



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

“DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA MICOPLASMAS EN
PACIENTES CON ENFERMEDADES REUMÁTICAS”

Tesis para obtener el grado de:
LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:
MARIANA CRISTINA LEAL ALCÁZAR

Director de Tesis:
D.C. MARÍA LILIA CEDILLO RAMÍREZ

AGOSTO 2020



INDICE

- RESUMEN
- 1. INTRODUCCIÓN
- 2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO
 - 2.1 ARTRITIS REUMATOIDE
 - 2.2 RESPUESTA INNATA Y ADAPTATIVA EN LA ARTRITIS REUMATOIDE
 - 2.3 MICOPLASMAS
 - 2.4 PATOGENICIDAD DE LOS MICOPLASMAS
 - 2.5 RESPUESTA INMUNOLÓGICA CONTRA MICOPLASMAS
 - 2.6 MICOPLASMAS Y ARTRITIS REUMATOIDE
 - 2.7 PRUEBAS DE DETECCIÓN DE ANTICUERPOS.
 - 2.7.1 AGLUTININAS FRÍAS
 - 2.7.2 PROTEÍNA C REACTIVA
 - 2.7.3 FACTOR REUMATOIDE
- JUSTIFICACIÓN
- HIPÓTESIS
- OBJETIVO GENERAL
- OBJETIVOS PARTICULARES

- 3. MATERIAL Y MÉTODOS
 - 3.1 DIAGRAMA DE TRABAJO
 - 3.2 CULTIVO DE MICOPLASMAS
 - 3.3 EXTRACCIÓN DE LIPOPROTEÍNAS (LAMPs)
 - 3.4 PRUEBA DE AGLUTININAS FRÍAS
 - 3.5 PRUEBA DE PROTEÍNA C REACTIVA
 - 3.6 PRUEBA FACTOR REUMATOIDE
- RESULTADOS
- DISCUSIÓN
- CONCLUSIONES
- BIBLIOGRAFÍA

RESUMEN

La artritis reumatoide, así como otras enfermedades de índole reumática, representa uno de los padecimientos multifactoriales en la población actual más comunes, afectando la calidad de vida de pacientes que lo padecen. Se ha estudiado la posible relación de la presencia de la artritis reumatoide con la infección de microorganismos del género *Mycoplasma*, como un inductor o potenciador de la enfermedad. Una de las estrategias para estudiar esta relación ha sido la detección de anticuerpos presentes en el paciente con enfermedades reumáticas en contra de micoplasmas. En el presente estudio, se llevaron a cabo estudios inmunoserológicos en el líquido sinovial para la detección de anticuerpos IgM e IgG presentes, que, en conjunto con resultados de detección molecular (PCR), ayuda a establecer una relación entre la artritis reumatoide y la infección por micoplasmas.

SUMMARY

Rheumatoid arthritis, as well as other diseases of a rheumatic nature, represents one of the most common multifactor diseases in the current population, affecting the quality of life of patients suffering from it. The possible relationship of the presence of rheumatoid arthritis with the infection of microorganisms of the *Mycoplasma* gender, as an inducer or enhancer of the disease, has been studied. One of the strategies to study this relationship has been the detection of antibodies present in the patient with rheumatic diseases against mycoplasmas. In the present study, immunoserological studies were performed on synovial fluid for the detection of IgM and IgG antibodies, which, in conjunction with molecular detection (PCR) results, helps to establish a relationship between rheumatoid arthritis and mycoplasma infection.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades reumáticas constituyen uno de las principales y más antiguos grupos de padecimientos estudiados, siendo aproximadamente 200 padecimientos que tienen como afección principal al sistema conformado por músculo, articulación y esqueleto. Caracterizadas por presentar como síntoma general el dolor, rigidez y dificultad en la movilidad de las articulaciones, las más frecuentes son la artritis reumatoide, la espondilitis anquilosante y la gota. Son conocidas como del tejido conectivo, ya que afectan la estructura que soporta el cuerpo y en el caso de las más conocidas, la artritis reumatoide, es de carácter autoinmune (1)

El impacto que han tenido en el individuo que la padece, ha representado importancia en diferentes países, desde la calidad hasta costos económicos. Esto le ha brindado distintos aspectos para su estudio, buscando el proceso, así como los factores de riesgo que conllevan a padecer la enfermedad, desde edad hasta ambiente en donde se desarrolla una población; con un énfasis especial en enfermedades catalogadas como reumáticas, tales como la Osteoartritis, Artritis reumatoide y espondilitis anquilosante. (2)

El padecimiento más común, es el de artritis reumatoide (RA), un padecimiento autoinmune que se ha asociado con diferentes síntomas que pueden ir desde una complicación progresiva sistémica hasta una degeneración que puede llevar hasta destinos como muerte temprana. Está caracterizada por inflamación sinovial, producción de autoanticuerpos, destrucción del cartílago y hueso y desórdenes que van desde nivel cardiovascular, pulmonar y esquelético. Es de carácter sistémico y de naturaleza multifactorial, con porcentajes considerables de prevalencia, además de tener un alto nivel de impacto en la calidad de vida de personas usualmente ubicadas entre los 40 a 60 años. A pesar de contar con factores múltiples, una de las causas más conocidas radica en la predisposición genética unida a la exposición a ciertos factores ambientales, procesos autoinmunes e infecciosos (3).

La enfermedad está principalmente relacionada con la inflamación de la membrana sinovial, que sigue con la destrucción progresiva del cartílago y la erosión de los

huesos adyacentes, limitando la función de estos, acompañándose de degeneración sistémica general. Se destaca la presencia de fibroblastos y macrófagos, encargados de la liberación de mediadores inflamatorios, en su mayoría citocinas, responsables de la iniciación del proceso inflamatorio, principalmente IL-17, que puede iniciar la inflamación local y la erosión ósea. La participación de distintas células inmunológicas en este proceso puede llevar a diferentes procesos de daño al cartílago, hueso y articulación, en su mayoría debido a una desregulación en la activación de la respuesta inflamatoria. (3)

Las causas de este padecimiento aún no se encuentran claras, ya que están involucrados varios complejos, por lo que se ha detectado como una enfermedad multifactorial, mediada por diversos factores genéticos y del medio ambiente. A pesar de que las causas puntuales de la enfermedad permanecen desconocidas, se ha demostrado en diversos estudios los riesgos a nivel genético de padecer artritis reumatoide, como lo son los antígenos de histocompatibilidad y factores de regulación inmunológica. Uno de los factores más importantes es aquel relacionado al Complejo mayor de histocompatibilidad, específicamente el Antígeno Leucocitario Humano (HLA) donde se ha hecho la hipótesis de la producción de alteraciones post traduccionales, dando lugar a proteínas citrulinadas, que desencadenan la producción de anticuerpos contra proteínas propias modificadas, generando una respuesta autoinmune (4)

Algunos autores han relacionado la enfermedad con la presencia de una infección por microorganismos diversos, con *Mycoplasma* como un factor inflamatorio inductor en las articulaciones en enfermedades reumáticas, especialmente en artritis reumatoide. Los micoplasmas han tenido un posible papel en la presencia de artritis en otras especies animales, encontrándose una amplia gama de referencias sobre su capacidad de causar o potenciar la presencia de artritis en humanos. El aislamiento de estos microorganismos del fluido sinovial en altas proporciones ha brindado bases para evaluar la posible relación de los micoplasmas con el desarrollo de la artritis reumatoide, principalmente con *M. fermentans* (3).

ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

2.1 Artritis reumatoide

La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune de naturaleza multifactorial, caracterizada principalmente por las complicaciones sistémicas y de daño progresivo que causa principalmente en el tejido conectivo, específicamente, en la membrana sinovial. Una de las afecciones más conocidas es la inflamación que se genera como respuesta a una cascada de señalización en respuesta a la producción de autoanticuerpos, conocidos como factor reumatoide, que lleva a una destrucción del cartílago y hueso.

Las causas de este padecimiento han tenido un amplio espectro, con distintas maneras de abordar la predisposición, presentando factores ambientales, genéticos, nutricionales, infecciosos y en algunas ocasiones étnicos, mismos que llevan al padecimiento autoinmune. A lo largo de los estudios alrededor, se ha sugerido que este proceso se puede explicar como un complejo de reacciones multifactoriales, destacando algunos como el locus HLA-DRB1 (región del complejo mayor de histocompatibilidad del genoma humano, alelo que contiene un grupo aminoacídico, el cual presenta una alteración en la afinidad, que sería la responsable de la generación de respuestas autoinmunes contra el organismo, debido a la generación de proteínas citrulinadas (CCP) generando inflamación y respuesta adaptativa, fenómeno al que se le ha conocido como “epítopo compartido” (4)

Existen diversos factores ambientales que pueden representar un riesgo potencial de sufrir el padecimiento, de los cuales se han identificado, el hábito de fumar, la presencia de otras enfermedades como la diabetes mellitus, esclerosis múltiple, y algunas exposiciones a minerales, así como la alimentación y la edad. Más recientemente, se ha sugerido como factor de riesgo algunas infecciones virales y bacterianas, tales como Micobacterias, Micoplasmas, Virus de Epstein-Barr, de rubéola, etc. (4)

La enfermedad es conocida por su característica inflamación de la membrana sinovial, formando un tejido conocido como “pannus”, masa de tejido creciente que invade al cartílago y hueso que tiene como fin una reacción descontrolada en cadena que termina en la destrucción del cartílago, erosión de huesos e inflamación crónica, incluso comportándose como un tumor local con respuesta inmune. La membrana sinovial de esta manera se ve afectada por todos estos cambios en las propias células residentes. Este proceso de inflamación crónico continuamente tiene respuesta autoinmune con la participación de macrófagos, osteoclastos, fibroblastos y linfocitos (5).

La membrana sinovial es una estructura que cubre la cavidad sinovial (cartílago) que sirve como lubricante y protector de este, se encuentra compuesta por diversas células del sistema inmune divididas en dos capas, la fase superficial (lining) y la fase profunda (sublining), como son fibroblastos y macrófagos. Su inflamación se ve potenciada por la activación de linfocitos T, que a su vez secretarán citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y que también activarán linfocitos B y posteriormente producción de autoanticuerpos. (4, 5).

