

Alteraciones histológicas a nivel pulmonar inducidas por *Mycoplasma fermentans*

Palabras clave: Alteración histológica, tejido pulmonar, modelo experimental, *Mycoplasma fermentans*.

Key words: Histologic evidence, pulmonary tissue, experimental model, *Mycoplasma fermentans*.

40

Recibido: 06/03/2007
Aceptado: 09/03/2007

Cristian Román-Méndez,* Ma. del Rayo Santellán-Olea,** Lilia Cedillo-Ramírez,*** José Antonio Rivera-Tapia***

* Laboratorio de Microbiología Oral, Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México.

** Laboratorio de Bacteriología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.

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

Correspondencia:

M. en C. Cristian Román Méndez.

Laboratorio de Microbiología Oral, Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
31 Poniente 1304, Colonia Volcanes.

72410 Puebla, Puebla, México.

Correo electrónico: cdrm_99@yahoo.com.mx

Resumen

Antecedentes: Está documentado que diversas especies de micoplasmas son causa importante de morbilidad y mortalidad por neumonía en humanos y modelos animales. **Objetivo:** Determinar las lesiones en tracto respiratorio causadas por *Mycoplasma fermentans*. **Material y métodos:** Dieciocho hámsters recibieron vía intratraqueal cultivo de *Mycoplasma fermentans* a una concentración de 10^6 UFC y fueron sacrificados tres ejemplares los días 5, 15, 30, 60, 80 y 120 posinoculación. Se obtuvieron muestras de suero para la detección de anticuerpos contra *Mycoplasma fermentans* por medio de la técnica de inhibición metabólica. Los pulmones se extrajeron para el aislamiento por cultivo y el estudio histológico. **Resultados:** La detección de anticuerpos resultó negativa en el total de las muestras. *Mycoplasma fermentans* persistió en tracto respiratorio durante todo el experimento y los hámsters infectados mostraron evidencia histológica de inflamación pulmonar. Los micoplasmas colonizan de forma primaria mucosas, entablando una asociación con las células

Abstract

Background: Mycoplasmas cause significant morbidity and mortality by pneumonia in humans and murine models. **Objective:** To evaluate the damage of *Mycoplasma fermentans* infection in respiratory tract. Hamsters were intratracheally inoculated with 10^6 CFU of *Mycoplasma fermentans* and sacrificed during 5, 15, 30, 60, 80 and 120 days postinoculation. Blood serum was obtained to detect antibodies against *Mycoplasma fermentans* by metabolic inhibition test. The lungs were removed aseptically to do the isolate in culture and histological study. **Results:** Serum anti-*Mycoplasma fermentans* antibodies titers were negative in all samples. *Mycoplasma fermentans* persisted in the respiratory tract for the entire 120 days studied and all hamsters became infected and developed histologic evidence of pulmonary inflammation. Mycoplasmas are primarily mucosal pathogens, living a parasitic existence in close association with epithelial cells of their host, usually in the respiratory or urogenital tracts. Animal models developed to investigate the potential role of

epiteliales de su hospedero, usualmente en tracto urogenital o respiratorio. Los modelos animales han permitido investigar la participación de los micoplasmas en condiciones crónicas pulmonares, además de revelar los aspectos histopatológicos de la enfermedad pulmonar.

Introducción

Los micoplasmas son microorganismos procariontes simples que carecen de pared celular, de vida libre, capaces de autorreplicarse y se consideran agentes etiológicos de diversas enfermedades en animales y en el ser humano. En este último se ha establecido que pueden provocar trastornos en la función inmunológica.¹⁻⁵

