

INTERACCIÓN SINÉRGICA ENTRE *Mycoplasma fermentans* Y LA EXPOSICIÓN A CENIZA VOLCÁNICA

JOSÉ ANTONIO RIVERA-TAPIA*, LILIA CEDILLO-RAMÍREZ**,
JORGE ANTONIO YAÑEZ-SANTOS***, SILVIA GIONO CEREZO****

Resumen

Introducción: *Mycoplasma fermentans* presenta propiedades inmunorreguladoras y puede desencadenar infecciones crónicas con signos leves de la enfermedad. Por su parte, la materia particulada atmosférica es un componente diverso y complejo de la contaminación del aire y que se asocia a efectos adversos para la salud. **Objetivo:** Estudiar el daño producido por la inoculación de *Mycoplasma fermentans* y la exposición a ceniza volcánica.

Materiales y métodos: Las muestras de ceniza se colectaron en zonas cercanas al volcán Popocatepetl. Diez hamsters se expusieron a la inhalación de ceniza volcánica, otros diez ejemplares fueron inoculados intratraquealmente con *Mycoplasma fermentans* y expuestos a inhalación de ceniza volcánica. Diez hamsters no fueron inoculados ni expuestos a la inhalación de ceniza, considerándose como grupo control. A partir del día 60 los ejemplares se sacrificaron, obteniéndose muestras de sangre para determinar el hematocrito, la cuenta diferencial y detección de anticuerpos. Se realizó estudio histopatológico al tejido pulmonar de los ejemplares.

Resultados: El grupo de hamsters expuestos a la ceniza volcánica mostraron pérdida en peso y decremento en el conteo de neutrófilos. No se detectaron anticuerpos contra *Mycoplasma fermentans*. El tejido pulmonar de los ejemplares expuestos a la ceniza mostró detritus celulares, reacción inflamatoria aguda e infiltrado linfocitario. Los hamsters previamente infectados y expuestos a la ceniza volcánica presentaron engrosamiento de la pared alveolar, infiltrado de células plasmáticas, neutrófilos y foco hemorrágico. Estos resultados indican que *Mycoplasma fermentans* puede interactuar con estímulos ambientales, como es el caso de la ceniza volcánica, potencializando efectos adversos en la salud.

* Posgrado en Ciencias Ambientales del Instituto de Ciencias de la BUAP.

** Centro de Investigaciones Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

*** Laboratorio de Microbiología, Facultad de Estomatología de la BUAP.

**** Laboratorio de Bacteriología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Distrito Federal, México.

Correspondencia: M. en C. José Antonio Rivera Tapia.

Edificio 103-J, Centro de Investigaciones Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Ciudad Universitaria C.P. 72570, Puebla, México.

Correo electrónico: jart70@yahoo.com

Remitido para publicación: 03-09-2008. Aprobado para publicación: 15-10-2008

Palabras clave: Ceniza volcánica, micoplasma, efectos adversos en salud.

ARCH. MED. (Manizales) 2008; 8 (2): 98-106

SYNERGISTIC INTERACTION BETWEEN Mycoplasma fermentans AND VOLCANIC ASH.

Summary

Introduction: *Mycoplasma fermentans* possess remarkable immunoregulatory properties and can potentially establish chronic latent infections with little signs of disease. Atmospheric particulate matter is a complex and diverse component of air pollution associated with adverse health effects. **Objective:** Damage study produced by *Mycoplasma fermentans* inoculation and inhalation of volcanic ashes. **Materials and methods:** Ashes were collected from small towns near the Popocatepetl volcano. 10 hamsters were exposed to the volcanic ashes, 10 hamsters were intratracheal injected with *Mycoplasma fermentans* and then exposed to volcanic ashes, and another group of 10 hamsters were not exposed to ashes and administration of mycoplasmas and were considered as control. After 60 days animals were sacrificed, blood was collected in order to determine hematocrite and white blood differential count, serum was used to determine the presence of antibodies. Histopathological studies were performed with the hamsters lung. **Results:** Animals exposed to volcanic ashes lost weight and they also showed a decrease in neutrophils count. Antibodies against *Mycoplasma fermentans* were not detected. The histopathological study of lungs exposed to ashes showed cellular detritus, acute inflammatory reaction and lymphocyte infiltrate. Animals that were previously infected with mycoplasma and then exposed to ashes showed enlargement of alveolar wall, infiltrate of plasmatic cells, neutrophils and hemorrhagic focus. These data indicate that *Mycoplasma fermentans* can interact with environmental stimuli such as inhalation of volcanic ashes, can potentially adverse health effects.