La artritis reumatoide es el resultado de interacciones de las células sinoviales similares a fibroblastos (fibroblast-like synoviocytes) con células del sistema inmune innato (células dendríticas, NK, neutrófilos, macrófagos) y del sistema adaptativo (linfocitos B y T) potenciadas por un proceso autoinmune. Al inicio de este proceso (sinoviosis) los leucocitos entran a la membrana sinovial, lo que resulta en el reclutamiento de moléculas de adhesión y quimiocinas. De este modo, se comienza por la inflamación de la membrana sinovial, respuesta de una cascada de señalización donde células de la respuesta inmune (T y B), además de macrófagos, se trasladan para la producción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y señalizadores de respuesta inmune. Este proceso mantiene la inflamación crónica, así como la producción de autoanticuerpos. (6).

2.2 Respuesta innata y adaptativa en la artritis reumatoide

La fase inicial de la AR se dedica a la producción de citocinas proinflamatorias no específicas, además de la introducción de células activadas para la reacción inmune después de la migración de leucocitos en la membrana sinovial (sinoviosis). Posteriormente, se lleva a cabo la presentación de auto antígenos y señales de estimulación (por HLA clase II) que lleva a cabo la activación de Linfocitos T. La activación de estos genera dos respuestas, la Th1 y la Th2. Si bien la respuesta Th1 lleva a la secreción de interferón gamma e interleucina 2 y los Th2 comienzan a liberar citocinas como IL-4, IL-10 e IL-13, existe una tercera línea, los Th17, los cuales secretan IL-17, asociadas fuertemente a procesos inflamatorios, crónicos y autoinmunes. (3)

El papel de IL-17 en la artritis va desde la estimulación de linfocitos B para la producción de autoanticuerpos, potenciar a IL-1 y factor de necrosis tumoral, es la encargada de estimular la diferenciación de osteoclastos (destrucción del cartílago y hueso por la diferenciación de fibroblastos sinoviales, que diferenciará por su parte a los osteoclastos, iniciando la erosión ósea), degradación de proteínas de cartílagos e inflamación local con ayuda de IL-1 e IL-6. La IL-17 se ha considerado como la responsable de iniciar el proceso inflamatorio siendo aquella que interacciona con células dendríticas, macrófagos y linfocitos B (3, 4)

A pesar de que IL-17 es la principal en el proceso inflamatorio, otras moléculas como TNF- α e IL-6 son citocinas que actúan como efectoras de la inflamación. El TNF – α tiene un papel importante en la producción de otras citocinas, metaloproteinasas, entre otras, mientras que la IL-6 ayudará a la inducción de anticuerpos por linfocitos B, proliferar más linfocitos T, síntesis de proteínas de fase aguda y diferenciación de células T citotóxicas. Adicional a estas, la presencia de IL-1 β (secreción de metaloproteinasas), IL- 23 (expansión de Th17), IL-18 (activación de T citotóxicos), IL-32 (linfocitos T, células NK), factor estimulador de linfocito B (BLys) y ligando inductor de la proliferación del linfocito B (APRIL). (4)

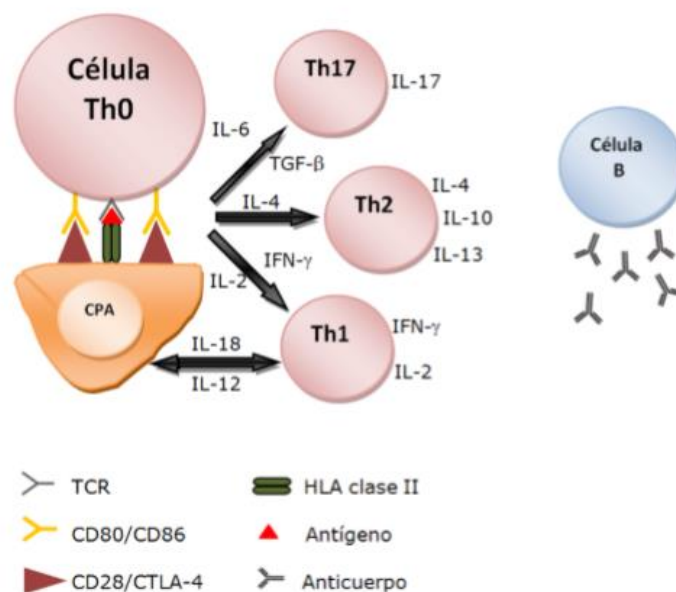


Figura 1. Activación de linfocitos T, con la posterior producción de Th17, Th2, Th1 durante el proceso de inflamación temprana y respuesta autoinmune contra el organismo.

Los fibroblastos sinoviales representan uno de los componentes más importantes de la membrana sinovial, viéndose aumentados de manera alterada, asociados a las vías de señalización intracelular desregulada (respuesta a las citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento), proceso que se ha relacionado con la retención inflamatoria, la angiogénesis y la destrucción de hueso y cartílago. (5)

Una vez que los fibroblastos son activados, se da lugar a secreción de quimiocinas además de la participación posterior de linfocitos B, encargados principalmente de producir auto anticuerpos, así como la activación de linfocitos T y de neutrófilos, que sintetizan moléculas proinflamatorias como las prostaglandinas y especies reactivas de oxígeno. La participación de los mastocitos representa un papel clave al expresar receptores IL-17, siendo la principal citocina en el proceso desarrollo de AR. (3)

La acción de los neutrófilos tiene un fuerte papel en la artritis, ya que llevan a cabo la retención en una “red” de patógenos para su posterior degradación por moléculas antimicrobianas. Durante una reacción autoinmune, la acción de los neutrófilos se ve elevada, asociándose con la presencia de altas cantidades de especies reactivas

de oxígeno, así como de la citrulinación de la histona H3. Además, los neutrófilos producen hiperplasia y activación de mastocitos. Los mastocitos funcionarán como receptores para IL-17 para mantener la inflamación y respuesta crónica (5, 6). Existen otras células inmunes participes de este proceso, como los macrófagos; estos, al igual que otros, tienen una secreción de mediadores inflamatorios (TNF, IL-1) que mantienen la inflamación crónica. (4).

Es resultado de interacciones entre las células dendríticas, linfocitos T y B (en los nodos linfáticos) el generar la respuesta inmune contra proteínas propias citrulinadas. Una vez que se encuentran en la membrana sinovial, se llevan a cabo procesos relacionados con células como los leucocitos, fibroblastos y osteoclastos, que generan ciertas moléculas de daño y desgaste, pasando de una inflamación local a generar daños a tejido y hueso. (6)

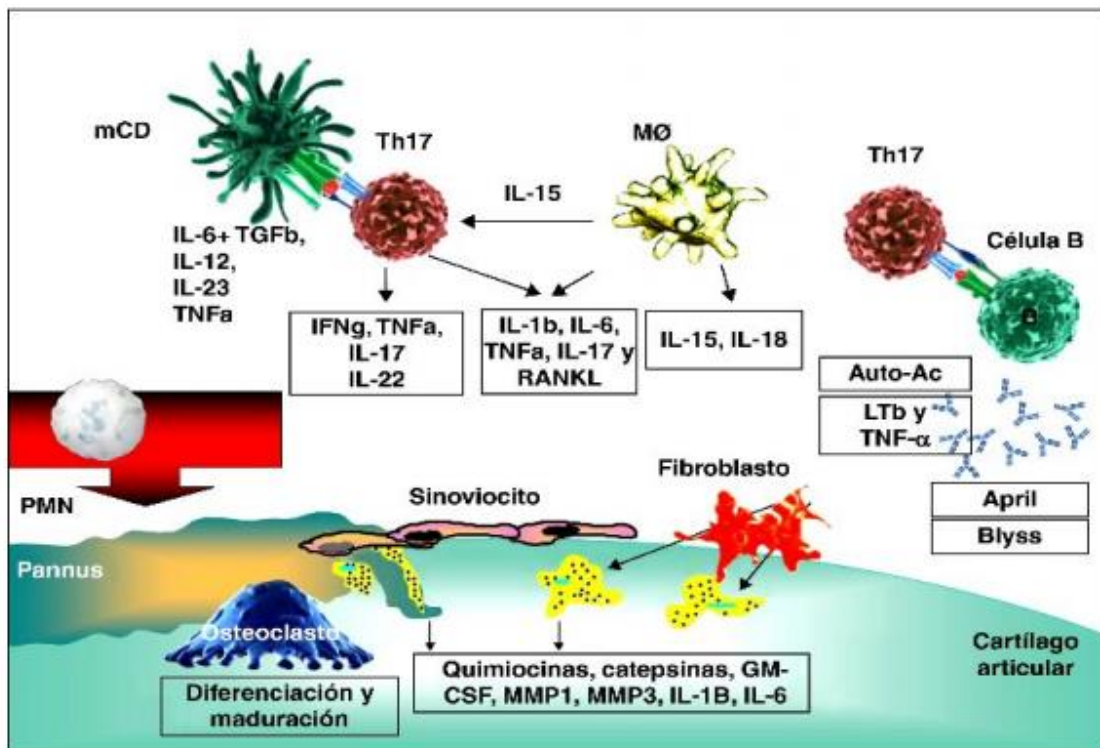


Fig. 2. Diferentes tipos celulares activados involucrados en el proceso de inflamación y daño óseo. (CD: células dendríticas, MØ: macrófagos, GM-CSF: factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos, MMP: metaloproteínasa, IL: interleucina, LTb: linfotixina beta, TGFβ: Transforming Growth Factor beta, April: ligando inductor de la proliferación del linfocito, Blyss: factor estimulador del linfocito B. (4)

2.3 Micoplasmas

Los micoplasmas son microorganismos procariontes, los más pequeños en tamaño, que se caracterizan principalmente por no contar con pared celular. Pertenecen a la clase *Mollicute*, la familia *Mycoplasmataceae* y género *Mycoplasma*. Son organismos rodeados por una membrana celular de tres capas que contiene esteroides adquiridos del medio donde se encuentren, en su membrana se presentan todos los determinantes antigénicos de naturaleza proteica y glucolípidicos. Debido al tamaño, también cuenta con un DNA de doble cadena pequeño. La mayoría de los micoplasmas son de naturaleza anaerobia facultativa, exceptuando a *M. pneumoniae*, que es aerobia, obteniendo energía de metabolismo de carbohidratos. La familia *Mycoplasmataceae* requiere de colesterol, otros utilizando urea, ácidos grasos o degradación de azúcares. Se han encontrado evidencias evolutivas sobre la descendencia de bacterias como *Clostridium innocum*, debido al pequeño tamaño del genoma y el bajo contenido del porcentaje de GC. (7,8)

