoplasmas*. La división citoplasmática de los *Micoplasmas* puede llevarse a cabo después de la replicación del genoma produciendo la formación de filamentos multinucleares (Peterson y col., 1973; Bredt y col., 1973). La división subsecuente del citoplasma por constricción de la membrana en algunos sitios entre los genomas lleva a la formación de cadenas características las cuales después se fragmentan para producir células sencillas. La "gemación" observada frecuentemente en los cultivos de *Micoplasmas* (Anderson y Barile, 1965; Razin y Cosenza, 1966) puede de hecho ser una forma de fisión binaria en la cual el citoplasma no se divide equitativamente entre las células hijas.

Los *Micoplasmas* tienen habilidades sintéticas limitadas, debidas probablemente a su genoma pequeño y forma de vida como parásitos. Consecuentemente requieren de un medio complejo para su crecimiento, consistente de infusión de cerebro y corazón peptona, extracto de levadura y suero (Edward, 1947; Hayflick, 1965; Freundt y col., 1980). El suero provee, entre otros nutrientes, ácidos grasos y colesterol para la síntesis de membrana en una forma asimilable no tóxica. Algunos medios de cultivo han sido desarrollados para los *Micoplasmas Mycoides* y *Acholeplasma laidlawii* (Rodwell, 1979), ambos organismos requieren de un complejo conjunto de aminoácidos, ácidos nucleicos o precursores, lípidos, vitaminas e iones inorgánicos y glucosa como fuente de energía. Ciertas cepas de *M. hyorhinis* crecen pobremente o no crecen en medios artificiales convencionales debido a su sensibilidad a factores tóxicos encontrados principalmente en el extracto de levadura y el suero de cerdo o de los restos de tejido del cual se aisló (Del Giudice y col., 1980). Estas cepas no cultivables pueden ser más rápidamente aisladas e identificadas por procedimientos de cultivo celular (Hopps y col., 1973).

La mayoría de las especies de *Micoplasmas* son anaerobios facultativos. Como los cultivos de muestras de tejidos primarios frecuentemente crecen solo en condiciones anaerobias, se prefiere una atmósfera de 95% de N_2 y 5% de CO_2 para el aislamiento primario. El pH inicial del medio de crecimiento debe ajustarse a aproximadamente 8.0

para los *Mycoplasmas fermentativos* y a 6 0-6 5 para los *Mycoplasmas no fermentativos degradadores de arginina*. El rango de temperatura para crecimiento varia de acuerdo a la especie y la composicion de colesterol y acidos grasos desde aproximadamente 20°C a aproximadamente 40°C. La temperatura óptima para la mayoría de los *Mycoplasmas* es de 36-37°C. La glucosa u otros carbohidratos metabolizables pueden servir como una fuente de energia para los *Mycoplasmas fermentativos* que poseen la via glicolitica de Embden-Meyerhof. Los productos finales principales son el ácido lactico en gran cantidad y el acido piruvico, ac. acetico y el acetil metil carbinol (Pollack, 1979). La degradacion de arginina por la via de la arginina hidrolasa se ha propuesto como la mayor fuente de ATP en los *Mycoplasmas no fermentativos* (Schimke y col., 1966).

Existe diversidad antigénica dentro de ciertas especies de *Mycoplasma* como el *M. hominis* (Razin, 1968, Hollingdale y Lemcke, 1970, Lin y Kass, 1974), *M. pulmonis* (Forshaw y Fallon, 1972) y *M. arginini* (Thurkill y Henny, 1975). Tal heterogeneidad antigénica ha sido notada con estas especies en una variedad de pruebas serologicas y parece estar correlacionada con diferencias entre antígenos de membrana o proteínas de membrana de cepas individuales (Alexander y Kenny, 1980). Los *Mycoplasmas* son usualmente resistentes a la bencilpenicilina y otros antibióticos β-lactámicos cuyo blanco principal es la síntesis de péptidoglicano pero son usualmente sensibles a los antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas en procaríotes, tales como las tetraciclinas y el cloranfenicol. La susceptibilidad a otros antibióticos es variable, particularmente a la eritromicina y ciertos otros macrólidos. Esta propiedad puede ser útil para la diferenciación de las especies (Brunner y Weidner, 1981). La mayoría de los *Mycoplasmas* toleran diluciones de 1:2000 a 1:4000 de acetato de talio, el cual es incorporado como agente selectivo en el medio.

1.3.3. Hospederos

Las especies de *Mycoplasmas* son parásitos de las mucosas y articulaciones. Las infecciones por estos organismos han sido más frecuentemente asociadas con enfermedades del tracto respiratorio y genitourinario, donde el parásito se adhiere firmemente para colonizar el tejido epitelial. La asociación íntima entre los *Mycoplasmas* y sus células hospedero provee un medio ambiente en el cual concentraciones locales de productos tóxicos excretados por los organismos (H_2O_2 , NH_3) pueden acumularse y causar daño tisular (Razin, 1978; Razin, 1981). Como ninguna pared celular separa a la membrana plasmática del parásito de la de su hospedero, el intercambio de antígenos

ocurre entre las dos membranas, un evento que puede desencadenar respuestas inmunológicas de consecuencias serias para el hospedero (Wise y col., 1978). La asociación íntima entre los *Mycoplasmas* y las membranas de las células del hospedero se refleja también por el fenómeno de "capping" (cubrimiento) que sucede en linfocitos infectados, seguido de la expulsión de vesículas de membrana de origen presumible del hospedero (Stanbridge y Weiss, 1978). Este fenómeno está relacionado a la bien conocida inducción de transformación blastoide por *Mycoplasmas* (Naot, 1982).

1.4. *Mycoplasma pulmonis*

Se han observado dos formas de células móviles: a) una célula redonda con una porción protuberante flexible, a menudo más gruesa en el extremo distal y b) una célula elongada con un alargamiento en un extremo. La longitud de las células varía de 1.5 μm a más de 5 μm . Las estructuras terminales sirven probablemente como organelos de adherencia durante la movilidad de desplazamiento exhibida por las células; también se ha descrito la rotación constante de las células cocoides. El microorganismo pierde la movilidad después de cultivos repetidos. Se puede demostrar la presencia de una matriz capsular extracelular por tinción con rojo de rutenio. También se han observado proyecciones similares a las de los mixovirus al microscopio electrónico. Las colonias en medio sólido tienen una apariencia granulada y vacuolada; tienen una tendencia pequeña a crecer dentro del agar; y el punto central está menos definido que en la mayoría de las otras especies de *Mycoplasmas*. Las características fisiológicas distintivas de esta especie se muestran en el cuadro 2. Produce ácido de maltosa, dextrina, glucógeno pero no partir de fructosa; mientras que se han reportado resultados conflictivos para galactosa.

Las colonias en medio sólido adsorben eritrocitos de carnero pero no células branquiales epiteliales de mono, rata, cuyo y pollo; también absorben espermatozoides de humano y toro. Además, el receptor de los eritrocitos no se destruye con neuraminidasa (Aguila y col., 1988).

Aunque una gran mayoría de las cepas de esta especie parecen constituir un grupo serológicamente homogéneo, han sido demostradas diferencias menores en pruebas de difusión en gel, entre la cepa C de Sabin (1941) y otras cepas murinas. Se ha demostrado la presencia de diferencias en la composición antigénica de ciertas cepas de origen no murino y se han demostrado antígenos comunes con otras especies

metabolizantes de glucosa, las cuales incluyen el *M. neurolyticum*, el *M. canis* y el *M. hyorhinis*.

El *M. pulmonis* es fuerte patógeno de ratones y ratas. Causante primario de enfermedad respiratoria crónica, una enfermedad lenta progresiva y muy común. Que se caracteriza en su estado agudo y crónico por rinitis, otitis media, conjuntivitis, laringotraqueitis y bronconeumonía llevando a bronquiectasias. La infección experimental del ratón por inoculación intranasal es dosis-dependiente y produce ya sea lesiones transitorias mínimas, enfermedad aguda fatal caracterizada por exudación de fluidos y un gran número de neutrófilos en los espacios alveolares o bronconeumonía crónica.

La enfermedad experimental en ratas no es dosis dependiente y se caracteriza por el desarrollo lento de enfermedad crónica en el pulmón. En las ratas, la enfermedad natural está acompañada, en más del 30% de animales hembras, por ooforitis y salpingitis que pueden ser producidos experimentalmente en ratas libres de patógenos por inoculación intravenosa. Un pequeño porcentaje de ratas machos con epididimitis y uretritis tienen *M. pulmonis* en los conductos eferentes. La enfermedad natural del tracto genital de ratones no ha sido reportada, pero lesiones similares a las observadas en ratas han sido producidas experimentalmente. Artritis purulenta aguda que puede llevar a artritis crónica dominada por infiltración celular mononuclear e hiperplasia del tejido sinovial puede producirse en ratas y ratones por inoculación intravenosa. La inoculación intracerebral del *M. pulmonis* en ratas recién nacidas induce hidrocefalia. La artritis aguda y crónica puede producirse en conejos por inoculación en la articulación de las rodillas (Cassel y Hill, 1979). La infección se adquiere normalmente de la madre durante los primeros días de vida. También se encuentra en la nasofaringe, conjuntiva y tracto genital de los cuyos, los hamsters chinos y sirios; y ocasionalmente en conejos. Algunas especies se han recuperado de la nasofaringe de caballos con enfermedad respiratoria aguda y febril (Barile y col., 1979).

1.5. *Mycoplasma capricolum*

Estos microorganismos se presentan en forma de células cocobacilares y filamentosas muy cortas. Estructuras intracitoplasmáticas, similares a las formas encontradas en el *M. mycoides*, han sido demostradas en cepas frescas aisladas de ésta especie. Las colonias en medio sólido pueden tener un diámetro de hasta 1cm (o más en algunos casos) y son por lo tanto similares en tamaño a las del *M. mycoides* subsp. *capri*

y la cepa LC (colonia larga) de *M. mycoides* subsp. *mycoides*. Se produce fuerte turbidez en cultivos en caldo después de 24 hr. Esta especie puede crecer con pequeñas cantidades de colesterol y los requerimientos de esterol pueden llenarse parcialmente con los precursores alquil-substituidos del colesterol. Bajos niveles de colesterol no son capaces de permitir el crecimiento del *M. capricolum*. Ninguno de los derivados de esterol que permiten el crecimiento probados son modificados metabólicamente (Odnozola y col., 1978, Dahl y col., 1980a, 1980b). Producen ácido a partir de glucosa y manosa, pero no a partir de esculina. Se ha demostrado que comparten antígenos con las dos subespecies de *M. mycoides* por la prueba de precipitación en crecimiento. Serológicamente son distintos de esta y otras especies de *Mycoplasma* y *Acholeplasma* por la prueba de inhibición del crecimiento e inmunofluorescencia.

El *M. capricolum* es patógeno para cabras bajo condiciones naturales y experimentales para borregos y cerdos. Aislado inicialmente de las articulaciones y bazo de cabras durante un brote en California, de una enfermedad de sorpresiva aparición con signos y síntomas como fiebre séptica, disminución o eliminación de la lactación, inflamación de las articulaciones de la pierna y conjuntivitis. A menudo la infección es rápidamente fatal para las crías. La patología de esta infección en cabras infectadas experimentalmente infectadas es similar a la observada en casos naturales con poliartitis fibrinopurulenta como la lesión sobresaliente. El microorganismo también se encuentra en la nasofaringe de cabras sanas y borregos y ha sido aislado en una ocasión de la mucosa urinaria de un borrego de rastro (Barile y col., 1979).

Cuadro 2. Características Bioquímicas del *M. pulmonis* (M.p.) y el *M. capricolum* (M.c.) (Krieg y Hott, 1984)

	C.G.	C.M.	H.A.	F.	F.P.	R.T.	H.G.	D.S.C	D.C.	H.	%M
Mc	+	+	d	+	-	+/+	?	+	?	-	24.1-25.5
Mp	+	+	-	-	+	-/+	-	-	-	d	27.5-29.2

C.G. = Catabolismo de Glucosa, C.M. = Catabolismo de Manosa, H.A. = Hidrólisis de Arginina, F = Fosfatasa, F.P. = Formación de Película, R.T. = Reducción de Tetraciclina, H.G. = Hidrólisis de Gelatina, D.S.C. = Digestión de Suero Coagulado, D.C. = Digestión de Caseína, H. = Hemadsorción, %M = %M.G.C del DNA

1.6. LOS MICOPLASMAS Y EL SISTEMA INMUNE.

Muchos productos derivados de diferentes cepas de *Mycoplasma* han sido propuésa como moduladores del sistema inmune en diferentes formas (Ruuth y Praz, 1989). Un producto del *Mycoplasma arthritidis* conocido como "MAS" estimula la

proliferación de linfocitos (Atkin, 1986) y la producción de interferón- γ (Kitchner y col., 1986); los *Acholeplasma* spp. (Sugama, 1990) y las membranas de los *Esrpplasma*s (Sher, 1990) estimulan la síntesis del Factor de Necrosis Tumoral - α (TNF- α) y las membranas del *M. arginini* o *M. arthritis* inducen la proliferación de macrófagos por la inducción del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Stuart, 1990). Una serie de reportes (Muhlradt, 1991), han descrito la presencia de material de alto peso molecular del *M. fermentans* que induce *in vitro* la producción de interleucina-6 (IL-6) y el papel de esta y otras interleucinas (IL-2, IL-4 y IL-6) en la generación de células T citotóxicas a partir de timocitos estimulados por el MDHM. Gallily y col. (Gallily, 1989), demostraron que la presencia de *M. orale* durante la incubación de macrófagos con células tumorales resulta en el aniquilamiento de estas últimas debido a la inducción del TNF- α . Lo mismo fue demostrado por Sher (Sher y col., 1990) usando membranas de *M. capricolum*, definiendo la similitud que existe entre el LPS y las membranas del *Mycoplasma* en cuanto a su capacidad inductora de monocinas.

Como estos ejemplos existen muchos artículos que establecen la actividad de los *Micoplasmas* o sus productos sobre las células inmunes, el cuadro 3 contiene un resumen de los reportes más importantes de esta área.

Aunque las manifestaciones clínicas asociadas con las infecciones por *Micoplasmas* son usualmente débiles, algunas infecciones pueden ser letales. La identificación de nuevas cepas con técnicas cada vez más sofisticadas para su detección está haciendo posible correlacionar más enfermedades con este microorganismo. Como ya se describió anteriormente estos microorganismos están obligados a vivir en la superficie o en la vecindad cercana de células eucariotes ya que no pueden sintetizar muchas moléculas precursoras.

La adherencia de los *Micoplasmas* a las células eucariotas es una necesidad para el uso efectivo de éstas como fuente de nutrientes. Es muy probable que la adherencia a la superficie del hospedero pueda, en sí misma, producir la amplia variedad de cambios celulares que ocurren durante las infecciones por *Mycoplasma*, tales como pérdida de cilios, ciliostasis, vacuolización citoplasmática, ruptura de mitocondrias, hiperplasia y metaplasia epitelial, formación de células gigantes, mitogénesis, citotoxicidad y secreción de inmunoglobulinas (Barile y col. 1979). Los *Micoplasmas* pueden inducir estos cambios por eliminación de nutrientes del medio ambiente de la célula eucariótica y/o afectando directamente el metabolismo del hospedero (McGarrity y col., 1984; Upchurch y Gabridge, 1983), liberando toxinas (Tully, 1981), interactuando con receptores (Matthes y col. 1988,

Berkoff y col . 1987; Wise y col . 1978) o induciendo la expresion de receptores (Fleisher, 1989; Lemke y col . 1985). Los *Mycoplasmas* poseen en sus membranas enzimas involucradas en el transporte de metabolitos que pueden interactuar con las funciones de la células hospederas (Dudler y col . 1988)

Cuadro 3 Efecto de algunos *Mycoplasmas* sobre el Sistema Inmune

ESPECIE	CÉLULA BLANCO	EFEECTO	REFERENCIA
<i>M. arginini</i>	células B murinas	mitógeno	Ruuth y col . 1985
<i>M. arginini</i>	macrófagos murinos	producción de GM-CSF	Stuart, 1990, Cole, 1986, Kurchner, 1986
<i>M. arthritis</i>	células T murinas y de humanos	mitógeno, IFN- γ -like	
<i>M. arthritis</i>	macrófagos murinos	producción de GM-CSF e IL-6	Homfeld y col . 1990 Stuart, 1990
<i>M. fermentans</i>	células B murinas	Síntesis de Ig	Silia y col . 1985
<i>M. fermentans</i>	monocitos humanos y macrófagos murinos	producción de IL-1, 6, TNF, prostaglandinas, óxido nítrico (NO) y efecto tumorigénico	Muhirad, 1990, 1991 y 1992
<i>M. gallisepticum</i>	macrófagos murinos	tumorigénico	Takema . 1991 Uno, 1990
<i>M. hominis</i>	macrófagos murinos	tumorigénico	Uno, 1990
<i>M. hyorhinis</i>	macrófagos murinos	tumorigénico	Uno, 1990
<i>M. hyorhinis</i>	células B murinas	mitógeno, síntesis de Ig	Proust, 1985
<i>M. neurolyticum</i>	células B murinas	mitógeno	Naot, 1977 Kaplan, 1986
<i>M. orale</i>	macrófagos murinos	tumorigénico	Loewenstein, 1983 Uno, 1990
<i>M. pneumoniae</i>	células B murinas y humanas	mitógeno	Biberfeld, 1976

Tales interacciones pueden jugar un papel en la inducción de los fenómenos autoinmunes y en su pobre aislamiento a partir de ciertas enfermedades asociadas comúnmente a estos microorganismos (Ruuth y Praz, 1989); alternativamente puede deberse al estacionamiento del microorganismo en sitios carentes de mecanismos efectores inmunes o a algún tipo de enmascaramiento antigénico como en el caso de algunas cepas que secuencian el antígeno Thy-1 y la IgG (Davis y col. 1981; Stanbridge y col., 1981; Watanabe y col., 1987). Además, se ha reportado que los tumores infectados con *Mycoplasmas* presentan mayor invasividad (Stackpole y col., 1988) y generación de metastasis (Dudler y col., 1988).

Varios *Mycoplasmas* han sido reconocidos como mitógenos policlonales para células T y/o B en forma restringida o no restringida al complejo mayor de

histocompatibilidad (MHC); los efectos mitogénicos son hospedero-específicos y más o menos célula-específicos (Cole y col., 1982; Naot y col., 1977). También se ha demostrado que los *Mycoplasmas* pueden inducir secreción de inmunoglobulinas de células B así como secreción de citocinas de líneas de monocitos. El hallazgo de que el *M. pneumoniae* induce transformación blastoide de linfocitos de pacientes con neumonía atípica primaria constituye una de las primeras descripciones de la actividad mitogénica *in vitro* de estos microorganismos (Barile y col., 1979). Esto se corroboró con la observación de que el *M. pneumoniae* actúa como un mitógeno policlonal para células B humanas y murinas (Biberfeld y Gronowicz, 1976; Biberfeld, 1977) y que los *Mycoplasmas* inducen "capping" en linfocitos (Stanbridge y Weiss, 1978). Posteriormente muchos grupos reportaron los efectos de varios tipos de *Mycoplasmas* sobre linfocitos de diferentes especies (Aldridge y col., 1977; Naot y col., 1977; Wise y col., 1978). La actividad biológica de los *Mycoplasmas* comúnmente es la activación de células efectoras en una forma irrestricta, no obstante se han reportado algunos casos de activación restringida por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (Bekoff y col., 1987; Cole y col., 1987).

Aunque la mayoría de los estudios reportan los efectos de los *Mycoplasmas* sobre los linfocitos está claro que los macrófagos pueden también ser estimulados (Dietz y Cole, 1981; Loewenstein y Gailly, 1984). Para tener un mayor entendimiento de los mecanismos por los que los *Mycoplasmas* inducen la expresión de citocinas proinflamatorias, Rawandi y colaboradores (1996) utilizaron tres líneas monocíticas (HL-60, U937 y THP-1) con las cuales demostraron que la inducción por *Mycoplasmas* es diferente a la realizada por el LPS bacteriano involucrando eventos postranscripcionales. Además, en las células THP-1 las vías de inducción de citocinas inducidas por los *Mycoplasmas* permanecen operables en condiciones donde las vías del LPS son abolidas, lo cual sugiere una independencia funcional. Estos mismos investigadores demostraron además que los constituyentes de las membranas fueron responsables de estos efectos, donde la fosforilación de tirosinas es un evento crucial. (Rawandi y col., 1996).

Existen dos cepas de ratas (LEW y F344) que difieren en su susceptibilidad a la infección con *M. pulmonis*; las ratas LEW son sensibles a la infección y desarrollo de la enfermedad mientras las ratas F344 no lo son (Davis y col., 1985). Las ratas LEW responden con más alto grado de activación policlonal a la activación con mitógeno y la inyección de *M. pulmonis* que las ratas F344. Hay una marcada diferencia en la producción de respuesta específica a la exposición de *M. pulmonis*; las ratas F344

producen 50 veces más IgG2b específica que las ratas LEW (Williamson y col., 1986, Simecka y Cassel, 1987). La producción de anticuerpos no ayuda a los animales a recobrase de la enfermedad respiratoria pero pueden protegerlo si se administran antes de la infección (Williamson y col., 1986).

En ratones, la exposición a *M. pulmonis* lleva a una respuesta específica de células B dependientes de células T en la cual la mayoría de las clones produce IgG, (Rose y Cebra, 1985). La respuesta específica a *M. pulmonis* se puede incrementar por la administración simultánea de sulfato de dextran (Kishima y col., 1987). Todo esto nos habla de que los efectos de los *Micoplasmas* sobre el sistema inmune pueden ser específicos de acuerdo a las cepas del *Micoplasmas* y la información genética del hospedero.

1.6.1. LOS SUPERANTÍGENOS DE LOS *MICOPLASMAS*.

Un grupo de moléculas activadores policlonales, conocidos como superantígenos se encuentran entre los más potentes mitógenos de células T. Se llamaron así por su habilidad para activar todas las células T que expresan secuencias comunes en su receptor de células T independientemente de su especificidad por el antígeno y MHC. A diferencia de los epítopos de células T que enlazan al sitio de unión del MHC y son reconocidos por el receptor de células T, los superantígenos parecen reconocer residuos fuera del sitio de enlace del MHC y el receptor de células T. Por lo tanto éstas moléculas enlazan simultáneamente al receptor de células T y las moléculas del MHC y activan un gran número de células. Incluidos entre los superantígenos están las enterotoxinas de *Staphylococcus* y la toxina del síndrome de choque tóxico no. 1 del *Staphylococcus aureus*. Éstas toxinas parecen activar gran número de células T cooperadoras por el entrecruzamiento de las moléculas de los receptores de células T con cualquier clase de molécula clase II expresada en una célula presentadora de antígenos. Se estima que una de cada cinco células T pueden ser activadas por los superantígenos produciendo la liberación de niveles anormales de citocinas, las cuales pueden llevar a choque y muerte en algunos casos (Kuby, 1992). Dentro de los *Micoplasmas* se detectó por primera vez la producción de un superantígeno en 1981 (Cole y col., 1981) conocido como MAM (mitógeno de *M. arthritis*) o MAS (*M. arthritis* superantígeno). El *Mycoplasma arthritis* es un artritógeno de roedores que causa una enfermedad crónica y recidiva que histológicamente semeja la artritis reumatoide humana. El mitógeno del *M. arthritis* (MAM) fue descrito cuando se demostró que los microorganismos vivos y los

sobrenadantes de cultivo inducen la proliferación de células citolíticas de bazo de ratón. Lo cual llevo al aislamiento de un potente mitógeno de células T e inductor de IFN- γ de linfocitos humanos y de ratón. Los estudios sobre los mecanismos de presentación de MAM a las células T y el reconocimiento de estas, sugirieron que este producto activaba a linfocitos de una forma novedosa. Ésta vía se sabe ahora que se asemeja a la de las moléculas incluidas dentro del grupo de los superantígenos (Cole y Atkin, 1991)

En un estudio reciente se comparó la capacidad de varios superantígenos de inducir la liberación de citocinas en células mononucleares periféricas humanas, se demostró que todas las toxinas probadas indujeron IL-1 α y β , IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ y TNF- α . Sin embargo, se encontró que la exotoxina enterogénica B del *Streptococcus pyogenes* tuvo especificidad por las células Th₂, mientras que las otras toxinas examinadas (enterotoxinas estafilococales A, B, C1, C2, C3, D y E, toxina del síndrome tóxico 1, toxina exfoliativa A y la exotoxina enterogénica C del *Streptococcus pyogenes*) estimularon tanto células Th₁ como Th₂. Como resultado, los superantígenos parecen ser capaces de desbalancear los antagonismos Th₁/Th₂. (Rink y col., 1996)

En otro estudio se estimularon leucocitos murinos y humanos con superantígeno de *M. arthritidis* (MAS), enterotoxina E de estafilococo (EES), o lipopolisacárido (LPS). La respuesta hacia MAS en humanos fue restringida a diferencia del LPS y EES, además el MAS mostró la misma capacidad de inducir las citocinas proinflamatorias IL-1, IL-6 e IL-8 como lo hacen EES y LPS, no obstante el MAS mostro una capacidad significativamente menor de inducir IL-10 (citocina anti-inflamatoria) e IL-1RA. En ratón la reactividad a MAS fue estrictamente restringida a moléculas de clase II en contraste con EES y LPS. La respuesta individual a MAS en humanos podría ser explicado por diferencias de haplotipos (Rink y col., 1996).

1.6.2. MICOPLASMAS Y ARTRITIS.

En 1940, Sabin y Johnson establecieron que era posible una etiología infecciosa para la artritis reumatoide ya que varios microorganismos patógenos causan enfermedades de las articulaciones, desde entonces se ha relacionado a varios agentes en la patogénesis de la artritis reumatoide con base en el aislamiento directo de un patógeno o la detección de un antígeno microbiano, la peptidoglicana ó componentes de ácidos nucleicos en tejidos inflamados de articulaciones o de un incremento en la respuesta de linfocitos sinoviales o de anticuerpos contra un patógeno específico (Barile y col., 1979).

Está bien documentado que la artritis séptica puede ser causada por varias especies de *Micoplasmas* (cuadro 1). Muchas de estas artritis infecciosas causan las mismas anomalías clínicas, fenómenos autoinmunes, anomalías inmunológicas y características patológicas que se observan en la artritis reumatoide incluyendo la formación de panus (ganglios linfáticos inflamados, sin supuración) (Barile, 1991).

Los *Micoplasmas*, las clamideas y las bacterias entéricas gram-negativas han sido relacionadas dentro de las causas de la artritis reumatoide y/o el síndrome de Reiter (Cole, 1985; Taylor y Robinson, 1985). Aunque las clamideas han sido recuperadas del tracto genital de pacientes con estas enfermedades, los fluidos de las articulaciones afectadas han sido consistentemente negativos para este patógeno (Keat, 1987). El involucramiento de las articulaciones es un rasgo común en las enfermedades sistémicas o respiratorias por *Micoplasmas* en humanos y animales. Se desarrolla artritis en humanos con neumonía primaria atípica (NPA), en gallinas y pavos con *M. gallisepticum*; en bovinos con *M. mycoides* subespecie *mycoides* o *M. bovis*; en cerdos infectados con *M. hyopneumoniae* y en cabras y borregos con *M. agalactiae*. Las secuelas no respiratorias en las infecciones por *Mycoplasma* incluyen las complicaciones hematológicas, neurológicas, cardiovasculares y musculoesqueléticas.

La artritis reumatoide es una enfermedad sistémica que frecuentemente involucra múltiples tejidos y anomalías autoinmunes, incluyendo el desarrollo de factor reumatoide y autoanticuerpos contra componentes vasculares y colágena. Las enfermedades por los *Micoplasmas* están asociadas frecuentemente con anomalías autoinmunes. Pacientes con NPA desarrollan aglutininas "frías" y aglutininas contra cerebro, pulmón y músculo, liso (Lind y col., 1988).

Los sueros de individuos infectados desarrollan agregación de plaquetas, lo que sugiere la posible formación de complejos inmunes durante la infección (Biberfeld y Norberg, 1974). Los rasgos histopatológicos de la vasculitis por artritis reumatoide semejan los de la enfermedad por complejos inmunes. El depósito de complejos inmunes y daño puede desarrollarse en pacientes con enfermedad por *Micoplasmas* y en ratones con artritis inducida por *M. pulmonis* (Washburn, 1980). Además los *Micoplasmas* pueden tener efectos más profundos sobre las funciones inmunológicas, lo cual sucede en pacientes con artritis reumatoide. Como se ha discutido anteriormente, varias especies de *Mycoplasma* y/o cepas pueden alterar, suprimir y/o modular las respuestas inmunológicas en humanos, animales y cultivos celulares infectados. En algunos pacientes infectados con *M. pneumoniae* puede presentarse una anergia a la tuberculina por más de cinco

meses (Biberfeld y col. 1976); este y otros *Mycoplasma* pueden actuar como activadores policlonales de células B en bazo y estimular la síntesis de DNA y anticuerpos no específicos, lo cual puede contribuir a la producción de autoanticuerpos durante la infección. Linfocitos de sangre cultivados, infectados con *M. pneumoniae* activaron la producción de anticuerpos no-específicos que fueron T dependientes (Biberfeld, 1985). Las infecciones por *Mycoplasma* en animales pueden causar la supresión de anticuerpos contra ciertos antígenos virales y bacterianos (Kaklamini y Pavlatos, 1972; Bergquist y col. 1974).

En general una revisión exhaustiva de la literatura indica que hay marcadas similitudes entre la artritis reumatoide humana y las enfermedades en las articulaciones de animales inducidas por *Micoplasmas*, sin embargo aún existen dudas acerca de la posibilidad de aislar al microorganismo de los sitios de inflamación (Barile y col., 1991)

Otros hallazgos recientes establecen por ejemplo que cuatro de 82 pacientes con el síndrome Guillain-Barre (GBS) y 1 de 12 con neuropatía motora multifocal quienes tuvieron infecciones previas con *M. pneumoniae* tuvieron anticuerpos séricos contra galactocerebrósidos (Gal-C). Como el Gal-C es un glicolípido importante en la mielina, un anticuerpo contra él puede actuar en la patogénesis de las neuropatías desmielinizantes autoinmunes (Kusunoki, 1995). Además se reportó un caso de inmunodeficiencia común variable (CVID) presentado como artritis séptica aguda debido a *M. hominis*. El diagnóstico fue aceptado hasta que se detectó la hipergammaglobulinemia y se recuperó el *Mycoplasma* de líquido sinovial (Steuer y col., 1996).

1.6.3. MICOPLASMAS Y SIDA

El anuncio que Luc Montagnier y su grupo hicieron en junio de 1991 durante la Conferencia Internacional sobre el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) acerca del presumible papel patogénico desarrollado en la determinación y subsecuente progresión de alteraciones patológicas en humanos infectados con el virus HIV, que tienen diferentes *Micoplasmas* como el *Mycoplasma incognitus* una cepa particular del *M. fermentans* (Saillard y col., 1990) identificado previamente en pacientes con SIDA (Lo y col., 1989), estimuló el interés por estudiar más la inmunología de estos microorganismos. Las infecciones por *Mycoplasma*, así como las causadas por retrovirus, se observan frecuentemente en borregos, cabras y bovinos en diferentes localizaciones del organismo y con varios grados de lesión después de la infección.