La patogénesis de la infección por micoplasmas involucra procesos complejos influenciados por antecedentes genéticos del hospedero y del microorganismo, de factores ambientales y de la presencia de otros agentes infecciosos. Aunque algunos factores de virulencia de ciertos micoplasmas han sido descritos, aún no se esclarecen en su totalidad los mecanismos de patogenicidad de los mismos. Esto es debido a la variabilidad fenotípica que presentan, a la capacidad que tienen de adherirse al tejido, causar daño celular, alterar y evadir la respuesta inmune del huésped.^{6,9} El interés por el estudio de los micoplasmas como patógenos humanos se presenta después del descubrimiento de *Mycoplasma fermentans* (cepa *incognitus*) en muestras de pacientes con el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida.^{10,11}

Mycoplasma fermentans juega un papel importante en la patogénesis de infecciones en humanos, ya que estudios recientes reportan haber aislado este micoplasma de diversos sitios anatómicos, a partir de médula ósea, tejido linfoide, tracto genital, tracto respiratorio y fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide.¹²⁻¹⁴ Además, se ha asociado la infección por *Mycoplasma fermentans* con el síndro-

me respiratorio progresivo del adulto (SIRPA) con o sin enfermedad sistémica en pacientes VIH negativos.¹⁵

En 1993 se reportó el aislamiento de *Mycoplasma fermentans* a partir de tres pacientes con SIRPA, los cuales no fallecieron. En los tres casos no se detectó agente etiológico conocido, sólo la presencia de este micoplasma.¹⁵

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el daño inducido por *Mycoplasma fermentans* en el aparato respiratorio en un modelo experimental.

Material y métodos. Material biológico

41

Treinta y seis hámsters dorados (*Mesocricetus auratus*) adultos y libres de micoplasmas proporcionados por el bioterio Claud Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla se incluyeron en el presente trabajo. Los ejemplares estuvieron en condiciones controladas: temperatura entre 18 y 26 °C, humedad relativa de 40 a 70%, periodo de luz con 12 horas de requerimiento al día, ventilación con 8 a 10 recambios totales por hora y alimentados a base de nutricubos purina y agua *ad libitum*.

Mycoplasma fermentans se cultivó en caldo Eaton (65 mL de agua destilada, 2 gramos de base para micoplasmas DIFCO Laboratories, 1 mL de rojo de fenol al 0.4%, 10 mL de dializado de levadura, 25 mL de suero de caballo Hy Clone, 200 UI/mL de penicilina), incubándose a 37 °C. La concentración del inóculo (10^6 UFC/mL) se ajustó por medio de diluciones decimales.

Administración del cultivo bacteriano

Dieciocho hámsters recibieron 50 μ L de cultivo bacteriano vía intratraqueal a una concentración de 10⁶ UFC/mL (grupo experimental). Dieciocho hámsters no recibieron tratamiento alguno (grupo control). A partir del día de la administración del cultivo bacteriano se sacrificaron tres animales, tanto del grupo experimental como del de control, durante los días 5, 15, 30, 60, 80 y 120 posteriores a la administración.

Extracción y procesamiento de las muestras

Durante todo el experimento, el manejo de los animales, la anestesia y los cuidados quirúrgicos fueron efectuados apegándose a lo establecido en "Guide for the care and use of laboratory animal of USA".¹⁶

Los hámsters fueron anestesiados con 0.15 μ L de pentobarbital sódico vía intraperitoneal, se pesaron y a cada uno se le realizó toma sanguínea vía cardiaca (10 mL), de la cual se vertió 0.1 mL en 0.9 mL de caldo Eaton y se incubó a 37 °C durante tres días; enseguida se sembraron 5 μ L de cada muestra en placas de agar, incubándose a 37 °C durante tres días, con la finalidad de corroborar la presencia del micoplasma. El resto de la sangre fue vertida en tubos con anticoagulante EDTA y sin anticoagulante. A las muestras con anticoagulante se les determinó cuenta total de glóbulos blancos, cuenta diferencial de leucocitos y hematocrito. Las muestras libres de anticoagulante se centrifugaron a 3,000 rpm durante 10 minutos para obtener suero y realizar la prueba de inhibición metabólica para la detección de anticuerpos contra *Mycoplasma fermentans*.