La ausencia de la pared celular es precisamente la que les brinda el polimorfismo que da lugar a la multiresistencia a antibióticos beta lactámicos y la dificultad para su observación; sin embargo, también la de ser altamente sensible a compuestos como detergentes o variaciones en pH y temperatura; representando a un grupo de microorganismos con requerimientos exigentes para cultivo. (9)

Se conocen más de 150 especies de Mollicutes, de las cuales 92 especies son del género *Mycoplasma* en diversas especies animales. De las especies que se han aislado del humano, y que guardan importancia médica, se tienen a *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. hominis*, *M. penetrans* y *M. fermentans*. (8)

El cultivo de estos microorganismos en ambiente de laboratorio es altamente exigente, debido a la adaptación que han tenido a nutrientes específicos, ricos en colesterol, así como precursores de aminoácidos y nucleótidos. Son crecidos tanto en medios sólidos como líquidos, con la característica especial de que requieren esteroides, vitamina E y los precursores necesarios. Son altamente conocidos por formar una estructura en forma de “huevo frito” debido a que las bacterias viables crecen al centro de la colonia y en la periferia se encuentran las bacterias no viables,

las colonias solo se observan con un microscopio, ya que su observación en medio líquido no puede llevarse a cabo a simple vista. (8)

Su medio de cultivo requiere enriquecimiento con peptona, extracto de levadura y suero, adicionado generalmente con glucosa además de añadir indicadores como el rojo de fenol para poder llevar a cabo la detección de su crecimiento por el cambio de pH en el medio; esto debido a que al crecer no se presenta la turbidez que caracteriza al resto de los microorganismos. Generalmente, se han desarrollado métodos para su crecimiento en medios como SP4 y PPLO (pleuroneumonia like organism) con extracto de levadura y suero de caballo. (7)

Pueden ser aislados de sangre, líquido sinovial, líquido amniótico, orina, aspirado bronquial, semen, exudados de cérvix y/o vaginal, del cual con medios de cultivo se lleva a cabo la aislación fácil de especies como *M. hominis* u *Ureaplasma*. En el caso de otras especies como *M. genitalium* o *M. pneumoniae*, el crecimiento es más lento. Debido a varias complicaciones que se pueden presentar al desarrollarse, una de las técnicas de detección ampliamente utilizadas es por medio de PCR en aquellas especies que no tienen un fácil crecimiento en medio (9).

2.4 Patogenicidad de los micoplasmas

Los micoplasmas son agentes patógenos para animales, plantas y el humano. En general han tenido un papel muy importante debido a su participación como agente infeccioso en enfermedades en el humano, como *M. pneumoniae* junto con otros como *M. genitalium*, *M. penetrans*, *M. hominis* y *M. fermentans*. Principalmente, *Mycoplasma pneumoniae* es uno de los patógenos de mucosas, responsable de alrededor del 15 al 20% de las neumonías alrededor del mundo. Algunas otras especies como *M. fermentans* son patógenos oportunistas que se han relacionado a enfermedades como el VIH y la artritis reumatoide (8)

La mayoría de los micoplasmas pueden estar presentes como comensales en tractos respiratorios y genitales, sin embargo, un contacto más cercano en una situación oportunista puede provocar la fusión de membranas o el intercambio de componentes, generando intercambio de material genético y citoplasmático. Existen

varias especies de micoplasmas que de manera natural se pueden encontrar en la flora bacteriana del humano, pero también han sido identificadas como cofactores de VIH, aberraciones cromosomales, síndrome de fatiga crónica, enfermedad de Crohn y artritis reumatoide (8, 9)

M. pneumoniae es el patógeno causante de la neumonía, una infección del tracto respiratorio que puede persistir largos periodos antes de mostrar sintomatología y permanecer remanente posterior a ella, debido al poder de adherencia que presenta a través de las adhesinas de la membrana celular y que puede llevar a hospitalización del paciente. Es de naturaleza extracelular por lo que excreta adhesina para colonizar las células del epitelio (mucosas), principalmente, la proteína P1, adhesina que se encarga de establecer las interacciones para la unión del microorganismo, siguiendo con la producción de hidróxido de nitrógeno. Una persistencia de esta actúa con moléculas endógenas que llevan a la destrucción de la capa epitelial. (8)

M. genitalium y *M. hominis* son dos de los patógenos causantes de infecciones del tracto genitourinario, generando padecimientos como vaginitis bacteriana, y algunas infecciones en pacientes inmunocomprometidos, así como causante coestimulador de la uretritis en hombres. (9)

Las especies de *M. fermentans* y *M. penetrans* están asociadas a la presencia de coinfecciones en pacientes inmunocomprometidos, involucrando una activación inmune celular de manera exacerbada, la producción de super antígenos que provocan la liberación de moléculas proinflamatorias (Enfermedades inflamatorias crónicas). Estas especies igualmente pueden estar presentes en tracto urogenital y respiratorio de manera comensal, sin embargo, la asociación con pacientes con virus VIH ha ido cobrando importancia desde los años 1980s, con el descubrimiento del padecimiento del SIDA. (8).

A pesar de encontrarse de manera natural, su patogenicidad se puede potenciar cuando existe la fusión entre dos membranas, o el intercambio de la membrana con un componente celular del hospedero (9).

2.5 Respuesta inmunológica contra micoplasmas

De manera natural, los micoplasmas se pueden encontrar en el tracto gastrointestinal, actuando como comensales. Sin embargo, con la capacidad que tienen de residir y de replicarse dentro de la célula en donde se encuentran, pueden llegar a fusionar su membrana e internalizarse, depositando su material genético en el citoplasma de huésped. Uno de sus mecanismos más importantes para el desarrollo es la presencia de adhesinas, proteínas que se encargan de fijarse a algunos receptores de membrana; además de la alta variación antigénica que presentan sus lipoproteínas asociadas a la membrana (LAMPs) (9).

De primera instancia, una vez adherida por medio de adhesinas y algunos glucolípidos sulfatados, causa un daño a la célula por medio de producción de peróxido de hidrógeno. Los micoplasmas han demostrado ser capaces de residir y replicar de manera intracelular en células humanas y existen pruebas sobre su capacidad de activación de células natural killer (NK), macrófagos, activación del complemento y la proliferación de células T y B; así como la inducción de la acción de MHC clase I y II; además de la presencia de algunas lipoproteínas membranales que poseen propiedades proinflamatorias. (10)

MALP-2, M161Ag y P48 de *M. fermentans* son lipoproteínas identificadas por su capacidad de modulación de respuesta inmune del hospedero a través del receptor Toll TLR2 y TLR6. En específico, MALP-2 es un lipopéptido ubicado en la membrana que puede inducir citocinas y quimiocinas (IL-8, TNF- α , IL-6) que actúan como mediadores inflamatorios en monocitos (macrófagos, neutrófilos y linfocitos) de células humanas hospederas, por medio de la interacción con residuos aminoacídicos específicos, aumentando su cantidad en células afectadas. Estas proteínas son abundantes en la membrana y muestran una fuerte antigenicidad e inmunogenicidad. La presencia de MALP-2 además demostró tener una influencia en el incremento de células T (CD4⁺, CD8⁺, CD4 de memoria) además de células NK y células dendríticas. (10)

Otras lipoproteínas son P48, la cual se ha demostrado, promueve la inducción de diversas citocinas como IL-6, TNF- α , IL-1 β participantes en la activación de

monocitos. Mientras, M161Ag, cuenta con la activación del complemento, así como la producción y reclutamiento de diversas citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-12, IL-6, IL-10. (10)

La participación de ambas respuestas, Th1 y Th2, se cree actúan de manera simultánea, aunque las investigaciones se han basado en el estudio de la inmunidad innata con la adaptativa de manera aislada y no como un mecanismo total (10).

2.6 Micoplasmas y artritis reumatoide

La asociación entre la relación oportunista entre micoplasma y la inmunodeficiencia ha sido reportada principalmente en afecciones de tejido conectivo desde 1970, principalmente de artritis reumatoide. La presencia de estos microorganismos en muestras de pacientes con enfermedades reumáticas ha generado un amplio espectro acerca del papel que tiene dentro de la enfermedad inflamatoria (13)

Algunos autores han abordado la relación como un cofactor de la inflamación articular, debido a que los micoplasmas afectan el crecimiento celular, la morfología, alteración metabólica, inmunológica y bioquímica, guardando similitudes con las características que se presentan en la artritis reumatoide, basándose en estudios en distintas especies animales (14)

Se ha observado en modelos animales, que una de las causas de la presencia de artritis crónica tiene que ver con la infección de *Mycoplasma*, debido a los aislamientos de *M. fermentans* en líquido sinovial. La detección de amplificación de segmentos de 16s RNA perteneciente a este género en pacientes con artritis reumatoide ha sido detectada con anterioridad. Se cree que la respuesta inflamatoria e inmune puede encontrarse potenciada por agentes infecciosos como bacterias y virus. El género *Mycoplasma*, ha sido observado con la capacidad de inducir respuestas inflamatorias, por medio de la activación de producción de citocinas, de macrófagos y linfocitos T y B. La detección de anticuerpos en sangre de pacientes con artritis reumatoide ha señalado resultados favorables en un 50% de los estudios acerca de la presencia de esta bacteria (11).