Con excepción del *M. pneumoniae*, el cual causa neumonía atípica, el papel de los *Mycoplasmas* humanos en enfermos de SIDA es difícil de establecer. Aunque varios desórdenes del tracto reproductivo y urogenital han sido asociados con el *Ureaplasma urealyticum* y *M. hominis* no se ha establecido su papel en el SIDA porque los microorganismos se encuentran frecuentemente en gente sana y enferma por igual (Taylor-Robinson y McCormack, 1980) El *M. genitalium* ha sido aislado de dos pacientes con uretritis no-gonococcica, pero la mayoría de los pacientes no tienen una clara evidencia de infección por *M. genitalium* . Los pacientes con SIDA son a menudo infectados con *Mycoplasmas* los cuales pueden comportarse como organismos oportunistas, como co-factores en la patogénesis o como agentes patógenos primarios (Lo y col., 1989; Chowdhury y col., 1990; Bauer y col., 1991; Anon, 1991).

El esfuerzo extenso hecho para comprender la compleja inmunopatología de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) ha hecho que los grupos de investigación enfoquen su atención en la hipótesis de un "superantígeno" del HIV y el posible requerimiento del *Mycoplasma* como cofactor. Sabiendo que una especie de *Mycoplasmas* posee "superantígenos", se discute actualmente un posible papel para la exacerbación de la enfermedad por proliferación o disfunción de células T inducida por los *Mycoplasmas* y proliferación de células B e hipergammaglobulinemia, así como la relevancia del hallazgo de homología en la secuencia de una adhesina de *Mycoplasma* y varias proteínas MHC clase II (Bisset y col., 1993).

Un *Mycoplasma* nuevo el *M. penetrans* muestra propiedades patobiológicas un tanto espectaculares: se adhiere a las superficies celulares, penetra profundamente en la célula, adsorbe fuertemente eritrocitos humanos y citoadsorbe monocitos y linfocitos humanos CD4+. Estas propiedades biológicas *in vitro* han mostrado previamente estar asociadas con la virulencia patogénica *in vivo* . La adhesión e invasión claramente involucran la estructura única de este microorganismo en forma de punta incrustada profundamente en el citoplasma de células de mamífero infectadas. La invasión extensiva del *Mycoplasma* en el citoplasma puede matar las células. Los mismos procesos patobiológicos de adhesión e invasión usando este organelo se han encontrado en el tracto urogenital de pacientes infectados. Ensayos *in vivo* e *in vitro* sugieren un papel patogénico de estos *Mycoplasmas* (Lo y col., 1993), coincidentemente este *Mycoplasma* ésta involucrado frecuentemente en pacientes con SIDA. No se encontró asociación entre el *M. penetrans* y el HIV, particularmente entre personas homosexuales pero su significancia clínica aún necesita ser investigada (Gruy y col. 1995).

En otro trabajo reciente se encontró que líneas de células T humanas y linfocitos T normales infectados persistente o agudamente con HIV-1 y *Mycoplasmas* liberaron peróxido de hidrógeno, una causa aparente de estrés oxidativo en éstas células, lo cual puede contribuir a la patogenicidad del HIV-1 (Chochola y col., 1995). Nirpaz y colaboradores (1995) transfectoron dos líneas celulares, los fibroblastos 293 y las células T Jurkat CD4+, con plásmidos que contenían elementos de replicación del HIV , y las infectaron con varias cepas de *Mycoplasmas* (*M. fermentans*, *M. penetrans*, *M. pirum*, y *Ureaplasma urealyticum*) monitoreándose la expresión de los genes incrustados, este trabajo muestra que estos microorganismos y específicamente sus membranas juegan un papel en la activación de los elementos genéticos del HIV (Nirpaz y col., 1995)

1.6.4. CANCER Y MICOPLASMAS

En los años sesentas dos estudios reportaron que la infección por *Mycoplasmas* (*M. orale* y uno no especificado) causaron cambios cromosómicos, pero los estudios no revelaron que células sufrieron transformación. Otro estudio reportó que la introducción de *Mycoplasma* en cultivos de células de riñón de hamster bebes (BHK) produjo transformación morfológica inmediata con alta eficiencia de clonación, sin embargo, se sabe que estas células tienen un alto grado de transformación espontánea (Tsai, y col., 1995). En 1986, Kotani y colaboradores reportaron que un espiroplasma de artrópodo transforma rápidamente las células de ratón y mono; sobre esto algunos investigadores han argumentado que los *Mycoplasmas* solamente introducen moléculas que imitan la transformación celular. Como la cuestión de si los *Mycoplasmas* pueden inducir transformación maligna de las células de mamíferos tiene mucha importancia en la biología de los tumores así como implicaciones clínicas directas muy importantes algunos investigadores han tratado de profundizar más en el hecho. Un trabajo reciente en esta área examinó los efectos transformantes de los *Mycoplasmas* en un sistema celular embrionario de ratón (C₃H/10T⁺ (C₃H)). Este sistema es uno de los pocos sistemas estándares accesible para estudiar agentes carcinogénicos potenciales en animales o humanos Usando este modelo los investigadores no observaron que los *Mycoplasmas* sean capaces de inducir la transformación celular antes reportada. Sin embargo observaron que los *Mycoplasmas* eran capaces de mediar un proceso de oncogénesis, siendo los *Mycoplasmas* asociados al SIDA como el *M. fermentans* (cepa *incognitus*) y el *M. penetrans* los que indujeron aparentemente transformación celular maligna gradualmente con muchas distintas etapas caracterizadas por la reversibilidad o

irreversibilidad de la transformación (Tsal, y col., 1995). Además se ha mostrado que la infección *in vitro* de linfocitos de sangre periférica humana por *Mycoplasmas* lleva a múltiples aberraciones cromosómicas, principalmente huecos de la cromátide y rupturas. El estrés oxidativo está involucrado como uno de los factores que causa daño cromosómico (Chernova y col., 1996). Se ha establecido que la fragmentación de DNA internucleosomal en células cultivadas bajo condiciones que inducen apoptosis puede deberse a las endonucleasas de *Mycoplasma* (Paddenberg y col., 1996).

1.6.5. OTROS FENÓMENOS CAUSADOS POR LOS *MICOPLASMAS*.

- a) El *M. neurolyticum* produce una leve conjuntivitis en ratón (Barile y col., 1979), también puede estar latente en el cerebro, incrementando su hasta que el animal muestra signos de alteraciones neurológicas (Tully, 1981). Este microorganismo vivo o muerto, o incluso sus membranas o sobrenadantes de cultivo inducen la enfermedad del arrastre ("rolling") en ratones infectados. Probablemente se deba a una toxina en la superficie celular del microorganismo (lipoglicanas) (Smith, 1987; Rothstein y Schreiber, 1988).
- b) Entre muchas cepas de *Mycoplasmas* probadas, la cepa incognitus demostró la más alta actividad de estimulación. Estos resultados sugieren que las células de *Mycoplasmas* interactúan con los sitios de unión de lisina en el activador de plasminógeno tejido-específico y el plasminógeno para mejorar la activación de plasminógeno (Tarshis y col., 1993).
- c) Los *Mycoplasmas* pueden estimular las células de la glia para producir citocinas y eicosanoides (leucotrienos y prostaglandinas) pudiendo ello contribuir a varias manifestaciones patológicas en el sistema nervioso central (Brenner y col., 1993).
- d) El *M. fermentans* puede activar el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal a través de un mecanismo central que involucra la hormona adenocorticotrópica (ACTH), este efecto es sensible al "feedback" negativo de los glucocorticoides. Es posible que los niveles elevados de glucocorticoides, producto de la infección por *Mycoplasma*, puedan estar involucrados en la patogénesis de las enfermedades asociadas con este microorganismo (Sandstedt y col., 1994; Weidenfeld y col., 1995).
- e) Las concentraciones incrementadas de productos de degradación de fibrinógeno en animales infectados con *M. pulmonis* indican que existe coagulopatía, sin embargo no se encontraron coágulos de fibrina intravasculares, además, en vez de disminuir como se esperaría durante una coagulopatía consumativa, las concentraciones de fibrinógeno se incrementaron. La hiperfibrinogenemia probablemente está asociada

con la respuesta de fase aguda a la infección con este *Mycoplasma* (Simecka y col., 1995)

- f) Fluido de lavado bronquioalveolar de cerdos experimentalmente infectados con *M hyopneumoniae* suprimieron la respuesta quimioluminiscente de neutrófilos polimorfonucleares porcinos. Este efecto supresor se correlacionó significativamente con la concentración de prostaglandina E₂ (PGE₂) en el fluido, además la PGE₂ purificada humana produjo el mismo efecto. Los niveles altos de PGE₂ que siguen a la infección con *M hyopneumoniae* pueden ser responsables de la supresión de la actividad de los PMN en la vías aéreas del cerdo y esto puede llevar a la exacerbación de infecciones secundarias en el pulmón (Asai y col., 1996).
- g) Cepas de *Mycoplasma* para bovinos fueron probadas en su capacidad para activar macrófagos alveolares bovinos *in vitro*. De interés particular fue el comportamiento del *M mycoides* ssp *mycoides* tipo de colonia pequeña (MMSC) el agente causal de la pleuropneumonia contagiosa bovina (CBPP). Se examinaron el incremento en la actividad procoagulante, y la producción de TNF- α y óxido nítrico (NO). Cuatro de las siete cepas indujeron PCA sin importar la patogenicidad y todas las cepas produjeron moderadas cantidades de NO a altas concentraciones, todas las cepas examinadas indujeron TNF- α a bajas concentraciones (10⁶ UFC) con excepción del *Acholeplasma laidlawii* (Jungi y col., 1996).
- h) Un producto de alto peso molecular de los *Micoplasmas* es un lípido que se purificó del *M fermentans*. Se estudió por ELISA la influencia de este producto sobre la expresión de moléculas de MHC clase II de macrófagos peritoneales de ratón. MDHM altamente purificado (4ng/ml) y 0.8mg/ml de *M. fermentans* inactivado por calor dieron la máxima respuesta en la supresión de la inducción de moléculas clase II dependiente de IFN- γ . El MDHM no fue tóxico y no produjo la pérdida de células adherentes. Datos de cinética mostraron que el MDHM primero aumento y después disminuyó la expresión de moléculas de clase II. Ésta supresión impidió la presentación de antígeno a líneas celulares de linfocitos T. Los investigadores intentaron identificar los productos que mediaron ésta supresión de los cuales se excluyeron el IFN, las prostaglandinas y el óxido nítrico. De las citocinas (TNF, IL-6, IL-10 y el TGF- β) sólo la IL-10 inhibió la expresión de las moléculas clase II incrementando su recambio y al mismo tiempo inhibe la formación de nuevas moléculas clase II (Frisch y col., 1996).

Toda la información relatada anteriormente lleva a una idea: los *Micoplasmas* tienen la capacidad de influir fuertemente en la respuesta inmune. La relación básica que

encontramos entre las infecciones por estos microorganismos y otras enfermedades (con excepción del cancer) es a nivel inmunológico, aparentemente los efectos en el sistema inmune del hospedero son los impulsores (o coadyuvantes) de la gravedad de estos males. Sin embargo, lo que aún no se logra comprender completamente es como los *Micoplasmas* usan todos estos mecanismos de manera orquestada *in vivo* para mantenerse en el hospedero, algunas veces hasta permanentemente. Este aspecto de la infección por *Micoplasmas* conocido como cronicidad ha sido como tal, poco estudiado, hasta la fecha se ha inferido que los efectos de los *Micoplasmas* sobre el sistema inmune afectan directamente sobre la cronicidad de la infección pero existen pocos trabajos que indiquen como estos microorganismos utilizan todos estos recursos en conjunto para evadir su destrucción.

La cronicidad de cualquier enfermedad infecciosa se debe principalmente a la forma efectiva de los microorganismos de escapar de los mecanismos de defensa del hospedero, estos mecanismos se pueden dividir en dos grupos.

- 1) Los mecanismos de evasión que tienen como fin distraer la respuesta inmune del individuo (imitación de moléculas, desprendimiento de moléculas antigénicamente importantes, adsorción de moléculas del hospedero)
- 2) Los mecanismos de evasión que tienen como fin afectar directamente al sistema inmune (superantígenos, moléculas fuertemente activadoras de células, moléculas con actividad de citocina).

Los *Micoplasmas* tienen ambos tipos de mecanismos, lo que se considera que los hace altamente efectivos para escapar de la respuesta inmune. Sin embargo, es necesario determinar de una forma más precisa la relación entre la sobrevivencia del microorganismo y los efectos que éste tiene sobre el sistema inmune del hospedero (la capacidad de inmunomodular el sistema inmune del hospedero). Los avances en la inmunología permiten en la actualidad contar con un gran número de reactivos que mejoran el estudio de poblaciones celulares, receptores y demás componentes del sistema inmune principalmente en ratones. Por otro lado la infección de roedores por *M. pulmonis* presenta las principales características de las enfermedades causadas por estos microorganismos, entre estas: alta cronicidad y desarrollo de neumonía con desencadenamiento a largo plazo de un proceso artrítico. Es por esto que se planteó la realización de este estudio con el fin entender si estos microorganismos son capaces de modificar la respuesta inmune *in vivo* a lo largo del proceso infeccioso, así como determinar cuales son los mecanismos por los cuales produce esta inmunomodulación.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GENERALES.

- 1.1. Caracterizar los efectos inmunomoduladores de *M. pulmonis* *in vivo*.
- 1.2. Establecer los posibles mecanismos por los cuales el *M. pulmonis* es *in vivo* capaz de modificar el curso de la respuesta inmune de animales infectados

2.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

- 2.2.1. Determinar el efecto de la infección por el *M. pulmonis* sobre la respuesta inmune humoral.
- 2.2.2. Determinar el efecto de la infección del *M. pulmonis* sobre la respuesta inmune celular.
- 2.2.3. Definir los cambios que ejerce la infección por el *M. pulmonis* en las subpoblaciones de linfocitos.
- 2.2.4. Determinar los niveles de las principales interleucinas representativas de subpoblaciones de células T (T_{H1} y T_{H2}) inducidos por los *M. pulmonis* *in vivo* e *in vitro*.

3.- MATERIAL Y METODOS

3.1. MATERIAL.

3.1.1. CEPAS.

3.1.1.1. Microorganismos.

- a) *Mycoplasma pulmonis* ATCC 19612 (Mp)
- b) *Mycoplasma capricolum* ATCC 27343 (Mc)

3.1.1.2. Animales.

Se utilizaron ratones Balb/c machos de 25 a 30gr, criados en el bioterio de la Coordinación de Posgrado de la FES-Cuautitlán, UNAM.

3.1.2. REACTIVOS.

Todas las soluciones amortiguadoras utilizadas fueron preparadas con sustancias grado reactivo, SIGMA, además se utilizaron Penicilina G, Lakeside; Solución salina fisiológica estéril libre de pirógenos, Abbott, eritromicina y tetraciclina, Lakeside; Tinta china, Rotring Art 591017; Gelatina, GIBCO; Tween 20, SIGMA; Proteína A peroxidada, SIGMA, no.cat. P8651; α -cloro-1-naftol marca SIGMA; suero fetal bovino, SIGMA; Histopaque, SIGMA; anti-CD4 de ratón, SIGMA no.cat. F-7400 clona H129.19; anti-CD8 de ratón, SIGMA no.cat. P-3067, clona 53-6.7; albúmina sérica bovina, SIGMA; suero estéril de caballo, GIBCO.

3.1.3. EQUIPO.

Se utilizaron un Citómetro de Flujo, modelo FacSort, Beckton Dickinson; lector de ELISA marca BIORAD modelo 3550; Lector de centelleo, Beckman modelo RS-3450.

3.1.4. MEDIOS DE CULTIVO.

Las condiciones de cultivo utilizadas en ambos *Mycoplasmas* fueron las siguientes:

a. Medio de Edward (ME) líquido:

PPLO caldo	21g ¹
Extracto de levadura	100ml ²
Suero Estéril de caballo	200ml ²
Glucosa al 1%	20ml ²
Penicilina G	10,000 U.I./ ml
Acetato de Talio	0.075% ¹
Agua destilada	680ml
Rojo de Fenol	0.05% ¹
	pH 7.2 - 7.4

b. ME agar. Todo lo anterior más:

PPLO agar	3.5g ¹
Agua	70ml

Otros medios de cultivo utilizados fueron: RPMI-1640, SIGMA no. cat. R7634; MEM-alpha MEDIUM, SIGMA no. cat. M1018; PPLO caldo y agar, GIBCO.

La preparación de soluciones amortiguadoras y otras formulaciones se encuentran en el APÉNDICE.

¹ Esterilizado en autoclave a 121° C/15 min

² Esterilizado por filtración con membranas de 0.22 µ

3.2. METODOLOGIA.

3.2.1. Determinación de las Unidades Formadoras de Colonias.

Se inocularó el microorganismo en un tubo con 3 ml de caldo de medio edward (ME) utilizando una sola colonia obtenida del crecimiento del *Mycoplasma* en medio solido, incubando el tubo posteriormente a 37°C durante 10 días para el *M. pulmonis* y 2 días para el *M. capricolum*. Después de este tiempo el contenido de el tubo se vertió a una Botella Roux con 100ml de caldo de medio edward y se incubo otros días para despues de este tiempo agregar 10 ml de este cultivo a otras 10 botellas Roux con 100ml del mismo caldo ME y se continuo la incubacion a la misma temperatura. Posteriormente, se mezcló el contenido de todas las botellas y se centrifugo a 5.000 rpm (Sorvall, rotor SS-34) por 30 min y se lavo dos veces con SSF. La pastilla resultante se suspendio en 1ml de caldo ME y se realizaron diluciones decimales seriadas del microorganismo en caldo ME. Se inocularó por triplicado 1 µl de cada dilución en placas de petri de 15x100 mm que contenian agar ME acomodando 4 a 5 diluciones por placa. Después de la incubacion a 37°C durante los días necesarios. Después del periodo de incubacion, se contaron las colonias en cada dilucion y se expresaron como unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro.

3.2.2. Caracterización Biológica de las Cepas de Mp y Mc (Krieg and Hott, 1984).

3.2.2.1. Crecimiento a 34° y 38°C.

Se inocularon placas de agar ME con las dos cepas y se incubaron a las temperaturas a estudiar determinando posteriormente el grado de crecimiento.

3.2.2.2. Crecimiento en condiciones aerobias y anaerobias.

Se inocularon placas de agar ME con las dos cepas y se incubaron en condiciones aerobias y anaerobias (jarras BBL Gas-Pack 100 anaerobic system con sobres de anaerobiosis) a 37°C determinando posteriormente (3 días y 10 días respectivamente) el grado de crecimiento.

3.2.2.3. Adsorción de Eritrocitos de Carnero.

Las cepas fueron inoculadas en agar ME y se incubaron a 37°C hasta que aparecieron colonias. Posteriormente se cubrieron con 0.5 ml de una suspensión al 0.5%

de eritrocitos de carnero en SSF. Después de 30 min de incubación a temperatura ambiente los cultivos se lavaron tres veces con amortiguador de fosfatos y se determinó la presencia de adsorción de eritrocitos de carnero a la superficie de las colonias.

3.2.2.4. Hemólisis.

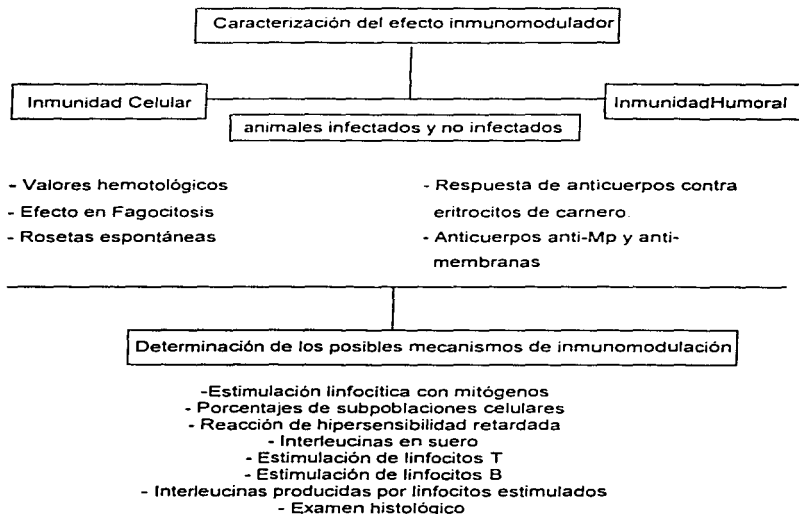
La producción de hemolisina se determinó por inoculación de 10^3 UFC en agar ME con 5% de EC. Los cultivos se incubaron a 37°C por el tiempo necesario y se detectó la presencia de hemólisis alrededor de las colonias.

3.2.2.5. Sensibilidad a antibióticos.

Las cepas se inocularon en 10ml de caldo ME y se incubaron el tiempo suficiente dependiendo de la especie a 37°C, se ajustó una suspensión de 10^9 UFC/ml. Las placas se prepararon para la prueba humedeciendo un hisopo en el caldo con los microorganismos y frotándolo en la superficie del agar. Cuando la superficie de la placa se secó, se colocaron discos de papel filtro estériles presionándolos para asegurar el contacto y se aplicaron 1.25 mg de eritromicina y 125 µg de tetraciclina en 25 µl de SSF estéril. Las placas se incubaron posteriormente el tiempo necesario para el desarrollo de las colonias. Determinando posteriormente la presencia de crecimiento alrededor de los discos.

3.2.2.6. Diseño Experimental.

El siguiente diagrama de flujo muestra la secuencia de las actividades experimentales desarrolladas:



3.2.3. Producción de la enfermedad respiratoria crónica en ratones.

Se inocularon 10^9 UFC de Mp en SSF a ratones machos Balb/c de aproximadamente 25 a 30g por aerosolización. Los animales se colocaron en una cámara de aerosolización (diseñada en el laboratorio de Virología de la Coordinación de Estudios de Posgrado de la FES-Cuautitlán) completamente sellada en la zona de exposición de los ratones y con un conducto que conectaba a una trampa de alcohol al 70% en donde burbujaba el aire de salida de la cámara, en la cual permanecieron 15 min en un ambiente saturado de aerosoles (el tiempo y la concentración del microorganismos fueron previamente estandarizados comprobándose el desarrollo de la enfermedad observando los signos y síntomas en los animales y por aislamiento del microorganismos de los pulmones de los animales comparándolos con pulmones de animales que no fueron infectados). Los animales fueron sacrificados en un tiempo determinado de acuerdo a las necesidades del estudio realizado.

3.2.4. Obtención de suspensiones enriquecidas de membranas de Mc y Mp.

Se inoculó el microorganismo en un tubo con 3 ml de caldo de medio edward (ME) utilizando una sola colonia obtenida del crecimiento del *Mycoplasma* en medio sólido, incubando el tubo posteriormente a 37°C durante 10 días para el *M. pulmonis* y 2 días para el *M. capricolum*. Después de este tiempo el contenido de el tubo se vertió a una Botella Roux con 100ml de caldo de medio edward y se incubo otros días para después de este tiempo agregar 10 ml de este cultivo a otras 10 botellas Roux con 100ml del mismo caldo ME y se continuó la incubacion a la misma temperatura. Posteriormente, se mezcló el contenido de todas las botellas y se centrifugó a 10,000 rpm (Sorvall, rotor SS-34) por 30 min y se lavó dos veces con SSF. La pastilla resultante se suspendió en 5 ml de SSF y se aplicó el método de choque osmótico utilizado por Razin (1964) el cual consiste en transferir una suspensión de células lavadas en NaCl 0.25 M (conteniendo de 10 a 20 mg de proteína celular por ml) a 50-100 volúmenes de agua desionizada o bidestilada precalentada a 37°C. Se realizó una centrifugación posterior a 10,000 rpm (Sorvall, rotor SS-34) con el fin de separar los microorganismos que aún estaban completos y las membranas se colectaron, después de 15 min de incubación, por centrifugación a 20,000 rpm (Sorvall, rotor SS-34) por 30 min. Las membranas se lavaron consecutivamente en agua desionizada, después en NaCl al 0.05M en amortiguador de fosfatos 0.01 M (PBS) pH 7.5, y con agua desionizada. Finalmente se

almacenaron a -20°C en SSF (Razin, 1968). El contenido proteico del extracto se calculó utilizando la metodología de Bradford (1976).

A) CARACTERIZACION DEL EFECTO INMUNOMODULADOR.

3.2.5. Efecto de la infección por *M. pulmonis* y preparados membranales de Mc y Mp en los valores hematológicos de ratones.

Se formaron 3 grupos de 5 ratones Balb/c, el grupo 1 fue inoculado por inhalación con Mp como se indico anteriormente, el grupo 2 se inoculo subcutaneamente (SC) con 0.5 ml de preparacion de membranas conteniendo aproximadamente 100 µg/ml de proteina celular y el tercer grupo se inoculo SC con 0.1 ml de SSF. Se determinaron los valores hematológicos del primer grupo a los 10 dias postinfección, del grupo dos 48 hr después de la inoculación y el grupo tres a las 48 hr. Las mediciones hematológicas que se realizaron fueron (ver Apéndice):

- a) Conteo Celular para Células rojas
- b) Conteo de Leucocitos
- c) Cuenta diferencial (polimorfonucleares y linfocitos).
- d) Conteo de Plaquetas.

3.2.6. Efecto de la infección por *M. pulmonis* y preparados membranales de Mc en el peso del bazo de ratones.

Tres grupos de 5 ratones BALB/c machos de 2 meses de edad se inocularon por aerosolización con Mp en la forma antes descrita. Al grupo 1 se le extrajo el bazo a la semana del inicio de la infección, el grupo 2 fue estudiado a la segunda semana después del inicio de la infección y el grupo 3 se estudió a la tercera semana después del inicio de la infección. Además a otros dos grupos de ratones se les inoculó una suspensión membranal (con un contenido proteico de 100µg/ml) preparada de acuerdo al inciso 3.2.4, los cuales se sacrificaron 72 hr. después y se les removió el bazo obteniéndose en ambos casos el peso relativo del bazo (peso del bazo/peso del animal).

3.2.7. Efecto de la infección por *M. pulmonis* en la respuesta inmune contra eritrocitos de carnero (EC).

Se inocularon 35 ratones con Mp, de la forma antes descrita, para desarrollar la enfermedad respiratoria crónica, a los cuales se les inoculó al día 0 (al mismo tiempo que la inoculación del microorganismo) 0.1 ml de una suspensión de eritrocitos de carnero al 5%. Estos ratones se fueron sacrificando en grupos de 5 a los días 0, 3, 5, 7, 14, 21 y 28 obteniendo muestras de sangre para determinar los títulos hemaglutinantes y porcentaje de fagocitosis.

3.2.8. Efecto de la inoculación de membranas de Mp y Mc en la respuesta inmune contra eritrocitos de carnero.

Se inocularon 70 ratones con 0.5 ml de preparados membranales de Mc (35) y Mp (35) conteniendo 100 mg/ml de proteína celular, y el mismo día con 0.1 ml de suspensión de eritrocitos de carnero al 5%, se sacrificaron en grupos de 5 ratones los días 0, 3, 5, 7, 14, 21 y 28 obteniéndose sangre para determinar los títulos hemaglutinantes.

3.2.9. Efecto de la infección por *M. pulmonis* sobre la fagocitosis (Rose y Bigazzi, 1973).

Se utilizaron muestras de sangre de los ratones agrupados en el inciso 3.2.6 para calcular el porcentaje de fagocitosis utilizando la siguiente metodología:

- Preparación de granulocitos. Se obtuvo sangre completa fresca la cual se dejó coagular sobre un portaobjetos limpio, se retiró el coágulo cuidadosamente y se lavaron los granulocitos adheridos utilizando una gota de medio RPMI.
- Preparación de levadura para pan. Levadura regular de pan se suspendió en solución salina 0.9%, se colocó en autoclave a 120°C por 15 min., se filtró dos veces a través de una gasa estéril y se ajustó a una densidad de 3.7×10^7 cels./ml.
- Prueba de fagocitosis. Los PMN adheridos al portaobjetos se cubrieron con 200 μ l de la suspensión de levadura previamente opsonizada con anticuerpos. Se incubó la mezcla 30 min a temperatura ambiente y se contaron las células que ingirieron más de tres levaduras.
- Cálculo del Porcentaje de Fagocitosis (%F): No. de células con más de tres partículas ingeridas / número total de granulocitos.

3.2.10. Efecto de la inoculación de membranas de Mp y Mc en el Porciento de Fagocitosis.

Se utilizaron muestras de sangre de los ratones agrupados en el inciso 3.2.7 para calcular el porciento de fagocitosis utilizando la metodología señalada en el inciso anterior (2.9.).

3.2.11. Efecto de la infección por Mp en la Eliminación de Carbón Coloidal (Kaklamani y col., 1991).

Cuatro grupos de 5 ratones Balb/c machos de 2 meses de edad se inocularon con Mp de la forma anteriormente descrita. El grupo 1 fue el control inoculado con SSF libre de pirógenos. Al grupo 2 se le aplicó la técnica de eliminación de carbón coloidal a la semana del inicio de la infección, el grupo 3 fue estudiado con la misma técnica a la segunda semana después del inicio de la infección y el grupo 4 se estudió a la tercera semana después del inicio de la infección. La técnica de eliminación de carbón coloidal que se utilizó es la siguiente: cada ratón se inoculó con una inyección intravenosa de una suspensión de 0.3 ml de tinta china (indian ink, Rotring Art), precalentada a 37°C (1.6 ml de tinta diluida en aprox. 8.4 ml de solución de gelatina en NaCl al 1%). Se tomaron muestras de sangre en intervalos de aproximadamente 0, 3, 7, 10 y 30 min del plexo retroorbital (25 µl de sangre en 2 ml de agua destilada para lisar los eritrocitos). Al final se midió la absorbancia de cada muestra a 650 nm. Las lecturas del logaritmo de la absorbancia graficadas contra el tiempo dan aproximadamente una línea recta y son un indicador del grado de funcionamiento fagocítico del sistema retículo endotelial.

3.2.12. Efecto de la inoculación de suspensiones membranales en la Eliminación de Carbón Coloidal.

Se formaron dos grupos con 5 ratones Balb/c machos de 2 meses de edad los cuales se inocularon subcutáneamente con concentrado de membranas de Mp y Mc respectivamente. El inóculo fué de 0.5 ml de una preparación con 100 mg/ml de proteína celular. La técnica que se utilizó es la mencionada en el inciso 2.11, la cual se aplicó 24 horas después de la inoculación de membranas. En ambos casos (inciso 3.2.11 y 3.2.12) el grupo control estuvo formado por tres ratones inoculados con SSF libre de pirógenos.

3.2.13. Determinación del título de anticuerpos anti-Mp durante la infección respiratoria crónica de ratones (Barcenas y Rodríguez, 1990).

Se obtuvo suero de los grupos de animales utilizados en el experimento del inciso 3.2.6 a los cuales les fueron determinados los títulos de anticuerpos contra Mp utilizando la prueba de Dot-ELISA de la siguiente forma. Se colocaron discos (6-7 mm de diámetro) de papel de nitrocelulosa sensibilizados previamente con el antígeno (50 µl de una preparación con 10 mg/ml de proteína celular de Mp en cada disco) en tubos de ensayo, se agregaron 100 µl de las diluciones del suero problema y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se lavaron los discos tres veces con 750 µl de solución TBS-Tween 20 al 0.05%, la tercera vez se dejaron los discos 10 minutos con la solución de lavado. En seguida se agregaron 100 µl de la solución de conjugado (previamente titulado) a la dilución adecuada en TBS-leche descremada al 1%, incubándose 1 hr a temperatura ambiente. El procedimiento de lavado descrito anteriormente, se repitió luego de la incubación con el conjugado. Por último se agregaron 150 µl de solución de revelado (1,1-cloronaftol, ver apéndice), incubándose 30 min a temperatura ambiente. La solución reveladora se descartó, se lavaron los discos con TBS y se dejaron secar a temperatura ambiente. Los discos positivos se tiñeron color violeta, el título se definió como la última dilución de suero que enfrentada a discos sensibilizados produjo color. Los detalles de las soluciones utilizadas se presentan en el apéndice.