Key words: Volcanic ash, mycoplasma, adverse health effects.

ARCH. MED. (Manizales) 2008; 8 (2): 98-106

Introducción

Diferentes trabajos permiten plantear que la desnutrición y el antecedente de enfermedades infecciosas condicionan incapacidad para hacer frente a diversos agresores externos, siendo representativo el problema que plantea la contaminación ambiental, ya sea antropogénica o natural. De tal manera, la influencia de un factor ambiental, ya sea físico, químico o

biológico, representa una fuente potencial de desequilibrio en la salud de la población.¹⁻³

Las fuentes de contaminación natural, como es el caso de la actividad volcánica, durante la historia geológica han generado impactos ambientales al afectar la calidad del aire, y causar problemas significativos en salud pública.^{4,5} La actividad del volcán Popocatepetl hasta ahora no ha significado un grave peligro en cuanto a destrucción física por su grado de actividad, sin

embargo las emanaciones de gases y ceniza pueden llegar a deteriorar el ambiente y el estado de la salud de la población.^{6,7}

Durante la exposición continua a contaminantes atmosféricos, la afección se puede complicar con algún tipo de infección, de tal forma la importancia de estudiar los contaminantes atmosféricos radica en conocer el riesgo que significa para la salud y el tiempo que pueden permanecer en el ambiente sin que provoquen el desarrollo de lesiones definitivas.⁸⁻¹¹

Los micoplasmas son los microorganismos más pequeños con capacidad de autorreplicación, con un número reducido de estructuras y sistemas enzimáticos básicos para su crecimiento. Estos microorganismos se han aislado de diversos sitios anatómicos, principalmente de vías respiratorias.¹²

El síndrome respiratorio agudo del adulto (SIRPA) está asociado con diferentes agentes causales, como puede ser la disminución en la producción de óxido nítrico al interior del pulmón¹³, por las endotoxinas producidas por bacterias¹⁴ ó por los padecimientos pulmonares inducidos por *Mycoplasma fermentans*.¹⁵ Se han aislado en tracto respiratorio varias cepas de *Mycoplasma fermentans*, presentándose colonización e infección de las células epiteliales del huésped, además se sugiere que este micoplasma puede afectar las funciones inmunológicas, tanto de forma aislada como en conjunto con ciertos factores ambientales.¹⁶⁻¹⁷ El objetivo del presente trabajo fue estudiar el daño producido por la inoculación de *Mycoplasma fermentans* y la exposición a ceniza volcánica.

Material y métodos

Se utilizaron 40 hámsters *Mesocricetus auratus* adultos, los cuales fueron proporcionados por el bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

La cepa bacteriana de *Mycoplasma fermentans* fue proporcionada por el laboratorio de micoplasmas del Centro de Investigaciones Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la BUAP. La viabilidad del micoplasma se confirmó cultivándolo en caldo Eaton, y la concentración a utilizar en el inóculo vía intratraqueal (1×10^6 UFC/ML) se ajustó a partir de diluciones decimales.

Durante los años de 1997 al 2002 se colectaron muestras de ceniza de caída libre provenientes de las exhalaciones del volcán Popocatepetl, en la comunidad de Atlixco-Puebla. La ceniza se tamizó con la finalidad de obtener partículas menores a 10 micras. La muestra tamizada se esterilizó a 120 °C durante 15 minutos, esta muestra se utilizó en el modelo de exposición a la inhalación de ceniza en dosis de 10 microgramos/m³, representando el límite de exposición para polvo que contiene sílice en ambientes laborales.