Se han manejado diversas hipótesis acerca de cómo puede afectar la infección de *Mycoplasma*, considerando que se potencie a la enfermedad por la infección crónica de niveles bajos de bacteria; o, por otro lado, el fenómeno “*hit and run*” en el cual la bacteria infecta por un periodo corto de tiempo, para luego salir del sistema, pero desencadenando un conjunto de reacciones inflamatorias que llevan a la artritis como consecuencia. (11)

Otra relación que se ha sugerido de los micoplasmas y la artritis reumatoide, es la posible generación de anticuerpos propios, por el mimetismo molecular de estos, que genera estos anticuerpos auto reactivos, que además impulsarán la respuesta inmune del organismo, exacerbando la cadena de señalización. Se ha encontrado que las adhesinas encontradas en la membrana de estos microorganismos cuentan con una alta similitud con bacterias de mamíferos, por lo que se cree que estas adhesinas tienen homologías con proteínas pertenecientes al complejo CD4, así como con otras moléculas del MHC clase I, lo que puede tener un papel para generar anticuerpos auto reactivos; además de poder inducir respuesta autoinmune debido a la activación de células T y B antiorganismo. (12, 14)

2.7 Pruebas de detección de anticuerpos (anti-micoplasma)

2.7.1 Aglutininas frías

Las aglutininas frías son inmunoglobulinas, anticuerpos oligoclonales del tipo IgM, que se dirigen al antígeno I del glóbulo rojo (eritrocito), que producen aglutinación a temperaturas bajas, entre 0 a 4°C, que ha sido utilizado para detección de algunas enfermedades infecciosas autoinmunes en el organismo. Cuando se tiene una aglutinación mayor de 1:16 se considera un factor de diagnóstico en enfermedades como mononucleosis, artritis reumatoide, neumonía anormal y algunos linfomas. Las aglutininas frías se presentan en la primera semana de las enfermedades, sin embargo, pueden llegar a persistir por 2 a 3 meses. Títulos de al menos 1:128 apoyan un diagnóstico de enfermedad en la primera semana, prevaleciendo durante meses, a pesar de no ser exclusivas, cuando llegan a aparecer con otras enfermedades de índole infecciosa, suelen tener títulos inferiores (16, 17).

La detección de este proceso es llevado a cabo por la observación de hemólisis, formación de conglomerados bajo las temperaturas adecuadas, esto debido a la activación del complemento por las Aglutininas Frías presentes, en un proceso donde se encuentre la infección, el antígeno I del eritrocito se vuelve autoinmunogénico debido a la adhesión con el micoplasma. A estas bajas temperaturas, el IgM anti-I se une al antígeno (micoplasma), activando el complemento por vía clásica, para posteriormente desaparecer con el aumento de la temperatura. (16, 18)

Las aglutininas frías aglutinan a los glóbulos rojos a temperaturas muy bajas, perdiendo el efecto una vez que son expuestas a una temperatura diferente (37°C). Esta prueba ha sido ampliamente usada para detección de anticuerpos IgM anti-micoplasma en infecciones por esta bacteria, representando sus títulos una correlación con el nivel de infección. Se ha considerado que entre más alto se tiene el título (cerca de 1:128) la especificidad es más fuerte (17).

2.7.2 Proteína C reactiva

La proteína C reactiva es una proteína plasmática de fase aguda que se une a la pared del microorganismo por medio de uniones proteicas, a la fosfocolina o directamente a la bacteria para la activación del complemento (proceso de fagocitosis por macrófagos). Su presencia es característica en el caso de un proceso inflamatorio de cualquier tipo, por lo que se ha utilizado como una correlación para el diagnóstico de distintos padecimientos, como la apendicitis principalmente (de manera no específica). Es sintetizada en el hígado y se va elevando, dependiendo del estado de inflamación, activada por la secreción de IL-6. En suero de pacientes con proceso agudo, se pueden encontrar niveles de 20 hasta 500 mg/L. Específicamente, se presentan elevaciones moderadas (10-100 mg/L) cuando se trata de la mayoría de las enfermedades reumáticas. (19, 21)

La proteína es sintetizada bajo estímulos generados por la liberación de citocinas inflamatorias (IL-6) que tiene un alza en su tasa normal, presentándose como un marcador en la fase aguda. Ha sido ampliamente utilizada para estudiar el nivel de

la enfermedad, incluso, como un biomarcador para el daño óseo en diferentes etapas de la artritis reumatoide. Se utiliza para la detección conjunta de IgM e IgG. (20) Debido a los procesos inflamatorios que se llevan a cabo durante la artritis reumatoide, la producción de citocinas se ve aumentada y con esto, la producción hepática de proteína C reactiva. El uso de esta proteína ha servido para predecir la manera en que se comporta el organismo durante la enfermedad (16, 20)

La proteína fue la primera de fase aguda en ser utilizada, siendo capaz de precipitar polisacáridos de microorganismos. Se cree que es parte de la respuesta innata primaria que se monta contra una infección y es principalmente generada por inflamación o daño tisular. Esta funciona en una forma pentamérica de 23 kDa asociadas no covalentemente en forma cíclica. Al unirse a su ligando, es reconocida y activa la vía del complemento, amplificando también la vía alterna, además de limitar la lisis celular. (20)

El principio de la aglutinación utilizado se lleva a cabo en látex en placa, donde una reacción inmunológica se lleva a cabo entre la Proteína C reactiva (como antígeno) y el anti PCR IgG pegado a las partículas de látex. De esta manera, es posible observar una aglutinación si se tiene más de 6 mg/L de Proteína C reactiva. (22)

2.7.3 Factor reumatoide

Una de las características más utilizadas para el diagnóstico es la detección de autoanticuerpos en el líquido sinovial y el suero. La prueba por excelencia para el diagnóstico de la artritis reumatoide es la detección del factor reumatoide en suero de pacientes, siendo el autoanticuerpo mayormente asociado. En base a diferentes estudios a lo largo de 60 años, se encuentran evidencias acerca de cómo el factor reumatoide, IgM, refleja aquellos procesos de la enfermedad vitales para comenzar el tratamiento. (23, 24)

La prueba de factor reumatoide se basa en inmunoglobulinas de carácter autoanticuerpo, que se dirigen contra antígenos que se encuentran en el fragmento Fc de las IgG 2 y 3, específicamente en la estructura terciaria modificada. Se detecta

entonces a IgM reumatoide, principalmente, pero también se ha llevado a cabo la detección de IgG, IgA e IgE. Un título elevado de alguno de estos factores, en el 75% de los casos ayuda a asociarse con etapas avanzadas de la enfermedad, sobre todo, con el daño óseo. La presencia de FR da lugar a la formación de inmunocomplejos que activan la fijación del complemento, además de comenzar a atacar las membranas, llevando como finalidad la destrucción de membrana sinovial, cartílago y hueso (23).

La presencia de este autoanticuerpo IgM es el resultado del reconocimiento de IgG propios, generados como respuesta a una infección en el organismo de diverso índole, que va a ser atacado como si de un extraño se tratara, generando la respuesta autoinmune de todas las células relacionadas con este padecimiento (24)

La prueba de aglutinación con partículas de látex de poliestireno recubiertas con gamma globulina (IgG) ha sido ampliamente utilizada, presentando la reacción entre el factor reumatoide presente en la muestra y el material recubierto (gamma globulina humana) generando la aglutinación en las partículas de látex. Cuando una muestra presenta aglutinación, se determina que existe una concentración de factor reumatoide mayor a 20 IU/ml. De acuerdo con el 80% de los casos, se ha observado la presencia de FR en la artritis reumatoide, mientras ha sido encontrado en algunas ocasiones en el suero de pacientes con poli arteritis nodosa, lupus eritematoso sistémico, así como otras enfermedades inflamatorias crónicas como sífilis o tuberculosis, en menor cantidad. (25)

JUSTIFICACIÓN

La prevalencia de las enfermedades reumáticas en la población ha estado en aumento conforme el paso del tiempo, afectando a nivel tejido-órgano del paciente, afectando su calidad de vida en el proceso; además del impacto económico. Se ha reportado una prevalencia del 1% en la población general, presentándose en mayor cantidad en mujeres que en hombres, entre los 40 a 60 años, teniendo distintas causas diversas entre las que se encuentran la predisposición genética, medio ambiente e infecciones crónicas (3)

Por lo tanto, es importante desarrollar investigación relacionada con el papel que tienen los micoplasmas como patógenos oportunistas cuando una enfermedad reumática se encuentra presente, la inducción de ella y las posibles implicaciones que tiene en la respuesta inmune del hospedero. El papel de las enfermedades reumáticas en la actualidad radica tanto en la prevalencia de la población, las posibles afecciones y consecuencias, así como de la discapacidad a la que pueden desencadenar de manera permanente (3)

La identificación de anticuerpos contra micoplasmas en el líquido sinovial por medio de estudios inmunoserológicos es una herramienta clave para la posible relación de la artritis reumatoide y la patogénesis de estos microorganismos, que ayuda a dar más evidencia de la relación entre la presencia de *M. fermentans* y el desarrollo de este padecimiento; además de futuras investigaciones para el tratamiento y mejor calidad en el diagnóstico. (8, 11).

HIPÓTESIS

El líquido sinovial de los pacientes con una enfermedad reumática contiene anticuerpos detectables en contra de algunas especies de *Mycoplasma*, principalmente de *M. fermentans* y *M. pneumoniae* ya que estos microorganismos tienen un papel en la inducción, potenciación o la cooperación con otros factores genéticos y ambientales que dirigen al padecimiento de artritis reumatoide u otras enfermedades reumáticas.