A cada ejemplar, bajo condiciones de asepsia, se le extrajo los siguientes órganos y tejidos: corazón, pulmones, bazo, hígado, cerebro, tráquea y sinovias de ambas rodillas. Una fracción (1 gra-

mo) de cada una de estas muestras fue resuspendida en 1 mL de caldo Eaton, incubándose a 37 °C durante tres días, enseguida se sembraron 5 μ L en agar incubándose a 37 °C durante ocho días, siendo observadas al microscopio estereoscópico diariamente.

Los pulmones se fijaron en formol al 10% para su posterior estudio histológico y teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina.

Para la detección del ADN de *Mycoplasma fermentans* se tomaron 500 μ L de los cultivos de los diferentes órganos, centrifugándose a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Al botón resultante se le adicionaron 100 μ L de solución de lisis A+B+K, incubándose a 60 °C durante una hora y conservadas a 4 °C. Las muestras se amplificaron en un termociclador programable, conteniendo la mezcla de reacción: 10 mM de Tris-HCl (pH 8.5) 200 μ M de cada dNTP's, 50 mM de KCl, 3.5 mM de MgCl₂, 2.5 U de enzima Taq polimerasa, 0.3 μ M de cada iniciador (Gibco BRL), 4% de dimetilsulfóxido, 5 μ L de la muestra problema y una gota de aceite mineral estéril, para un volumen final de 50 μ L de muestra. La amplificación se realizó bajo el siguiente esquema: desnaturalización a 94 °C durante un minuto, alineación a 50 °C un minuto y polimerización a 72 °C por un minuto (40 ciclos). Finalmente se da una extensión durante 5 minutos. En seguida se preparó un gel al 2% teñido con bromuro de etidio (10 mg/mL), colocándose 8 μ L de cada uno de los productos amplificados más 2 μ L de azul de bromofenol. El corrimiento electroforético fue a 70 voltios durante 90 minutos y los resultados se observaron en un analizador de imágenes (SYNGENE). Los iniciadores utilizados (RW004 y RW005) amplifican un fragmento de 207 pares de bases.

Los datos referentes a la cuenta total de glóbulos blancos, cuenta diferencial de leucocitos y hematocrito fueron evaluados con la prueba estadística t de Student (Software INSTAT versión 2).

Cuadro I. Sitio anatómico y fecha postinoculación donde se recuperó a *Mycoplasma fermentans*.

Día	Corazón	Pulmón	Hígado	Bazo	Cerebro	Tráquea	Sinovia derecha	Sinovia izquierda	Sangre
5	-	+	+	+	-	+	-	-	-
15	-	+	-	+	-	+	-	-	+
30	+	+	-	+	-	+	-	-	+
60	+	+	+	+	+	+	+	+	+
80	+	+	+	+	+	+	+	-	+
120	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Resultados

Cuatro ejemplares experimentales presentaron: hipotermia, temblor, rigidez articular, incremento en el ritmo respiratorio, pérdida del equilibrio, hepatomegalia y pérdida progresiva en el peso corporal, muriendo en los días 60, 69 y 97.

La cuenta total de glóbulos blancos mostró incremento por parte del grupo experimental, principalmente en los días 5, 15, 80 y 120 posinoculación, presentando diferencia significativa ($P < 0.05$).

Los datos de la cuenta diferencial estuvieron dentro de los valores de referencia, para neutró-

filos 15 a 45% y linfocitos 50 a 95%, sin diferencia significativa ($P > 0.05$) respecto al grupo control. Los resultados del hematocrito estuvieron dentro de los valores de referencia reportados 39 a 59%.

La detección de anticuerpos para *Mycoplasma fermentans* por medio de la prueba de inhibición metabólica resultó negativa en el total de las muestras.