Las muestras de ceniza colectadas en las localidades aledañas al volcán Popocatepetl fueron sometidas al estudio de microscopia electrónica de barrido. Se deshidrataron las muestras con alcohol al 30%, 50%, 70%, 90% y 100% durante una hora cada concentración. Las muestras se fijaron con solución de etanol: acetona 30:70, 50:50 y 70:30, durante 20 minutos cada concentración. Las muestras fueron tratadas a punto crítico en acetona al 100% y revestidas con oro, realizándose el examen con un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 5410-LV.

Al grupo A (n=10) se inocularon vía intratraqueal con un cultivo de *Mycoplasma fermentans* 0.1 ml a una concentración de 1×10^6 UFC/ml. Tres días postinoculación los ejemplares fueron expuestos a la inhalación de ceniza volcánica, previamente tamizada (10 microgramos/m³) diariamente por 60 días, dentro de un dispositivo de acrílico de 1 m³, con flujo de aire 12 horas diarias. El grupo B (n=10) solo recibieron el inóculo de *Mycoplasma fermentans* vía intratraqueal, el mismo volumen y concentración. Grupo C

(n=10) solo estuvieron expuestos a la inhalación de ceniza, bajo las mismas condiciones. Grupo D (n=10) no fueron inoculados ni expuestos a la inhalación de ceniza, representando al grupo control. Cada tercer día se valoró la masa corporal de los 40 ejemplares.

Transcurridos los sesenta días se anestesiaron los ejemplares con 0.1 ml de pentobarbital sódico vía intraperitoneal y se tomaron muestras de sangre por punción cardíaca (10 ml), a partir de esta muestra se realizó la técnica de hematocrito, cuenta diferencial, detección de anticuerpos contra *Mycoplasma fermentans* y aislamiento del micoplasma. Enseguida se sacrificaron a

los ejemplares con la administración de 0.5 ml de pentobarbital sódico vía cardíaca. Se realizó disección ventral y obtuvo el tejido pulmonar del cual una fracción de 0.2 gramos fue resuspendida en 1 ml de caldo Eaton, incubándose a 37 °C hasta presentarse el vire del indicador, a continuación se realizó la resiembra de cada muestra (5 µl) en agar Eaton e incubándose, para verificar la presencia de *Mycoplasma fermentans* por medio de microscopia estereoscópica. El resto del tejido se fijó en formol al 10 % para realizar cortes histológicos y teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina. Para analizar los datos de variación en la masa corporal, hematocrito y cuenta diferencial se realizó análisis de

Tabla 1. Valores estadísticos de la masa y hematocrito en los grupos estudiados

Grupo	Masa (gramos)	Hematocrito (%)
A	17.6 (DE)	4.4 (DE)
	120.9 (Promedio)	37.2 (Promedio)
B	6.4 (DE)	3.2 (DE)
	124.4 (Promedio)	49.6 (Promedio)
C	18.75 (DE)	2.3 (DE)
	122.3 (Promedio)	48.5 (Promedio)
D	14.5 (DE)	1.6 (DE)
	140.2 (Promedio)	44.2 (Promedio)

DE: Desviación Estándar

Tabla 2. Valores estadísticos de la cuenta diferencial sanguínea, presentándose diferencia significativa (P<0.05) entre los grupos A y C, respecto al grupo D

Grupo	Neutrófilos	Linfocitos
A	22 (%)	78 (%)
	6.8 (DE)	6.8 (DE)
	20.6 (Promedio)	79.4 (Promedio)
B	31 (%)	69 (%)
	4.9 (DE)	4.9 (DE)
	31 (Promedio)	69 (Promedio)
C	8 (%)	92 (%)
	4.1 (DE)	4.1 (DE)
	9.2 (Promedio)	90.8 (Promedio)
D	30 (%)	70 (%)
	8.9 (DE)	8.9 (DE)
	30.4 (Promedio)	69.6 (Promedio)

DE: Desviación Estándar

varianza, considerándose significativas con una $P < 0.05$ (Software Instant 2.0).

Resultados

El análisis por microscopía electrónica de barrido realizado a las muestras de ceniza mostró presencia de fracción respirable menor a 10 micras, como resultado de su fragmentación y condicionando capacidad abrasiva de las muestras (Figura 1).