OBJETIVOS

GENERAL

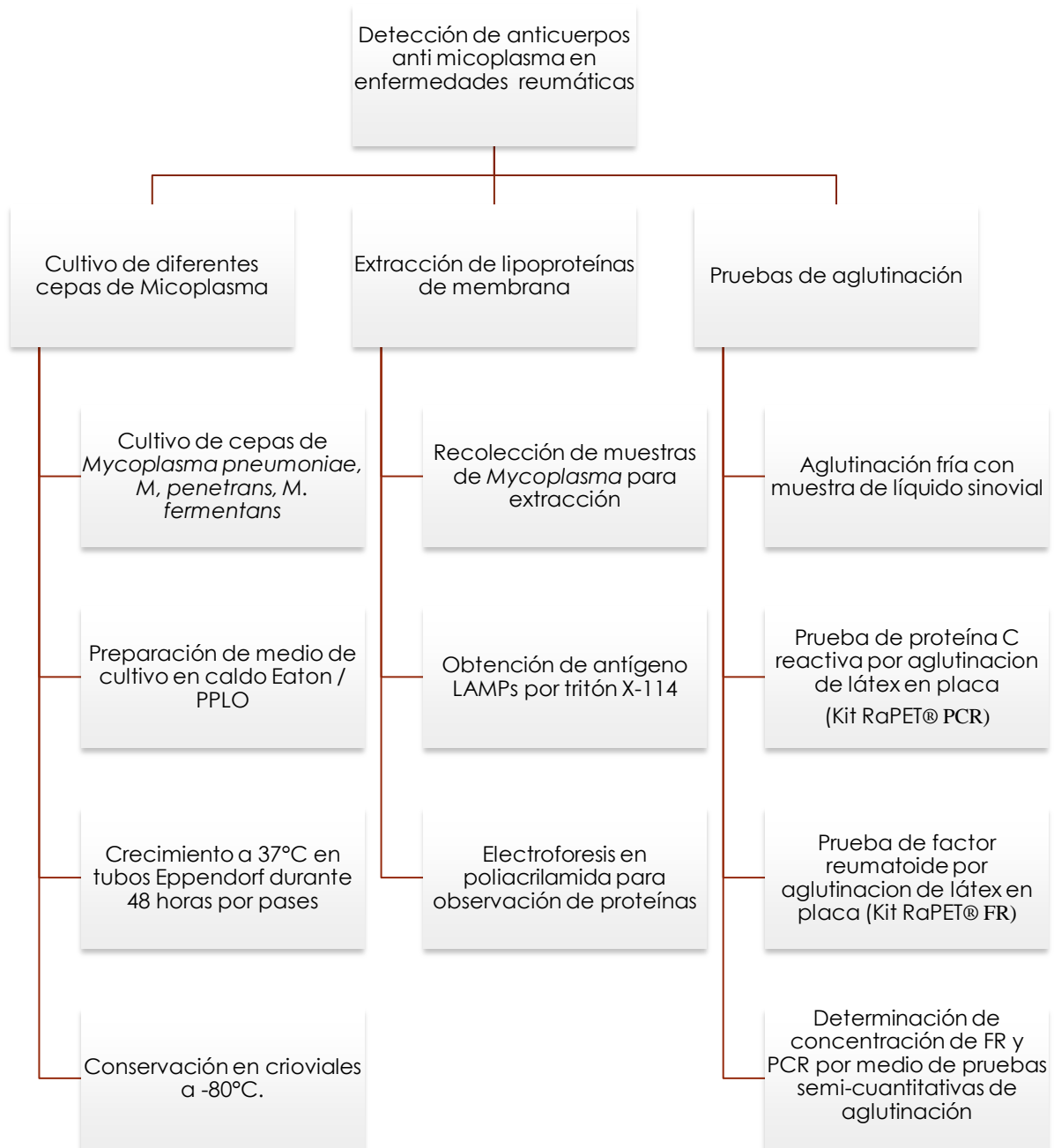
Demostrar la presencia de anticuerpos anti-micoplasma en el líquido sinovial de pacientes con enfermedades reumáticas como una relación indirecta de la artritis reumatoide y la reactividad hacia este microorganismo.

ESPECIFICOS

- Detectar las aglutininas frías en líquido sinovial de pacientes
- Identificar la presencia de proteína C reactiva con pruebas de aglutinación en el líquido sinovial de pacientes con enfermedades reumáticas
- Encontrar el factor reumatoide en el líquido sinovial de pacientes con enfermedades reumáticas por medio de pruebas de aglutinación.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Diagrama de Trabajo



3.2 Cultivo de micoplasmas

- Medio de cultivo

Se preparó medio PPLO/ Eaton para crecimiento de micoplasmas de acuerdo con la siguiente formulación (caldo y agar) agregando 65 ml de caldo base PPLO (2.25 g de caldo base en 65 ml de agua destilada) con 1 ml de rojo de fenol (indicador), mismo que se esterilizó a 15 lb/15 min. Posteriormente, se le añadieron 10 ml de dializado de levadura y 25 ml de suero de caballo estéril y dextrosa al 1% (1 g). Se le añadió 1 mg de penicilina (1500 UI) para evitar contaminaciones. En el caso del agar, se le añadieron 1.5 de agar posterior a la esterilización. Todos los medios fueron sometidos a pruebas de esterilidad durante 24 horas a 37°C.

- Cepas utilizadas

Las cepas que se utilizaron fueron obtenidas del laboratorio de micoplasmas del Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas del ICUAP – BUAP. Se crecieron diferentes cepas de micoplasmas, pertenecientes a *M. pneumoniae*, *M. penetrans*, *M. fermentans*.

- Crecimiento bacteriano

Las diferentes cepas fueron crecidas en crioviales, con 700 µl de precultivo con 200 µl de medio PPLO adicionado con dextrosa para tener una incubación posterior a 37°C, una vez que la coloración de medio rojo intenso viró a amarillo translúcido debido al crecimiento del microorganismo, se tomaron 350 µl del cultivo para su resiembra en nuevos tubos, mientras que los previos se preservaron en crioviales a -80°C.

Se realizó el crecimiento de varias cepas de micoplasmas en crioviales, evitando la posible contaminación. Anexo al crecimiento en caldo PPLO se realizaron crecimientos periódicos en agar PPLO para corroborar que no existiera la presencia de algún microorganismo contaminante.

Tabla 1. Cepas utilizadas para el crecimiento de microorganismos, pertenecientes a 3 cepas usualmente presentes en las muestras de suero de pacientes con enfermedades reumáticas.

Número	Cepa <i>Mycoplasma</i>	Abreviatura
1	<i>M. fermentans</i>	MF 2 ori
2	<i>M. pneumoniae</i>	MN Polt ori
3	<i>M. fermentans</i>	MF2 24717 -38
4	<i>M. penetrans</i>	M. penetrans
5	<i>M. fermentans</i>	MF2 04/01
6	<i>M. pneumoniae</i>	MN Polt MA
7	<i>M. pneumoniae</i>	MN Polt M
8	<i>M. pneumoniae</i>	MN Polt 8817
9	<i>M. pneumoniae</i>	P140 2.2 MA
10	<i>M. pneumoniae</i>	P140
11	<i>M. pneumoniae</i>	P140 30/04

Posteriormente, las cepas fueron almacenadas en el ultra congelador a -80°C para preservar su conservación y evitar la contaminación. Para comprobar que no existiera contaminación se crecieron en placas de agar Mueller – Hinton para descartar la presencia de otros microorganismos que pudieran crecer en el medio rico. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 72 horas para observar si existía crecimiento de colonias.

3.3 Extracción de lipoproteínas por Tritón X-114

El tritón X-114 es uno de los métodos más utilizados para la purificación o extracción de proteínas de carácter hidrofóbico. El proceso para la extracción se basa en la naturaleza de detergente no iónico (X114) el cual genera dos fases, la detergente y la acuosa cuando es incubada arriba de su punto de ebullición (22°C). Durante la incubación, los solutos de carácter hidrofóbico son secuestrados por el detergente, mientras que los hidrofílicos se quedan en la fase acuosa. Durante esta metodología, las proteínas hidrofóbicas son retenidas en la fase detergente con el tritón, de modo que pueden separarse del resto del material celular (15).

Las LAMPs de los micoplasmas han estado relacionadas a una relación con la presencia de enfermedades reumáticas, por lo que su carácter hidrofóbico las hace

viales a extracción con Tritón X-114. Para la realización de este procedimiento se utilizó la siguiente metodología.

1. Después de que se recopilaron las cepas de *Mycoplasma* crecidas en tubos de 50 ml, se centrifugaron a 12,000 rpm durante 20 minutos/4°C
2. El precipitado generado (proteínas) se re suspendió en 250 ml de PBS estéril y luego se centrifugó a 12,000 rpm durante 20 min/4°C, llevando a cabo este lavado tres veces.
3. El precipitado final se re suspendió en 10 ml de PBS y posteriormente se le agregó el detergente Tritón X-114 al 2%
4. Se mantuvo en incubación a 4°C durante 1 hora.
5. Se centrifugó la muestra a 4,000 rpm para posteriormente separar el precipitado de la fase acuosa. A esta fase se le añadieron 25 ml de sacarosa 0.6 y Tritón X-114 al 0.06%
6. Se realizó una segunda incubación a 37°C hasta ver la formación de las dos fases. Posterior a esto, se centrifugó a 8000 rpm/10 min y se separó la fase acuosa.
7. A la fase detergente se le agregaron 2.5 ml de metanol – cloroformo (4:1) para solubilizar el botón y precipitar a las LAMPs
8. Se centrifugó a 5000 rpm/ 5 min, posteriormente se decantó y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente durante 1 hora
9. Se re suspendió en 2 ml de PBS, almacenándose a -20°C

Las LAMPs obtenidas de la extracción fueron sometidas a corrimiento en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% con 25 µl de muestra con 16 µl de buffer de corrimiento y fueron corridas a 80V durante 4 horas, con un lapso de 30 minutos al inicio a 60V.

3.4 Prueba de Aglutininas Frías

El procedimiento que se utilizó para la realización de la detección de aglutininas frías fue el siguiente (por cada 8 muestras en una placa de 10 diluciones).

1. Se obtuvo sangre fresca del tipo O positivo (4 ml) con tubos Vacutainer y se dejó sedimentar durante 2 horas para que se llevara la separación de plasma con eritrocitos. Una vez separados, se descartó el plasma con ayuda de una micropipeta (en la parte superior del tubo), dejando los eritrocitos en el sedimento para el posterior uso.
2. Se preparó una suspensión de glóbulos del grupo O+ al 5% en suero fisiológico (NaCl 0.85%). En el caso de cada experimento, se prepararon 15 ml para hacer 10 diluciones, añadiendo 14.2 ml de solución fisiológica con 0.8 ml de glóbulos rojos en un tubo Falcon.
3. Se utilizaron placas de micro titulación para las pruebas, agregando a cada pozo 100 μ l de solución fisiológica para las 8 muestras (con excepción de la dilución 1:1), con 10 diluciones dobles por muestra (1:1 hasta 1:512)
4. Se prepararon diluciones dobles partiendo del líquido sinovial en cada pozo (1:1) tomando 200 μ l de la muestra del paciente, que se fue diluyendo (100 μ l) hasta que el volumen de todos los pozos fuera de 100 μ l.
5. Posteriormente, se añadieron 100 μ l de la solución de eritrocitos al 5% a cada pozo para observar la reacción de aglutinación, teniendo un volumen final de 200 μ l por cada pozo.
6. Se incubó la placa en refrigeración (4°C) durante 2 horas aproximadamente, para posteriormente leer el título de esta, en base a la formación de aglutinación alrededor o dentro del botón.
7. Se colocó la placa a 37°C durante 30 minutos y se observó que el efecto de aglutinación fría desapareciera, volviendo a su estado original.