3.2.14. Determinación del título de anticuerpos anti-Mp y anti-Mc después de la inoculación de concentrados de membranas de Mp y Mc en ratones Balb/c.

Se obtuvo suero de los grupos de animales utilizados en el experimento del inciso 3.2.7 a los cuales les fueron determinados los títulos de anticuerpos contra Mp y Mc utilizando la prueba de Dot-ELISA explicada en el inciso 3.2.13.

3.2.15. Efecto de la infección por Mp en la formación de rosetas "E" (Mishell y Shligi, 1980).

Se inocularon 5 ratones BALB/c machos con Mp como se describió anteriormente para desarrollar la enfermedad respiratoria crónica y 5 ratones Balb/c inoculados SC con

0.1 ml de SSF libre de pirogenos los cuales fueron sacrificados en el día 10 post-infección para obtener los bazos, los cuales fueron procesados para determinar el porcentaje de Rosetas Espontáneas bajo la técnica siguiente.

1. Se colocaron 0.9 ml de EC en 2 tubos de 12X75 mm
2. Se añadieron 0.1 ml de células de bazo tratado a un tubo y 0.1 ml de suspensión celular de bazo normal al tubo
3. Se centrifugaron los 2 tubos a 500 rpm (Sorvall, rotor SS-34) durante 15 min en una centrifuga clínica
4. Con una micropipeta se resuspendió suavemente la pastilla celular y se colocó una alicuota pequeña en un hematocitometro
5. Se contó el número de linfocitos con 5 o más células rojas adherentes que estuvieron presentes en los 4 cuadrados grandes. Se multiplicó este número por 2500 para determinar el número de células positivas por 10^6 células del bazo

3.2.16. Efecto de la inoculación de concentrados de membranas de Mp y Mc en la formación de rosetas "E".

Se formaron tres grupos de cinco ratones Balb/c machos de dos meses de edad. Dos de estos grupos fueron inoculados SC con Mp y Mc respectivamente (0.5 ml de suspensión con 100 mg/ml de proteína celular) y uno fue inoculado con 0.1 ml de SSF libre de pirógenos, los ratones fueron sacrificados 24 hr después para obtener los bazos y determinar el porcentaje de Rosetas espontáneas utilizando la técnica mencionada arriba (inciso 3.2.15.).

B) DETERMINACION DE LOS POSIBLES MECANISMOS DE INMUNOMODULACION.

3.2.17. Efecto de las membranas de Mc sobre la estimulación linfoblástica de células del bazo de ratones Balb/c (Mishell y Shligi, 1980) .

Se obtuvo el bazo de tres ratones en condiciones estériles y se procesó de acuerdo a la metodología mencionada en el apéndice con el fin de obtener una preparación homogénea de linfocitos. Estos linfocitos se purificaron por centrifugación en gradiente de Ficoll, usando el homogeneizado de bazo. La preparación celular se ajustó a una densidad de 5×10^5 cels./ml. y se agregaron 0.2 ml de esta preparación en cada pozo de una placa de cultivo con 96 pozos junto con 20 μ l de la suspensión de membranas en

varias concentraciones (2.6, 5, 10 μg de proteínas celulares/ml) disueltas en medio RPMI-1640, e incubadas en 5% CO_2 , 95% aire y humedad relativa de 90%, por 88 hrs. Las células con solo medio sirvieron como el control para el nivel de estimulación, 18 hr antes del fin del periodo de incubación, se añadió 0.17 μCi de timidina (H^3) a cada pozo. Las células se cosecharon con un cosechador automatico y la cantidad de timidina incorporada se cuantificó en un contador de centelleo beta (Beckman). La prueba se hizo por triplicado.

3.2.18. Determinación del Porcentaje de subpoblaciones celulares CD4+, CD8+ y doble positivas en sangre, bazo y timo.

Se sacrificaron grupos de 5 ratones infectados a diferentes periodos de la infección, de los cuales se extrajeron el timo, el bazo (trozos de estos órganos se utilizaron en el estudio histológico) y aproximadamente 2 ml de sangre por punción intracardiaca. Al mismo tiempo se sacrificaron 2 ó 3 ratones no infectados que se utilizaron como controles. Los timocitos se extrajeron por maceración del timo, lavados 2 veces con SSF libre de pirógenos. Las células de bazo se extrajeron por picado de este órgano en condiciones estériles, separando los restos de tejido y pasando la suspensión celular resultante a través de un volumen semejante de Ficoll-Hypaque para eliminar los eritrocitos, la muestra de sangre también se separó por un volumen semejante de Ficoll-Hypaque. Las suspensiones de leucocitos obtenidas en todos los casos se ajustaron a una concentración de 1×10^6 células/ml en una solución amortiguadora conteniendo PBS pH = 7.2 + glucosa 20 mM + 5% de suero de rata, y se siguieron los pasos que a continuación se mencionan:

- a. Se diluyeron 5 μl del anticuerpo conjugado (anti-CD4 fluoresceinado y anti-CD8 rodaminado, SIGMA Co.) en 45 μl de PBS (1:10) (estos valores se obtuvieron después de realizar la titulación correspondientes de los conjugados).
- b. Para cada experimento se prepararon los siguientes grupos control: células sin anticuerpos para la autofluorescencia; células con anti-CD4-FITC y células con anti-CD8-RPE, por separado para la compensación de colores.
- c. Se incubaron durante 30 min. a temperatura ambiente, cubriendo los tubos con papel aluminio.
- d. Se agregó 1ml de amortiguador diluyente que consistió de PBS = 7.2 + glucosa 20 mM + 0.5% de albúmina sérica bovina.

- e. Se centrifugaron los tubos dos veces a 1000 rpm x 10 min.
- f. Se desecaró el sobrenadante
- g. Se resuspendió la pastilla en 0.250 ml de paraformaldehído o formaldehído al 2% en PBS
- h. Se leyeron las muestras por duplicado en un citómetro de flujo (FacSort, Beckton Dickinson).

3.2.19. Determinación de los niveles de interleucinas.

Se tomaron muestras de suero de los animales utilizados en el experimento descrito en el inciso 3.2.18, las cuales fueron utilizadas para cuantificar los niveles de interleucina 4 (IL-4) e Interferón- γ usando los sistemas de ELISA. Intertest-4x (IL-4) y Intertest-gamma (IFN- γ) producidos por los laboratorios Genzyme, Corp los cuales se desarrollan de la forma descrita en el apéndice.

3.2.20. Influencia de la infección por *M.pulmonis* en la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) a albúmina sérica bovina (ASB) inoculada intraplantarmente a ratones (Cher y Mossman, 1987).

Se inocularon 30 ratones Balb/c machos por aerosolización como se describió anteriormente, dejando 20 ratones sin inocular como controles. Se inocularon 100 mg de ASB en 1 ml subcutáneamente 7 días antes de realizar la prueba, cumplido ese tiempo se desafió el cojinete plantar derecho de los ratones con 100 μ g de ASB para producir una respuesta DTH. El cojinete plantar izquierdo se usó como un control y se inoculó con SSF. La inflamación del cojinete plantar fue medida 24 hrs. después con un micrómetro (Mitutoyo, Japón). El grado de reacción se calculó de la siguiente forma:

Grado de reacción (mm) = (grosor del cojinete después del desafío - grosor del cojinete antes del desafío) - grosor neto del cojinete contralateral inyectado con SSF estéril.

3.2.21. Eliminación de linfocitos T de suspensiones celulares de bazo usando anti-Thy 1.2 y complemento (Fong y Mossman, 1990).

Se obtuvo una suspensión de bazo como se indica en el apéndice y se le sometió al siguiente tratamiento: Las células de bazo de ocho ratones Balb/c no inmunizados, fueron mezcladas y se eliminaron las células T incubando dos veces esta suspensión con un

anticuerpo anti- Lyt 2 1 más complemento de cobayo. Como control positivo, células de bazo fueron incubadas por dos ciclos con Complemento solamente. Después del tratamiento con complemento todas las poblaciones celulares fueron centrifugadas sobre gradientes de Ficoll-Hypaque y se colectaron las células viables de la interfase. Para establecer la eficacia de la depleción, se tomaron alícuotas de las células de bazo y se analizaron con el citómetro de flujo, utilizando anti-CD4 fluoresceinado y anti-CD8 rodaminado bajo el procedimiento descrito en el inciso 3.2.18.

3.2.22. Determinación de los niveles de Interleucinas producidos por preparaciones de linfocitos T de animales sanos y animales infectados separados con el Sistema Dynabeads y estimulados con diferentes mitógenos.

3.2.22.1. Aislamiento de Linfocitos T.

El aislamiento inmunomagnético de células usando Dynabeads provee un método rápido y confiable para el aislamiento de células Thy 1.2 positivas está diseñado para una selección efectiva y separación de células Thy 1.2 positivas a partir de una suspensión celular. Las células pueden aislarse directamente de muestras de tejidos. Las perlas son prelavadas y añadidas directamente a la suspensión celular conteniendo células Thy 1.2 positivas. Durante un periodo de incubación las perlas enlazan a las Thy 1.2 positivas y después las células pueden ser aisladas usando un mecanismo magnético. Las células seleccionadas negativamente en el sobrenadante pueden pipetarse y usarse directamente en varias aplicaciones ya que están sin alterarse. La forma de preparación y utilización de este sistema se puede encontrar en el apéndice.

3.2.22.2. Estimulación de Linfocitos T con diferentes mitógenos.

La preparación celular se ajusta a una densidad de 5×10^5 cels./ml. y se agregan 0.2 ml de esta preparación en cada pozo de una placa para cultivo de 96 pozos con fondo redondo junto con 20 μ l del mitógeno correspondiente o la solución a probar, disueltas en medio RPMI-1640 y se incubaron en 5% CO_2 , 95% de aire, 95% de humedad y 37°C por 72 hrs. Las células con solo medio sirvieron como el control de estimulación.

3.2.22.3. Determinación de las concentraciones de Interleucinas en sobrenadante de cultivos de linfocitos.

Se desarrolló la metodología descrita en el inciso 2.19 variando solamente el diluyente utilizado que contiene el kit correspondiente y que reproduce la coloración del sobrenadante de cultivo.

3.2.23. Determinación de los niveles de Interleucinas producidos por preparaciones de linfocitos T de animales sanos y animales infectados separados con el Sistema Dynabeads, estimulados con diferentes mitógenos e incubados con células adherentes provenientes de sangre periférica.

Se utilizó la misma metodología señalada en el inciso 3.2.23 pero las células de bazo se incubaron en placas con una capa de células adherentes (previamente preparada), para lograr esto se obtuvo aproximadamente 3 ml de sangre de ratón que se colocó en Ficoll para separar los leucocitos los cuales se ajustaron a 1×10^6 cels/ml con medio RPMI-1640 con 2% de SFB, posteriormente se agregó 100 μ l de esta suspensión a una placa de 96 pozos con fondo redondo. Esta placa se incubó por 30 min a 39°C y 5% de CO₂, después de este tiempo se retiró cuidadosamente el medio de cultivo con las células no-adherentes de los pozos y se procedió a colocar en ellos la suspensión de células para ser estimuladas con diferentes productos.

3.2.24. Estudio Histológico de pulmón, timo y bazo de ratones Balb/c en diferentes etapas de infección.

Se realizó el análisis histológico de muestras de pulmón, timo y bazo de ratones Balb/c a diferentes etapas de la infección (inciso 3.2.18), para esto se tomaron trozos de aproximadamente 1.5 cm³ del órgano y se depositaron en formol al 10% en PBS (formalina). Se realizaron cortes mediante inclusión en parafina de aproximadamente 5 μ m de grosor, de los tejidos fijados previamente con formalina. Se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina para posteriormente ser montados con resina (SIGMA).

3.3. Análisis Estadístico.

Los resultados de todos los experimentos fueron analizados para determinar su significancia estadística, utilizando una prueba t-student para muestras pequeñas con un 95% de confianza ($p = 0.05$), determinando con esto los intervalos de confianza para cada variable estudiada. En los puntos más críticos la determinación de la significancia estadística se realizó utilizando una técnica de comparación de medias por pruebas de hipótesis, con un nivel de confianza del 95% (Hurley y col., 1986).

4. RESULTADOS.

El siguiente capítulo presenta los resultados obtenidos siguiendo la metodología descrita en el capítulo anterior, los cuales se muestran siguiendo la misma secuencia en que fueron descritos.

4.1. Caracterización Biológica de las Cepas de *M. pulmonis* y *M. Capricolum*.

El cuadro 4 muestra los resultados obtenidos en las pruebas realizadas para identificar las cepas de microorganismos utilizadas

VARIABLE	Mp	Mc
Crecimiento a 34 °C	+	+
Crecimiento a 38 °C	-	+
Crecimiento aerobio	+	+
Crecimiento anaerobio	+	+
Inhibición del crecimiento	+	+
Hemadsorción de GRB	+	-
Producción de hemolisina	+	+
Sensibilidad a eritromicina	+	+
Sensibilidad a tetraciclina	+	+

Mp = *Mycoplasma pulmonis*. Mc = *Mycoplasma capricolum*

Cuadro 4. Caracterización Biológica de los Mycoplasmas

A) CARACTERIZACION DEL EFECTO INMUNOMODULADOR DE LOS MICOPLASMAS

4.2. Efecto de la infección por Mp y preparados membranales de Mc y Mp en los valores hematológicos de ratones Balb/c.

Los valores hematológicos encontrados se muestran en los cuadros 5, 6 y 7; la figura 1 muestra la representación gráfica de los valores hematológicos en animales tratados y controles. Se resalta que existió un aumento general en la cantidad de las poblaciones celulares estudiadas en los animales inoculados con suspensiones enriquecidas de membranas de *M. capricolum*, sobre todo en las plaquetas y linfocitos. Este aumento también se encontró (en menor proporción) en animales infectados.

4.3. Efecto de la infección por Mp y preparados membranales de Mc en el peso del bazo de ratones Balb/c.

El cuadro 8 contiene los valores de peso de animales infectados e inoculados con membranas, los cuales después se muestran en el histograma de la figura 2. Se observa un incremento significativo en el peso del bazo de animales infectados y animales inoculados con suspensiones membranales comparados con los valores de peso de bazo de animales inoculados con solución salina fisiológica (SSF)

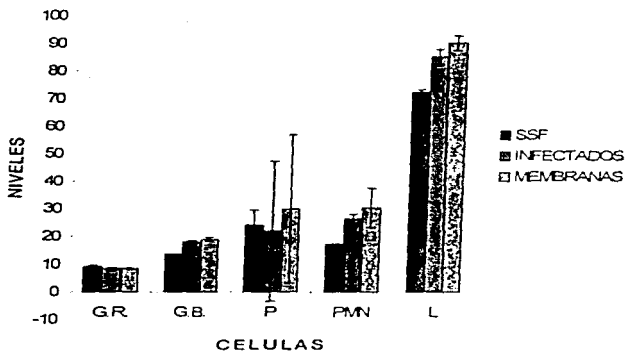


Figura 1[†]. Efecto en los valores hematológicos de ratones Balb/c, de la infección con *M. pulmonis* y la inoculación de preparados de membranas de *Mycoplasma*. Los valores en los animales infectados se determinaron a los 10 días post-infección con *M. pulmonis* desarrollada a través de la aerosolización de estos animales con 5ml de una suspensión de 10^8 UFC/ml y animales inoculados con 1ml (100mg de proteínas/ml) de suspensiones enriquecidas de membranas de *M. pulmonis* y *M. capricolum*.

[†] GB = Glóbulos Blancos $\times 10^3/\text{mm}^3$, P = Plaquetas $\times 10$, PMN = Polimorfonucleares (%), GR = Glóbulos Rojos $\times 10^6/\text{mm}^3$, L = Linfocitos (%). Las barras de error muestran los intervalos de confianza, $p=0.05$

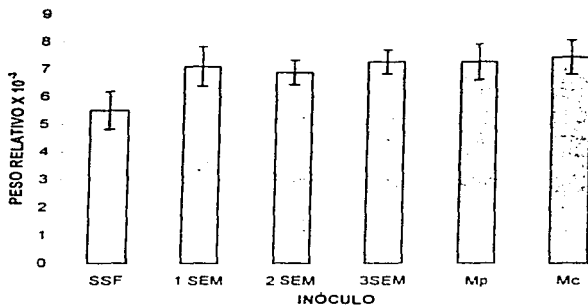


Figura 2¹. Efecto de la infección con *M. pulmonis* y preparados de membranas de *Mycoplasmas* sobre el peso relativo del bazo de ratones Balb/c. El histograma representa los valores de peso relativo de bazo (peso de bazo/peso de ratón) de animales en diferentes etapas de la infección con *M. pulmonis* desarrollada através de la aerosolización de estos animales con 5ml de una suspensión de 10⁹ UFC/ml y animales inoculados con 1ml (100mg de proteínas/ml) de suspensiones enriquecidas de membranas de *M. pulmonis* y *M. capricolum*.

¹ Mp. = Membranas de *M. pulmonis*; Mc = membranas de *M. capricolum*; Las barras de error muestran los intervalos de confianza. p=0.05

4.4. Efecto de la infección por *M. pulmonis* en la respuesta inmune contra eritrocitos de carnero (EC).

Los cuadros 9 y 10 contienen los valores del título de anticuerpos anti-eritrocitos (EC) de carnero de animales control (inoculados con solución salina fisiológica) y animales infectados con *M. pulmonis* en diferentes etapas de la infección. Todos los datos obtenidos se presentan graficados en la figura 3. En la cual se detecta una depresión de la respuesta inmune contra los EC notable en los animales infectados desde el día 5 post-infección, que se hace estadísticamente significativa con respecto a los controles a partir del día 7 hasta el final del experimento.

4.5. Efecto de la inoculación de membranas de *M. pulmonis* y *M. capricolum* en la respuesta inmune contra eritrocitos de carnero (EC).

Los cuadros 11 y 12 muestran los valores de los títulos de anticuerpos anti-EC en animales inoculados con suspensiones enriquecidas de membranas de *M. pulmonis* y *M. capricolum*. Estos animales montan una respuesta de anticuerpos más rápida (inicia en el día 5) y más elevada (que el grupo control), pero menos prolongada y sin diferencia estadística con respecto a los controles.

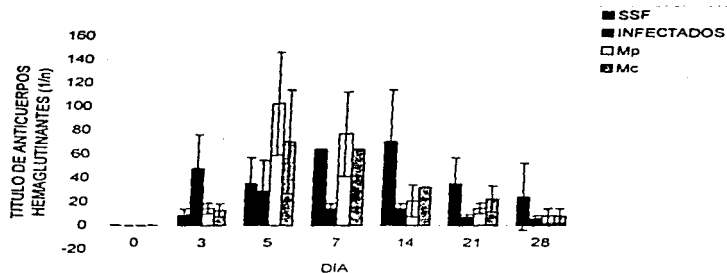


Figura 3¹. Efecto de la infección con *M. pulmonis* y la inoculación de preparaciones de membranas de *Mycoplasma* en los niveles de anticuerpos aglutinantes anti-eritrocitos de carnero. Las suspensiones enriquecidas de membranas de provinieron de *M. pulmonis* y *M. capricolum*, los animales controles fueron inoculados con solución salina fisiológica. Sólo se muestran los intervalos de confianza de los controles y el grupo infectado

¹ SSF = Solución salina fisiológica; Mp = Membranas de *Mycoplasma pulmonis*; Mc = Membranas de *Mycoplasma capricolum*; sólo se muestran las barras de error en dos de los grupos, las cuales muestran los intervalos de confianza, $p = 0.05$

4.6. Efecto de la infección por *M. pulmonis* en el porcentaje de fagocitosis.

El cuadro 13 muestra los valores del porcentaje de fagocitosis (ver inciso 2.9.d) de ratones Balb/c durante diferentes etapas de la infección por *M. pulmonis*, los cuales son representados en el histograma de la figura 4. Se destaca una depresión en la actividad fagocítica durante los días 7 y 14 post-infección.

4.7. Efecto de la inoculación de membranas de *M. pulmonis* y *M. capricolum* en el porcentaje de fagocitosis.

El cuadro 14 contiene los valores del porcentaje de fagocitosis (%F) de animales infectados (10 días de infección) con *M. pulmonis* y animales inoculados con suspensiones enriquecidas de *M. pulmonis* y *M. capricolum* y la figura 5 representa estos valores en un histograma, en el cual sobresale la depresión estadísticamente significativa en el %F de los animales a los 10 días de infección lo cual coincide con los datos de la figura 4, en donde la depresión de la función fagocítica se presenta en el día 7. No se observa una diferencia significativa entre los valores de los animales inoculados con las membranas y los controles.

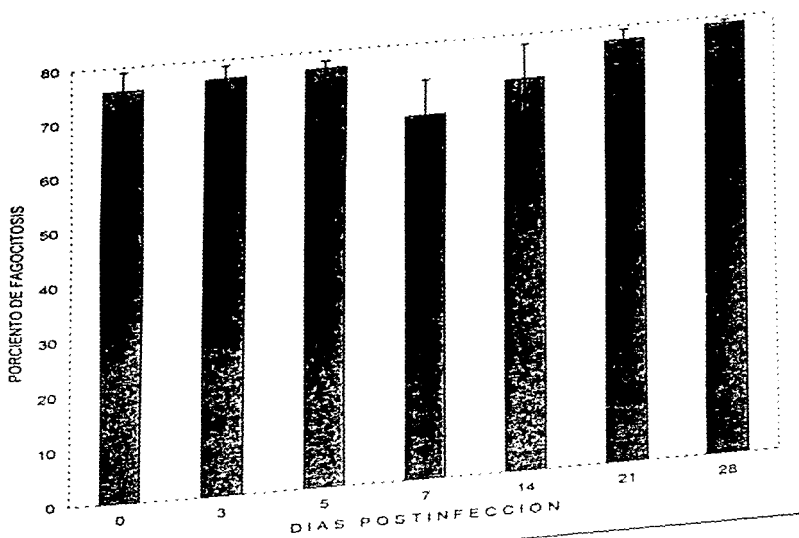


Figura 4¹ . Efecto en el porcentaje de fagocitosis en la infección por *M. pulmonis*. El Histograma representa los valores del porcentaje de fagocitosis de animales en diferentes etapas de la infección por *M. pulmonis* : Porcentaje de fagocitosis = No. de células con más de 2 partículas ingeridas /No. total de granulocitos (p = 0.05).

¹ Las barras de error representan los intervalos de confianza. p = 0.05

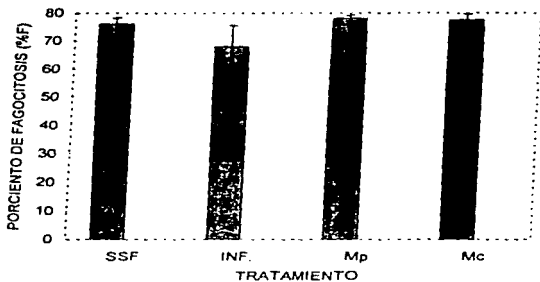


Figura 5¹. Histograma que representa los valores de Índice Fagocítico de animales infectados con *M. pulmonis* a los diez días de infección y animales 72hr después de haber sido inoculados con suspensiones enriquecidas de membranas de *M. pulmonis* y *M. capricolum*.

¹ SSF = Solución salina fisiológica; Mp = Membranas de *Mycoplasma pulmonis*; Mc = Membranas de *Mycoplasma capricolum*; las barras de error representan los intervalos de confianza, $p = 0.05$.

4.8. Efecto de la infección por *M.pulmonis* en la eliminación de carbón coloidal.

La prueba de Eliminación de carbón coloidal (ECC) se realizó de acuerdo a lo establecido en la metodología, en los cuadros 15, 16, 17, 18 y 19 se muestran los valores de absorbancia a 650nm a diferentes tiempos (0, 3, 7, 10, 30min después de la inoculación de carbón coloidal) de sangre de animales en diferentes etapas de infección con *M. pulmonis* y animales inoculados con solución salina fisiológica utilizados como controles. Se observa una variación muy pronunciada en los valores de ECC en los animales con una semana de infección.

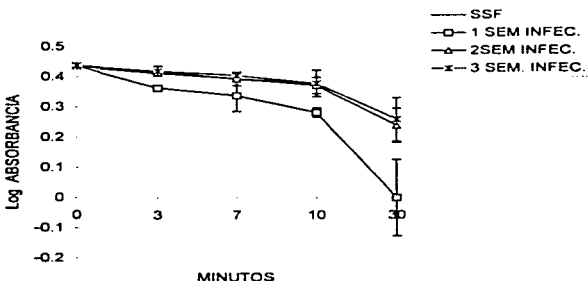


Figura 6¹. Efecto de la infección por *M.pulmonis* en la eliminación de carbón coloidal. La gráfica representa la variación de los valores de absorbancia a 650nm de muestras de sangre de ratones Balb/c en diferentes etapas de la infección por *M. pulmonis* y animales inoculados con solución salina fisiológica (controles).

¹ SSF = Solución salina fisiológica, las barras de error representan los intervalos de confianza obtenidos de los logaritmos de las absorbancias, $p = 0.05$.

4.9. Efecto de la inoculación de suspensiones membranales en la eliminación de carbón coloidal.

Los cuadros 20,21,22,23 y 24 contienen los valores de absorbancia de muestras de sangre de ratón a diferentes tiempos de haber sido inoculados (72hr antes de la prueba) con suspensiones enriquecidas de membranas de *M. pulmonis* y *M. capricolum*. La figura 7 muestra una variación estadísticamente significativa entre la eliminación de carbón coloidal de los controles y los ratones inoculados con preparados membranales de Mp. En el caso de los ratones inoculados con Mc se detecta gráficamente un cambio en la velocidad de eliminación, sin embargo este no es estadísticamente significativo.

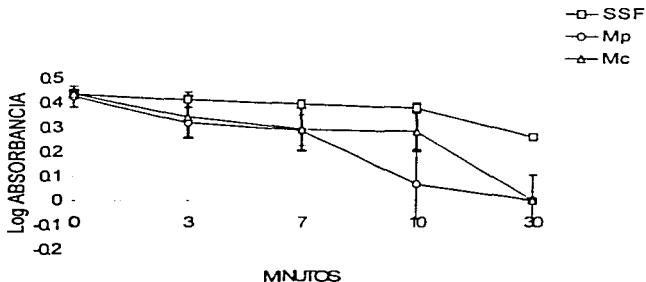


Figura 7¹. Efecto de la inoculación de suspensiones membranales en la eliminación de carbón coloidal. La gráfica representa la variación de los valores de absorbancia a 650nm de muestras de sangre de animales inoculados con suspensiones enriquecidas de membranas de *M. pulmonis* y *M. capricolum*, 72hr antes de realizarse la prueba. Los valores graficados son el promedio de las mediciones obtenidas con 5 ratones Balb/c.

¹ Mp = Membranas de *M. pulmonis*; Mc = Membranas de *M. capricolum*.

4.10. Determinación del título de anticuerpos anti-*M. pulmonis* durante la infección respiratoria crónica de ratones Balb/c.

El cuadro 25 contiene los valores de los títulos de anticuerpos específicos contra *M. pulmonis* en ratones durante diferentes etapas de la infección. Estos títulos fueron determinados por la prueba de DOT- ELISA. La figura 8 muestra la forma gráfica de los niveles de estos valores en donde destacan los niveles muy bajos de anticuerpos específicos que alcanzan estos animales a lo largo de todo el periodo de infección determinado.

4.11. Determinación del título de anticuerpos anti-*M. pulmonis* y anti-*M. capricolum* después de la inoculación de concentrados de membranas de *M. pulmonis* y *M. capricolum* en ratones Balb/c.

En el cuadro 26 se muestran los valores promedio de títulos de anticuerpos específicos de al menos 5 ratones inoculados con membranas de *M. pulmonis* y *M. capricolum*, determinados por la prueba de DOT-ELISA. En ambos casos los títulos se elevan rápidamente (comparados con los animales infectados), manteniéndose en niveles relativamente altos durante todo el periodo de estudio (figura 8).

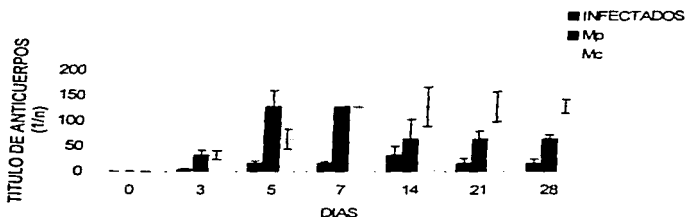


Figura 8¹. Títulos de anticuerpos específicos en ratones Balb/c en diferentes etapas de la infección con *M. pulmonis* y ratones inoculados con suspensiones enriquecidas de membranas de *M. pulmonis* y *M. capricolum*, determinados por Dot-ELISA.

¹ Mp = Membranas de *M. pulmonis*; Mc = Membranas de *M. capricolum*; las barras de error representan los intervalos de confianza. $p = 0.05$.

4.12. Efecto de la infección por *M. pulmonis* y la inoculación de membranas de *M. pulmonis* y *M. capricolum* en la formación de rosetas "E".

El cuadro 27 muestra los porcentajes de células formadoras de rosetas espontáneas (E) en ratones bajo diferentes tipos de tratamiento, los cuales son representados en un histograma en la figura 9. Se encontró que en animales con 10 días de infección los porcentajes fueron mas bajos que los controles inoculados con suspensiones enriquecidas de membranas de *M. pulmonis* (Mp) y *M. capricolum* (Mc). Sin embargo estas variaciones no fueron estadísticamente significativas.

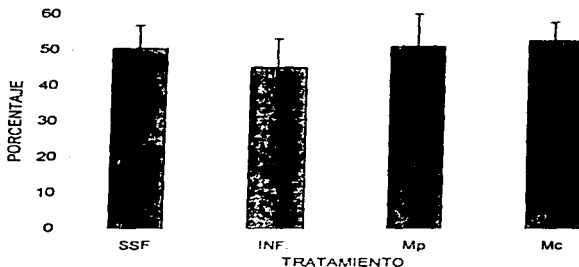


Figura 9¹ . Porcentajes de células formadoras de Rosetas "E" en ratones Balb/c machos con 10 días de infección con *M. pulmonis* y animales inoculados con membranas de *M. pulmonis* y *M. capricolum*.

¹ Mp = Membranas de *M. pulmonis*, Mc = Membranas de *M. capricolum*, las barras de error representan los intervalos de confianza, p = 0.05.

B) DETERMINACION DE LOS POSIBLES MECANISMOS DE INMUNOMODULACION

4.13. Efecto de las membranas de *M. capricolum* sobre los linfocitos de bazo de ratón (cuantificadas de acuerdo al contenido proteico).

En el cuadro 28 se muestra el efecto mitogénico de las membranas de *M. capricolum*, cuantificados por el método de incorporación de timidina. Se observó que las membranas indujeron la proliferación celular de los linfocitos de bazo. Este efecto fué proporcional a la cantidad de membrana utilizada como lo muestra la figura 10.