El grupo de ejemplares que fue inoculado con *Mycoplasma fermentans* y expuesto a la ceniza volcánica presentaron disminución de masa en un 13 %, mostrando diferencia significativa ($P < 0.05$) respecto a los otros grupos estudiados. Por su parte, los resultados del hematocrito no mostraron diferencia ($P > 0.05$) entre los tratamientos de los grupos (Tabla 1). Las variaciones en la cuenta diferencial de los grupos estudiados mostraron diferencia significativa ($P < 0.05$), con tendencia a la disminución de neutrófilos y su respectivo incremento del paquete de linfocitos, principalmente el grupo que solamente estuvo expuesto a la inhalación de ceniza (Tabla 2).

La detección de anticuerpos para *Mycoplasma fermentans* resultó negativa en los cuatro grupos involucrados.

Mycoplasma fermentans se reaisló en las muestras de pulmón de los grupos A y B, que recibieron inóculo con este micoplasma (Figura 2).

El estudio histológico de los tejidos pulmonares en los ejemplares control no presentó cambios en su estructura (Figura 3). Por su parte el grupo que recibió inóculo de *Mycoplasma fermentans* y exposición a ceniza desarrolló engrosamiento de las paredes alveolares con infiltrado de células plasmáticas, neutrófilos y focos hemorrágicos (Figura 4). Los cortes histológicos de los ejemplares que solo re-

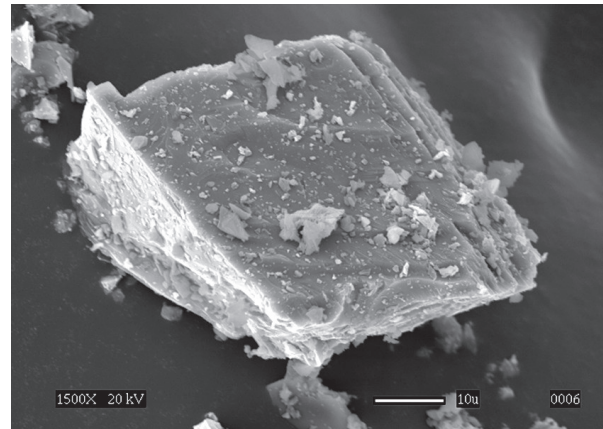


Figura 1. Microscopía electrónica de barrido de ceniza proveniente del volcán Popocatepetl, mostrando fracción respirable menor a 10μ .

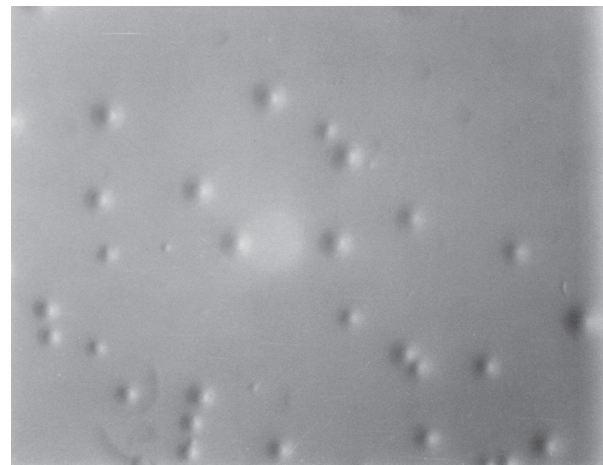


Figura 2. Se presenta el crecimiento colonial característico de *Mycoplasma fermentans* en agar Eaton, del reaislamiento en los ejemplares que fueron inoculados (10x).

cibieron inóculo de *Mycoplasma fermentans* presentaron pérdida alveolar, infiltrados de células plasmáticas y linfocitos y zonas hemorrágicas. Las muestras de tejido pulmonar de los ejemplares que solo fueron expuestos a la ceniza presentaron detritus celulares y reacción inflamatoria.