Mycoplasma fermentans se aisló durante las seis fechas de sacrificio a partir de tráquea, pulmón y bazo, y en todos los tejidos en los días 80 y 120 (cuadro I).

Los ejemplares experimentales presentaron a nivel pulmonar, a partir del día 5 posinoculación, infiltrados de linfocitos y células plasmáticas, zonas de hemorragia interalveolar mínima, la cual a

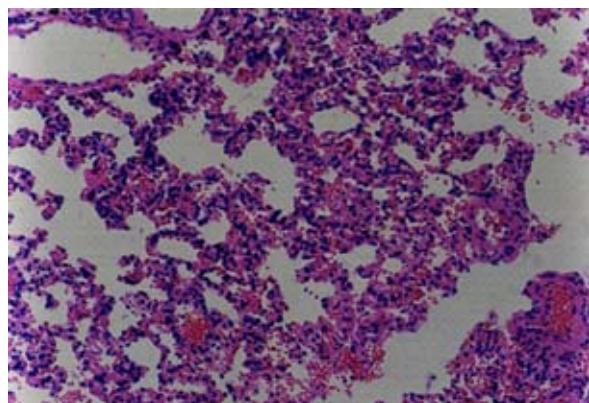


Figura 1. Corte histológico de pulmón experimental, sacrificado el día 80 posinoculación, se observa engrosamiento de los tabiques interalveolares por reacción inflamatoria de predominio mononuclear. Teñidos con la técnica de hematoxilina y eosina (20X).

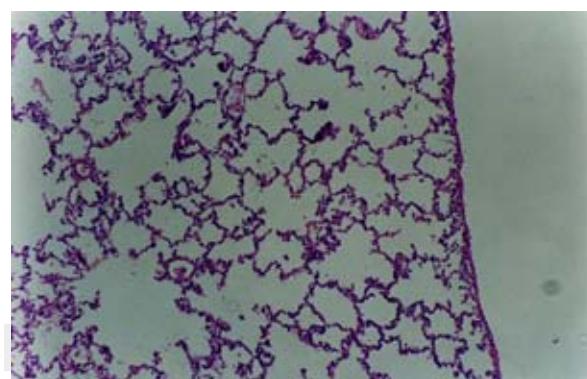


Figura 2. Corte histológico de pulmón control, no se observan alteraciones en el tejido (10X).

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

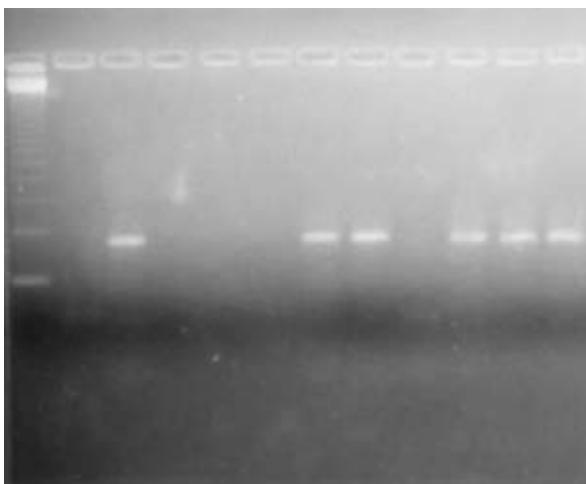


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 2% que muestra los productos amplificados a partir de los aislamientos realizados. (1) marcador de peso molecular (1 kb), (2) control negativo, (3) control positivo, (4-6) muestras de sinovia derecha, sinovia izquierda e hígado, (7 y 8) muestras de corazón y pulmón, (9) muestra de cerebro y (10-12) muestras de bazo, tráquea y sangre.

44

partir del día 15 evolucionó progresivamente con engrosamiento de los tabiques interalveolares (figura 1), las muestras control no presentaron alteración (figura 2).

La detección de ADN de *Mycoplasma fermentans* a partir de los extractos obtenidos de los cultivos realizados de corazón, pulmón, bazo, tráquea y sangre resultó positiva (figura 3).