3.5 Prueba de Proteína C reactiva

Se llevó a cabo un análisis cualitativo con las muestras de líquido sinovial de la siguiente manera

1. En la placa, se colocaron gotas de cada muestra de líquido además de controles positivos y negativos, cuidando que cada uno quedara en cada círculo marcado.
2. Posteriormente, se colocó una gota del reactivo de látex al lado de la muestra (previamente resuspendido). Luego de esto, se mezclaron ambas gotas con una pipeta desechable cubriendo toda la superficie disponible.
3. Se agitaron las placas durante 2 minutos de manera rotatoria de manera manual y suavemente.
4. Posterior a los 2 minutos, se observó la aglutinación generada en cada círculo. Los controles fueron utilizados para la comparación, aquellos que tuvieron una reacción positiva fueron identificados por la presencia de aglutinación blanca mientras que los negativos tuvieron una mezcla homogénea.

Posterior a la observación de resultados, se hizo la prueba de aglutinación de manera semi-cualitativa, en aquellas muestras que resultaron positivas en la aglutinación (de manera representativa) utilizando el diluyente glicina- salina (solución de glicina y cloruro de sodio, pH 8.2 +/- 0.1), llevando a cabo diluciones del 1:1 al 1:16 en tubos estériles. Una vez que estas diluciones se tuvieron, se probaron en la placa con el reactivo de látex de la misma manera que la prueba cualitativa.

En base a la dilución mayor observada, se determina una concentración en base a la siguiente tabla, de acuerdo con Stanbio Laboratory (22):

Dilución de aglutinación mayor	Concentración de PCR en mg/L
1:2	≥12
1:4	≥24
1:8	≥48
1:16	≥96

3.6 Prueba de Factor reumatoide

Se llevó a cabo una prueba por el método cualitativo de la siguiente manera:

1. Se tomó una gota (40 µl) de líquido sinovial de las muestras de pacientes, colocándola en cada una de las celdas de las placas; además de añadir una gota de control positivo y control negativo.
2. Se colocó una gota de reactivo de látex resuspendido previamente al lado de las gotas, para posteriormente mezclarlo con una pipeta desechable, cubriendo todo el espacio del círculo formado por las gotas.
3. Se agitó manualmente durante 2 minutos, de manera suave, de modo que el contenido de ambas gotas hiciera reacción.
4. Pasados los 2 minutos, se observó la presencia o ausencia de aglutinación, utilizando los controles para una comparación más adecuada para determinar el resultado.

Una vez que se observaron los resultados, se seleccionaron las muestras positivas en aglutinación (representativa) para realizar una prueba semi-cualitativa, en la cual se llevaron a cabo diluciones de 1:1 al 1:16, con el diluyente glicina-salina (solución de glicina y cloruro de sodio, pH 8.2 +/- 0.1). Las diluciones posteriormente se probaron en la placa con el reactivo de látex de la misma manera que la prueba cualitativa.

De acuerdo con el título mayor que tuvo presencia de aglutinación, se utilizó la siguiente ecuación para una estimación de la concentración de factor reumatoide presente en la muestra (25):

$$\frac{IU}{mL} \text{ de la muestra} = \frac{IU}{mL} \text{ control} \times \text{Título de la muestra}$$

En donde el IU/mL del control positivo es de 20 IU/mL de FR.

RESULTADOS

1. Crecimiento de micoplasmas

Se realizaron los pases a las diferentes cepas de micoplasmas, sin embargo, debido a problemas relacionados con la viabilidad de las cepas, muchas de ellas no fueron capaces de crecer sin ser contaminadas por otros microorganismos, o en todo caso, fueron incapaces de virar el medio. Se variaron algunas condiciones del medio, así como el uso de distintos antibióticos para evitar la contaminación, sin embargo, durante el crecimiento en agar PPLO se pudieron observar colonias de bacterias contaminantes.

Las cepas que, si fueron capaces de crecer o mantener un desarrollo estable, fueron conservadas en crioviales en el ultra congelador a -80°C, sin embargo, debido a fallas de este, las cepas estuvieron expuestas a cambios bruscos de temperatura que pudieron haber afectado su viabilidad. Se cultivaron nuevas en medio nuevo rico (Mueller-Hinton) para descartar su contaminación y su posterior uso.

2. Extracción de LAMPs

Se realizó la extracción con detergente Tritón X114, pero no se encontraron resultados significativos en el gel, esto debido al cambio de temperatura que sufrió durante la extracción, en el paso de la incubación a 4°C a la de 37°C. Estos cambios de temperatura se vieron reflejados en el corrimiento en el gel de poliacrilamida,

debido a que las proteínas hidrofóbicas se degradaron, por lo que no se pudieron visualizar en bandas.

3. Prueba de aglutininas frías

Se llevaron a cabo 69 pruebas de aglutininas en base a la cantidad de muestras de pacientes con diversas enfermedades reumáticas, leyendo los títulos de acuerdo con una reacción positiva de aglutinación con los eritrocitos utilizados (del tipo O+). Se detectó entonces la presencia de IgM en las muestras de líquido sinovial.

Las aglutininas frías pueden ser observadas cuando la placa se incubaba a 4°C, condiciones bajo las cuales se muestra la formación de reacciones de aglutinación, en las cuales los anticuerpos IgM anti – micoplasma que se encuentren en el líquido sinovial, reaccionen con los eritrocitos del tipo O+, lo que se observa en la pérdida de la integridad del botón, observándose los agregados alrededor del botón o incluso la presencia de un halo de color cremoso alrededor del botón (Fig. 3)

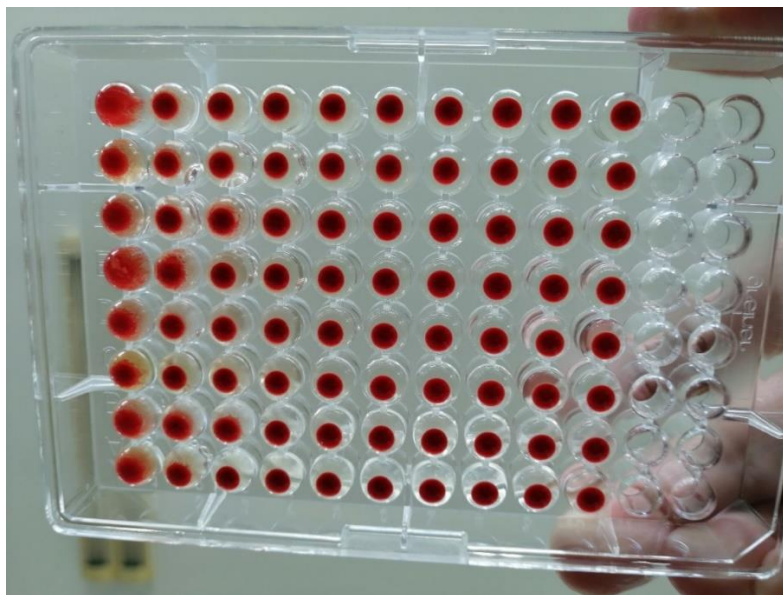


Fig. 3. Placa de micro titulación utilizada para prueba de aglutininas frías después de la incubación a 4°C. Se realizaron diluciones de 1:1 hasta 1:512 para la reacción inmunológica bajo condiciones frías de la muestra de líquido sinovial con los eritrocitos del tipo O. De abajo hacia arriba, se encuentran las muestras de la A la H, pertenecientes a muestras de líquido sinovial de pacientes con enfermedades reumáticas.

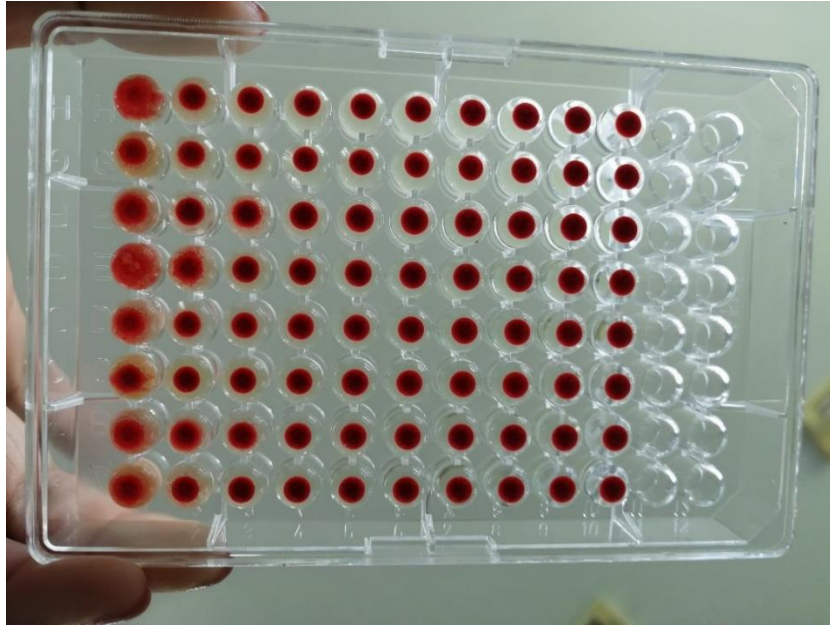


Figura 4. Placa después de la incubación a 37°C. Debido a que las aglutininas solamente actúan de manera febril, una vez que fueron incubadas a mayor temperatura, el botón vuelve a su integridad inicial, manera de comprobar que efectivamente hubo una interacción reversible entre el eritrocito y el micoplasma.