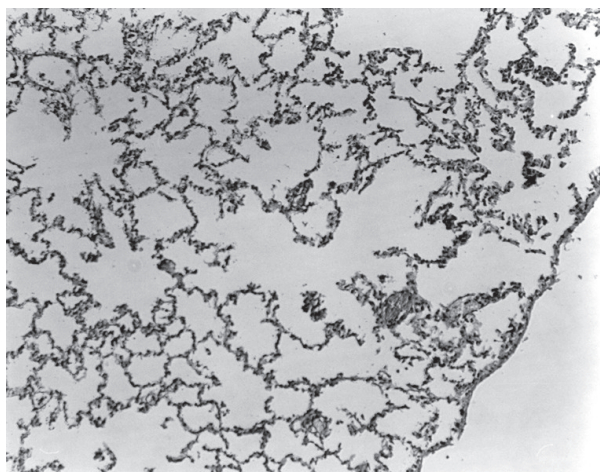


Figura 3. Corte histológico de muestra de pulmón a partir de un ejemplar control, teñido con la técnica de hematoxilina-eosina (20x).

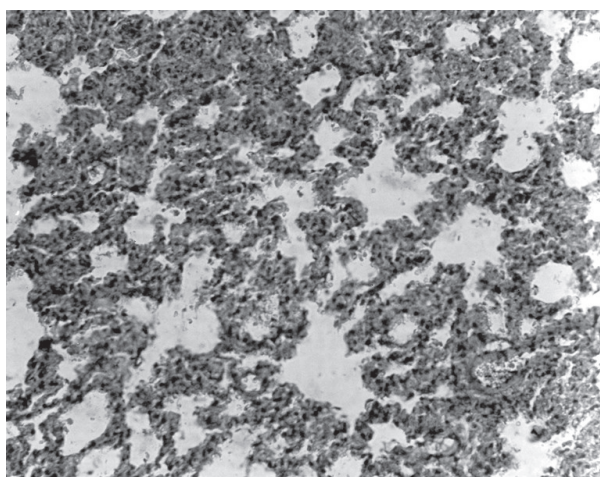


Figura 4. Corte histológico de tejido pulmonar de un ejemplar que fue inoculado con *Mycoplasma fermentans* y expuesto a la inhalación de ceniza volcánica, mostrando engrosamiento de las paredes alveolares con infiltrado de células plasmáticas, neutrófilos y focos hemorrágicos, teñido con la técnica de hematoxilina-eosina (20x).

Discusión

Los estudios de contaminación se han favorecido por la implementación de modelos animales, tratando con estos de interpretar la interacción medio ambiente-ser vivo.^{18,19} Los resultados de los diferentes trabajos experimentales mencionan que la influencia de un factor ambiental representa una fuente desequilibrante de los sistemas reguladores en los seres vivos.¹ De tal forma, se ha visto que los efectos inducidos por la contaminación condicionan manifestaciones y alteraciones en animales y el hombre.²⁰

Las variaciones en los valores de la masa presentados en este trabajo mostraron mayor tendencia a la disminución en el grupo de ejemplares infectados con *Mycoplasma fermentans* y expuestos a la inhalación de ceniza volcánica. Estos datos son comparables a los obtenidos en el estudio donde se expuso a un grupo de ratas a la inhalación de ceniza volcánica proveniente del Monte Santa Helena.²¹ Además, los estudios que involucran exposición a la ceniza volcánica en modelos animales registran aumento de leucocitos polimorfonucleares y de macrófagos a nivel alveolar²², también cambios morfológicos en células sanguíneas, proliferación de linfocitos T en sangre periférica, disminución en la producción de interleucina-1 y alteración en la síntesis de proteínas. Por su parte, las fluctuaciones en la cuenta diferencial sanguínea se relacionan con la continua exposición a la ceniza volcánica, ya que si consideramos que el factor ambiental involucrado puede acelerar la utilización, la destrucción o alterar la producción en los elementos celulares, se verá reflejado en cambios de los elementos celulares sanguíneos.^{23,24}

La ausencia de anticuerpos contra *Mycoplasma fermentans* se relaciona con sus sistemas genéticos que hacen posible su interacción con tejidos del hospedero, principalmente por

la acción de proteínas de superficie, ya que la variabilidad de estas proteínas parece estar relacionada con la evasión al sistema inmunológico.²⁵

La presencia de *Mycoplasma fermentans* en las muestras de pulmón sugiere que este microorganismo presenta la capacidad de colonizar este tejido, además de la adherencia y penetración al epitelio celular que son aspectos importantes en los mecanismos de patogenicidad²⁵, favoreciendo los efectos de cualquier otro factor ambiental, como es el caso de la exposición a la ceniza volcánica.