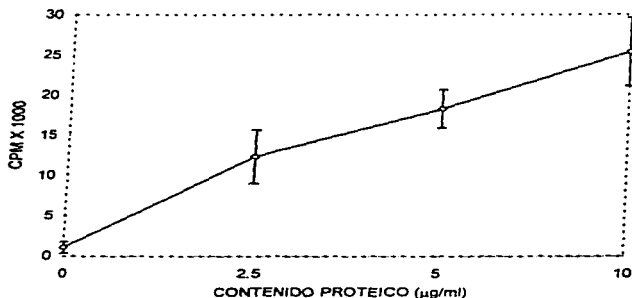


Figura 10¹. Transformación blastoide de linfocitos de bazo de ratones Balb/c sanos expuestos a diferentes cantidades de suspensión enriquecida de membranas de *M. capricolum* calculadas de acuerdo a su contenido proteico.

¹ CPM = cuentas por minuto; las barras de error representan los intervalos de confianza, $p = 0.05$.

4.14. Efecto de la infección por *M. pulmonis* en la prueba de hipersensibilidad retardada (DTH) en ratones Balb/c.

El cuadro 29 muestra los valores del grado de reacción (inflamación) de ratones Balb/c en diferentes estados de la infección con *M. pulmonis*. Los valores se obtuvieron de acuerdo a los cálculos descritos en la sección de métodos, realizando la prueba por triplicado. La figura 11 muestra que los animales infectados sufrieron una depresión pronunciada en la respuesta DTH contra albúmina sérica bovina, efecto que tuvo en el día 30 un indicio de recuperación pero que después volvió a descender aún más que la depresión inicial.

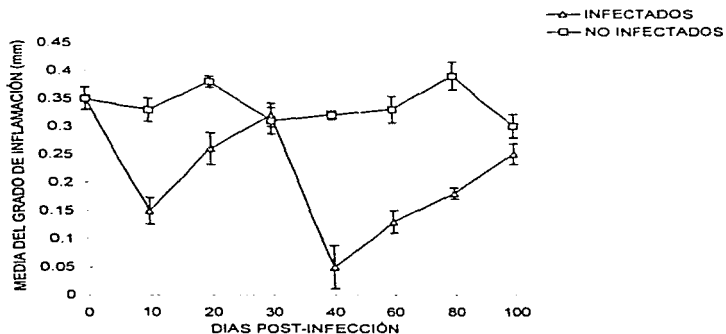


Figura 11¹. Efecto de la infección por *M. pulmonis* en la prueba de hipersensibilidad retardada (DTH) en ratones Balb/c. La prueba de Hipersensibilidad retardada (DTH) fué realizada en cojinete plantar de ratones Balb/c, utilizando albúmina sérica bovina como antígeno.

¹ DTH = Hipersensibilidad retardada; ASB = Albúmina Sérica Bovina; las barras de error representan los intervalos de confianza, $p = 0.05$.

4.15. Efecto de la infección con *M. pulmonis* en los niveles de Interleucina-4 en suero de ratones Balb/c.

Los valores de absorbancia en la prueba de ELISA para la detección de IL-4 en suero se muestran en el cuadro 30, los cuales son graficados en la figura 12. Es sobresaliente en estos datos la elevación de la concentración de esta citocina en los días 24 y 38 que aparentemente corresponden a la zona de depresión en la reacción de hipersensibilidad retardada.

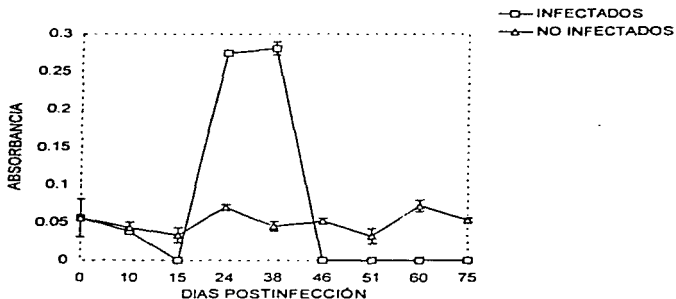


Figura 12¹. Efecto de la infección con *M. pulmonis* en los niveles de Interleucina-4 en suero de ratones Balb/c. La gráfica representa las absorbancias obtenidas en suero ratones Balb/c utilizando el kit Intertest-4x (Genzyme). Las determinaciones se hicieron por duplicado.

¹ Las barras de error representan los intervalos de confianza. $p = 0.05$.

4.16. Efecto de la infección con *M. pulmonis* en los niveles de Interferón- γ en suero de ratones Balb/c.

Los valores de absorbancia en la prueba de ELISA para la detección de IFN- γ en suero se muestran en el cuadro 31. Es de notarse una elevación en la IFN- γ en sangre al día 15 que disminuyó paulatinamente hasta llegar a niveles más bajos de los normales y manteniéndose ahí hasta el fin del estudio. La disminución de IFN- γ coincidió con la elevación de IL-4 en los sueros de los mismos animales estudiados.

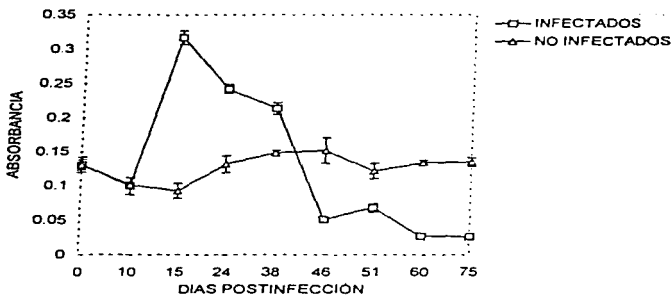


Figura 13¹. Efecto de la infección con *M. pulmonis* en los niveles de Interferón- γ en suero de ratones Balb/c. La gráfica representa las variaciones de la concentración en suero de IFN- γ en diferentes etapas durante la infección de ratones Balb/c con *M. pulmonis*. Las determinaciones se hicieron por duplicado utilizando el kit Intertest- γ (Genzyme).

¹ Las barras de error representan los intervalos de confianza, $p = 0.05$

La gráfica 14 muestra una comparación de los niveles de IL-4 e IFN- γ en suero de animales en el transcurso de una infección con *M. pulmonis*.

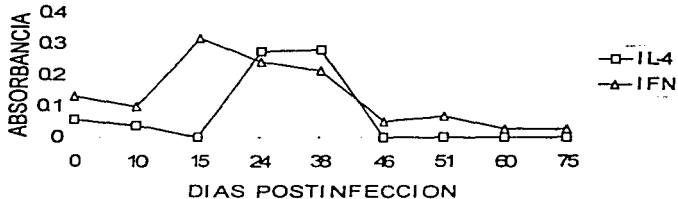


Figura 14. Gráfica que representa la comparación en los niveles de IL-4 e IFN- γ en suero de animales en diferentes etapas de la infección con *M. pulmonis*.

4.17. Efecto de la infección con *M. pulmonis* el nivel de Interleucina-10 en suero de ratones Balb/c.

El cuadro 32 muestra los valores de absorbancia de muestras de suero de cinco ratones Balb/c infectados y no infectados que se produjeron al detectar IL-10 utilizando un Kit de ELISA (R&D systems) En estos resultados se puede observar que los niveles de esta interleucina se encontraron elevados (con diferencia estadísticamente significativa) en los animales que presentan una infección crónica

Cuadro 32. Absorbancia de la prueba de ELISA (R&D systems) para detectar la concentración de IL-10 en suero de 5 ratones Balb/c infectados (60 días) y no infectados con *M. pulmonis*

INFECTADOS (Absorbancia)	NO INFECTADOS (Absorbancia)
0.248 ± 0.017	0.006 ± 0.001

4.18. Efecto mitogénico de las membranas de *M. pulmonis* en preparaciones de linfocitos de bazo de ratones normales tratados con anti-Thy 1.2 y complemento.

El cuadro 33 muestra los valores de incorporación de timidina de células de bazo de ratones normales sujetos a tratamiento con α -Thy1.2+C' para eliminar más del 90% de linfocitos T y dejar básicamente una población elevada de linfocitos B. A la preparación resultante se le estimuló con una suspensión enriquecida de membranas de *M. pulmonis*.

4.19. Efecto mitogénico de la Fitohemaglutinina (PHA) en los linfocitos de bazo de ratones normales tratados con anti-Thy 1.2 y complemento (C).

El cuadro 34 muestra los valores de incorporación de timidina de células de bazo de ratones normales sujetos a tratamiento con α -Thy1.2+C para eliminar más del 90% de linfocitos T y dejar básicamente una población elevada de linfocitos B. A la preparación resultante se le estimuló con fitohemaglutinina. La figura 15 representa gráficamente los valores obtenidos, encontrándose que las preparaciones celulares tratadas con anti-Thy-C aún son estimuladas con PHA, lo que indica que posiblemente las poblaciones T que no se eliminaron fueron estimuladas, impidiendo observar si los linfocitos B fueron estimulados.

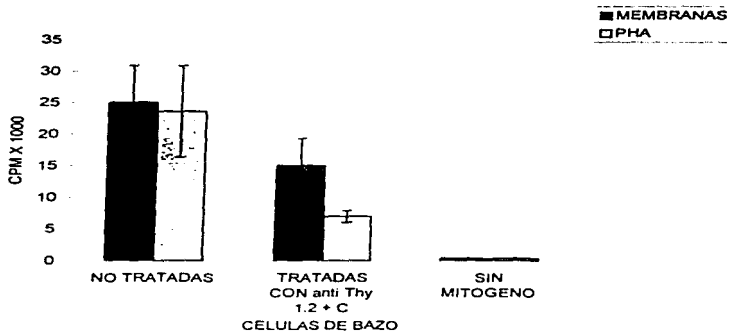


Figura 15¹. Transformación blastoide de suspensiones de células de bazo tratadas y no tratadas con anti-Thy1.2+C, utilizando una suspensión enriquecida de membranas de *M. pulmonis* y PHA como mitógenos.

¹ PHA = Fitohemaglutinina, CPM = Cuentas por minuto, C = Complemento, las barras de error representan los intervalos de confianza, p = 0.05.

4.20. Incorporación de Timidina- H^3 de linfocitos de bazo de animales usando *M. pulmonis* y PHA como mitógenos.

El cuadro 35 muestra los valores de la transformación blastoide de células de bazo de ratones Balb/c durante diferentes etapas de la infección con *M. pulmonis* usando fitohemaglutinina como mitógeno. La figura 16 es una grafica de las variaciones en la incorporación de timidina durante la transformación blastoide, observandose que existe una depresión en la respuesta a mitógenos en los animales con 38 días de infección, efecto que se produjo con los dos mitógenos probados, sin embargo el fenómeno en ambos casos no es estadísticamente significativo ($p = 0.05$)

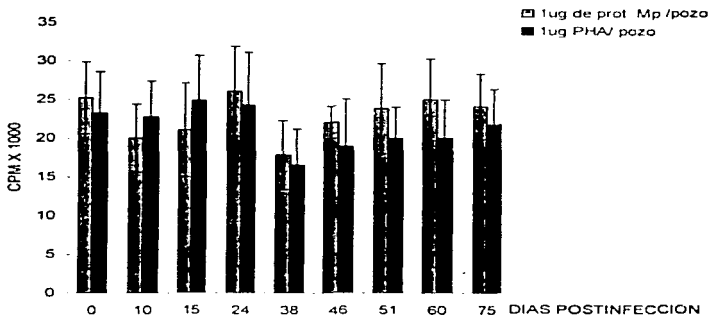


Figura 16¹. Incorporación de timidina tritiada de células de bazo de ratones Balb/c en diferentes etapas de la infección con *M. pulmonis*. Los mitógenos utilizados fueron una suspensión enriquecida de membranas (medidas por su contenido protéico) y la PHA (1 µg/pozo).

¹ CPM = Cuentas por minuto, Mp = Membranas de *M. pulmonis*, PHA = Fitohemaglutinina. Las barras de error representan los intervalos de confianza, $p = 0.05$

4.21. Peso del timo de ratones Balb/c en diferentes etapas de la infección con *M. pulmonis*.

El cuadro 36 muestra el peso del timo de animales infectados, en diferentes etapas de infección. Es de hacerse notar la poca diferencia de los valores a lo largo del periodo de infección (significancia estadística nula)

Cuadro 36. Peso del timo de ratones Balb/c en diferentes etapas de la infección con *M. pulmonis*

Día de Infección	0	10	15	24	38	46	51	60	75
Peso del Timo (g)	0.148 ±0.02	0.102 ±0.02	0.098 ±0.10	0.095 ±0.01	0.086 ±0.02	0.090 ±0.01	0.089 ±0.02	0.099 ±0.01	0.099 ±0.01

4.22. Efecto de la infección con *M. pulmonis* en los niveles de células CD8+ en Timo de ratones Balb/c determinados por citometría de flujo.

El cuadro 37 muestra los valores de porcentajes de células CD8+ en el timo de ratones Balb/c durante diferentes etapas de la infección con *M. pulmonis*. La figura 17 representa estos valores mostrando gráficamente las variaciones, observándose en general valores menores que en los animales controles no infectados, sobresaliendo una elevación del porcentaje el día 46 para recuperar los niveles iniciales el día 60. No hay significancia estadística a lo largo del proceso infeccioso, incluso los porcentajes se traslapan en algunas zonas ($p = 0.05$).

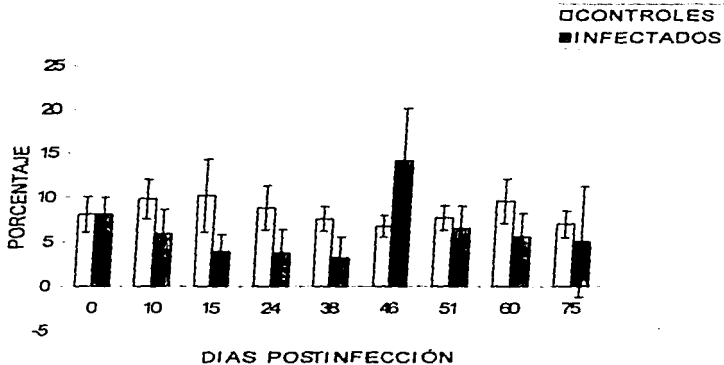


Figura 17¹ . Cinética del efecto de la infección con *M. pulmonis* en los porcentajes de células CD8⁺ en Timo de ratones Balb/c determinados por citometría de flujo utilizando anti-CD8 rodaminado (SIGMA)

¹ Las barras de error representan los intervalos de confianza, $p = 0.05$.

4.23. Efecto de la infección con *M. pulmonis* en los niveles de células CD4+ en Timo de ratones Balb/c determinados por citometría de flujo.

El cuadro 38 muestra los valores de porcentajes de células CD4+ en el timo de ratones Balb/c durante diferentes etapas de la infección con *M. pulmonis*. La figura 18 representa estos valores mostrando gráficamente las variaciones, observándose en general valores menores que en los animales controles no infectados, sobresaliendo una elevación del porcentaje el día 46 para recuperar los niveles iniciales el día 60.

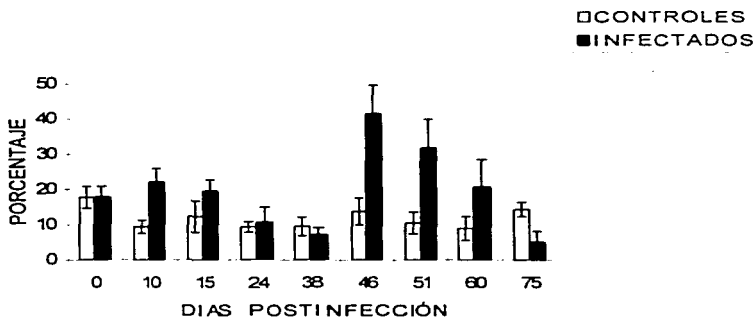


Figura 18¹. Cinética del efecto de la infección con *M. pulmonis* en los porcentajes de células CD4+ en Timo de ratones Balb/c determinados por citometría de flujo utilizando anti-CD4 fluoresceinado(SIGMA)

¹ Las barras de error representan los intervalos de confianza, $p = 0.05$.

4.24. Efecto de la infección con *M. pulmonis* en los niveles de células doble positivas (CD4+ y CD8+) en Timo de ratones Balb/c determinados por citometría de flujo.

El cuadro 39 muestra los valores de porcentajes de células doble positivas (CD8+ y CD4+) en el timo de ratones Balb/c durante diferentes etapas de la infección con *M. pulmonis*. La figura 19 representa estos valores mostrando gráficamente las variaciones, notándose en general valores menores en el grupo infectado (estadísticamente significativos, $p = 0.05$) que en los animales controles no infectados, sobresaliendo una disminución del porcentaje a partir del día 38 que se recupera paulatinamente hasta el día 60.

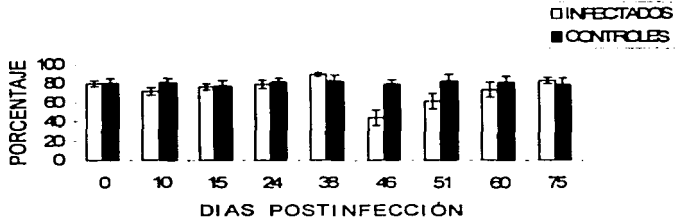


Figura 19¹. Cinética del efecto de la infección con *M. pulmonis* en los porcentajes de células CD8+ en Timo de ratones Balb/c determinados por citometría de flujo utilizando anti-CD8 rodaminado (SIGMA) y anticuerpos anti-CD4 fluoresceinado (SIGMA).

¹ Las barras de error representan los intervalos de confianza, $p = 0.05$.

4.25. Niveles de células CD4+, CD8+ y doble positivas en timo de ratones en diferentes estados de infección, determinadas por citometría de flujo.

La figura 20 muestra gráficamente la comparación de las variaciones de los porcentajes de células CD8+, CD4+ y doble positivas en timo, destacándose los cambios que sufren los valores a partir del día 46 postinfección como se ha señalado en los incisos anteriores.

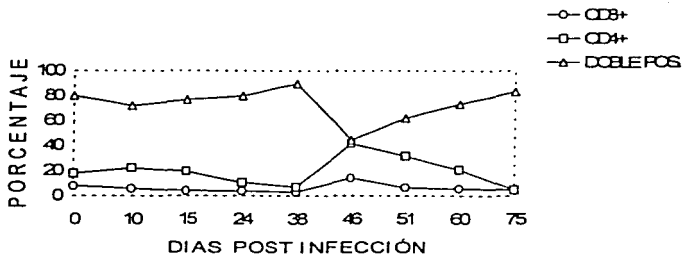


Figura 20¹ .Valores de porcentajes de células CD4+ y CD8+ en timo de animales en diferentes etapas de la infección con *M. pulmonis*.

¹ Las barras de error representan los intervalos de confianza, $p = 0.05$

4.26. Efecto de la infección con *M. pulmonis* en los niveles de células CD8+ en sangre de ratones Balb/c determinados por citometría de flujo.

El cuadro 40 muestra los valores de porcentajes de células CD8+ en la sangre de ratones Balb/c durante diferentes etapas de la infección con *M. pulmonis*. La figura 21 muestra gráficamente las variaciones estos valores, notándose en general valores menores que en los animales controles, sobresaliendo una elevación del porcentaje al día 51 para recuperar los niveles iniciales al día 60.

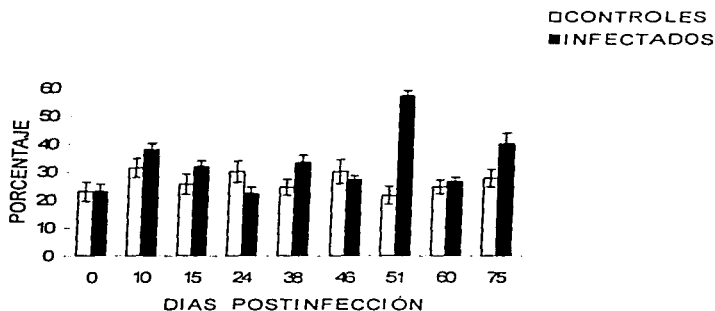


Figura 21¹. Cinética del efecto de la infección con *M. pulmonis* en los porcentajes de células CD8+ en sangre de ratones Balb/c determinados por citometría de flujo utilizando anti-CD8 rodaminado (SIGMA).

¹ Las barras de error representan los intervalos de confianza, $p = 0.05$

4.27. Efecto de la infección con *M. pulmonis* en los niveles de células CD4+ en sangre de ratones Balb/c determinados por citometría de flujo.

El cuadro 41 muestra los valores de porcentajes de células CD4+ en la sangre de ratones Balb/c durante diferentes etapas de la infección con *M. pulmonis*. La figura 22 representa estos valores mostrando gráficamente las variaciones, notándose en general valores semejantes a los animales controles no infectados, sobresaliendo una disminución del porcentaje el día 51

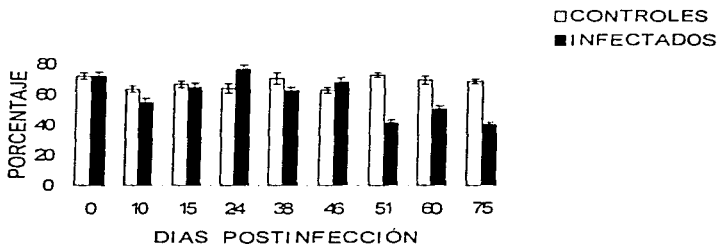


Figura 22¹ . Cinética del efecto de la infección con *M. pulmonis* en los porcentajes de células CD4+ en sangre de ratones Balb/c determinados por citometría de flujo utilizando anti-CD4 fluoresceinado (SIGMA).

¹ Las barras de error representan los intervalos de confianza, $p = 0.05$.

4.28. Niveles de células CD4+ y CD8+ en sangre de ratones en diferentes estados de infección, determinadas por citometría de flujo

La figura 23 nos muestra la comparación de los porcentajes de células CD8+ y CD4+ en sangre a lo largo del periodo de infección, destacándose los cambios que sufren los valores a partir del día 51 postinfección como se ha señalado en los incisos anteriores.

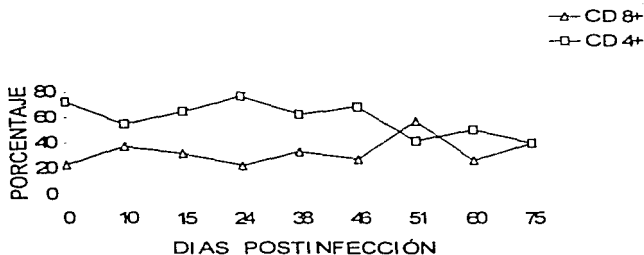


Figura 23¹. Cinética del efecto de la infección con *M. pulmonis* en los porcentajes de células CD8+ y CD4+ en sangre de ratones Balb/c determinados por citometría de flujo utilizando anti-CD8 rodaminado (SIGMA).

¹ Las barras de error representan los intervalos de confianza, $p = 0.05$.

4.29. Efecto de la infección con *M. pulmonis* en los niveles de células CD8+ en bazo de ratones Balb/c determinados por citometría de flujo.

El cuadro 42 muestra los valores de porcentajes de células CD8+ en el bazo de ratones Balb/c durante diferentes etapas de la infección con *M. pulmonis*. La figura 24 representa estos valores mostrando gráficamente las variaciones, notándose en general valores semejantes a los animales controles no infectados.

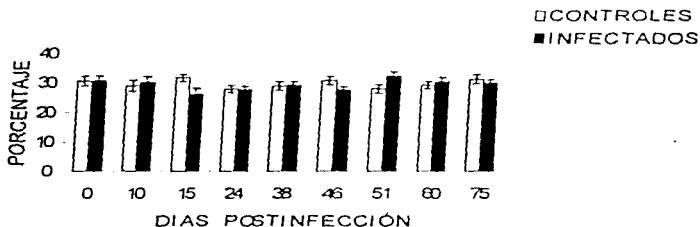


Figura 24¹. Cinética del efecto de la infección con *M. pulmonis* en los porcentajes de células CD8+ en bazo de ratones Balb/c determinados por citometría de flujo utilizando anti-CD8 rodaminado (SIGMA).

¹ Las barras de error representan los intervalos de confianza, $p = 0.05$.

4.30. Efecto de la infección con *M. pulmonis* en los niveles de células CD4+ en bazo de ratones Balb/c determinados por citometría de flujo.

El cuadro 43 muestra los valores de porcentajes de células CD4+ en el bazo de ratones Balb/c durante diferentes etapas de la infección con *M. pulmonis*. La figura 25 representa estos valores mostrando gráficamente las variaciones, notándose en general valores semejantes a los animales controles no infectados.

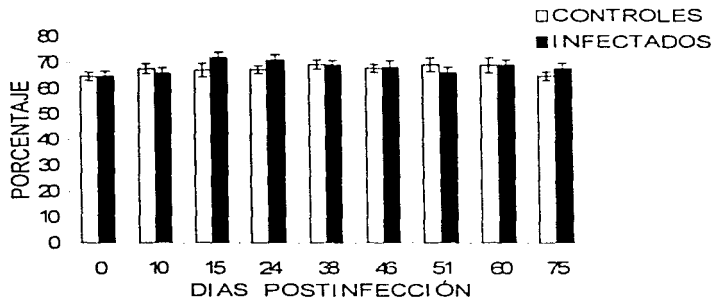


Figura 25¹. Cinética del efecto de la infección con *M. pulmonis* en los porcentajes de células CD4+ en bazo de ratones Balb/c determinados por citometría de flujo utilizando anti-CD4 fluoresceinado (SIGMA).

¹ Las barras de error representan los intervalos de confianza, $p = 0.05$.

4.31. Niveles de células CD4+ y CD8+ en bazo de ratones en diferentes estados de infección, determinadas por citometría de flujo.

La figura 26 nos muestra gráficamente la comparación de los porcentajes de células CD8+ y CD4+ en bazo en diferentes periodos de la infección, en los cuales observamos que no hubo variaciones en los valores entre los animales infectados.



Figura 26. Cinética del efecto de la infección con *M. pulmonis* en los porcentajes de células CD8+ y CD4+ en bazo de ratones Balb/c determinados por citometría de flujo utilizando anti-CD8 rodaminado y anti-CD4 fluoresceinado (SIGMA).

4.32. Relación de las células CD4+/CD8+ en timo, sangre y bazo de ratones en diferentes estados de infección, determinadas por citometría de flujo.

El cuadro 44 muestra la relación en los valores de porcentajes de células CD4+ con los de las células CD8+ en los 3 órganos de animales infectados estudiados. La figura 27 nos muestra estos en forma gráfica, observándose que existen dos etapas de la infección en los que se producen cambios en la relación CD4/CD8 que son los días 10, 15, 51 y 60 lo cual corroboraría el concepto de recurrencia característica de las enfermedades causados por estos microorganismos.

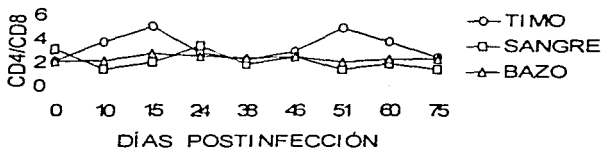


Figura 27. Cinética de la relación entre células CD4+/CD8+ en timo, sangre periférica y bazo de animales infectados con *M. pulmonis*, en diferentes etapas de la infección.

4.33. Estudio del efecto mitogénico de diferentes preparaciones sobre células B de bazo separadas usando el sistema Dynabeads.

La cuadro 45 muestra los valores de incorporación de Timidina de células B separadas usando el sistema Dynabeads y estimuladas con diferentes productos. En la figura 28 se muestran los resultados en un histograma, observándose estimulación por productos del *M. pulmonis* y muy baja estimulación por fitohemaglutinina.

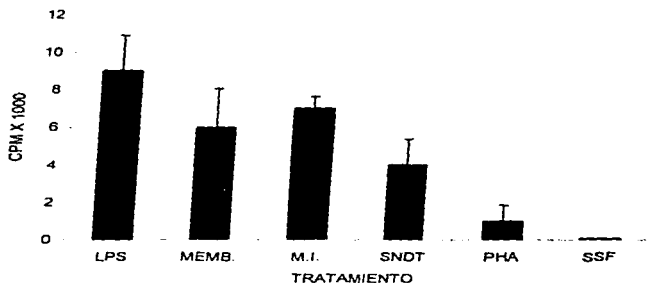


Figura 28¹. Incorporación de timidina tritiada de suspensiones enriquecidas de linfocitos B, estimulados con diferentes productos.

¹ LPS = Lipopolisacárido bacteriano, MEMB = membranas de *M. pulmonis*; M.I. = *M. pulmonis* inactivado por calor; SNDT = sobrenadante de cultivo, PHA = Fitohemaglutinina SSF = Solución salina Fisiológica; CPM = Cuentas por minuto; las barras de error representan los intervalos de confianza. p = 0.05

4.34. Estudio del efecto mitogénico de diferentes preparaciones en células T separadas usando el sistema Dynabeads.

El cuadro 46 muestra los valores de incorporación de timidina tritiada de células T separadas usando el sistema Dynabeads y estimuladas con diferentes productos. En la figura 29 se muestran los resultados en un histograma, observándose muy una muy baja estimulación por productos del *M. pulmonis* y una alta estimulación por fitohemaglutinina.

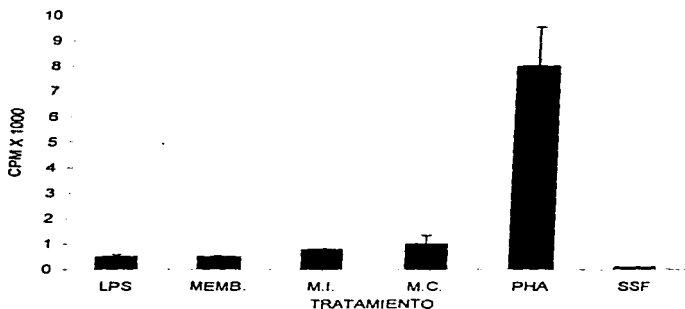


Figura 29¹. Incorporación de Timidina tritiada de suspensiones enriquecidas de linfocitos T, estimulandolos con diferentes productos.

¹ LPS = Lipopolisacárido bacteriano, MEMB. = membranas de *M. pulmonis*; M.I. = *M. pulmonis* inactivado por calor; M.C. = Medio de Cultivo; PHA = Fitohemaglutinina, SSF = Solución salina Fisiológica. CPM = Cuentas por minuto, las barras de error representan los intervalos de confianza, p = 0.05

4.35. Estudio del efecto mitogénico de diferentes preparaciones sobre células T separadas usando el sistema Dynabeads, incubadas con células adherentes.

El cuadro 47 muestra los valores de incorporación de Timidina de células T separadas usando el sistema Dynabeads incubadas con células adherentes y estimuladas con diferentes productos. En la figura 30 se muestran los resultados en un histograma, observándose una estimulación mayor por productos del *M. pulmonis* que cuando se estimularon sin incubación previa con células adherentes y una estimulación por fitohemaglutinina que no tuvo mayores cambios con respecto al anterior experimento.

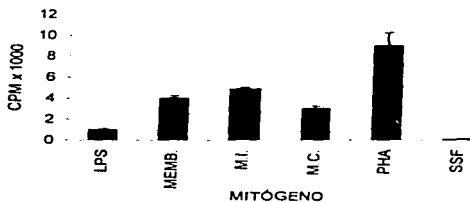


Figura 30¹. Incorporación de Timidina tritiada de suspensiones enriquecidas de linfocitos T incubados con células adherentes y estimulados con diferentes productos.