Discusión

Las variaciones en el peso presentaron tendencia a disminuir durante los 120 días en los ejemplares experimentales, relacionando este efecto al proceso infeccioso que condicionó alteraciones fisiológicas y por consiguiente la pérdida de peso.

Con respecto al análisis de los elementos sanguíneos, las variaciones observadas se atribuyen a la exposición al microorganismo, ya que cualquier antígeno que induzca la utilización, destrucción o que altere la producción, resultará en cambios en

la cuantificación de las células sanguíneas. Los datos aquí presentados concuerdan con otros reportados donde los valores sanguíneos no presentaron variaciones durante la infección experimental en ratones y primates.¹⁷⁻¹⁸

La nula detección de anticuerpos para *Mycoplasma fermentans* está relacionada con los sistemas genéticos que ha desarrollado y que hacen posible su relación con los tejidos del huésped, básicamente por medio de proteínas de superficie. La variabilidad en la generación de estas proteínas parece estar involucrada con la capacidad para evadir la respuesta inmunológica. La proteína de superficie P29 confiere diversidad antigenica a *Mycoplasma fermentans*, presentando un papel importante en lo que respecta a la variación fenotípica. El gen (*p29*) que codifica a la proteína ha sido identificado en varias cepas de *Mycoplasma fermentans* (K-2, SK-5, MY-2, cepa *incognitus*) y en cinco cultivos de pacientes positivos al síndrome de la inmunodeficiencia adquirida.¹⁹⁻²¹ Por tanto, la capacidad de variabilidad en la superficie celular contribuye a la supervivencia de este micoplasma, particularmente cuando el reconocimiento por parte del huésped es específico a proteínas de superficie, causando cambios en la respuesta inmunológica.^{21,22} Además, se ha reportado que la detección de anticuerpos es tardía y transitoria en primates infectados con este microorganismo.¹⁸

El haber reaislado a *Mycoplasma fermentans* en diversos tejidos permite sugerir que el microorganismo presenta la capacidad para invadir diferentes órganos, por medio de la fusión a linfocitos T de acuerdo al trabajo reportado por Dimitrov y colaboradores (1993), además la adhesión y penetración al epitelio celular son aspectos importantes en los mecanismos de patogenicidad que presentan los micoplasmas.²⁰⁻²⁴

Las alteraciones causadas a nivel pulmonar se relacionan con la capacidad que tienen los micoplasmas para atacar la superficie de células del huésped induciendo ciliostasis, hiperplasia y me-

taplasia epitelial. Aunado a estos procesos se observa la producción de lipasas, proteasas, nucleasas y peróxido de hidrógeno, lo cual contribuye al daño epitelial, afectándose también los canales de transporte para sodio y potasio, resultando en ciliostasis.²⁵⁻²⁸

Es importante plantear que una excesiva o inapropiada activación de neutrófilos puede resultar en inflamación y daño severo al tejido, contribuyendo con esto a la patología de enfermedades no infecciosas. En relación a esto debemos considerar que estímulos endógenos y/o exógenos pueden actuar sinérgicamente e inducir hiperreactividad y daño pulmonar agudo, caracterizado por la inflamación neutrofílica, edema, hiperpermeabilidad y fibrosis pulmonar, favoreciendo la susceptibilidad a infecciones microbianas.²⁹⁻³² Lo anterior permite precisar la relevancia y aplicabilidad de este trabajo en el laboratorio de patología clínica, ya que en ciertas ocasiones se presentan biopsias humanas que cursaron con infección por micoplasmas y no se tiene referencia de los daños producidos por estos microorganismos.