Los cambios observados en el estudio histológico se atribuyen al sinergismo establecido entre el proceso infeccioso y la exposición a la inhalación de ceniza, ya que la composición química y el tamaño de las partículas de la ceniza condiciona el daño en vías respiratorias. Esto se corrobora con los reportes donde se inoculó con *Streptococcus* y exposición a la

inhalación de ceniza a un grupo de ratas, provocándoles la muerte a los ejemplares a las 24 horas. También se demostró mayor susceptibilidad a la infección por *Listeria monocytogenes* posterior a la exposición a cenizas de aceite residual.^{22,26}

También se ha descrito que la exposición moderada a la ceniza volcánica condiciona padecimientos respiratorios como inflamación en vías respiratorias, bronquitis e incluso fibrosis pulmonar^{27,28}, la exposición a la contaminación atmosférica representa un problema serio, ya que también se ha documentado ser causa de neuro-inflamación, alteración de la respuesta inmunológica innata del cerebro y de incremento de los riesgos de eventos cardiovasculares.^{29,30} De tal forma, consideramos que un factor o factores físicos, químicos o biológicos condicionan y en ocasiones pueden llegar a potencializarse, derivando en efectos negativos en la salud de las poblaciones expuestas.

Literatura citada

1. ROMIEU I, MENESES F, RUIZ S, SIERRA JL, HUERTA J, WHITE MC. Effects on air pollutions on the respiratory health of asthmatic children living in Mexico City. *Am J Resp Crit Care Med*. 1996; 154:300-307.
2. SCHWARZE PE, OVREVIK J, LAG M, REFSNES M, NAFSTAD P, HETLAND RB, et al. Particulate matter properties and health effects: consistency of epidemiological and toxicological studies. *Human Exp Toxicol*. 2006; 25:559-579.
3. FUBINI B, FENOGLIO I. Toxic potential of mineral dust. *Elements* 2007; 3:407-414.
4. NANIA JM, BRUYA TE. In the wake of Mount St. Helens. *Ann Emerg Med*. 1982; 11: 184-191.
5. HANSELL AL, HORWELL CJ, OPPENHEIMER C. The health hazards of volcanoes and geothermal areas. *Occup Environ Med*. 2006; 63:149-156.
6. KREES V. Magma mixing as a source for Pinatubo sulphur. *Nature* 1997; 389: 591-593.
7. RIVERA-TAPIA, YAÑEZ-SANTOS A, CEDILLO-RAMIREZ L. Emisión de ceniza volcánica y sus efectos. *Ecosistemas* 2005; 14:107-115.
8. HATCH GE, BOYKIN E, GRAHAM JA, LEWTAS J, POTT F, LOUD K. Inhalable particles and pulmonary host defense: in vivo and in vitro effects of ambient air and combustion particles. *Environ Res*. 1985; 37: 61-71.
9. BERUBE KA, JONES TP, HOUSLEY DG, RICHARDS RJ. The respiratory toxicity of airborne volcanic ash from the Soufriere Hills volcano, Montserrat. *Mineralogical Magazine* 2004; 68:47-60.
10. LONGO BM, GRUNDERA, CHUAN R, ROSSIGNOL A. SO₂ and fine aerosol dispersion from Kilauea plume, Kau district, Hawaii, USA. *Geology* 2005; 33:217-220.
11. BRUNO C, COMBA P, ZONA A. Adverse health effects of fluoro-edenitic fibers: epidemiological evidence and public health priorities. *Ann NY Acad Sci*. 2006; 1076:778-783.
12. RAZIN S, YOGEV D, NAOT Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998; 62: 1094-1156.
13. SINGH LJ, EVANS TW. Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction?. *Eur Respir J*. 1997; 10: 699-707.