Posteriormente, se realizaron otras placas con las muestras de líquido sinovial utilizando el mismo procedimiento que en la previa, para la medición de los títulos obtenidos en base a la observación de la reacción. De las 69 muestras probadas, se obtuvieron 25 con presencia de *Mycoplasma* previamente detectada (PCR) que presentaron aglutinación desde 1:4 hasta 1:256. De estos resultados positivos, 18 pertenecientes a pacientes con artritis reumatoide, 3 de naturaleza desconocida, 1 de espondilitis anquilosante y 2 de osteoartritis (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados de las aglutinaciones frías de las muestras de líquido sinovial de pacientes con padecimientos como artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante y gota. Además, se muestra con base a experimentos previos de detección de *Mycoplasma* por PCR o crecimiento en cultivo. En color amarillo, se encuentran aquellos que tuvieron aglutinación positiva y que fueron positivos para *Mycoplasma* en PCR o cultivo.

Muestras	Diagnóstico	Título aglutininas frías	Mycoplasma	Muestra	Diagnóstico	Título aglutininas frías	Mycoplasma
S4108068	Artritis reumatoide	1:4	+	29	-	1:4	+
S4108069	Artritis reumatoide	1:4	+	36	-	1:2	-
S4108070	Artritis reumatoide	1:4	+	32	Osteoartritis	1:64	-
S4108071	Artritis reumatoide	1:8	+	33	LD*	1:8	-
S5923078	Artritis reumatoide	1:4	-	40	Artritis reumatoide	1:8	-
S5823078	Osteoartritis	1:8	-	ML029	Artritis reumatoide	1:16	-
S4622068	Artritis reumatoide	1:4	+	ML043	Artritis reumatoide	1:512	-
S4322068	Gota	1:4	-	ML034	Artritis reumatoide	1:8	+
S520048	Artritis reumatoide	1:4	-	ML042	Artritis reumatoide	1:32	-
S4522068	Artritis reumatoide	1:32	-	ML041	Osteoartritis	1:8	-
S4522069	Artritis reumatoide	1:16	-	ML033	Artritis reumatoide	1:32	-
S4522070	Artritis reumatoide	1:64	-	ML013	Osteoartritis	1:16	-
S4522071	Artritis reumatoide	1:16	-	ML040	Artritis reumatoide	1:8	+
S4522072	Artritis reumatoide	1:16	-	ML024	Artritis reumatoide	1:8	-
S4522073	Artritis reumatoide	1:16	-	ML016	Artritis reumatoide	1:4	+
37	-	1:8	-	ML014	Osteoartritis y Artritis reactiva	1:8	-
3	Espondilitis anquilosante	1:8	-	ML017	Osteoartritis	1:4	-
6	-	1:8	-	ML028	-	1:2	-
21	Osteoartritis	1:32	-	ML025	Artritis reumatoide	1:2	-
14	-	1:4	+	ML015	Artritis reumatoide	1:32	+
31.1	Artritis reumatoide	1:8	-	ML067	-	1:4	+
38	Osteoartritis	1:8	-	ML023	Artritis reumatoide	1:64	+
12	-	1:128	-	ML026	Artritis reumatoide	1:8	+
11	-	1:4	-	ML009	Artritis reumatoide	1:8	+
5.1	Espondilitis anquilosante	1:8	+	ML006	Osteoartritis y Artritis reactiva	1:8	-
27	Osteoartritis	1:32	-	ML005	Artritis reumatoide	1:4	+
8	-	1:8	-	ML003	Artritis reactiva	1:4	-
28	-	1:16	-	ML066	Osteoartritis y Artritis reactiva	1:8	+
25	Artritis reumatoide	1:8	+	ML063	Artritis reumatoide	1:256	M. penetrans
18	Osteoartritis	1:32	-	ML062	Osteoartritis y Artritis reactiva	1:8	-
39	Osteoartritis	1:4	-	ML061	Artritis reumatoide	1:1	-
16	Osteoartritis	1:16	-	ML053	Artritis reumatoide	1:16	M. fermentans
4.2	Espondilitis anquilosante	1:8	-	ML052	Artritis reumatoide	1:4	M. fermentans
23	Gota	1:4	+	ML051	Osteoartritis	1:8	M. fermentans
				ML050	Artritis reumatoide	1:2	M. fermentans

4. Prueba de proteína C reactiva

Se llevaron a cabo 48 pruebas de aglutinación en látex para la detección cualitativa de proteína C reactiva, leyendo la aglutinación con base en la formación de grumos sobre las placas de color negro. (Figura 5). Posteriormente, se tomaron 6 muestras representativas del grupo de positivas, para observar la concentración aproximada de PCR. De las muestras probadas, se obtuvieron 20 de aglutinación positiva con presencia de *Mycoplasma* detectada en estudios previos sobre las mismas pruebas, con 13 pertenecientes a pacientes con artritis reumatoide, 2 espondilitis anquilosante, 1 gota, 1 de artritis reactiva, 1 osteoartritis y 2 de naturaleza desconocido (Tabla 3). En la prueba semi cuantitativa, se obtuvieron concentraciones desde los 12 a los 48 mg/L de PCR en líquido sinovial.

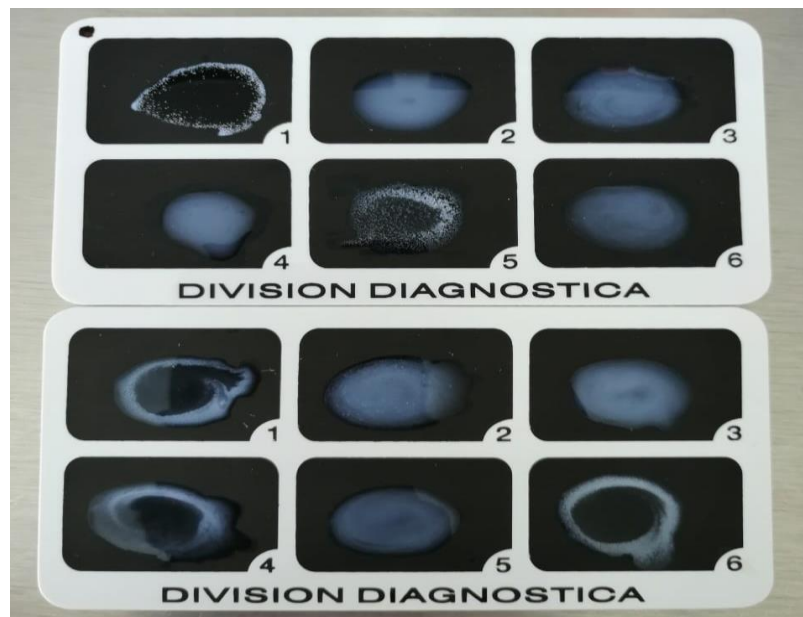


Figura 5. Placa de diagnóstico con 6 celdas en cada una. En la primera (arriba) se tiene en el número 1 se tiene un control positivo (suero humano con 6 mg/L de PCR) el cual se observa una aglutinación con fondo negro, en el 2 un control negativo (suero humano con menos de 6 mg/L de PCR) el cual se observa como una mezcla homogénea color blanca y de la celda 3 a 6 de la segunda placa (abajo) se tienen muestras de líquido sinovial con diferentes niveles de aglutinación.

Tabla 3. (1) (arriba) Resultados de pruebas de aglutinación para detección de proteína C reactiva de las muestras de líquido sinovial de pacientes con padecimientos como artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante y gota. En color amarillo, se encuentran aquellos que tuvieron aglutinación positiva y que fueron positivos para *Mycoplasma* en PCR o cultivo en estudios previos. (2) (abajo) Resultados de prueba semi-cuantitativa de PCR en grupo representativo de muestras con aglutinación positiva más alta.

Muestras	Diagnóstico	Final		Muestra	Nombre del paciente	Proteína C	Final Mycoplasma
		Proteína C	Mycoplasma				
S4108068	Artritis reumatoide	+	+	8	-	+	-
S3118058	Espondilitis anquilosante	-	+	28	-	+	-
S4008068	Artritis reactiva	+	+	25	Artritis reumatoide	+	+
S3218058	Espondilitis anquilosante	+	+	18	Osteoartritis	-	-
S5923078	Artritis reumatoide	+	-	39	Osteoartritis	+	-
S5823078	Osteoartritis	+	-	16	Osteoartritis	+	-
S4622068	Artritis reumatoide	+	+	23	Espondilitis anquilosante	++	-
S4322068	Gota	+	-	29	Gota	++	+
S520048	Artritis reumatoide	+	-	36	-	++	+
S4522068	Artritis reumatoide	+	-	32	-	+	-
S3808068	Espondilitis anquilosante	+	-	33	Osteoartritis	+	-
S4215068	Artritis reumatoide	-	-	40	LD*	+	-
S1220048	Artritis reumatoide	+	-	ML034	Artritis reumatoide	++	+
37	-	+	-	ML040	Artritis reumatoide	++	+
3	Espondilitis anquilosante	+	-	ML016	Artritis reumatoide	++	+
6	-	+	-	ML023	Artritis reumatoide	+	+
21	Osteoartritis	+	-	ML026	Artritis reumatoide	++	+
14	-	++	+	ML009	Artritis reumatoide	+	+
31.1	Artritis reumatoide	++	-	ML005	Artritis reumatoide	+	+
38	Osteoartritis	+	-	ML066	Osteoartritis y Artritis reactiva	-	+
12	-	-	-	ML053	Artritis reumatoide	+	M. fermentans
11	-	+++	-	ML052	Artritis reumatoide	+	M. fermentans
5.1	Espondilitis anquilosante	+	+	ML051	Osteoartritis	+	M. fermentans
27	Osteoartritis	+	-	ML050	Artritis reumatoide	++	M. fermentans

Muestra	Título	[PCR] (mg/L)
S36	1:4	≥24
S23	1:2	≥12
ML016	1:8	≥48
S4108068	1:8	≥48
S4322068	1:4	≥24
S4622068	1:4	≥24

5. Prueba de Factor Reumatoide

Se llevaron a cabo 65 pruebas de FR para las muestras de líquido sinovial con ayuda del kit, reportando las siguientes resultados, siguiendo la misma estrategia, se basa en la observación de formación de grumos sobre la placa de color negro para la detección de una aglutinación positiva (presencia de anticuerpos IgM), posteriormente se seleccionaron 11 muestras para hacer la prueba semi-cuantitativa de FR a partir de los resultados de aglutinación más positiva (Figura 6). Los resultados observados demostraron que se tuvieron 19 reacciones positivas, con 14 de artritis reumatoide, 1 de artritis reactiva, 1 osteoartritis, 1 espondilitis anquilosante y 1 de diagnóstico desconocido. (Tabla 4)



Figura 6. Placa de diagnóstico con 6 celdas en cada una. En la primera (arriba) se tiene en el número 1 se tiene un control positivo (suero humano con más de 20IU/mL de FR) el cual se observa una aglutinación con fondo negro, en el 2 un control negativo (suero humano libre de FR) el cual se observa como una mezcla homogénea color blanca y de la celda 3 a 6 de la segunda placa (abajo) se tienen muestras de líquido sinovial con diferentes niveles de aglutinación.