La prueba de PCR involucró las muestras del día 60 posinoculación, ya que en este momento se logró aislar a *Mycoplasma fermentans* en el total de las muestras. El reaislamiento coteja con el trabajo reportado por Hardy y colaboradores (2001). Respecto a las muestras de sinovia derecha, sinovia izquierda, hígado y cerebro que resultaron negativas para el PCR, se plantea que esta ausencia en la amplificación del fragmento específico se debe a una baja concentración de ADN en dichas muestras.

Conclusión

Diversas especies de micoplasmas pueden establecerse en infecciones latentes y asociarse con artritis, leucemia y enfermedad pulmonar crónica, condicionando alteraciones fisiológicas como las observadas en el presente estudio experimental. Por su parte, la variabilidad antigénica que pre-

senta *Mycoplasma fermentans* da como resultado que bajo determinadas condiciones la producción de anticuerpos se presente tardía o transitoria.

El aislamiento posinoculación en los diferentes sitios anatómicos reportados, plantea la capacidad de estos microorganismos para establecer una relación estrecha con células huésped y causar alteraciones de forma crónica. Por tanto, se considera a este micoplasma como un patógeno potencial, principalmente cuando el paciente se presenta inmunosuprimido y el diagnóstico no presenta a otro agente etiológico.

Referencias

1. Razin S, Yoge D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 1094-1156.
2. Beccham MJ, Lo SC, Lewis DE, Comer SW, Riley KJ, Oldfield EC. Recovery from fulminant infection with *Mycoplasma fermentans* (incognitus strain) in non-immunocompromised host. *Lancet* 1991; 338: 1014-1015.
3. Barry C. Mycoplasma interaction with the immune system: implications for disease pathology. *Features* 1996; 62: 471-475.
4. Waites KB, Talkington D. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 697-728.
5. Stadtlander CTKH, Watson HL, Simecka JW, Cassell GH. Cytopathogenicity of *Mycoplasma fermentans* (including strain incognitus). *Clin Infect Dis* 1993; 17 (suppl 1): S289-301.
6. Rivera-Tapia JA, Ramírez CL, Bermejo ZD, Giono CS. Papel de *Mycoplasma fermentans* en patologías gastrointestinales y su relación con la artritis reactiva. *Rev Mex Patol Clin* 2006; 53: 134-138.
7. Ellison JS, Olson LD, Barile MF. Immunity and vaccine development. In: Maniloff J, Mc Elhaney RN, Finch LR, Baseman JB (eds). *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. Washington, DC: American Society for Microbiology 1992; 491-499.
8. Tryon VV, Baseman JB. Pathogenic determinants and mechanisms. In: Maniloff J, Mc Elhaney RN, Finch LR, Baseman JB (eds). *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. Washington, DC: American Society for Microbiology 1992; 454-471.
9. Rivera A, Yáñez A, León G, Gil C, Giono S, Barba E, Cedillo L. Experimental arthritis induced by a clinical *Mycoplasma fermentans* isolate. *BMC Muscul Dis* "002; 3: 1-7.
10. Baseman JB, Quackenbush LR. Preliminary assessment of AIDS-associated mycoplasma. *ASM News* 1990; 56: 319-323.
11. Lo SC, Dawson MS, Wong DM. Identification of *Mycoplasma incognitus* infection in patients with AIDS: an immunohistochemical, *in situ* hybridization and ultrastructural study. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 41: 601-616.
12. Bauer FA, Wear JD, Angritt P, Lo SC. *Mycoplasma fermentans* (incognitus strain) infection in the kidneys of patients with acquired immunodeficiency syndrome and associated nephropathy. *Human Pathol* 1991; 22: 63-69.
13. Chirgwin KD, Cummings CM, DeMeo LR, Murphy M, McCormack WM. Identification of mycoplasma in urine from persons infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1993; 17 (suppl 1): S264-266.