¹ LPS = Lipopolisacárido bacteriano; MEMB. = membranas de *M. pulmonis*; M.I. = *M. pulmonis* inactivado por calor; M.C. = Medio de Cultivo; PHA = Fitohemaglutinina; SSF = Solución salina Fisiológica; CPM = Cuentas por minuto; las barras de error representan los intervalos de confianza, $p = 0.05$.

4.36. Niveles de IFN- γ e IL-4 producidos por células de bazo de ratones Balb/c sanos estimulados con varios productos.

El cuadro 48 muestra los valores de IL-4 e IFN- γ que se obtuvieron de sobrenadantes de cultivo de células de bazo de ratones normales después de 72hr de incubación con diferentes productos los cuales son mostrados gráficamente en la figura 31, en esta se observó una producción estandar de IL-4 y una producción de IFN- γ elevada cuando se estimulan las células con suspensión membranar y *M. pulmonis* inactivado.

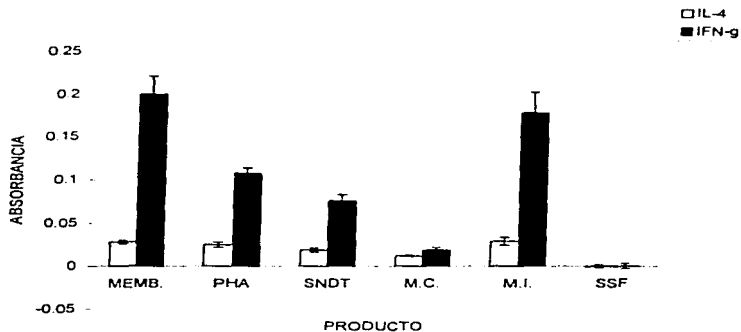


Figura 31¹ Valores de absorbancia de IL-4 e IFN- γ de sobrenadantes de cultivo de células de bazo estimuladas con diferentes productos.

¹ MEMB = Membranas de *M. pulmonis*, PHA = Fitohemaglutinina, SNDT = Sobrenadante de Cultivo, M.C. = Medio de Cultivo; M.I. = *M. pulmonis* inactivado, SSF = Solución salina fisiológica, las barras de error representan los intervalos de confianza, $p = 0.05$.

4.37. Niveles de IFN- γ e IL-4 producidos por células de bazo de animales infectados, utilizando varios productos para la estimulación.

El cuadro 49 muestra los valores de IL-4 e IFN- γ que se obtuvieron de sobrenadantes de cultivo de células de bazo de ratones infectados (60 días), después de 72hr de incubación con diferentes productos los cuales son mostrados gráficamente en la figura 32, en esta se observa una producción estandar aumentada de IL-4 en casi todos los casos.

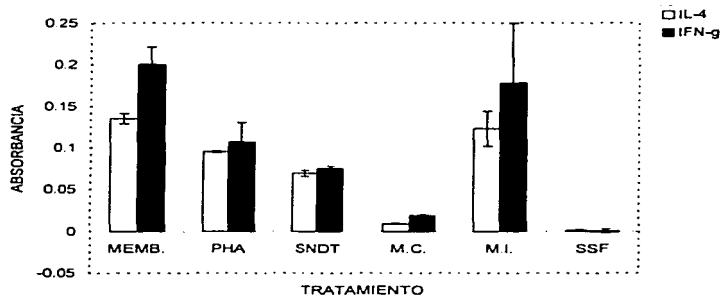


Figura 32¹. Valores de absorbancia de IL-4 e IFN- γ de sobrenadantes de cultivo de células de bazo estimuladas con diferentes productos.

¹ MEMB = Membranas de M. pulmonis, PHA = Fitohemaglutinina, SNTD = Sobrenadante de Cultivo, M.C. = Medio de Cultivo, M.I. = M. pulmonis inactivado, SSF = Solución salina fisiológica, las barras de error representan los intervalos de confianza, $p = 0.05$.

4.38. Observaciones histológicas de muestras de pulmón, bazo y timo de ratones Balb/c en diferentes etapas de infección con *M. pulmonis*.

En las figuras 33 a 37 se muestran las imágenes de los cortes que se realizaron a fragmentos de pulmón, bazo y timo de animales con diferentes tiempos de infección. En general se observa en el caso del pulmón los siguientes fenómenos: proliferación de células linfoides, hipertermia, engrosamiento de los septos, infiltración mononuclear de los septos, activación de macrófagos alveolares, exudado inflamatorio seroso, hemorragia, infiltrado intersticial. En el bazo se observó un aumento del tamaño del órgano, con disminución de la cantidad de folículos e incluso carencia de estos y en los cortes de timo se observó un apariencia más delgada del órgano con un contenido de medula de aproximadamente de 50%.



Figura 33. Fotografía que muestra un corte de pulmón de ratón Balb/c sano teñido con hematoxilina-eosina (100x)



Figura 34. El grupo de fotografías de arriba muestran cortes de pulmón de ratón Balb/c infectado teñidos con hematoxilina-eosina (100x)

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

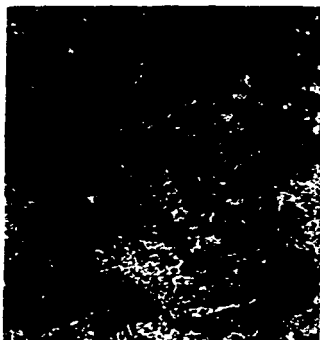


Figura 35. Fotografía que muestra un corte de bazo de raton Balb/c sano teñido con hematoxilina-eosina (100x)

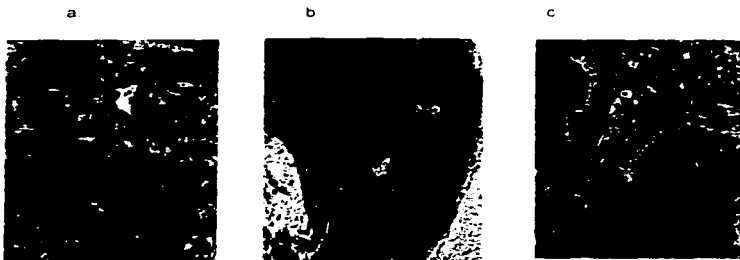


Figura 36. El grupo de fotografías de arriba muestran cortes de bazo de raton Balb/c infectados teñidos con hematoxilina-eosina (100x) Es notorio en la imagen (b) la ausencia de folículo en la zona examinada



Figura 37. Fotografía que muestra un corte de timo de ratones Balb/c sanos teñido con hematoxilina-eosina (100x)



a



b



c)

Figura 38. El siguiente grupo de fotografías (a y b) muestran cortes de timo de ratones Balb/c infectado teñidos con hematoxilina-eosina (100x). En la imagen (c) se muestra un corte que demuestra la presencia de traqueítis en el animal examinado

5. DISCUSIÓN

Los *Mycoplasmas* causan enfermedades respiratorias, artríticas y urogenitales en animales y humanos. La incidencia de infecciones del tracto respiratorio debido a *M. pneumoniae* en los Estados Unidos se ha estimado de 8 a 15 millones de casos (Fernald y col., 1975). En animales, estos microorganismos causan enfermedades severas en virtualmente todas las especies de mamíferos estudiadas, con gran importancia económica debido a su alta mortalidad y morbilidad que causa reducciones en la producción de bovino, borregos, cabras, cerdos y aves. Además, las enfermedades respiratorias por *Mycoplasmas* en ratas y ratones de laboratorio pone en riesgo los resultados en la investigación biomédica que los usan como modelos (Casell y col., 1981).

Mientras que los mecanismos de inmunidad humoral juegan un papel importante en la protección contra infecciones sistémicas, la protección de la superficie de mucosas contra infecciones por *Mycoplasmas* parece llevarse a cabo a través de mecanismos complejos locales y mediados por células que no se han entendido completamente (Maniloff y col., 1992). La patogénesis de las micoplasmosis es un proceso complejo influenciado por la información genética del hospedero y del organismo, factores ambientales y la presencia de otros agentes infecciosos. Se han sugerido muchos factores de virulencia para varios *Mycoplasmas*, pero no hay casos claros de causa y efecto entre estos factores y la patogenicidad. No obstante, hay un número de atributos en estos microorganismos que aparentemente afectan la patogenicidad de la enfermedad los cuales incluyen su habilidad para adherirse a células, causar daño tisular, variar fenotípicamente con una alta frecuencia y distorsionar o resistir la respuesta inmune del hospedero para sobrevivir (Maniloff y col., 1992).

En este trabajo la pregunta principal fue ¿que hacen los *Mycoplasmas* al sistema inmune del hospedero para mantenerse por tanto tiempo sin ser destruido?. Una propiedad sobresaliente de estos microorganismos es el de provocar infecciones crónicas en las cuales se asume que son capaces de regular o modular la respuesta inmune del hospedero en su beneficio, tema que es muy complejo y aún se encuentra en evolución. El presente trabajo refuerza muchos elementos ya anteriormente reconocidos de los *Mycoplasmas* y profundiza más en lo que realiza este microorganismo para persistir en el hospedero. Las evidencias en este trabajo son claras, este microorganismo hace más

que distraer la respuesta inmune, aparentemente logra dirigirla en el sentido que le conviene para lograr condiciones de crecimiento más estables.

La micoplasmosis en ratón ofrece un modelo accesible y presenta las características más importantes de esta enfermedad en otros hospederos, además se cuenta con una gran cantidad de reactivos inmunológicos para ratón que no se tienen para otras especies. Para poder utilizar este modelo, en primera estancia se debía corroborar que el *M. pulmonis* estuviera alterando el perfil inmunológico normal de los animales, para esto se diseñaron experimentos que nos brindaron información acerca del estado de la inmunidad humoral y celular de ellos. Para evaluar la inmunidad humoral de los ratones infectados se realizó la variación de los niveles de anticuerpos contra eritrocitos de carnero y contra antígenos del *Mycoplasma*, en el primer caso se encontró que los animales infectados tuvieron una capacidad de respuesta disminuida, dando por lo tanto una respuesta pobre de anticuerpos aglutinantes. Esta observación es similar a los hallazgos de un reporte que describe la depresión de los títulos de IgG en ELISA contra colágena en ratas Lewis infectadas experimentalmente 28 días antes con *M. pulmonis* (Taugog, 1984). Además, Williamson y colaboradores (1986) mencionan que las ratas Lewis y Fischer incrementaron la respuesta inmune humoral medida por las células formadoras de placas (CFP), ésta respuesta tuvo un pico al día 3 después de la inmunización con *M. pulmonis*, regresa a los valores normales el día 4 y permanece así hasta el final del estudio el día 6. La comparación con los resultados de este trabajo es difícil ya que se utilizaron diferentes cepas de animales y tiempos de estudio, sin embargo es importante mencionarlos por lo poco que se ha encontrado en la literatura acerca de la cinética de la respuesta inmune humoral contra *Mycoplasma* en estado crónico infeccioso. En otro estudio (Aguila y col., 1988) las ratas fueron infectadas al menos 14 días antes de que los títulos de anticuerpos contra GRC fueran determinados. En estudios con colágena (Taugog, 1984) las mediciones se hicieron 28 días después de que los animales fueron expuestos al *M. pulmonis*. En el estudio conducido por Williamson y col., las ratas fueron expuestas al microorganismo de 0 a 6 días antes de realizar el ensayo de células formadoras de placas (CFP). Puede ser que el ensayo de CFP hubiera sido reducido más allá de 6 días, no obstante las diferencias metodológicas en los casos anteriores también se obtuvo una respuesta inmune contra el antígeno reducida. Los mecanismos por los cuales el *M. pulmonis* produce supresión sobre la respuesta inmune humoral contra los GRC se desconoce hasta ahora. Aguila y col., trataron de explicar este fenómeno como una competencia antigénica secuencial (Rodovich, 1967) en el que por

ejemplo la inyección de un antígeno (*M. pulmonis*) en un animal puede suprimir parcialmente la respuesta inmune de ese animal contra otros antígenos administrados posteriormente. Otras explicaciones que estos autores ofrecen es la existencia de complejos inmunes en animales infectados con este microorganismo, lo cual ya ha sido reportado previamente (Kono, 1985). Estos complejos inmunes pueden suprimir la activación de células B a través de la activación de una línea "supresora" de células T (Bolton, 1980). Los complejos antígeno-anticuerpo también pueden interactuar con los linfocitos, aparentemente por medio de receptores para la porción Fc de los anticuerpos participantes para suprimir la respuesta contra el antígeno (Cox, 1983)

En cuanto a la evaluación de los niveles de anticuerpos anti-*Mycoplasma* los resultados obtenidos muestran que los animales infectados no producen una respuesta de anticuerpos adecuada para contrarrestar el proceso patológico, al inocular solo membranas los títulos de anti-Mp y anti-Mc alcanzan niveles más altos. Esto nos da a entender que el cuerpo del *Mycoplasma* si es antigénico y despierta una buena repuesta inmune pero que el microorganismo vivo elimina esa antigenicidad y hace que la respuesta de anticuerpos sea menor, es decir el *Mycoplasma* esta impidiendo de alguna manera que se desarrolle la inmunidad humoral adecuadamente. Otra posibilidad de interpretación de estos resultados es que la respuesta de anticuerpos sea mas bien local (en las mucosas) que sérica y que por eso los títulos de anticuerpos sean bajos en suero. Hay pocos estudios que relacionen los niveles de anticuerpos con el estado de la infección, sin embargo se sabe que la inmunidad contra *M. bovis* correlaciona mejor con la presencia de anticuerpos en lavados bronquiales que en suero (Howard y Taylor, 1985), lo cual puede explicar parcialmente la obtención de títulos de anticuerpos anti-Mp séricos bajos en el experimento realizado en este trabajo. En ratas infectadas experimentalmente con *M. pulmonis*, los ganglios linfáticos del tracto respiratorio superior son los sitios iniciales y principales de producción de anticuerpos a lo largo de la enfermedad (Simecka y col., 1991). Subsecuentemente, las células formadoras de anticuerpos anti-Mp aparecen en lavados nasales, pulmones, ganglios linfáticos asociados a pulmón y bazo, por lo tanto es posible que la respuesta específica contra *Micoplasmas* en un proceso infeccioso se desarrolle primero en la región de la enfermedad y se refleje poco en suero. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que los fenómenos de regulación inmunológica que se discutirán más adelante tengan un efecto negativo en la respuesta de anticuerpos específicos contra éste microorganismo.

En relación al estudio de la respuesta inmune celular se decidió utilizar técnicas básicas sencillas pero que no brindaron una idea de que es lo que el infección por *Mycoplasma* está produciendo en el sistema inmune. Así, se estudiaron los cambios en los valores hematológicos de animales infectados comparados con los no infectados; el efecto de la infección en las funciones fagocíticas, en los porcentajes de células formadoras de rosetas espontáneas y en el peso de un órgano inmunológicamente importante como es el bazo. Según se ha reportado, las infecciones con varias especies de *Mycoplasma* puede suprimir la respuesta mediada por células (Fiala y col., 1974; Bibeferd, 1982), *M. bovis* (Benett y Jasper, 1977), y *M. mycoides* var. *mycoides* (Roberts, 1973), *M. suis* en cerdo (Adegboye, 1978), y *M. arthritis* en ratas y ratones (Kaklamanis y Pavlatos, 1972). En los estudios de Aguila y col. (1988), la respuesta inmune celular no fue significativamente disminuida o elevada de los niveles control. El *M. pulmonis* se sabe es mitogénico en ratas (Naot, 1979) y en este trabajo se demuestra que también es mitogénico para células de bazo de ratón. Se ha demostrado que el número de linfocitos se incrementan en ratas Lewis y Fisher 344 infectadas con *M. pulmonis* (Davis y col., 1982). Por lo tanto uno podría esperar que la respuesta inmune mediada por células estuviera elevada en animales infectados debido al incremento en células. Sin embargo esto no ocurre. Estos resultados concuerdan con otro reporte en los cuales se observó un incremento no significativo en la incorporación de timidina en la transformación blastoide en respuesta a antígenos de *M. pulmonis* (Davis, 1985). En los experimentos realizados en este trabajo se observó una afección en el sistema fagocítico tanto a nivel de polimorfonucleares como a nivel del bazo evidenciados con la técnica de fagocitosis *in vitro* y la técnica de eliminación de carbón coloidal respectivamente, esto es posiblemente debido a la inducción de síntesis de citocinas (p.ej. IL-10), ya que en ambos casos no fue posible el aislamiento del microorganismo de bazo ni de sangre, por lo tanto es difícil demostrar una interacción directa entre el *Mycoplasma* y las células fagocíticas que pudiera haber causado la disminución en los valores. El análisis de la prueba de formación de rosetas "espontáneas" (E) mostró controles de aproximadamente 50% de células positivas a rosetas E, mientras que los animales infectados tuvieron 45%, sin embargo esta diferencia no fue significativa. En un análisis global, los animales infectados presentaron una alteración significativa de los niveles de glóbulos blancos totales, porcentaje de linfocitos, porcentaje de polimorfonucleares además de una cantidad de plaquetas muy variable; su capacidad fagocítica mostró reducción notable sobre todo al día 7 y 10 post-infección situación que no fue reproducida por los

preparados membranales. Estos animales tuvieron un pico de anticuerpos en 14 días con muy bajos títulos de anticuerpos específicos (pero quizá altos títulos de anticuerpos inespecíficos de acuerdo a la literatura), con una infección persistente que no se resuelve en un periodo de tiempo, lo cual montó la escena para evaluar la disfunción de la respuesta inmune en una infección crónica, trabajando con la hipótesis de un posible cambio de activación celular T_{H1} a activación de células T_{H2} impulsando con esto una respuesta inmune inefectiva contra este microorganismo.

Intentando definir si alguna parte integral del *Mycoplasma* era la responsable de estos efectos se analizaron los efectos de la inoculación de membranas en la inmunidad de animales normales. *In vivo* las fracciones de *M. pulmonis* y *M. capricolum* produjeron respuestas de anticuerpos muy marcadas medidas por DOT-ELISA las cuales dieron pico en el día 7. La inmunización concomitante de eritrocitos de carnero mostró títulos de hemaglutinación al día 5 con las dos preparaciones con una declinación de los títulos a partir del día 14 (se sugiere una posible papel adyuvante de estas preparaciones pero se necesitan realizar más experimentos). El tratamiento de animales con estas fracciones incrementaron el peso del bazo a las 24 hr, sin modificar el porcentaje de células formadoras de rosetas, pero incrementando la cantidad de células polimorfonucleares, linfocitos y células blancas de sangre periférica, sin efectos en las células rojas. La administración de estas membranas también mejoró la eliminación de carbón coloidal dentro de un periodo de 30 minutos de medición y produjo el aumento de tamaño del bazo a las 24 hr después de la inoculación. *In vitro* las preparaciones de membranas mostraron una actividad mitogénica en células de bazo con una curva dosis-respuesta directamente proporcional. Todas estas observaciones son consistentes quizá con una actividad adyuvante de los preparados membranales, con la activación de macrófagos y liberación de monocinas, lo cual ya ha sido reportado y pudiera o no contribuir a la interpretación de la acción de este microorganismo en la infección crónica. La aparente activación policlonal de las membranas puede interpretarse como parecida a la causada por la endotoxina (LPS), sin embargo experimentos realizados anteriormente mostraron mecanismos diferentes de activación que la endotoxina (Romero y col., 1993). Bajo esta perspectiva lo que se presentó entonces fue una enfermedad cuyo agente causal provoca una fuerte supresión de la respuesta inmune pero cuyos componentes orgánicos (membranas) tienen actividad estimuladora en el sistema inmune, una paradoja interesante que nos dio la oportunidad para tratar de entender los fenómenos celulares en una enfermedad crónica de este tipo.

El concepto de heterogeneidad de las respuestas inmunes se produjo a partir de observaciones a nivel clínico de infecciones que se presentaban con rasgos patológicos y clínicos completamente diferentes y polarizados. Por ejemplo, la forma tuberculoides de la lepra se encontró que estaba asociada con reacciones fuertes de hipersensibilidad retardada (DTH) y bajos niveles de anticuerpos mientras que la lepra lepromatosa estaba asociada con altos títulos de anticuerpos y débiles reacciones de hipersensibilidad retardada. La relación inversa entre los anticuerpos y la DTH pudo ser manipulada experimentalmente variando la dosis y la forma del antígeno usado para inmunizar los animales (Abbas y col., 1996). Estos resultados mostraron una sorprendente dicotomía en la naturaleza de las respuestas inmunes contra infecciones naturales e inmunizaciones experimentales. Una paradoja surgió cuando se estableció que la reacción DTH y la producción de anticuerpos contra antígenos proteicos eran dependientes de la función de los linfocitos CD4+. ¿Podría la misma subpoblación estar relacionada en dos respuestas tan opuestas? Mossman y col. (1986) demostraron que las clonas de células T de ratón CD4+ pueden clasificarse en dos distintas poblaciones con base en su patrón de producción de citocinas. Este grupo de investigadores llamó a las subpoblaciones T_{H1} (T cooperadoras 1) y T_{H2} (T cooperadoras 2), siendo las T_{H1} los encargados de producir Interleucina 2 (IL-2), interferón- γ (IFN- γ) y el Factor de Necrosis Tumoral (TNF- β) y las clonas T_{H2} aquellas que producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y IL-13. Con el tiempo, se ha recolectado mucha evidencia de que ambas subpoblaciones difieren en el tipo de respuesta por anticuerpos (isotipos) que inducen, que las T_{H1} son mediadoras de las reacciones DTH y las células T_{H2} fueron cooperadoras más potentes para la producción de anticuerpos, dándonos una explicación sencilla para la dicotomía mencionada anteriormente.

Otros dos elementos cruciales para el entendimiento de la generación de la diversidad de las células cooperadoras T fueron que cada subpoblación produce citocinas que sirven como su propio factor autócrino de crecimiento (Lichtman y col., 1987) y promueven la diferenciación de células T hacia alguna de las subpoblaciones. En segundo lugar las dos subpoblaciones producen citocinas que regulan en forma cruzada el desarrollo y actividad de la subpoblación opuesta. Por ejemplo, el IFN- γ producido por las células T_{H1} amplifica el desarrollo de T_{H1} e inhibe la proliferación de las células T_{H2} (Fitch y col., 1993), mientras que la IL-10 producida por las células T_{H2} bloquea la activación de las células T_{H1} . El resultado neto de la auto-amplificación e inter-regulación

es que una vez que la respuesta inmune de células T se inicia en un sentido sea T_{H1} o T_{H2} tiende a ser progresivamente polarizada en esa dirección

La mayoría de los estudios de tolerancia inmunológica se han enfocado en la inducción de tolerancia contra antígenos proteicos extraños o trasplantes de tejidos. La tolerancia de las células T cooperadoras a antígenos proteicos puede inducirse administrando grandes dosis de los antígenos sin adyuvantes, bloqueando co-estimuladores durante el reconocimiento inicial del antígeno o administrando péptidos mutados que enganchan receptores de antígenos específicos de células T de una forma anormal (Krusbeek y col., 1996). En muchos de estos sistemas experimentales de tolerancia periférica la inducción de las respuestas de células T_{H1} son bloqueadas preferencialmente. El hallazgo de que las respuestas T_{H2} a menudo no son afectadas viene de la posibilidad de que el estado de no respuesta inmunológica es, al menos parcialmente, debido a las citocinas inmunosupresoras producidas por las células T_{H2} . Se ha obtenido evidencia que apoya esta hipótesis de algunos sistemas experimentales (Liblau y col., 1995; Rocken y col., 1996). La tolerancia a los antígenos propios puede imitarse expresando varias proteínas tales como moléculas alógenicas del complejo mayor de histocompatibilidad o proteínas virales en tejidos usando tecnología transgénica (Miller y Flavell, 1994). En estas situaciones la proteína expresada está presente a través del desarrollo del animal y es un antígeno propio efectivamente. En este caso también la tolerancia está a menudo asociada con un bloqueo en el desarrollo de las células Th1 reactivas a antígenos propios. La activación de células T_{H1} proinflamatorias se correlaciona con la inducción de daño autoinmune a tejido (Scott B., 1994; von Herrath y col., 1995) y en algunos modelos muestra el mismo control genético que la resistencia a leishmaniasis (Scott B., 1994). Un aspecto importante de la dicotomía de células T son las implicaciones de este concepto provee a los determinantes inmunológicos de enfermedad. De hecho los resultados de una gran parte de procesos patológicos incluyendo infecciones, desórdenes alérgicos y autoinmunes han sido relacionados a la expresión de patrones de citocinas (T_{H1} o T_{H2}) y por lo tanto a la inducción de una subpoblación de células particular. En el caso de enfermedades infecciosas el balance entre las respuestas T_{H1} y T_{H2} contra un agente infeccioso puede influenciar el crecimiento del patógeno y la inmunopatología. Los estudios de leishmaniasis en cepas de ratón proveen la primera clara demostración de que la resistencia y susceptibilidad a enfermedades infecciosas correlacionan con las respuestas antimicrobiales T_{H1} y T_{H2} respectivamente (Reiner y Locksley, 1995). Se reconoce ahora que la resistencia a

muchos microorganismos intracelulares incluyendo bacterias, protozoarios y hongos está relacionada a la inducción de respuestas T_{H1} y en particular a las citocinas activadoras de macrófagos: IFN- γ y TNF- α (Sher y Coffman, 1992, Kaufman S H., 1993).

Mientras que las respuestas T_{H1} también predominan en la mayoría de las infecciones intracelulares, un grupo más diverso de mecanismos efectores que incluyen células NK activadas con IFN- α/β , linfocitos T CDB+ citolíticos y anticuerpos neutralizantes (a menudo con patrones tipo T_{H1}) son responsables de la resistencia del hospedero. En muchas de estas infecciones, la IL-12 es inducida muy temprano durante la infección y juega un papel central en el establecimiento de la resistencia dependiente de IFN- γ así como de los perfiles polarizados de las respuesta T_{H1} .

Las respuestas antimicrobianas T_{H1} también producir también patología en la forma de inflamación granulomatosa, artritis y colitis (Romagnani S., 1994). En muchos casos, los daños tisulares al hospedero se desprenden del lado tóxico de los efectos de las interleucinas y otros mediadores de la inflamación liberados durante el ataque inmune normal sobre el patógeno. Reacciones patológicas severas pueden también ser resultado de la inter-regulación defectuosa por la IL-10, el TGF- β y otras citocinas que normalmente inhiben las funciones efectoras de T_{H1} , esto se ilustra perfectamente por el incremento en la susceptibilidad de los ratones "Knockout" a IL-10 a la enfermedad inflamatoria inducida por protozoarios y bacterias (Kuhn y col., 1991). La similitud de estas patologías con las enfermedades autoinmunes apoya la noción de un mecanismo común de daño de tejido debido a la excesiva o descontrolada respuesta T_{H1} .

En contraste con los microorganismos intracelulares, los patógenos extracelulares y particularmente los helmintos disparan una respuesta típica T_{H2} . Los anticuerpos IgG dependientes de T_{H2} pueden contribuir a la neutralización de toxinas que son producidas por las bacterias extracelulares. No obstante, hay una gran controversia acerca del papel protector de la respuesta de anticuerpos IgE, eosinófilos y células cebadas producida por la reacción T_{H2} que acompaña las infecciones por parásitos protozoarios. Esto es particularmente válido en modelos de ratón donde la eliminación de la respuesta de eosinófilos y/o IgE a menudo no tiene efecto sobre la resistencia a los helmintos. Se requiere la IL-4 para el control de muchas infecciones intestinales por helmintos, aparentemente a través de la inducción de cambios fisiológicos en el intestino, y no a través de la inducción de anticuerpos IgE (Abbas y col., 1996). También es posible que los helmintos hayan desarrollado la capacidad de inducir las respuestas T_{H2} para protegerse a sí mismos contra mecanismos efectores. A pesar de los mecanismos y

valor protector de las respuestas antihelmínticas T_{H2} , está claro que tales respuestas pueden ser detrimentales para el hospedero contribuyendo a la formación de granuloma y hipereosinofilia (Romagnani S., 1994).

Los hallazgos en el caso de la lepra han sugerido una relación causal entre la actividad relativa T_{H1}/T_{H2} y la progresión de las enfermedades infecciosas, en la cual las lesiones tuberculoideas y lepromatosas expresan citocinas predominantes T_{H1} y T_{H2} respectivamente (Abbas, 1996). Un mecanismo similar se ha sugerido para subrayar la progresión del SIDA. Se han observado una pérdida temprana de la producción y respuesta de IL-2, IFN- γ e IL-12, pero hay un debate considerable acerca de si hay un incremento simultáneo en la producción de citocinas T_{H2} y si es así, esto explicaría la progresión viral y la inhibición de T_{H1} (Graziosi y col., 1994). Quizás algo más sensato sea la observación de que los virus HIV-1 infectan preferentemente clones T_{H2} , un hallazgo que podría explicar la persistencia del virus en un medio ambiente deficiente de T_{H1} (Maggi E., 1994).