14. PETTY TL, BONE RC, GEE MH, HUDSON LD, HYERS TM. Contemporary clinical trials in acute respiratory distress syndrome. *Chest* 1992; 101: 550-552.
15. LO SC, DOUGLAS J, WEAR S, GREEN L, JONES PG, LEIGER F. Adult respiratory distress syndrome with or without systemic disease associated with infection due to *Mycoplasma fermentans*. *Clin Infect Dis*. 1993; 17(Suppl 1): 259-263.
16. CAMPO L, LAROCQUE P, BLACKBURN WD, WATSON H. Genotypic and phenotypic of *Mycoplasma fermentans* strains isolated from different host tissues. *J Clin Microbiol*. 1998; 36: 1371-1377.
17. GAO F, BARCHOWSKY A, NEMEC AA, FABISIAK JP. Microbial stimulation by *Mycoplasma fermentans* synergistically amplifies IL-6 release by human lung fibroblasts in response to residual oil fly ash (ROFA) and nickel. *Toxicol Sci*. 2004; 81: 467-479.
18. LAWTON JH. Ecological experiments with model system. *Science* 1995; 269: 328-331.
19. HOUSLEY DG, BERUBE KA, JONES TP, ANDERSON S, POOLEY FD, RICHARDS RJ. Pulmonary epithelial response in the rat lung to instilled Montserrat respirable dust and their major mineral components. *Occup Environ Med*. 2002; 59: 466-472.
20. VENKATESH IG. Human health and trace elements including effects on high-altitude populations. *Ambio* 1988; 17: 31-35.
21. WEHNER AP, DAGLE GE, CLARK ML, BUSCHOM. Lung changes in rats following inhalation exposure to volcanic ash: hemolytic activity. *Environ Res*. 1986; 30: 349-360.
22. GROSE EC, GRADY MA, ILLING JW, DANIELS MJ, SELGRADE MK, HATCH GE. Inhalation studies of Mt. St. Helens volcanic ash in animals III. Host defense mechanisms. *Environ Res*. 1985; 36: 61-71.
23. RUBES J, BORKOVEC L, HORINOVA Z, URBANOVA J, PROKOVA I, KULIKOVA L. Cytogenetic monitoring of faro animals under conditions of environmental pollution. *Mutation Res*. 1992; 283: 199-210.
24. KIMBERLY A, Mc CREA KA, ENSOR JE. Altered cytokine in the lungs of cigarette smokers. *Am J Res Crit Care Med*. 1994; 50: 696-703.
25. RAZIN S. Adherence of pathogenic mycoplasmas to host cells. *Biosci Rep*. 1999; 19:367-372.

26. ANTONINI JM, ROBERTS JR, JERIGAN MR, JANE YC, CLARKE RM. Residual oil fly ash increases the susceptibility to infection and severely damages the lungs alter pulmonary challenge with a bacterial pathogen. *Toxicol Sci.* 2002; 70: 110-119.
27. MARTIN TR, WEHNER AP, BUTLER J. Evaluation of physical health due to volcanic hazards: the use of experimental systems to the pulmonary toxicity of volcanic ash. *Am J Public Health* 1986; 76: 59-65.
28. AGOPYAN N, HEAD J, YU S, SIMON SA. TRPV1 receptors mediate particulate matter-induced apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004; 286:563.
29. BROOK RD, FRANKLIN B, CASCIO W, HONG Y, HOWARD G, LIPSETT M, et al. Air pollution and cardiovascular disease. *Circulation* 2004; 109:2655-2671.
30. CALDERON GL, SOLT CA, HENRIQUEZ RC, TORRES JR, NUSE B, HERRITT L. Long-term air pollution exposure is associated with neuroinflammation, an altered innate immune response, disruption of the blood-brain barrier, ultrafine particulate deposition, and accumulation of amyloid β -42 and α -synuclein in children and young adults. *Toxicol Pathol.* 2008; 36:289-310.