14. Hakkerine K, Turanen M, Miettinen A, Karppelin M, Kaitila K, Jansson E. *Mycoplasma* and arthritis. *Ann Rheum Dis* 1992; 51: 1170-1172.
15. Lo SC, Wear DJ, Green SL, Jones PG, Legier JF. Adult respiratory distress syndrome with or without systemic disease associated with infections due to *Mycoplasma fermentans*. *Clin Infect Dis* 1993; 17 (suppl 1): S259-263.
16. Guide for care and use of laboratory animals USA. Department of Health and Human Services, National Institute of Health. NIH Publication 1985.
17. Gabridge MG, Gerald DA, Murphy WH. Toxic membrane fraction from *Mycoplasma fermentans*. *Infect Immun* 1971; 4: 678-682.
18. Lo SC, Wear DJ, Shin JWK, Wang RYH, Newton PB, Rodriguez JF. Fatal systemic infection of nonhuman primates by *Mycoplasma fermentans* (Incognitus strain) *Clin Infect Dis* 1993; 17 (suppl 1): S283-288.
19. Bove JM. Molecular features of Mollicutes. *Clin Infect Dis* 1993; 17 (suppl 1): S10-31.
20. Razin S. Adherence of pathogenic mycoplasmas to host cells. *Biosci Rep* 1999; 19: 367-372.
21. Theiss PM, Karpas A, Wise KS. Antigenic topology of the P29 surface lipoprotein of *Mycoplasma fermentans* differential display of epitopes result in high-frequency phase variation. *Infect Immun* 1996; 64: 1800-1809.
22. Theiss PM, Kim MF, Wise KS. Differential protein expression and surface presentation generates high-frequency antigenic variation in *Mycoplasma fermentans*. *Infect Immun* 1993; 61: 5123-5128.
23. Dimitrov DS, Franzoso G, Salaman M, Blumenthal R, Tarshis M, Barile MF. *Mycoplasma fermentans* (Incognitus strain) cells are capable to fuse with T lymphocytes. *Clin Infect Dis* 1993; 17 (suppl 1): S305-308.
24. Giron JA, Lange M, Baseman JB. Adherence, fibronectin and induction of cytoskeleton reorganization in cultured human cells by *Mycoplasma penetrans*. *Infect Immun* 1996; 64: 197-208.
25. Brenner C, Neyrolles O, Blanchard A. *Mycoplasma* and HIV infection: from epidemiology to their interaction with immune cells. *Frontiers in Bioscience* 1996; 1: 42-54.
26. Hardy RD, Jafri HS, Olsen K, Wordemann M, Hatfield J, Rogers BB, Patel P, Duffy L, Cassell G, McCracken GH, Ramilo O. Elevated cytokine and chemokine levels and prolonged pulmonary airflow resistance in a murine *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia model: a microbiological, histological, immunologic, and respiratory plethysmographic profile. *Infect Immun* 2001; 69: 3869-3876.
27. Shimizu T, Kida Y, Kuwano K. A dipalmitoylated lipoprotein from *Mycoplasma pneumoniae* activates NF- κ B through TLR1, TLR2, and TLR6. *J Immunol* 2005; 175: 4641-4646.
28. Hickman-Davis JD, McNicholas-Bevensee C, Davis IC, He-Ping M, Davis GC, Bosworth CA, Matalon S. Reactive species mediate inhibition of alveolar type II sodium transport during mycoplasma infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 334-344.
29. Parker LC, White MKB, Dower SK, Sabroe I. The expression and roles of toll-like receptors in the biology of the human neutrophils. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 886-892.
30. Cho HY, Jedlicka AE, Clarke R, Kleeberger SR. Role of toll-like receptor-4 in genetic susceptibility to lung injury induced by residual oil fly ash. *Physiol Genomics* 2005; 22: 108-117.
31. Fabisiak JP, Gao F, Thomson RG, Strieter RM, Watkins SC, Dauber JH. *Mycoplasma fermentans* and TNF- α interact to amplify immune-modulating cytokines in human lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 291: L781-L793.
32. 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. *Tox Sci* 2004; 81: 467-479.