¿Es posible que los *Mycoplasmas* puedan mantenerse crónicamente en un individuo dirigiendo el tipo de respuesta (T_{H1} o T_{H2}) que le convenga? Para resolver esta pregunta se diseñaron una serie de experimentos con el fin de determinar la influencia de la infección en la actividad de diferentes subpoblaciones celulares. Se diseñó un experimento en el que se obtuvieron los porcentajes de células CD4+ y CD8+ de ratones en diferentes etapas de la infección extendiendo el tiempo de estudio a casi tres meses después de la infección. Además se determinaron los efectos a nivel histológico que sufrieron el bazo y el timo de los animales infectados y se midieron los niveles de IL-4 e IFN- γ en suero de los mismos animales. En un experimento aparte se realizó la prueba de hipersensibilidad retardada (DTH) contra albúmina sérica bovina en animales infectados y no infectados. En otro experimento se intentó determinar si el *Mycoplasma* era mitogénico para células B o para células T, utilizando dos metodologías diferentes para la separación de las células a partir de suspensiones celulares de bazo, así como las concentraciones de IL-4 e IFN- γ secretadas por estas preparaciones celulares. En todo esto se encontró que existe un efecto en los porcentajes de células CD4+ y CD8+ en las muestras estudiadas, pero lo más interesante fue que este cambio se llevó a cabo de los 46 a los 60 días post-infección, es decir, cuando ya el microorganismo se ha instalado perfectamente y logrado escapar a los mecanismos de defensa, tal vez esta sea la razón por la que nadie había reportado este tipo de fenómenos, en sí el fenómeno produce el descenso del porcentaje de la población CD4+ en timo y en sangre con el colateral

aumento de las células CD8⁺ en ambos órganos, es difícil establecer en este experimento si el aumento de una población se debe por el descenso de la otra o viceversa, sin embargo los datos se validan al observar los porcentajes invariables en el bazo; además, el peso del timo en los animales infectados se mantiene casi constante lo que hace pensar que en este órgano no hubo reducción de masa celular pero si de células con ciertos receptores. Este es el primer reporte en donde se detecta este tipo de variaciones celulares en la infección por *Mycoplasmas*, el caso más representativo de este tipo de fenómenos producidos por un agente infeccioso es el del virus del SIDA en donde la disminución de los linfocitos CD4⁺ muestra el estado de la infección (Maggi y col., 1994), además el efecto en las subpoblaciones de linfocitos T por los *Mycoplasmas* ofrece más argumentos para incluir a estos microorganismos como cofactores en el desarrollo del SIDA (Lo y col., 1991). Otros datos interesantes obtenidos a partir de este experimento son las variaciones en concentración que sufren la IL-4 e IFN- γ en el suero de estos animales infectados. Se encontró un aumento normal en la concentración de IFN- γ a partir del día 10 que se sostuvo parcialmente hasta el día 24 pero que se vio disminuido cuando la concentración de IL-4 subió de nivel a partir del día 15, para mantenerse ambos en niveles basales para el resto del tiempo de infección en estudio. Esto pudo haber influido para que las poblaciones de CD4⁺ y CD8⁺ cambien en proporción como se muestra en la figura 27 la cual establece que la relación CD4⁺/CD8⁺ sufrió en el timo dos "oleadas" una a partir del día 10 hasta el día 24 y otra a partir del día 45 hasta el día 75 de la infección. Esto a la vez coincide con los resultados de la prueba de hipersensibilidad retardada (DTH) la cual muestra igualmente dos "oleadas" en la gráfica, una del día 10 que se recupera gradualmente hasta el día 30 y otra del día 40 que se recupera hasta el final del estudio. Estos estudios nos dan elementos para establecer que el microorganismo está desviando la respuesta inmune de T_{H2} que lo hace consistentemente a lo largo de su presencia en el hospedero y sus efectos toman un corte de tipo recurrente que además es característico en la enfermedad crónica cursada por *Mycoplasma*. Hay muchos casos de respuestas T_{H1} y T_{H2} bien documentados como lo muestra Mossman (Mossman, 1996), pero es la primera vez que un indicio de este tipo de respuesta se presenta en la infección por *Mycoplasmas*. Actualmente se reconocen varios fenotipos de células T de acuerdo al patrón de citocinas que expresan, por ejemplo las citocinas de ambos patrones (T_{H1} y T_{H2}) se han llamado células T_{H0} (Mossman y Coffman, 1989); las células que producen grandes cantidades del factor transformante del crecimiento beta (TGF- β) han sido llamadas T_{H3} (Chen y col., 1994) y otros fenotipos

adicionales se han descrito entre las clones de larga duración. A nivel de cultivos de corta duración, la IL-4 y la IL-5 son a menudo co-expresadas, la IL-4 y el IFN- γ son normalmente expresados exclusivamente y el IFN- γ y la IL-10 son co-expresadas en algunas células. Puede haber heterogeneidad dentro de las subpoblaciones T_{H1} y T_{H2} si las grandes variaciones cuantitativas de la secreción de citocinas que se observan entre las clonas *in vitro* también ocurren en células normales, las interpretaciones posibles de la complejidad de los subgrupos va desde un simple modelo T_{H1}/T_{H2} (y T_{H0}/T_{H1}) con diferencias cuantitativas a diferentes estados de desarrollo, a un modelo en el que no hay subgrupos definidos sino una cascada de combinaciones diferentes de secreción de citocinas (Kelso, 1995). En algunos sistemas, las clonas muestran patrones de expresión de citocinas T_{H1} y T_{H2} que encajan en una distribución al azar. No obstante el análisis de los datos de estudios anteriores revela que clonas aloespecíficas de corta duración de ratones no inmunizados o ratones infectados con *Nippostrongylus brasiliensis*, mostraron una correlación inversa de síntesis de IFN- γ e IL-4, mientras que las síntesis de IL-4 e IL-5 mostró una correlación positiva (Street y col., 1990). Los patrones de la expresión de citocinas por células individuales en cultivos de corta duración también indican que mientras hay claramente mas patrones que el patron extremo T_{H1}/T_{H2} , la expresión de citocinas no es normalmente al azar. ¿Si la expresión de citocinas no es el azar, cuantos fenotipos distintos de células T existen? Diferencias menores o cuantitativas en la expresión de citocinas pueden representar distintos fenotipos, estados de desarrollo o respuestas transitorias a las condiciones de estimulación (por ejemplo diferentes etapas de infección). Los patrones de citocinas pueden ser cambiados por un fuerte estímulo u otras citocinas: por ejemplo, la IL-2 y la IL-12 mejoran la síntesis de IFN- γ , mientras que la IL-4 y la IL-10 inhiben la síntesis de citocinas T_{H1} . Esto podría permitir la modulación de corta duración de la respuesta de citocinas sin alteración permanente de los fenotipos de células T (Abehsira-Amar y col., 1992). No hay duda de que muchas clonas de células T *in vitro* e *in vivo* muestran al ser estimuladas una clara dicotomía entre la respuesta IL-2/IFN- γ /TNF y la respuesta IL-4/IL-5/IL-10, que es una división funcional del sistema inmune (Mossman y Sad, 1996). La IL-4 estimula la diferenciación hacia células T_{H2} mientras que el IFN- γ , IL-12 y TGF- β mejora el desarrollo de T_{H1} (Seder y Paul, 1994). Sin embargo el papel del IFN- γ puede variar en diferentes sistemas experimentales: la diferenciación T_{H1} se inhibe en algunos sistemas con anti-IFN- γ pero no en todos los casos sucede esto (Seder y col., 1993). En una respuesta primaria común las células T

antígeno-específicas están presentes en muy baja frecuencia (1 en 10^5) y otras células proveen el IFN- γ o IL-4 inicial que influencia la diferenciación de las células T. La IL-12 es producida por muchos tipos de células, pero particularmente por macrófagos en respuesta a ciertos productos bacterianos. Las células NK sintetizan IFN- γ en respuesta a la IL-12 o al enlace de anticuerpos a los receptores para Fc mediado por antígeno. En ratón, la producción temprana de IL-4 puede ser inducida por las células cebadas, los basófilos y por la recientemente descubierta subpoblación de células T CD3+CD4+NK1.1+ que parecen estar restringidas a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad. Estas células tienen un repertorio de receptores de células T (TcR) restringido, se desconoce su especificidad a antígeno y produce grandes cantidades de IL-4 en pocas horas después de una estimulación policlonal. Aunque las explicaciones iniciales fueron que tipos de células presentadoras de antígeno (CPA) influenciarían selectivamente la diferenciación de células T, es bien conocido que las células dendríticas, los macrófagos y las células B son capaces de inducir la diferenciación de las células T_{H1} y T_{H2} en presencia de las citocinas apropiadas. Sin embargo esto no excluye un papel para diferentes CPA en la decisión T_{H1} - T_{H2} , ya que pueden producir influencias selectivas dependiendo de las citocinas que ellas secretan. Además evidencia reciente sugiere que las moléculas co-estimuladoras de CPA pueden influenciar selectivamente la diferenciación de las células T (Mossman, 1996). Aunque muchas citocinas tienen efectos que han sido bien caracterizados sobre la diferenciación de las células T, está poco claro como es que el sistema inmune escoge apropiadamente la respuesta contra un patógeno particular. Se ha sugerido que las proteinasas, requeridas por organismos multicelulares para la penetración de tejidos, inducen una respuesta T_{H2} apropiada contra los parásitos multicelulares. Además un producto de *Listeria* induce la síntesis de IL-12 iniciando con esto la respuesta T_{H1} (Hsieh y col., 1993). En los *Mycoplasmas* esto último no se descarta, es decir la posibilidad de que algún producto integral o de excreción produzca el cambio de T_{H1} a T_{H2} . En este trabajo se intentó dilucidar el efecto de los *Mycoplasmas* sobre linfocitos T y B tanto a nivel de proliferación como en la síntesis de citocinas. Se separaron suspensiones celulares de linfocitos con dos métodos diferentes, a) utilizando anti-Thy 1.2+ complemento de cobayo que ofrece aproximadamente 90% de pureza en la separación de linfocitos de T y B, y b) el método que utiliza las perlas Dynabeads que provee una separación celular del 99%. En el primer caso como era de esperarse no se pudo distinguir si los linfocitos B son estimulados en realidad por el *Mycoplasma* y/o sus derivados por la contaminación de

células T aún presente en la suspensión. Sin embargo con las perlas Dynabeads se puede distinguir claramente dos tipos de estimulación, la que se obtiene por células T y la obtenida por células B, y aunque las cuentas por minuto son bajas (por el bajo rendimiento de células obtenido) es claro que hay una diferencia. Lo más interesante obtenido es que las células T son estimuladas por el *Mycoplasma* solo en presencia de células adherentes como se muestra en la figura 30. Este resultado nos permite especular acerca de la posibilidad de una estimulación inespecífica del tipo similar a la causada por los superantígenos, los cuales han sido aislados ya de otras especies de este microorganismo pero nunca de *M. pulmonis*.

Esto pudo también estar contribuyendo a la inmunosupresión encontrada en esta infección como lo muestran recientes reportes donde se comparó la producción y proliferación de células provenientes de pacientes con espondilitis anquilosante (SA) contra las de donadores sanos usando un ensayo de sangre completa. Donde cultivos de células sanguíneas fueron estimuladas por el superantígeno conocido como MAS y otras más. Los individuos con SA mostraron IFN- γ significativamente más bajo y rangos de proliferación celular más baja que los controles con todos los mitógenos probados. Mientras que no hubo variación en los niveles de IL-6. La IL-1 fue ligeramente baja en los grupos con SA pero sólo con MAS mostró diferencia estadística. Además hubo una elevación significativa de linfocitos en pacientes con SA produciendo números altos de células CD4+ lo que implica que la relación CD4/CD8 alta, los autores concluyen que los resultados apuntan hacia un fenómeno de supresión de los linfocitos T (Brand y col., 1997). Como se notará muchas de las observaciones del anterior reporte se asemejan a varios fenómenos obtenidos en este trabajo, lo cual da consistencia y despierta muchas interrogantes.

La micoplasmosis por *M. arthritis* depende del MAM (*M. arthritis* mitogen) ya que la toxicidad ocurre sólo en cepas de ratones congénicos e intracruzados que expresan moléculas I-E. Una asociación similar con el I-E se ha demostrado también por la necrosis dérmica inducida por la inyección subcutánea del microorganismo en ratón. Los investigadores sugirieron que el MAM participa no sólo activando las células T produciendo la liberación de linfocinas inflamatorias sino también suprimiendo las defensas del hospedero, evidencia de esto es que el organismo inyectado intravenosamente persiste más tiempo en circulación sanguínea de las cepas de ratones I-E⁺ que en las cepas de ratones congénicos I-E⁻ (Cole y col., 1982). La inmunosupresión se ha observado recientemente después de la inyección de MAM en ratones portadores

de I-E, estos ratones presentan linfocitos incapaces de proliferar en respuesta al MAM y en menor proporción a los mitógenos de lectinas. Este estado anérgico parece estar mediado por las células CD4⁺ que pueden suprimir la respuesta normal de las células a los mitógenos. MAM parece suprimir otras funciones de células T tales como la sensibilidad al contacto del dinitrofluorobenceno (DNFB) y pueden prolongar los trasplantes entre las barreras H-2 y no H-2 (Cole, 1991). En contraste el MAM parece no tener efectos supresores consistentes *in vivo* sobre las funciones de los linfocitos T sino al contrario parece aumentar su actividad, esto es concluido cuando se observó que las inyecciones intravenosas de MAM incrementa el número de células productoras de anticuerpos en respuesta a la administración de eritrocitos de carnero *in vivo* (Cole, 1991).

El fenómeno observado en los experimentos de este trabajo muestran una secuencia de activación y desactivación de clones de linfocitos T que nos lleva a la presencia de diferentes patrones de interleucinas durante la infección, los superantígenos pueden lograr esto como se discutió anteriormente pero ¿que tanto puede la dosis de los antígenos de *Mycoplasmas* influenciar en la regulación de la respuesta inmune?. La dosis de antígeno puede ser un regulador importante para la selección de las funciones efectoras. Estudios *in vivo* mostraron que altas y bajas cantidades de antígeno estimularon DTH mientras que niveles moderados estimularon la producción de anticuerpos (Mossman y Sad, 1996). Efectos similares ocurren en modelos infecciosos como se demostró en la inducción de una reacción DTH que sanaba a ratones BALB/c infectados con cantidades muy bajas de *Leishmania* y una respuesta de anticuerpos que no sanaba a los ratones utilizando dosis más altas (Bretscher y col., 1996).

Experimentos recientes *in vitro* también han implicado la dosis del antígeno como un factor importante en la decisión T_{H1} - T_{H2} aunque la interpretación de los resultados es complicada. El incremento de la dosis puede cambiar la respuesta de T_{H1} a T_{H2} o viceversa y cuando se usa un amplio rango de dosis pueden ocurrir dos fenómenos: $T_{H2} > T_{H1} \rightarrow T_{H2}$ (Hosken y col., 1995). No obstante los resultados *in vivo* sugirieron una progresión DTH \rightarrow anticuerpos \rightarrow DTH. Los efectos de la concentración del antígeno sobre la diferenciación deben distinguirse de la regulación de células efectoras T_{H1} y T_{H2} maduras, células T_{H1} completamente diferenciadas son estimuladas por dosis moderadas pero no por dosis altas, mientras que las células T_{H2} responden a un amplio rango de concentraciones (Fitch y col., 1993). Las consecuencias de las dosis altas o bajas de antígeno depende de la naturaleza soluble o particulada del antígeno. A bajas

concentraciones de un péptido antigénico soluble, cada CPA debe presentar un baja densidad de complejos péptido-CMH. En cambio, a bajas dosis de un agente infeccioso, relativamente pocas CPA capturan antígeno, sin embargo cada CPA debería presentar cantidades substanciales de antígeno debido a la digestión de partículas completas, este efecto se exagera si el patógeno se localiza en una pequeña área de infección. El *M. pulmonis* podría estar utilizando la concentración del antígeno para lograr los cambios T_{H1} a T_{H2} secretando dosis reguladas de productos en forma intermitente que le permitiría desviar la respuesta inmune que le estuviera combatiendo.

La decisión T_{H1} - T_{H2} es crucial para una inmunidad efectiva, por lo tanto puede ser ventajoso para los *Mycoplasmas* el influenciar en esta decisión. Si un solo criterio fuera responsable únicamente para la decisión es muy posible que los microorganismos con cambios evolucionarios rápidos hayan desarrollado formas de interferir. Por ejemplo es bien conocido que los virus han desarrollado mecanismos sofisticados de interferencia inmune basado en la apropiación de muchos genes para receptores de citocinas. Por esto, tiene sentido que la decisión de que función efectora se requiere debe basarse en una compleja red de factores intercomunicados ya que esto debe dificultar la interferencia de patógenos. Aunque las células T_{H1} y T_{H2} son fuentes principales de sus citocinas respectivas otras muchas células dentro y fuera del sistema inmune también producen estas citocinas. Las subpoblaciones de células $T \gamma \delta$ CD4+ y las células CD8+ pueden secretar todos los patrones de citocinas T_{H1} o T_{H2} (Ferrick y col., 1995). Las células NK producen IFN- γ y TNF y contribuyen a una respuesta parecida a la T_{H1} . Como se mencionó antes, la IL-4 (y posiblemente otras citocinas T_{H2}) es sintetizada por las células cebadas, células B, basófilos y células CD3+CD4+NK1.1+ (Yoshimoto y Paul, 1994). Además la IL-10 es producida por macrófagos, queratinocitos y células aún no identificadas de la placenta (Mossman T.R., 1996). Así muchos tipos de células pueden contribuir a un patrón general de citocinas T_{H1} o T_{H2} , y se ha sugerido que estas respuestas deberían referirse como Tipo 1 o Tipo 2 (Sallgame y col., 1991). Aunque muchas tendencias T_{H1} o T_{H2} se han encontrado en infecciones y enfermedades autoinmunes, es seguro que los estudios cuidadosos de las localizaciones anatómicas y la cinética de la respuesta proveerá datos más definitivos. Muchas respuestas inmunes pueden permanecer localizadas, por esto el muestreo de linfocitos de sangre periférica puede proveer información acerca de las respuestas potenciales, mientras que se requiere el muestreo de las células de los ganglios linfáticos para saber las respuestas en activo. Además los tiempos de estudio son importantes como se observó en un modelo

de malaria en la que las respuestas T_{H2} y T_{H2} predominan en diferentes etapas de la infección (Taylor-Robinson y col., 1993) y como se ha demostrado también en este trabajo. El patrón de citocinas T_{H1} y T_{H2} han sido implicadas ahora en muchas respuestas inmunes concernientes a infecciones, alergia y autoinmunidad. Estos patrones de citocinas también contribuyen a la inter-regulación del sistema inmune con otros sistemas como se observa durante la relación entre infección y el embarazo (Wegmann y col., 1993).

Después del análisis de los resultados obtenidos en el presente trabajo en el contexto de los más recientes hallazgos en esta área, solo queda continuar el estudio de los mecanismos de inmunomodulación de los *Micoplasmas* en dos vertientes 1) Tratar de bloquear los efectos a nivel de la producción de interleucinas, inyectando a los animales IL-12 o IFN- γ , o agravarlos inoculando IL-4 o IL-10, y 2) Determinar si el microorganismo induce el efecto estimulando a las células correspondiente o secretando productos "interleucina-like" o algún tipo de superantígeno, como ya se ha demostrado para otras especies de *Micoplasmas*.

6. CONCLUSIONES

1. El *M. pulmonis* causa alteraciones en la respuesta inmune de ratones Balb/c, tanto a nivel humoral como a nivel celular
2. A nivel humoral produce una disminución de la respuesta de anticuerpos contra eritrocitos de carnero
3. Los niveles de anticuerpos anti-Mp en una infección crónica son muy disminuidos, sin embargo, se presenta una respuesta de anticuerpos adecuada contra la membrana de estos microorganismos
4. Existen cambios hematológicos en animales infectados y una disminución en la función fagocítica
5. Las membranas de los *Micoplasmas* son altamente mitogénicas, fenómeno que es independiente de la especie de microorganismo
6. La infección con este microorganismo afecta los porcentajes de linfocitos T CD4+ y CD8+ en timo y sangre, pero no en bazo
7. Existen variaciones en los niveles de IL-4 e IFN- γ durante el transcurso de la infección, los cuales coinciden con la disminución de la respuesta DTH
8. Estos cambios no son permanentes, tienen un comportamiento de tipo recurrente durante todo el proceso infeccioso.
9. De acuerdo a los resultados de este trabajo, los *Micoplasmas* y sus membranas son activadores de los linfocitos B y en menor proporción de los linfocitos T.
10. Los linfocitos T de animales sanos estimulados con productos de *Micoplasmas* secretan niveles altos de IL-4.
11. Linfocitos T de animales infectados estimulados con fitohemaglutinina producen niveles altos de IL-4, que son anormales comparados con los niveles secretados por linfocitos T normales estimulados con este mismo mitógeno
12. Se encontraron pocos cambios histológicos en el timo y bazo de animales estudiados.
13. De acuerdo a los resultados aquí presentados, los *Micoplasmas* parecen estar modulando la respuesta inmune a su conveniencia cambiando el patrón de activación de subpoblaciones de células T de T_{H1} a T_{H2} , con el fin de hacer inadecuada la respuesta inmune del hospedero para su eliminación.

7. APENDICE

- A) Utilización de los Kits para el cálculo de la concentración de Interleucinas.**
- a. Equilibrar el kit a temperatura ambiente
 - b. Determinar el tamaño del ensayo y la distribución de las placas. Determinar el tamaño del ensayo (mitad de la placa o placa entera) considerando el número total de pozos requeridos
 - c. Preparar el buffer de lavado añadiendo 50 ml del concentrado en 950 ml de agua desionizada y mezclar vigorosamente
 - d. Preparar diluciones estándar de IL-4 e IFN- γ
 - e. Para la curva estándar, añadir 100 μ l por pozo de cada estándar en duplicado (total de diez pozos)
 - f. Para muestras de suero se añaden 50 μ l de diluyente de ensayo seguido de 50 μ l de suero
 - g. Sellar la placa con cubierta adhesiva e incubar 1 hora \pm 5 min a $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
 - h. Remover el líquido de los pozos por aspiración o por inversión de la placa y agitación, cuidando de no desensamblar los pozos
 - i. Lavar 4 veces utilizando buffer de lavado en cada pozo
 - j. Eliminar el exceso de líquido utilizando papel higiénico.
 - k. Pipetear 100 μ l del conjugado en cada pozo.
 - l. Sellar la placa con la cubierta adhesiva e incubar por 1 hora \pm 5 min a $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
 - m. Remover el líquido de los pozos aspirando o invirtiendo la placa y agitando sin remover las tiras.
 - n. Lavar 4 veces como en el paso i), después decantar completamente.
 - o. Secar con papel higiénico.
 - p. Pipetear 100 μ l del sustrato a cada pozo.
 - q. Incubar a temperatura ambiente por 20 min
 - r. Detener el desarrollo del color añadiendo 100 μ l de solución de paro por pozo. Los tonos azules de los pozos se tornan amarillos.
 - s. Calibrar el lector de ELISA en los pozos con el estándar de 0 pg/ml, después leer la absorbancia a 450 nm de los pozos restantes.

B) Preparación y uso de perlas Dynabeads.

a. Lavado de las perlas Dynabeads

1. Resuspender las perlas en el vial
2. Transferir la cantidad deseada a un tubo de ensayo.
3. Colocar el tubo junto a un magneto por 2 minutos y pipetear el fluido.
4. Remover el vial y añadir 1 a 2 ml de solución amortiguadora y resuspender
5. Repetir el paso 3 y resuspender al final con un volumen de amortiguador igual al removido

b. Separación de las células Thy 1.2 positivas

1. Preparar la muestra de tejido y suspender las células en medio de cultivo o sol. de Hank con 1% de suero fetal de bovino
2. Contar las células blancas y hacer un estimado del número de células blanco
3. Pipetear el volumen requerido de perlas prelavadas de acuerdo a la tabla o los propios cálculos del experimentador
4. Añadir Dynabeads directamente a la suspensión celular. Mezclar vigorosamente por 1 segundo e incubar durante 20 min a 4°C en un agitador circular con movimiento suave.
5. Colocar el tubo en el magneto por 2 min (3 min para tubos de 50 ml)
6. Pipetear el sobrenadante del tubo mientras las células rosetadas son unidas a la pared del tubo por el magneto.
7. Remover el tubo de ensayo del magneto y resuspender suavemente las células rosetadas en amortiguador de lavado. Evitar la resuspensión usando pipeteo vigoroso o movimiento prolongado con el vortex ya que se puede causar daño a las células.
8. Repetir los pasos 5, 6 y 7 tres veces y resuspender las células en el volumen deseado de un amortiguador apropiado. Las células rosetadas aisladas pueden ser usadas para diversas aplicaciones.

A	Vol. pipeteado	25 μ l	25 μ l	25 μ l
B	No. de perlas	1.0 x 10 ⁶ perlas	2.0 x 10 ⁶ perlas	4.0 x 10 ⁶ perlas
C	No. máximo de células	2.5 x 10 ⁶ células	5.0 x 10 ⁶ células	1.0 x 10 ⁷ células

A = Conversión del volumen pipeteado de las Dynabeads; B = Número de Dynabeads; C = Cantidad máxima de células que estas cantidades pueden aislar.

c. Obtención de las células separadas con Dynabeads

1. Incubar las células rosetadas a 37°C durante toda la noche.
2. Colocar el tubo junto al magneto durante 2 min y pipetear la suspensión de células que permanece en el fondo
3. Lavar las células una vez con solución de Hank y/o medio de cultivo con suero fetal bovino.

C) CONTEO DE CÉLULAS ROJAS.

- a. Se llenó la pipeta de toma de eritrocitos hasta la marca de 0.5 con sangre conteniendo anticoagulante
- b. La pipeta inclinada aproximadamente 45°C se giro mientras se llenaba con el líquido de Hayen hasta la marca de 101
- c. Tapando con el dedo el extremo inferior de la pipeta, se retiró con cuidado el tubo de aspersión.
- d. Tomándola entre los dedos índice y pulgar se sometió la pipeta a agitación durante 3 min .
- e. Se tiraron las primeras cinco gotas y se lleno la cámara hematocitométrica por capilaridad, sin que se derramara por los canales y a su vez quedara la superficie bien cubierta.
- f. Se dejó reposar tres min y se observo al microscopio.
- g. Se realizó la cuenta de eritrocitos en 5 de los 25 cuadros pequeños del centro (los cuatro extremos y el del centro) de la cámara de Neubauer
- h. Para conocer el valor eritrocitario, a la suma de eritrocitos contados se le agregaron cuatro ceros y el y el resultado se exprese en eritrocitos por mm^3 .
- i. La cuenta se hizo por triplicado, se calculó la media y la desviación estándar y se hizo la gráfica correspondiente en forma de histograma con los valores promedio de cada una de las sustancias estudiadas.

D) CONTEO DE LEUCOCITOS.

- a. Se llenó la pipeta de toma de eritrocitos hasta la marca de 0.5 con sangre con anticoagulante.
- b. La pipeta inclinada aproximadamente 45°C se giró mientras se llenó con el líquido de Hayen hasta la marca de 11.
- c. Tapando con el dedo el extremo inferior de la pipeta, se retiró con cuidado el tubo de aspersión.

- d. Tomándola entre los dedos índice y pulgar se sometió a la pipeta a agitación durante 3 min .
- e. Se tiraron las primeras cinco gotas y se llenó la cámara hematocitométrica por capilaridad, sin que se derramara por los canales y a su vez quedara la superficie bien cubierta
- f. Se dejó reposar tres min y se observó al microscopio
- g. Se realizó la cuenta de leucocitos en 4 cuadrículas grandes de los extremos de la cámara hematocitométrica
- h. Para conocer el valor leucocitario la suma de leucocitos contados promedió y se multiplicó por 50 y el resultado se da en leucocitos por mm^3 .
- i. La cuenta se hizo por triplicado, se calculó la media y la desviación estándar y se hizo la gráfica correspondiente en forma de histograma con los valores promedio de cada una de las sustancias estudiadas

E) CUENTA DIFERENCIAL (POLIMORFONUCLEARES Y LINFOCITOS).

- a. En el extremo de un portaobjetos, limpio y desengrasado se depositó una pequeña gota de sangre recién extraída y con anticoagulante
- b. Otro portaobjetos con bordes esmerilados se colocó en un ángulo de 45° sobre la gota de sangre y se dejó difundir por capilaridad a lo largo de la arista del portaobjetos, con un movimiento suave se realizó la extensión de sangre lo más delgada posible.
- c. Se dejó secar la extensión al aire libre para evitar la ruptura de las células.
- d. En una cámara de tinción conteniendo colorante de Wright se colocó la extensión seca durante 3 min.
- e. Sin escurrir ni secar la extensión se coloca en otra cámara de tinción conteniendo agua destilada durante 5 min.
- f. Una vez transcurrido ese tiempo se saca de la cámara y se deja secar.
- g. Se observa al microscopio y se hace el conteo diferencial por triplicado.
- h. Se calculó la media y desviación estándar y se hizo la gráfica correspondiente en forma de histograma con los valores promedio.

F) NÚMERO DE PLAQUETAS.

- a. Se cargó con sangre una pipeta para cuenta de glóbulos rojos hasta la marca de 0.5 y se llena con líquido de dilución (oxalato de amonio) hasta la marca 101.

- b. Se agitó la mezcla por 15 min.
- c. Se cargó la cámara de Neubauer plana y se deja reposar por 10 min en una cámara húmeda.
- d. Se contaron las plaquetas en toda la cuadrícula central con el microscopio de contraste de fase y a mayor aumento
- e. La cifra obtenida se multiplica por 2,000 dando el número de plaquetas por mm^3 .

G) ABSORCIÓN DEL SUERO FETAL DE CARNERO.

1. Se lavaron los eritrocitos de carnero 3 veces en PBS (pH 7.4)
2. Se añadió 1ml de FCS, 0.5 ml de eritrocitos de carnero (EC) lavados y empacados.
3. Se incubó a 37°C por 30 min.
4. Se centrifugó la preparación y se separó el suero.

H) PREPARACIÓN DEL MEDIO DE INCUBACIÓN PARA LA PRUEBA DE ROSETAS E.

1. Se añadió 0.5 ml de FCS absorbido a 9.5 ml de MEM
2. Se añadió 0.2 ml de EC lavados al MEM

I) PREPARACIÓN DE SUSPENSIÓN DE CÉLULAS DE BAZO.

1. Se sacrificaron un ratón normal y un inoculado, por dislocación cervical y remover su bazo.
2. Se colocó cada bazo en la malla #50 estéril que estaba en una caja de petri (60X15 mm) conteniendo 10.0 ml de MEM.
3. Usando un lado de un bisturí, se presionó el bazo a través de la malla dentro del MEM.
4. Con un capilar se aspiró la suspensión celular muchas veces para dispersar aún más las células y transfirió la suspensión a un tubo de ensayo largo.
5. Después de permitir sedimentar a los grumos grandes durante 10 min., se transfirió el sobrenadante a un tubo de centrifuga cónico y se centrifugó durante 5 min. a 400 rpm.
6. Se resuspendieron células en 5.0 ml de MEM-FCS, se realizó un conteo con un hematocítmetro y se preparó 1.0ml de una suspensión celular conteniendo 10^6 células / 0.1ml.

J. SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE TRIETANOLAMINA (TBS)

NaCl (g) (Backer)	7.5
Trietanolamina (SIGMA)	2.8
HCl 1N (ml)(Backer)	17.0
MgCl ₂ ·6H ₂ O(g) (Merck)	0.001
CaCl ₂ ·2H ₂ O (ml) (Merck)	0.02
Agua desionizada(ml)	980.2

K) SOLUCIÓN DE LECHE DESCREMADA AL 5% EN TBS

Skin-milk (GIBCO)	5g
TBS	100ml

L) SOLUCIÓN REVELADORA

Alfa-cloronaftol (SIGMA)	30 ml
Metanol (BACKER)	10 ml
TBS	50 ml
H ₂ O ₂ (SIGMA)	0.05 ml

m) CUADROS

Cuadro 5. Valores hematológicos de los animales inoculados con solución salina fisiológica (Controles)

POBLACIONES CELULARES				
G.R.	G.B.	P	PMN (%)	L (%)
8.8	13.7	240	17.2	72.3
9.0	13.6	242	17.3	73.2
9.5	13.8	245	17.1	71.4
9.7	13.4	233	17.5	72.0
9.0	13.5	239	16.9	72.6
m = 9.2	13.6	239.8	17.2	72.3
s = ±0.381	±0.158	±4.44	±0.224	±0.671
i.c. = m±0.474	i.c. = m±0.196	i.c. = m±5.52	i.c. = m±0.278	i.c. = m±0.834

G.B. = Glóbulos Blancos $\times 10^9/\text{mm}^3$; P = Plaquetas $\times 10$; PMN = Polimorfonucleares (%); G.R. = Glóbulos Rojos $\times 10^6/\text{mm}^3$; L = Linfocitos (%); m = media; s = desviación estándar; i.c. = intervalo de confianza.

Cuadro 6. Valores hematológicos de los animales infectados con Micoplasmas, determinados a 10 días después de haber sido infectados.

POBLACIONES CELULARES				
G.R.	G.B.	P	PMN (%)	L (%)
8.6	18.3	233	27.3	86.0
8.4	18.5	267	28	88
9	17.6	265	25	85
8.3	17.6	246	26	82
8.3	17.6	220	25.3	84
m = 8.52	17.92	246.2	26.32	85
s = ±0.295	±0.444	±20.29	±1.291	±2.236
i.c. = m±0.367	i.c. = m±0.552	i.c. = m±25.23	i.c. = m±1.61	i.c. = m±2.78

G.B. = Glóbulos Blancos $\times 10^9/\text{mm}^3$; P = Plaquetas $\times 10$; PMN = Polimorfonucleares (%); G.R. = Glóbulos Rojos $\times 10^6/\text{mm}^3$; L = Linfocitos (%); m = media; s = desviación estándar; i.c. = intervalo de confianza.

Cuadro 7. Valores hematológicos de los animales inoculados con membranas aisladas de Mycoplasma capricolum.

POBLACIONES CELULARES				
G.R.	G.B.	P	PMN (%)	L (%)
8.4	18.9	288	27	88
8.2	19.1	268	23	90
8.7	19.7	315	38	93
8.5	18.0	320	31	88
8.8	18.9	308	33	91
m = 8.5	18.9	299.8	30.4	90
s = ±0.274	±0.61	±21.545	±5.727	±1.897
i.c. = m±0.297	i.c. = m±0.758	i.c. = m±26.79	i.c. = m±7.12	i.c. = m±2.64

G.B. = Glóbulos Blancos $\times 10^9/\text{mm}^3$; P = Plaquetas $\times 10$; PMN = Polimorfonucleares (%); G.R. = Glóbulos Rojos $\times 10^6/\text{mm}^3$; L = Linfocitos (%); m = media; s = desviación estándar; i.c. = intervalo de confianza.

Cuadro 8. Valores de peso relativo de bazo de animales infectados con *M. pulmonis* en diferentes estados de la infección, y con preparados de membranas aisladas de *M. pulmonis* y *M. capricolum*

Controles	ANIMALES INFECTADOS (Semanas post-infección)			ANIMALES CON MEMBRANAS	
	1	2	3	Mp	Mc
6.0	7.7	6.4	7.2	7.6	7.7
5.8	7.7	6.8	6.9	8.0	8.1
4.9	6.6	7.4	7.6	7.0	7.0
5.9	6.5	6.9	7.8	6.9	6.9
4.9	7.0	6.9	7.4	6.8	7.5
m = 5.5	7.1	6.88	7.38	7.26	7.44
±0.55	±0.58	±0.36	±0.35	±0.52	±0.498
i.c. = m±0.684	i.c. = m±0.721	i.c. = m±0.448	i.c. = m±0.435	i.c. = m±0.646	i.c. = m±0.619

Mp = Membranas de *M. pulmonis*; Mc = membranas de *M. capricolum*; m = media; ± = desviación estándar; i.c. = intervalo de confianza

Tabla 9. Títulos de anticuerpos aglutinantes contra eritrocitos de certero en animales inoculados en el día cero con SSF. Los eritrocitos también fueron inoculados al día cero

DÍA	Título de anticuerpos (1/n)					
	3	5	7	14	21	28
0	8	32	64	64	32	16
0	4	32	64	32	32	16
0	8	16	64	64	64	16
0	16	32	64	128	16	64
0	8	64	64	64	32	8
m = 0	8.8	35.2	64	70.4	35.2	24
s = ±0.0	±4.38	±17.53	±0.0	±35.05	±17.53	±22.63
i.c. = m±0.0	i.c. = m±5.45	i.c. = m±21.79	i.c. = m±0.0	i.c. = m±45.6	i.c. = m±21.8	i.c. = m±28.3

m = media; s = desviación estándar; i.c. = intervalo de confianza; p = 0.05

Tabla 10. Títulos de anticuerpos aglutinantes contra eritrocitos de certero en animales infectados con *M. pulmonis*. Los eritrocitos también fueron inoculados al día cero.

DÍA	Títulos de anticuerpos (1/n)					
	3	5	7	14	21	28
0	64	16	16	16	4	4
0	64	16	16	16	8	4
0	32	32	16	16	8	8
0	16	64	8	8	8	8
0	64	16	16	16	8	4
m = 0	48	28.8	14.4	14.4	7.2	5.6
s = ±0.0	±22.63	±20.86	±3.58	±3.58	±1.79	±2.19
i.c. = m±0.0	i.c. = m±28.1	i.c. = m±25.9	i.c. = m±4.45	i.c. = m±4.45	i.c. = m±2.23	i.c. = m±2.72

m = media; s = desviación estándar; i.c. = intervalo de confianza; p = 0.05

Tabla 11. Titulos de anticuerpos contra eritrocitos de carnero en animales inoculados con membranas de *M. pulmonis* al dia cero. Los eritrocitos tambien fueron inoculados al dia cero.

Titulos de anticuerpos (1/n)						
DIA 0	3	5	7	14	21	28
0	16	128	64	16	16	16
0	16	64	64	8	8	4
0	8	64	128	32	16	8
0	16	128	64	32	16	4
0	16	128	64	16	16	8
m = 0	14.4	102.4	76.8	20.8	14.4	8
s = ±0.0	±3.58	±35.05	±28.62	±10.73	±3.58	±4.9
ic=m±0.0	ic=m±4.45	ic=m±43.6	ic=m±35.6	ic=m±13.3	ic=m±4.45	ic=m±6.09

Los valores representan log₂ del título de anticuerpos hemaglutinantes. m = media, s = desviación estándar, ic = intervalo de confianza, p = 0.05

Tabla 12. Titulos de anticuerpos contra eritrocitos de carnero en animales inoculados con membranas de *M. capricolum* al dia cero. Los eritrocitos tambien fueron inoculados al dia cero.

Titulos de anticuerpos (1/n)						
DIA 0	3	5	7	14	21	28
0	16	64	64	32	32	16
0	8	32	64	32	16	8
0	8	64	64	32	32	8
0	16	128	64	32	16	4
0	16	64	64	32	16	4
m = 0	12.8	70.4	64	32	22.4	8
s = ±0.0	±4.38	±35.05	±0.0	±0.0	±8.76	±4.89
ic=m±0.0	ic=m±5.44	ic=m±43.6	ic=m±0.0	ic=m±0.0	ic=m±10.9	ic=m±6.08

Los valores representan log₂ del título de anticuerpos hemaglutinantes. m = media, s = desviación estándar, ic = intervalo de confianza, p = 0.05

Tabla 13. Valores del porciento de fagocitosis durante diferentes etapas de la infección con *M. pulmonis*. Los valores de los animales al dia cero son considerados controles ya que son animales que no se les inoculó el microorganismo.

DIA 0	3	5	7	14	21	28
78	78	78	74	70	77	79
76	76	76	65	67	78	78
74	78	76	66	68	79	79
72	74	78	63	79	75	79
72	73	76	65	75	78	79
m = 75.6	76.5	76.8	66.6	71.8	77.4	78.8
±2.61	±1.91	±1.09	±4.28	±5.07	±1.51	±0.447
ic=m±3.24	ic=m±2.37	ic=m±1.35	ic=m±6.56	ic=m±6.30	ic=m±1.88	ic=m±0.56

Los valores representan el porcentaje de fagocitosis que se conoce como índice fagocítico. m = media, s = desviación estándar, ic = intervalo de confianza, p = 0.05

Tabla 14. Valores del Índice Fagocítico de animales infectados con *M. pulmonis* a los diez días de infección y animales 72hr después de haber sido inoculados con suspensiones enriquecidas de membranas de *M. pulmonis* y *M. capricolum*

INDICE FAGOCÍTICO			
CONTROLES	INFECTADOS	Mp	Mc
78	79	79	75
76	85	78	79
74	66	78	77
75	65	77	78
78	65	79	79
m = 76.2	68	78.2	77.6
±1.79	±6.164	±0.837	±1.673
ic = m ± 2.22	ic = m ± 7.66	ic = m ± 1.041	ic = m ± 2.08

Los valores representan el porcentaje de fagocitosis que se expresa como índice fagocítico. m = media, s = desviación estándar. ic = intervalo de confianza. p = 0.05

Cuadro 15. Valores de absorbancia a 650 nm. de sangre de animales infectados y no infectados, inoculados con Carbón Coloidal. Tiempo_cero

C	1	2	3
2.73	2.73	2.73	2.74
2.71	2.75	2.76	2.79
2.76	2.70	2.71	2.72
2.69	2.76	2.75	2.75
2.74	2.71	2.70	2.71
m = 2.726	2.73	2.73	2.74
s = ±0.027	±0.025	±0.025	±0.031
ic = m ± 0.034	ic = m ± 0.031	ic = m ± 0.031	ic = m ± 0.039

m = media, s = desviación estándar, ic = intervalo de confianza, p = 0.05

Cuadro 16. Valores de absorbancia a 650nm de sangre de animales infectados y no infectados, inoculados con Carbón Coloidal a 3 min después.

SEMANAS DE INFECCIÓN			
CONTROLES	1	2	3
2.6	2.32	2.61	2.65
2.4	2.3	2.63	2.63
2.8	2.36	2.57	2.68
2.5	2.27	2.6	2.7
2.6	2.3	2.66	2.5
m = 2.58	2.31	2.614	2.632
s = ± 0.148	±0.0332	±0.0336	±0.0785
ic = m ± 0.184	ic = m ± 0.041	ic = m ± 0.042	ic = m ± 0.098

m = media, s = desviación estándar, ic = intervalo de confianza, p = 0.05

Cuadro 17 Valores de absorbancia a 650 nm de sangre de animales infectados y no infectados, inoculados con Carbon Coloidal a 7 min despues

CONTROLES	SEMANAS DE INFECCIÓN		
	1	2	3
2.49	2	2.46	2.54
2.42	2.5	2.6	2.58
2.39	2.3	2.33	2.47
2.59	2.1	2.51	2.60
2.49	2	2.46	2.51
m = 2.476	2.18	2.472	2.54
s = ±0.077	±0.2168	±0.0978	±0.0524
ic = m ± 0.096	ic = m ± 0.269	ic = m ± 0.122	ic = m ± 0.0651

m = media, s = desviación estándar, ic = intervalo de confianza, p = 0.05

Cuadro 18 Valores de absorbancia a 650 nm de sangre de animales infectados y no infectados inoculados con Carbon Coloidal a 10 min despues

CONTROLES	SEMANAS DE INFECCIÓN		
	1	2	3
2.37	1.87	2.33	2.4
2.29	1.93	2.51	2.63
2.31	2	2.19	2.1
2.46	1.9	2.32	2.42
2.5	1.87	2.40	2.38
m = 2.386	1.914	2.35	2.386
s = ±0.0918	±0.0541	±0.1173	±0.1889
ic = m ± 0.114	ic = m ± 0.067	ic = m ± 0.146	ic = m ± 0.2348

m = media, s = desviación estándar, ic = intervalo de confianza, p = 0.05

Cuadro 19 Valores de absorbancia a 650 nm de sangre de animales infectados y no infectados, inoculados con Carbon Coloidal a tiempo de 30 min

CONTROLES	SEMANAS DE INFECCIÓN		
	1	2	3
1.82	0.82	1.72	1.81
1.71	1.01	1.65	1.95
1.90	0.93	1.8	2
1.82	0.55	1.51	2.5
1.83	0.83	2	1.81
m = 1.816	0.828	1.736	2.014
±0.068	±0.1738	±0.182	±0.284
ic = m ± 0.084	ic = m ± 0.2161	ic = m ± 0.226	ic = m ± 0.353

m = media, s = desviación estándar, ic = intervalo de confianza, p = 0.05

Cuadro 20 Valores de absorbancia a 650 nm de sangre de animales inoculados con Carbón Coloidal a tiempo de 0 min

CONTROLES	Mp	Mc
2.73	2.71	2.73
2.71	2.5	2.64
2.76	2.4	2.65
2.69	2.9	2.79
2.74	2.81	2.83
m = 2.726	2.66	2.728
±0.027	±0.2096	±0.084
ic = m ± 0.0336	ic = m ± 0.2606	ic = m ± 0.104

Mp = Membranas de *M. pulmonis*; Mc = Membranas de *M. capricolum*; m = media; s = desviación estándar; ic = intervalo de confianza; p = 0.05

Cuadro 21 Valores de absorbancia a 650 nm de sangre de animales inoculados con Carbón Coloidal a tiempo de 3 min

CONTROLES	Mp	Mc
2.6	2.1	2.3
2.4	2.3	2.06
2.8	1.9	1.99
2.5	2.6	1.87
2.6	2.08	2.8
m = 2.58	2.08	2.204
±0.148	±0.4147	±0.368
ic = m ± 0.184	ic = m ± 0.332	ic = m ± 0.458

Mp = Membranas de *M. pulmonis*; Mc = Membranas de *M. capricolum*; m = media; s = desviación estándar; ic = intervalo de confianza; p = 0.05

Cuadro 22 Valores de absorbancia a 650 nm de sangre de animales inoculados con Carbón Coloidal a tiempo de 7 min

CONTROLES	Mp	Mc
2.49	1.9	2.0
2.42	1.7	2.4
2.39	2.3	1.7
2.59	2.0	2.1
2.49	1.8	1.6
m = 2.476	1.94	1.96
±0.0.77	±0.2302	±0.3209
ic = m ± 0.096	ic = m ± 0.2862	ic = m ± 0.3989

Mp = Membranas de *M. pulmonis*; Mc = Membranas de *M. capricolum*; m = media; s = desviación estándar; ic = intervalo de confianza; p = 0.05

Cuadro 23 Valores de absorbancia a 650 nm de sangre de animales inoculados con Carbón Coloidal a tiempo de 10 min.

CONTROLES	Mp	Mc
2.37	1.0	1.9
2.29	0.85	2.3
2.31	0.99	1.7
2.46	1.4	2.1
2.5	1.6	1.6
m = 2.386	1.168	1.92
±0.0918	±0.3168	±0.2863
ic = m ± 0.1141	ic = m ± 0.3939	ic = m ± 0.3559

Mp = Membranas de *M. pulmonis*, Mc = Membranas de *M. capricornium*, m = media, s = desviación estándar, ic = intervalo de confianza, p = 0.05

Cuadro 24 Valores de absorbancia a 650 nm de sangre de animales inoculados con carbón coloidal a tiempo de 30 min.

CONTROLES	Mp	Mc
1.82	0.82	0.93
1.71	1.11	0.94
1.90	1.0	0.93
1.82	0.75	0.91
1.83	0.7	0.92
m = 1.816	0.876	0.926
±0.068	±0.1733	±0.0114
ic = m ± 0.084	ic = m ± 0.215	ic = m ± 0.0142

Mp = Membranas de *M. pulmonis*, Mc = Membranas de *M. capricornium*, m = media, s = desviación estándar, ic = intervalo de confianza, p = 0.05

Tabla 25. Título de anticuerpos contra *M. pulmonis* de animales infectados.

DIAS DE INFECCIÓN	TÍTULO (1/n ± s) ¹
0	0
3	4.4 ± 1.96
5	12.8 ± 3.92
7	14.4 ± 3.2
14	34.7 ± 14.4
21	22.4 ± 7.84
28	17.3 ± 7.1

1. Título promedio de cinco animales, s = desviación estándar

Tabla 26. Título de anticuerpos contra *M. pulmonis* y *M. capricolum* de animales inoculados con membranas

DÍAS DE INFECCIÓN	Mp	Mc
	(1/n ± s)	(1/n ± s)
0	0 ¹	0
3	25.6 ± 7.84	26.4 ± 6.86
5	115.0 ± 25.6	51.1 ± 15.7
7	128.0 ± 0	128.0 ± 0
14	104.0 ± 31	102.4 ± 31.35
21	57.6 ± 12.8	117.3 ± 23.85
28	64.0 ± 0.0	128.0 ± 0.0

¹ Título promedio de cinco animales. Mp = Membranas de *M. pulmonis*; Mc = Membranas de *M. capricolum*; s = desviación estándar.

Tabla 27. Porcentaje de células formadoras de rosetas espontáneas en animales infectados con *M. pulmonis* y animales inoculados con membranas

GRUPOS	ROSETAS "E" (%)
Control	50.3 ± 5.2
Infectados	45.0 ± 6.5
Membranas de Mp	50.9 ± 7.3
Membranas de Mc	52.5 ± 4.2

1. Porcentaje obtenido haciendo un "pool" de las muestras trabajadas

Tabla. 28. Mitogenicidad de las membranas de *M. capricolum* sobre linfocitos de bazo de ratón.

CONTENIDO PROTEICO (µg/ml)			
0	2.5	5	10
1090 ¹	12,860	18,880	25,829
2050	10,150	17,670	29,350
880	12,890	19,650	26,907
670	9,595	20,005	24,998
760	16,305	15,300	20,061
m = 1090	12,360	18,301	25,429
±559.2	±2,675	±1,901.5	±3,417.6

¹ Cuentas por minuto = cpm. m = media. s = desviación estándar

Tabla. 29. Valores de grado de inflamación de cojinete plantar de ratones infectados y no infectados inoculados con Albúmina Serica Bovina (100 µg), para determinar la respuesta de hipersensibilidad retardada.

DIA	INFECTADOS	NO INFECTADOS
0	0.35 ± 0.160	0.35 ± 0.016
10	0.15 ± 0.019	0.33 ± 0.017
20	0.26 ± 0.023	0.38 ± 0.008
30	0.32 ± 0.017	0.31 ± 0.019
40	0.05 ± 0.031	0.32 ± 0.006
60	0.13 ± 0.016	0.33 ± 0.019
80	0.18 ± 0.008	0.39 ± 0.020
100	0.25 ± 0.015	0.30 ± 0.017

Cuadro. 30. Valores de absorbancia de la prueba de ELISA (Enzyme labeled immunosorbent assay) para detectar los niveles de IL- 4 en suero de ratones infectados y no infectados con *M. pulmonis*.

DIA	INFECTADOS (Absorbancia)	NO INFECTADOS (Absorbancia)
0	0.056 ± 0.020	0.056 ± 0.001
10	0.038 ± 0.001	0.043 ± 0.006
15	0.00 ± 0.00	0.033 ± 0.008
24	0.275 ± 0.003	0.07 ± 0.003
38	0.281 ± 0.007	0.045 ± 0.005
46	0.0	0.052 ± 0.003
51	0.0	0.032 ± 0.008
60	0.0	0.072 ± 0.006
75	0.0	0.053 ± 0.002

Cuadro. 31. Valores de absorbancia de la prueba de ELISA (Enzyme labeled immunosorbent assay) para detectar los niveles de IFN-γ en suero de ratones infectados y no infectados con *M. pulmonis*.

DIA	INFECTADOS (Absorbancia)	NO INFECTADOS (Absorbancia)
0	0.131 ± 0.009	0.131 ± 0.006
10	0.100 ± 0.010	0.102 ± 0.003
15	0.317 ± 0.008	0.093 ± 0.009
24	0.242 ± 0.005	0.132 ± 0.010
38	0.214 ± 0.007	0.149 ± 0.003
46	0.051 ± 0.003	0.152 ± 0.015
51	0.068 ± 0.005	0.122 ± 0.009
60	0.027 ± 0.0016	0.134 ± 0.003
75	0.026 ± 0.003	0.135 ± 0.005

Cuadro 33. Incorporación de timidina tritiada de suspensiones de células de bazo de ratones sanos tratadas con anticuerpos anti-Thy 1.2 y complemento y estimuladas con membranas de *M. pulmonis*

CELULAS	CPM x 1000
No tratadas	25.0 ± 4.750
Tratadas	15.0 ± 3.450
Sin Mitógeno	0.40 ± 0.0650

Tabla 34. Incorporación de timidina tritiada de suspensiones de células de bazo de ratones sanos tratadas con anticuerpos anti-Thy 1.2 y complemento y estimuladas con fitohemaglutinina (PHA)

CELULAS	CPM x1000
No Tratadas	23.6 ± 5.83
Tratadas	7.0 ± 0.75
Sin Mitógeno	0.4 ± 0.047

Cuadro 35. Incorporación de timidina tritiada de suspensiones de células de bazo de ratones sanos en diferentes etapas de la infección y estimulados con membranas y fitohemaglutinina (PHA).

DIA	CPM x 1000	
	5µg de prot. Mp /ml	5µg PHA/ ml
0	25.2 ± 3.750	23.2 ± 4.31
10	20.0 ± 3.49	22.7 ± 3.75
15	21.0 ± 4.85	24.8 ± 4.70
24	26.0 ± 4.67	24.2 ± 5.50
38	17.8 ± 3.56	16.5 ± 3.75
46	22.0 ± 1.680	18.9 ± 4.89
51	23.8 ± 4.65	19.9 ± 3.25
60	24.95 ± 4.23	20.0 ± 3.95
75	24.1 ± 3.40	21.7 ± 3.70

Mp = Membranas de *M. pulmonis*. PHA = Fitohemaglutinina

Cuadro 37. Porcentajes de células CD8+ en Timo de animales infectados con *M. pulmonis* en diferentes etapas de la infección, analizados por citometría de Flujo.

DÍA	CONTROLES	INFECTADOS
	(m ± s)	(m ± s)
0	8.06 ± 1.6	8.00 ± 1.6
10	9.78 ± 1.8	5.85 ± 2.2
15	10.15 ± 3.3	3.86 ± 1.6
24	8.79 ± 2.0	3.73 ± 2.1
38	7.55 ± 1.1	3.18 ± 1.9
46	6.74 ± 0.98	14.1 ± 5.3
51	7.65 ± 1.1	6.47 ± 2.0
60	9.55 ± 2.0	5.56 ± 2.1
75	6.96 ± 1.2	4.99 ± 1.6

m = media, s = desviación estándar

Cuadro 38. Porcentajes de células CD4+ en Timo de animales infectados con *M. pulmonis* en diferentes etapas de la infección, analizados por citometría de Flujo.

DÍA	CONTROLES	INFECTADOS
	(m ± s)	(m ± s)
0	17.79 ± 2.5	17.79 ± 2.5
10	9.37 ± 1.6	22.08 ± 3.1
15	12.3 ± 3.6	19.45 ± 2.6
24	9.35 ± 1.2	10.56 ± 3.5
38	9.5 ± 2.1	7.08 ± 1.6
46	13.71 ± 3.1	41.45 ± 6.5
51	10.05 ± 2.5	31.65 ± 6.7
60	8.95 ± 2.7	20.67 ± 6.3
75	14.35 ± 1.6	4.99 ± 2.6

m = media, s = desviación estándar

Cuadro 39. Porcentajes de células doble positivas (CD8+ y CD4+) en timo de animales infectados con *M. pulmonis* y animales inoculados con solución salina fisiológica (SSF).

DÍA	CONTROLES	INFECTADOS
	(m ± s)	(m ± s)
0	80.15 ± 4.1	80.15 ± 3.3
10	72.06 ± 3.7	80.85 ± 6.5
15	76.67 ± 4.7	77.55 ± 7.1
24	79.56 ± 3.9	81.86 ± 4.2
38	89.75 ± 5.2	82.95 ± 5.3
46	44.45 ± 3.7	79.55 ± 5.1
51	61.87 ± 6.1	82.3 ± 5.0
60	73.37 ± 5.3	81.5 ± 4.8
75	83.31 ± 6.1	78.51 ± 3.7

Cuadro 40. Porcentajes CD8+ en sangre de animales infectados con *M. pulmonis* y animales inoculados con Solución Salina Fisiológica (SSF)

DIA	CONTROLES (m ± s)	INFECTADOS (m ± s)
0	23.01 ± 2.8	23.01 ± 2.1
10	31.47 ± 2.75	37.49 ± 1.8
15	25.65 ± 2.9	31.86 ± 1.7
24	30.16 ± 3.1	22.43 ± 1.9
38	24.65 ± 2.3	33.44 ± 2.1
46	30.15 ± 3.5	27.27 ± 1.2
51	21.65 ± 2.6	57.11 ± 1.5
60	24.75 ± 2.9	26.62 ± 1.2
75	27.89 ± 2.5	40.03 ± 3.1

Cuadro 41. Porcentajes CD4+ en sangre de animales infectados con *M. pulmonis* y animales inoculados con Solución Salina Fisiológica (SSF).

DIA	CONTROLES (m ± s)	INFECTADOS (m ± s)
0	72.26 ± 1.8	72.26 ± 2.1
10	63.46 ± 1.65	54.77 ± 2.3
15	66.79 ± 1.76	64.62 ± 2.4
24	64.17 ± 2.5	76.79 ± 2.3
38	70.57 ± 3.1	62.445 ± 2.1
46	62.97 ± 1.5	68.18 ± 2.3
51	72.83 ± 1.2	41.36 ± 1.5
60	69.54 ± 2.1	50.5 ± 1.6
75	68.56 ± 1.2	40.03 ± 1.2

m = media, s = desviación estándar

Cuadro 42. Porcentajes CD8+ en bazo de animales infectados con *M. pulmonis* y animales inoculados con Solución Salina Fisiológica (SSF).

DIA	CONTROLES (m ± s)	INFECTADOS (m ± s)
0	30.62 ± 1.3	30.62 ± 1.3
10	29.04 ± 1.5	30.13 ± 1.5
15	31.75 ± 0.98	25.89 ± 1.7
24	27.91 ± 0.99	27.57 ± 0.987
38	28.91 ± 1.2	29.135 ± 0.97
46	30.75 ± 1.12	27.55 ± 0.9
51	27.95 ± 1.17	32.14 ± 1.2
60	29.16 ± 0.998	30.27 ± 1.2
75	31.12 ± 1.2	29.815 ± 1.0

Cuadro 43. Porcentajes CD4+ en bazo de animales infectados con *M. pulmonis* y animales inoculados con Solución Salina Fisiológica (SSF).

DIA	CONTROLES (m ± s)	INFECTADOS (m ± s)
0	64.74 ± 1.3	64.74 ± 1.6
10	67.56 ± 1.5	65.265 ± 1.7
15	66.68 ± 2.1	71.64 ± 1.75
24	67.08 ± 1.2	70.7 ± 1.7
38	69.08 ± 1.45	68.965 ± 1.3
46	67.57 ± 1.23	67.96 ± 2.1
51	68.89 ± 2.1	65.83 ± 1.7
60	68.66 ± 2.3	68.97 ± 1.5
75	64.57 ± 1.3	67.48 ± 1.65

Cuadro 44. Valores de la relación CD4+/CD8+ en timo, sangre y bazo de animales infectados con *M. pulmonis*.

DIA	TIMO	SANGRE	BAZO
0	2.155	3.144	2.114
10	3.773	1.46	2.164
15	5.025	2.028	2.77
24	2.831	3.423	2.564
38	2.227	1.869	2.364
46	2.941	2.5	2.469
51	4.901	1.426	2.049
60	3.718	1.897	2.278
75	2.415	1.426	2.262

Cuadro 45. Incorporación de Timidina tritiada de preparados de células B separadas por el sistema Dynabeads, utilizando diferentes sustancias como mitógenos.

PRODUCTO	CPM x 1000 (±s)
LPS	9.0 ± 1.52
Membranas	6.0 ± 1.65
Mycop. Inact.	7.0 ± 0.496
SNDT	4.0 ± 1.1
PHA	1.0 ± 0.675
SSF	0.09 ± 0.0002

CPM = Cuentas por minuto; s = desviación estándar; sndt = sobrenadante; PHA fitohemaglutinina; SSF = solución salina fisiológica.

Cuadro 47. Incorporación de Timidina tritiada de preparados de células T separadas por el sistema Dynabeads incubadas con células adherentes, utilizando diferentes sustancias como mitógenos.

PRODUCTO	CPM x 1000 (± s)
LPS	1 ± 0.0456
MEMBRANAS	4 ± 0.175
MYCOP. INACT.	4.89 ± 0.0996
MED.CULT.	3 ± 0.175
PHA	9 ± 1.016
SSF	0.09 ± 0.003

CPM = Cuentas por minuto LPS = lipopolisacárido PHA = fitohemaglutinina. SSF = solución salina fisiológica

Cuadro 48. Valores de absorbancia de la prueba de ELISA para determinar los niveles de IFN-γ e IL-4 producidos por células de bazo de animales sanos e inducidos por diferentes productos.

PRODUCTO	IL-4 (±s)	IFN-γ (±s)
Mp	0.028 ± 0.0016	0.2 ± 0.017
PHA	0.025 ± 0.0025	0.107 ± 0.005
SNDT	0.019 ± 0.0019	0.075 ± 0.006
M.C.	0.009 ± 0.0005	0.019 ± 0.0023
M.I.	0.029 ± 0.0036	0.178 ± 0.0195
SSF	0 ± 0.0016	0 ± 0.0023

Mp = Membranas de M. pulmonis. PHA = Fitohemaglutinina. SNDT = Sobrenadante de Cultivo. M.C. = Medio de Cultivo. M.I. = M. pulmonis inactivado. SSF = Solución salina fisiológica. s = desviación estándar

Cuadro 49. Valores de absorbancia de la prueba de ELISA para determinar los niveles de IFN-γ e IL-4 producidos por células de bazo de animales infectados e inducidos por diferentes productos.

PRODUCTO	IL-4 (±s)	IFN-γ (±s)
Mp	0.135 ± 0.005	0.2 ± 0.017
PHA	0.095 ± 0.0010	0.107 ± 0.019
SNDT	0.069 ± 0.0003	0.075 ± 0.0023
M.C.	0.009 ± 0.0004	0.019 ± 0.0009
M.I.	0.123 ± 0.017	0.178 ± 0.0576
SSF	0 ± 0.09	0 ± 0.019

Mp = Membranas de M. pulmonis. PHA = Fitohemaglutinina. SNDT = Sobrenadante de Cultivo. M.C. = Medio de Cultivo. M.I. = M. pulmonis inactivado. SSF = Solución salina fisiológica. s = desviación estándar

8. BIBLIOGRAFIA

- Abbas, A.K., Murphy K.M. y Sher A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383:787-788.
- Adegboye, D.S. (1978) A review of mycoplasma-induced immunosuppression. *Br. Vet. J.* 134:556-562.
- Abehsira-Amar, O., Gilbert M., Joly M., Theze J y Jankovic D.L. (1992) IL-4 plays a dominant role in the differential development of Th0 into Th1 and Th2 cells. *J. Immunol.* 148:3820-3824.
- Aguila, H.N. Wayne, C. Lai, Lu Y.S. y Pakes S.P. (1988) Experimental *M. pulmonis* infection of rats suppresses humoral but not cellular immune response. *Laboratory Animal Science* 38: 138-143.
- Aldridge, K.E., Cole, B.C. y Ward, J.R. (1977) Mycoplasma-dependent activation of normal lymphocytes: role of arginine and nonviable mycoplasma antigen in the induction of lymphocyte-mediated cytotoxicity for syngeneic mouse target cells. *J. Immunol.* 118:386.
- Alexander, A.G. y Kenny G.E. (1980) Characterization of the strain-specific and common surface antigens of *M. arginini*. *Infect Immun.* 29:442-446.
- Anderson, D.R. y Barile M.F. (1965) Ultrastructure of *M. hominis*. *J. Bacteriol.* 90:180-183.
- Anon, H. (1991) Mycoplasma and AIDS-what connection? *Lancet* 337:20-21
- Asai, K., Ohta S. (1995) Case 42-1994: *Mycoplasma pneumoniae* and transverse myelitis. *New England Journal of Medicine* 332:1719-1722.
- Atkin, K.E., Cole B.C., Sullivan, G.J., Washburn, L.R. y Wiley B.B. (1986) Stimulation of mouse lymphocytes by a mitogen-derived from *M. arthritis* V. A small basic protein from culture supernatants is a potent T cell mitogen. *J. Immunol.* 137:1581-1586.
- Barcenas, M.G. y Rodríguez P.M.C. (1990) Diagnóstico de *A. pleuropneumoniae* en cerdos utilizando el método Dot-ELISA. Tesis de Licenciatura, UNAM.
- Barile, M.F., Razin, S., Tully, J.G. y Whitcomb, R.F., editores. (1979) *The Mycoplasmas*. Academic Press, London.
- Barile, M.F. y Yoshida H. (1991) Rheumatoid arthritis: New findings on the failure to isolate or detect mycoplasmas by multiple cultivation or serologic procedures and a review of the literature. *Rev. Infec. Dis.* 13:571-576
- Bauer, F.A., Wear D.J., Angritt P., Lo, S.C. (1991) *M. fermentans* (incognitus strain) infection in kidneys of patients with acquired immunodeficiency syndrome and associated nephropathy: a light microscopic, immunohistochemical and ultrastructural study. *Hum. Pathol.* 22:63-66.

- Bekoff, M.C., Cole, B.C. y Grey, H.M. (1987) Studies on the mechanism of stimulation of T cells by the *Mycoplasma arthritidis*-derived mitogen. Role of class II-IE molecules. *J Immunol.* **139**:3189-3194
- Bennett, R.H. Jasper D.E. (1977) Immunosuppression of humoral and cell-mediated responses in calves associated with inoculation of *M. bovis*. *Am J Vet Res* **38**:1731-1735.
- Bergquist, L.M., Lau, H.S.B. y Winter C.E. (1974) Mycoplasma associated immunosuppression. Effect on hemagglutinin response to common antigens in rabbit. *Infect Immun* **9**:410-416.
- Biberfeld, G. y Norberg R. (1974) Circulating immune complexes in *M. pneumoniae* infection. *J Immunol* **112**:413-417
- Biberfeld, G. y Sterner G. (1976) Tuberculin anergy in patients with *M. pneumoniae* infection. *Scand J Infect Dis* **8**:71-76.
- Biberfeld, G. (1977) Activation of human subpopulations by *M. pneumoniae*. *Scand J Immunol.* **9**:1145-1149.
- Biberfeld, G. y Gronowicz, E. (1976) *Mycoplasma pneumoniae* is a polyclonal B cell activator. *Nature* **261**:238-244
- Biberfeld, G. Sterner G. (1982) Effect of *M. pneumoniae* infection on cell-mediated immunity. *Infection* **4**:517-523.
- Biberfeld, G. (1985) Infection sequelae and autoimmune reactions in *M. pneumoniae* infection. En razin S, Barile M.F., eds. *The mycoplasmas*. Vol.4 New York: Academic Press, p. 293-315.
- Bisset, L.R. (1993). Looking for a Superantigen in AIDS - A Possible Role for *Mycoplasma*. *Medical Hypotheses* **40**:146-154.
- Bolton, R.W. (1980) Immunosuppression of anti-sheep erythrocyte responses by glycerol teichoic acid immune complexes. *Infect. Immun.* **30**:723-728.
- Borrel, A., Dujardin-Beaumez E., Jovan C. (1910) Le microbe de la peripneumonie. *Ann.Inst.Pastur (Paris)* **24**:168-174.
- Bradford, M.N. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microquantities of protein. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Brand, J.M., Neustock, P., Kruse, A., Alvarezossorio, L., Schnabel, A., Kirchner H. (1997) Stimulation of whole blood cultures in patients with ankylosing spondylitis by a mitogen derived from *Mycoplasma arthritidis* (MAS) and other mitogens. *Rheumatology International* **16**: 207-211.
- Bredt, W., Heunert H., Höfling K.H. y Milthaler B. (1973) Micro-cinematographic studies of *M. hominis* cells. *J. Bacteriol.* **113**:1223-1230.

- Bredt, W. (1979) Motility. En Barile and Rzin (editores). The mycoplasmas, vol 1 Acad. Press, NY.
- Brenner, T., Yamin, A., Abramsky, O., Gallily, R. (1993) Stimulation of Tumor Necrosis Factor-alpha Production by *Mycoplasmas* and Inhibition by Dexamethasone in Cultured Astrocytes. *Brain Research* 608 273-278
- Brunner, H. y Wiedner W. (1981) Chemotherapy of human mycoplasma disease *Isr J. Med. Sci.* 17:656-661.
- Cassell, G.H y Hill A. (1979) Murine and other small-animal mycoplasmas En Tully and Whitcomb (editores) The mycoplasmas vol. II Acad Press. NY.
- Casell, G.H., Lindsey J.R., y Davis J.K. (1981) Respiratory and genital *Mycoplasmas* of laboratory rodents. implications for biomedical research. *Isr J Med Sci.* 17:548-554.
- Chen, Y., Kuchroo V.K., Inobe J., Hafler D.A y Weiner H.L. (1994) Regulatory T cell clones induced by oral tolerance supression of autoimmune encephalomyelitis *Science* 265 1237-1243.
- Cher, D.J., y Mossman T.M. (1987) Two types of murine helper T cell clone. II Delayed type hypersensitivity is mediated by Th₁ clones. *J Immunol.* 138 3688-3694.
- Chernov, V.M., Markina, O.S., Chernova O.A. (1996) Topoisomerase I-recognition-like sites in mycoplasma genomes. *Microbios* 86 19-25
- Chowdhury, M.I.H., Koyanagi Y., Kobayashi S., Yamamoto N., Munakata T. y Arai, S. (1990) Mycoplasmas and AIDS. *Lancet* 336 247-253.
- Cole, B.C, Sullivan, G.J., Daynes, R.A. and Ward, J.R. (1981) *J. Immunol.* 127:1931-1937.
- Cole, B.C., Washburn, L.R., Sullivan, G.J. y Ward J.R. (1982) Specificity of a mycoplasma mitogen for lymphocytes from human and various animal hosts. *Infect. Immunol* 36:662-670.
- Cole, B.C., Washburn L.R., Taylor-Robinson D. (1985) Mycoplasma-induced arthritis. En: Razin S., BarileM.F. eds. The mycoplasmas Vol. 4 NY, Academic Press, p. 108.
- Cole, B.C., Araneo, B.A. y Sullivan, G.J. (1986) Stimulation of mouse lymphocytes by a mitogen derived from *M. arthritidis* *J. Immunol.* 136:3572-3580.
- Cole, B.C., Tuller, J.W. y Sullivan, G.J. (1987) Stimulation of mouse lymphocytes by a mitogen derived from *M. arthritidis*. Detection of a non-MCH gene(s) in the E alpha-bearing RIIS mouse strain that is associated with a specific lack of T cell responses to the *M. arthritidis* soluble mitogen. *J. Immunol.* 139:927-932.
- Cole, B.C y Atkin C.L. (1991) The *M. arthritidis* T cell mitogen, MAM: a model superantigen. *Imm. Today.* 12:271-278.

- Cole, B.C., Ahmed E., Araneo, B.A., Shelby, J., Kamerath C., Wie S., McCall S., Atkin C. (1993) Immunomodulation in vivo by the *M. arthritidis* superantigen. *MAM. Clin Infect Dis* 17(suppl. 1) S163-S170
- Cox, H.W., Hayes, M.M. Saleh S.M. (1983) Immune complexes and immunoglobulin interactions associated with altered lymphocytes activity in *P. chabaudi* infections. *J Parasitol* 69 809-814
- Dahl, C.E., Dahl J.S. y Bloch K. (1980) Effect of alkyl substituted precursors of cholesterol on artificial and natural membranes and on the viability of *M. capricolum*. *Biochemistry* 19 1462-1470.
- Davis, J.K., Cassel, G.H., Minion, F.C. y Wise, K.S. (1981) Mycoplasma host-cell interactions resulting in chronic inflammation, acquisition of host antigens and other mechanisms. *Isr J Med Sci* 17 633-637
- Davis, J.K., Thorp, R.B., Maddox P.A. (1982) Murine respiratory mycoplasmosis in F344 and LEW rats: evolution of lesions and lung lymphoid cell populations. *Infect Immun* 36 720-725
- Davis, J.K., Simecka J.W., Williamson S.P. (1985) Non-specific lymphocyte responses in F344 and LEW rats: susceptibility to murine respiratory mycoplasmosis and examination of cellular basis for strain differences. *Infect Immun* 49 152-155.
- Del Giudice, R.A., Gardella R.S. y Hopps H.E. (1980) Cultivation of formerly noncultivable strains of *M. hyorhinus*. *Curr.Microbiol* 4 75-79
- Dietz, J.N. y Cole, B.C. (1981) Direct activation of the J774. 1 murine macrophage cell line by *M. arthritidis*. *Infect Immun* 37 811-817
- Dudler, R., Schmidhauser, C., Parish, R.W., Wettenhall, E.H. y Schmidt, T. (1988) A mycoplasma high-affinity transport system and the in vitro invasiveness of mouse sarcoma cells. *EMBO J* 7:3963-3970.
- Edwards, D.G. (1947) A selective medium for pleuropneumonia-like organisms. *J.Gen.Microbiol.* 1:238-240.
- Elson, L.H., Nutman T.B., Metcalfe D.D., Prussin C. (1995) Flow cytometric analysis for cytokine production identifies Th1, Th2 and Th0 cells within the human CD4⁺CD27⁻ lymphocyte subpopulation. *J. Immunol.* 154:4294-4300.
- Fernald, G.W., Collier A.M. y Clyde W.A. (1975) Respiratory infections due to *M. pneumoniae* in infants and childrens. *Pediatrics* 55:327-335.
- Ferrick, D.A., Schrenzel M.D., Mulvania T., Hsieh B., Fertin W.G., Lepper. (1995) Differential production of interferon- γ and IL-4 in response to Th1 and Th2 stimulating pathogens by *gd* T cells in vivo. *Nature* 373:255-258.
- Fiala, M., Myhre B.A., Chinh L.T. (1974) Pathogenesis of anemia associated with *M. pneumoniae*. *Acta Haematol.* 51:297-302.

- Fitch, F.W., McKisick M.D., Lancki D.W. y Gajewski T.F. (1993) Differential regulation of murine T lymphocyte subsets. *Annu. Rev. Immunol.* **11**:29-32.
- Fong, T.A.T. y Mossman T.R. (1990) Alloreactive murine CD8+ T cell clones secrete the Th₁ pattern of cytokines. *J. Immunol.* **144**: 1744-1747.
- Forshaw, K.A. y Fallon R.J. (1972) Serological heterogeneity of *M. pulmonis*. *J. Gen. Microbiol.* **72**: 501-504.
- Fleisher, B. (1989) Bacterial toxins as probes for the T cell antigen receptor. *Immunol. Today* **10**: 262-267.
- Freundt, E.A., Erno H. y Lemcke R.M. (1980) Identification of mycoplasmas. En Norris and Gibbons (editores). *Methods in Microbiology* vol. 13 Acad. Press. NY.
- Frosch, P. (1923) Zür morphologie des Lungenseucheerregers. II Mitteilung. *Arch. Wiss. Prakt. Tierheilk* **49**:273-277.
- Gallily, R. (1989). Tumor Necrosis Factor as a mediator of *Mycoplasma orale*-induced tumor cell lysis by macrophages. *Cell. Immunol.* **121**:146-150.
- Gourlay, R.N. y Thrower K.J. (1968) Morphology of *M. mycoides* thread-phase growth. *J. Gen. Microbiol.* **54**: 155-159.
- Graziosi, C., Pantanelo G., Gantt K.R., Fortin J.P. Demarest J.F. (1994) Lack of evidence for the dichotomy of Th1 and Th2 predominance in HIV-infected individuals. *Science* **265**:248-252.
- Hayflick, L. (1965) Tissue cultures and mycoplasmas. *Texas Rep Biol. Med.* **234**: (suppl. 1) 285-289.
- Hollingdale, M.R. y Lemcke R.M. (1970) Antigenic differences within the species *M. hominis*. *J. Hyg (Camb.)* **68**:469-453.
- Homfeld, J., Homfeld A., Nicklas W., Rink L., Weyland A. y Kirchner H. (1990) Induction of interleukin-6 in murine bone marrow-derived macrophages stimulated with the *M. arthritidis* mitogen MAS. *Autoimmunity* **7**:317-323.
- Hopps, H.E., Meyer B.C., Barile M.F. y DelGiudice R.A. (1973) Problems concerning "noncultivable" mycoplasma contaminants in tissue cultures. *Ann NY Acad. Sci.* **225**:265-271.
- Howard, C.J. y Taylor G. (1985) Humoral and cell mediated immunity, p. 259-292. En Razin y Barile (eds) *The Mycoplasmas* vol. 4. Acad. Press., New York.
- Hsieh, C.S., Macatonia S.E., Tripp C.S. Wolf S.F., O'garra A., y Murphy K.M. (1993) Development of Th1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* **260**:547-552.
- Hurley, D., Aguilar M., Garibay B., Rodríguez B., Valdepeña L. (1984). Estadística: curso CINVESTAV-SEP. Centro de Investigación y Estudios Avanzados, IPN.

- Jungi, T.W., Krampe, M., Sileghem, M., Griot, C., Nicolet J. (1996) Differential and strain-specific triggering of bovine alveolar macrophage effector functions by mycoplasmas. *Microbial Pathogenesis* 21: 487-492
- Kaklamani, E., Koumantaki Y., Kuralis D., Rommain M., Smets P., Kaklamani P., Blackwell C.C. y Weir D M (1991) *Klebsiella pneumoniae* glycoprotein RU-41740 inahnces resistance of mice against *M. arthritis*-induced arthritis *FEMS-Microbiology Immunology* 76 205-211.
- Kaklamani, E., Koralis D., Kaklamani Ph, Koumandaki Y., Katsougarı K., Blackwell C., Sparos L., Weir D., Trichopoulos D. (1991) The effect of *M. arthritis* infection on the phagocytic activity of macrophages in rats and mice *FEMS Microbiology Immunology* 76 151-154
- Kaklamini, E. y Pavlatos M (1972) The immunosuppressive effect of mycoplasma infection. 1. Effect on humoral and cellular response *Immunology* 22 695-671.
- Kaplan, P.J. y Garvey, J.S. (1986) *M. neurolyticum* membranes: a T-independent antigen in the rat. *Immunol Invest* 15 35-41.
- Kauffman, S.H.E. Immunity to intracellular bacteria (1993) *Annu Rev Immunol* 13 151-157.
- Keat, A., Thomas, B., Dixey J., Osborn M., Sonnex C., Taylor-Robinson D (1987) Chlamydia trachomatis and reactive arthritis. the missing link. *Lancet* 1 72-77.
- Kelso, A. (1995) Th1 and Th2 subsets: paradigms lost? *Immunol Today* 16 373-375.
- Kirchner, H., Bauer, A., Moritz, T. y Herbst, F. (1986) Lymphocyte activation and induction of interferon gamma in human leucocytes cultures by the mitogen in *M. arthritis* supernatant (MAS) *Scand J Immunol* 24 609-613.
- Kishima, M., Kuniyasu, C., Eguchi., M. y Nakagawa, M. (1987) Humoral immune response to non-viable *M. pulmonis* in mice is enhanced by dextran sulfate. *Vet. Microbiol* 13:335-341.
- Kono, M., Yoshioka M., Imai M. (1985) *M. pulmonis* arthritis in mice: microbiological and immunological features. *Microbiol. Immunol* 29 645.
- Krieg, N.R. y Holt J.G. (1984) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1 Ed. Wilkins, Baltimore, London.
- Kuby, J. (1992) IMMUNOLOGY. De. W.H. Freeman y Company N.Y.
- Kuhn, R., Rajewsky K., Müller W., (1991) Generation and analysis of IL-4 deficient mice. *Science* 254:707-712.
- Kusunoki, S., Chiba, A., Hitoshi, S., Takizawa, H., Kanazawa Y. (1995) Anti-Gal-C antibody in autoimmune neuropathies subsequent to mycoplasma infection. *Muscle y Nerve* 18: 409-413.

- Lemke, H., Krause, R., Lorenzen, J. y Havsteen, B. (1985) Mycoplasma infection of cell lines can stimulate the expression of Fc receptors by binding of the carbohydrate moiety of antibodies. *Eur J Immunol.* 15: 442-448
- Lin, J.S. y Kass E.H. (1974) Serological reactions of *M. hominis* differences among mycoplasmae: metabolic inhibition and growth agglutination tests. *Infect Immun* 10: 535-540
- Lind, K., Hoier-Madsen M., Wiik A. (1988) Autoantibodies to mitotic spindle apparatus in *M. pneumoniae* disease. *Infect Immun.* 56: 714-720
- Lo, S.C., Shih J.W., Yang, N.K. (1989) A novel virus-like infectious agent in patients with AIDS. *Amer J trop Med Hyg.* 40: 213-220
- Lo, S.C., Shih, J.W., Newton P.B. III, Wrong D.M., Hayes, M.M., Benish, J.R., Wear D.J., y Wang R.Y. (1989) Virus-like infection agent (VLIA) is a novel pathogenic mycoplasma: *M. incognitus*. *Amer J trop Med Hyg.* 41: 586-590
- Lo, S.C., Hayes M.M., Wang R.Y., Pierce P.F., Kotani H., Shih J.W.-K. (1991) Newly discovered mycoplasma isolated from patients infected with HIV. *Lancet* 338: 1415-1420.
- Lo, S.C., Hayes, M.M., Kotani, H., Pierce, P.F., Wear, D.J., Newton, P.B., Tully, J.G., Shih, J.W.K. (1993) Adhesion Onto and Invasion into Mammalian Cells by *Mycoplasma-pneumoniae* - A Newly Isolated Mycoplasma from Patients with AIDS. *Modern Pathology* 6: 276-279.
- Loewenstein, J. y Gallily, R. (1984) Studies of the mechanism of macrophage-mediated tumor cell lysis induced by *M. orale*. *Isr J Med Sci.* 20: 895-900
- Maggi, E., Mazzetti M., Ravina A., Annunziato F. (1994) Ability of HIV to promote a Th1 to Th0 shift and to replicate in Th2 and Th0 cells. *Science* 265: 1152-1158.
- Maniloff, J., McEihaney R.N., Finch L.R. y Baseman J.B. Eds. (1992) *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis*. Am.Soc Microb. Washington, D.C.
- Martzinovski, E.-J. (1911) De l'etiologie de la peripneumonia. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 25: 914-920.
- Matthes, M., Schrezenmeier, H., Homfeld, J., Fleisher, S., Malissen, B., Kirchner, H. y Fleischer B. (MAS). *Eur. J. Immunol.* 18: 1733-1738.
- McGarrity, G.J., Vanaman, V. y Sarama, J. (1984) Cytogenic effects of mycoplasmal infection of cell cultures: a review. *In Vitro* 20: 1-8.
- Mishell, B.B. y Shigi S.M. (eds.) (1980) *Selected methods in cellular Immunology*. De. Freeman W.H. and Company, Sn. Francisco.
- Morowitz, H.J. y Wallace D.C. (1973) Genome size and life cycle of the mycoplasma. *Ann. NY Acad.Sci.* 225: 62-67.

- Mossmann, T.R. (1986) Two types of murine helper T cell clone. 1. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 136:2348-2357.
- Mossman, T.R. y Coffman R.L. (1989) Th1 and Th2 cells different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev Immunol* 7: 145-149.
- Mossman, T.R. y Sad S. (1996) The expanding universe of T cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today* 17: 138-142.
- Mühlradt, P.F. (1991) MDHM, a macrophage-stimulatory product of *Mycoplasma fermentans*, leads to *in vitro* IL-1, IL-6, TNF, and prostaglandins production and is pyrogenic in rabbits. *Infect Immun* 59: 3969-3972.
- Naot, Y., Tully, J.G., y Ginsburg, H. (1977) Lymphocyte activation by various *Mycoplasma* strains and species. *Infect Immun* 18: 310-316
- Naot, Y., Merchav, S., Ben-Davie E. (1979) Mitogenic activity of *M. pulmonis*. 1. Stimulation of rat B and T lymphocytes. *Immunol* 36: 399-403
- Naot, Y. (1982) *In vitro* studies on mitogenic activity of mycoplasma towards lymphocytes. *Rev Infect Dis* suppl. 4: S205-209.
- Nocard, E. y Roux E. (1898) Le microbe de la peripneumonie. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 12:240-245.
- Nowak, J. (1929) Morphologie, nature et cycle evolutif du microbe de la peripneumonie des bovines. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 43: 1330-1336.
- Odriozola, J.M., Waitzkin E., Smith T.L. y Bloch K. (1978) Sterol requirement of *M. capricolum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:4107-4111.
- Paton, G.R., Jacobs, J.P. y Perkins F.T. (1965) *Natura* (London) 207:43-49.
- Peterson, J.E., Rodwell A.W. y Rodewell E.S. (1973) Occurrence and ultrastructure of a variant (rho) form of *Mycoplasma*. *J. Bacteriol.* 115: 411-417.
- Plackett, P. y Buttery S.H. (1964) A galactofuranose disaccharide from the galactan of *M. mycoides*. *Biochem. J.* 90:201-206.
- Pollack, J.D. (1979) Respiratory pathways and energy-yielding mechanisms. En Barile y Razin (editores). *The mycoplasma* vol. 1, Acad.Press NY:
- Proust, J.J., Buchholz, M.A. y Nordin, A.A. (1985) A lymphokine-like soluble product that induces proliferation and maturation of B cells appears in the serum-free supernatant of a T cell hybridoma as a consequence of mycoplasmal contamination. *J. Immunol.* 134:390-396.
- Razin, S. y Oliver O. (1961) Morphogenesis of mycoplasmal and bacterial L-form colonies. *J. Gen.Microbiol.* 24:225-230.

- Razin, S. y Cosenza B.J. (1966) Growth phases of *Mycoplasma* in liquid media observed with phase-contrast microscope. *J. Bacteriol.* 91:858-862.
- Razin, S. y Rottem S. (1976) Techniques for the manipulation of mycoplasma membranes. En Maddy (editor) *Biochemical Analysis of membranes*, Chapman and Hall, London.
- Razin, S. (1968) *Mycoplasma* taxonomy studied by electrophoresis of cell proteins. *J. Bacteriol.* 96: 687-691
- Razin, S. (1978) The mycoplasmas. *Microbiol. Rev.* 42: 414-119
- Razin, S. (1981) The mycoplasma membrane. En Ghosh (editor), *Organization of prokaryotic Cell membranes*, Vol. 1 CrC Press, Boca Raton, Florida p 165
- Rawadi, G., Romanroman, S., Castedo, M., Dutilleul, V., Susin, S., Marchetti, P., Geuskens, M., Kroemer G. (1996) Effects of *Mycoplasma fermentans* on the myelomonocytic lineage - Different molecular entities with cytokine-inducing and cytotoxic potential. *Journal of Immunology* 156: 670-673.
- Rink, L., W Nicklas, W., J Luhm, J., R Kruse, R., H Kirchner H. (1996) Induction of a proinflammatory cytokine network by *Mycoplasma arthritis*-derived superantigen (MAS). *Journal of Interferon and Cytokine Research* 16: 861-866.
- Roberts, D.H., Windsor R S Masiga W.N. (1973) Cell-mediated immune response in cattle to *M. mycoides* var. *mycoides*. *Infect. Immun.* 3:349-353.
- Rodovich, J. Talmage D.W. (1967) Antigenic competition: cellular or humoral. *Science* 158:512-514.
- Rodwell, A.W. (1979) Nutrition, growth y reproduction. En Barile and Razin (editores). *The mycoplasmas* vol.1 Acad.Press NY.
- Romagnani, S. (1994) Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu. Rev. Immunol.* 12:227-231.
- Romero, R.A., Montaraz C.J.A., Rosendal S.. (1993) "Fracciones de micoplasma que matan ratones sensibles al LPS previamente inoculados con D-galactosamina". Memorias del X Congreso Nacional de Inmunología, Ixtapa-Zihuatanejo, Gro., México.
- Rose, F.V. y Cebra, J.J. (1985) Isotype commitment of B cells and dissemination of the primed state after mucosal stimulation with *M. pulmonis*. *Infect. Immun.* 49:428-433.
- Rose, N.R. y Bigazzi P.E. (Eds.) (1973) *Methods in Immunodiagnosis*. De. John Wiley y Sons.
- Rothstein, J.L. y Schreiber, H. (1988) Synergy between tumor necrosis factor and bacterial products causes hemorrhagic necrosis and lethal shock in normal mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 17:569-573.

- Ruuth, E., Ranby, M., Friedrich, B., Persson, H., Goustin, A., Leanderson, T., Coutinho, A. y Lundgren, E. (1985) Mycoplasma mimicry of lymphokine activity in T cell lines *Scand J Immunol* 21:593-597
- Ruuth, E. y Praz F. (1989) Interactions between Mycoplasmas and the Immune System *Immunological Reviews* 112:133-137
- Sabin, A.B. (1941) The filtrable microorganisms of the pleuropneumonia group. *Bacteriol Rev* 5:1-6.
- Sabin, A.B. y Johnson, B. (1940) Search for microorganisms of the pleuropneumonia group in rheumatic and non-rheumatic children *Proc Soc Exp Biol Med*, 44:569-574
- Saillard, C., Carte, P., Bove, J.M., Bebear, C., Lo, S.C., Shih, J.W.K., Wang, R.Y., Rose D.I. y Tully, J.G. (1990) Genetic and serologic relatedness between *M. fermentans* strains and a mycoplasma recently identified in tissues of AIDS and non-AIDS patients. *Res Virol* 141:385-393.
- Salgame, P., Abrams J.S., Clayberger C., Goldstein H., Convit J., Modlin R.L., Bloom B.R. (1991) Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science* 254:279-283
- Schimke, R.T., Berlin C.M., Sweeny E.W. y Carroll W.R. (1965) The generation of energy by the arginine dihydrolase pathway in *M. hominis*. *J Biol Chem* 241:2228-2232.
- Seder, R.A. y Paul W.E. (1994) Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 12:635-658.
- Sher, T. (1990). *In vitro* induction of TNF, tumor cytolysis and blast transformation by *Spiroplasma* membranes. *J Natl. Cancer Inst* 82:1142-1147.
- Sher, A. y Coffman R.L. (1992) Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 11:129-140.
- Simecka, J., y Casell, G.H. (1987) Serum antibody and cellular responses in LEW and F344 rats after immunization with *M. pulmonis*. *Infect. Immun.* 55:731-735.
- Simecka, J., y Casell, G.H. (1991) Specific and non-specific antibody responses in different segments of the respiratory tract in rats infected with *M. pulmonis*. *Infect. Immun.* 59:3715-3721.
- Sitia, R., Rubartelli, A., Deambrosis, S., Pozzi, D. y Hammerling, U. (1985) Differentiation of the murine B cell lymphoma I.29: inductive capacities of lipopolisaccharide and *M. fermentans* products. *J. Immunol.* 15:570-573.
- Smith, P.F. (1987) Antigenic character of membrane lipoglycans from mollicutes: a review. *Isr. J. Med. Sci.* 23:448-452.

- Stackpole, C.W., Alterman, A.L. y Fornabaio, D M (1988) Host immunity to mycoplasma antigens introduced into B16 melanoma cells effects on tumor growth rate and metastasis. *Clin Exp Metastasis* **6**: 271-276
- Stanbridge, E.J. y Weiss, R.L. (1978) Mycoplasma capping on lymphocytes *Nature* **276**:583-586
- Steuier, A., Franz, A., Furr, P.M., Taylor-robinson, D., Webster, A D B , Hughes G R V. (1996) Common variable immunodeficiency presenting as a *Mycoplasma hominis* septic arthritis *Journal of Infection* **33**: 235-243
- Street, N.E., Schumacher J.H., Fong A T , Bass H., Fiorentino D F. (1990) Heterogeneity of mouse helper T cells. *J. Immunol.* **157**: 798-804.
- Stuart, P.M. (1990) Differential induction of bone marrow macrophages proliferation by mycoplasmas involves granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Infect Immun.* **58**:3558-3562
- Sugama, K. (1990). *Mycoplasma* induce transcription and production of TNF in a monocytic cell line, THP-1, by a protein kinase C-independent pathway. *Infect.Immun.* **58**:3564-3569.
- Takema, M., Oka S., Uno K., Nakamura S., Arita H., Tawara K., Inaba K. y Muramatsu S. (1991) Macrophage-activating factor extracted from mycoplasma. *Cancer Immunol Immunother.* **33**:39-45.
- Tarshis, M., Morag, B., Mayer, M. (1993) Mycoplasma Cells Stimulate Invitro Activation of Plasminogen by Purified Tissue-Type Plasminogen Activator. *FEMS-Microbiology Letters* **106**:201-206.
- Taugrog, J.D., Leary, S.L., Cremer M.A. (1984) Infection with *M. pulmonis* modulates adjuvant and collagen arthritis in Lewis rats. *Arthritis Rheum.* **27**: 943-949
- Taylor-Robinson, A.W., Phillips R.S., Severn A., Moncada S. y Liew F.Y. (1993) The role of Th1 and Th2 in a rodent malaria infection. *Science* **260**: 1931-1943.
- Taylor-Robinson, D., Furr, P.M., Webster, A.D. (1986) Ureaplasma urealyticum in the immunocompromised host. *Pediatr.Infect.Dis.* **5**(suppl 6):S236-241.
- Taylor-Robinson, D. y McCormack D. (1980) The genital mycoplasmas. *N.Engl.J.Med.* **302**:1003-1009.
- Thirkill, C.E. y Henny G.E. (1975) Serological comparison of five arginine-utilizing *Mycoplasma* species by two dimensional immunoelectrophoresis. *Infect.Immun.* **10**:624-629.
- Tsai, S., Wear D.J., Shih J.W-K y Lo, S-C. (1995) Mycoplasmas and oncogenesis: Persistent infection and multistage malignant transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**:10197-10204
- Tully, J.G. (1981) Mycoplasmal toxins. *Isr.J.Med.Sci.* **17**:604-609.

- Turner, A.W. (1935) A study of the morphology and life cycles of the organism of pleuropneumonia contagiosa boum (*Borrelomyces peripneumoniae* nov gen.) by observation in the living state under dark-ground illumination. *J. Pathol Bacteriol* 41:1-9.
- Uno, K., Takema M., Hidaka S., Tanaka R., Konishi T., Kato T., Nakamura S., Muramatsu S. (1990) Induction of antitumor activity in macrophages by mycoplasmas in concert with interferon. *Cancer Immunol Immunother* 34: 151-158.
- Upchurch, S. y Gabridge, M. (1983) De novo purine sunthesis, purine salvage, and DNA synthesis in normal Lesch-Nyhan fibroblasts infected with *M. pneumoniae*. *Infect Immun.* 39: 164-171.
- Washburn, L.R., Cole, B.C., Gelman M.I., Ward J.R. (1980) Chronic arthritis in rabbits induced by mycoplasmas. *Arthritis Rheum.* 23: 825-832.
- Watanabe, T., Shibata, K.I. y Hasegawa, K. (1987) Production of immunoglobulin M (IgM) autoantibodies to IgG in rabbits inoculated with *M. salivarum* cells grown in medium supplemented with rabbit serum. *Infect Immun.* 55: 263-268.
- Weidenfeld, J., Wohlman, A., Gallily R. (1995) Mycoplasma fermentans activates the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the rat. *Neuroreport* 6: 910-916
- Weisburg, W.G., Tully J.G., Rose D.L., Petzel J.P., Oyaizu H., Yang D., Mandelco L., Schrest J., Lawrence T.G., Van etten J., Maniloff J. y Woese C.R. (1989) A phylogenetic analysis of the Mycoplasmas: Basis for their classification. *J. Bacteriol.* 171:6455.
- Williamson, J.S., Davis, J.K. y Casell, G.H. (1986) Polyclonal activation of rat splenic lymphocytes after in vivo administration of *M. pulmonis* and its relation to in vitro response. *Infect Immun.* 52:594-600.
- Wise, K.S., Cassel, G.H. y Acton, T.R. (1978) Selective association of murine T lymphoblastoid cell surface alloantigens with *M. hyorhinis*. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 75:4479-4485.
- Wroblewski, W., (1931) Morphologie et cycle evolutif des microbes de la peripneumonie des bovides et de l'agalaxie contagiuese des chèvres et des moutons. *Ann.Inst.Pasteur.* (Paris) 47:94-101.