Tabla 4. (1) (arriba) Resultados de pruebas de aglutinación para detección de factor reumatoide de las muestras de líquido sinovial de pacientes con padecimientos como artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante y gota. En color amarillo, se encuentran aquellos que tuvieron aglutinación positiva y que fueron positivos para *Mycoplasma* en PCR o cultivo en estudios previos. (2) (abajo). Resultados de prueba semi-cuantitativa de FR en grupo representativo de muestras con aglutinación positiva más alta.

Muestras	Diagnóstico	Factor Reuma	Final Mycoplasma	Muestra	Diagnóstico	Factor Reuma	Final Mycoplasma
S4108068	Artritis reumatoide	++	+	23	Gota	-	+
S3118058	Espondilitis anquilosante	-	+	29	-	-	+
S4008068	Artritis reactiva	+	+	36	-	+++	-
S3218058	Espondilitis anquilosante	-	+	32	Osteoartritis	+	-
S5923078	Artritis reumatoide	++	-	33	LD*	-	-
S5823078	Osteoartritis	+	-	40	Artritis reumatoide	+	-
S4622068	Artritis reumatoide	+++	+	ML043	Artritis reumatoide	+	-
S4322068	Gota	-	-	ML034	Artritis reumatoide	+++	+
S520048	Artritis reumatoide	+	-	ML042	Artritis reumatoide	++	-
S4522068	Artritis reumatoide	++	-	ML041	Osteoartritis	++	-
S3808068	Espondilitis anquilosante	-	-	ML033	Artritis reumatoide	+++	-
S4215068	Artritis reumatoide	+	-	ML013	Osteoartritis	+	-
S1220048	Artritis reumatoide	++	-	ML040	Artritis reumatoide	+	+
37	-	+++	-	ML024	Artritis reumatoide	+++	-
3	Espondilitis anquilosante	+	-	ML016	Artritis reumatoide	+++	+
6	-	-	-	ML014	Osteoartritis y Artritis reactiva	+	-
21	Osteoartritis	++	-	ML017	Osteoartritis	+	-
14	-	+++	+	ML028	-	+++	-
31.1	Artritis reumatoide	-	-	ML025	Artritis reumatoide	+++	-
38	Osteoartritis	+	-	ML015	Artritis reumatoide	++	+
12	-	-	-	ML067	-	+++	+
11	-	+++	-	ML023	Artritis reumatoide	+	+
5.1	Espondilitis anquilosante	++	+	ML026	Artritis reumatoide	+++	+
27	Osteoartritis	+	-	ML009	Artritis reumatoide	++	+
8	-	+++	-	ML005	Artritis reumatoide	-	+
28	-	+	-	ML003	Artritis reactiva	-	-
25	Artritis reumatoide	++	+	ML066	Osteoartritis y Artritis reactiva	-	+
18	Osteoartritis	+	-	ML063	Artritis reumatoide	+	M. penetrans
39	Osteoartritis	+	-	ML062	Osteoartritis y Artritis reactiva	-	-
16	Osteoartritis	+	-	ML061	Artritis reumatoide	+++	-
4.2	Espondilitis anquilosante	NR	-	ML053	Artritis reumatoide	++	M. fermentans
ML051	Osteoartritis	+	M. fermentans	ML052	Artritis reumatoide	+	M. fermentans
ML050	Artritis reumatoide	+++	M. fermentans				

Muestra	Título Obtenido	[FR] (IU/mL)
S14	1:16	3200
S5.1	1:4	800
S25	1:2	400
ML034	1:6	1200

S4008068	1:1	200
S4622068	1:16	3200
S4108068	1:8	1600
S1220048	1:8	1600
S5923078	1:2	400
S37	1:16	3200
S8	1:16	3200

6. Prueba de chi cuadrada para asociación entre micoplasmas y pruebas de detección de anticuerpos.

Tabla 5. Resultados de la prueba de chi cuadrada para el análisis estadístico de los datos de las tres pruebas, analizadas de manera individual para determinación de la asociación (1) Prueba de aglutininas frías (2) Prueba de factor reumatoide (3) Prueba de proteína C reactiva.

(1)

	Con aglutininas frías	Sin aglutininas frías	Total	
Con micoplasmas	13	12	25	Donde p= 0.0141
Sin micoplasmas	35	8	43	

(2)

	Con factor reumatoide	Sin factor reumatoide	Total	
Con micoplasmas	19	6	35	Donde p= 0.03
Sin micoplasmas	31	31	62	

(3)

	Con proteína C reactiva	Sin proteína C reactiva	Total	
Con micoplasmas	20	2	22	Donde $p \geq .05$
Sin micoplasmas	23	2	25	

Existe asociación entre la presencia de aglutininas frías y la presencia de micoplasmas en el líquido sinovial de pacientes con enfermedades reumáticas, así como existe asociación entre el factor reumatoide y los micoplasmas presentes. No se encontró una asociación significativa entre la detección de proteína C reactiva y la presencia de micoplasmas.

DISCUSIÓN

A lo largo del estudio dedicado a la artritis reumatoide, se han propuesto diversas causas para la presencia del padecimiento en humanos, tomando en cuenta varios factores desde diferentes perspectivas. Durante el estudio de los micoplasmas como un factor inductor de artritis, se han generado modelos animales para ver la posible inducción de AR en aquellos que fueron inoculados con micoplasma, principalmente con *M. fermentans*, observando que se genera la presencia de artritis reumatoide. Estudios como el de *Gil et al* (11), pone en evidencia el papel de los micoplasmas como una causa mayor en artritis inducida en modelos animales, permitiendo también el aislamiento de *M. fermentans* de líquido sinovial de las articulaciones de estos animales.

En este estudio, se eligió abordar el problema con el enfoque de la detección por medio de técnicas de serología (pruebas de aglutinación), de esta manera, los resultados de tres pruebas aisladas de detección de inmunoglobulinas relacionadas con micoplasmas en pacientes con un diagnóstico positivo de artritis reumatoide u otras enfermedades, en conjunto con la presencia confirmada de micoplasma en el líquido sinovial, ayudarían a generar una hipótesis sobre la estrecha relación entre la artritis y la bacteria.

De los resultados de la prueba de aglutininas frías, la detección se llevó a cabo en diversos padecimientos (Tabla 2), siendo el más predominante la artritis reumatoide, obteniendo 18 pacientes con aglutinación positiva mayor a 1:4 y que además tienen presencia de *Mycoplasma* detectada por medio de PCR. Tres de las muestras pertenecientes a artritis reumatoide y 1 de osteoartritis, tenían la detección previa de *M. fermentans*, y además presentaron niveles considerables de aglutinación positiva de aglutininas frías. Es importante considerar que la presencia de estas inmunoglobulinas ha sido ampliamente utilizada para la detección de diversos padecimientos, pero destacado para la detección de infección por *M. pneumoniae* (17).

Una de las razones más importantes por las que, a pesar de que *Mycoplasma* no fue detectado en líquido sinovial, a pesar de presentar aglutinación alta y un

diagnóstico positivo, puede explicarse con experimentos llevados en modelos animales, donde micoplasmas han inducido artritis, pero que no pueden ser aislados después de las primeras semanas de infección, conservando el proceso del padecimiento (29). De acuerdo con *Girloy et al* (29), se ha reportado un aislamiento de *M. fermentans* en baja frecuencia en líquido sinovial, haciendo los resultados poco reproducibles en diversas ocasiones. Esta explicación puede fundamentar el hecho de que *Mycoplasma* no pueda ser detectado en todas las muestras de líquido sinovial o pueda ser cultivable.

Uno de los mecanismos propuestos ha sido conocido como “*hit and run*”, en el cual la bacteria ingresa a las articulaciones (membrana sinovial) pero no reside por tanto tiempo, sin embargo, deja atrás aquella reacción de inflamación crónica, conllevando al desarrollo de artritis, pero imposibilitando el aislamiento de esta (11,27). La presencia de IgM en el líquido sinovial estaría representando la reacción inmune que ha sido montada en contra de la presencia de micoplasmas en el paciente con artritis reumatoide en el momento en que residió en las articulaciones, dejando antígeno remanente en ellas para la respuesta crónica inflamatoria (26). Otro de los mecanismos se ha relacionado con la presencia de una baja concentración crónica de la bacteria, que induce la infección y posterior desarrollo de artritis reumatoide. El apoyo de estas hipótesis ayuda a generar un fundamento en el cual, por acción del sistema inmune, procesos como la ubiquitinación, entre otros, eliminan o mantienen a la bacteria en bajas concentraciones, sin embargo, el efecto inflamatorio se mantiene presente. (11).

Previo a este estudio, se llevó a cabo la detección de micoplasma por medio de la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR), que fue utilizada como una manera conjunta de analizar la presencia de anticuerpos anti-micoplasma en cada muestra. En la detección de proteína C reactiva, de las 20 muestras positivas, 13 pertenecieron a artritis reumatoide, siguiendo la hipótesis de una infección previa al padecimiento. La proteína C reactiva es conocida como uno de los marcadores más utilizados debido a su variedad en unión a diversas proteínas en microorganismos, por lo que ante cualquier evento que genere inflamación se presenta (de manera no específica) (19). De las 48 pruebas llevadas a cabo, 43 resultaron con un nivel

significativo de aglutinación de PCR, obteniendo resultados favorecedores en la presencia de esta proteína, de estas muestras; 24 no tuvieron presencia de micoplasma en cultivo, sin embargo, fueron positivas en aglutinación. Estos resultados coinciden con la hipótesis de que se pueden encontrar anticuerpos remanentes, aquellos que participaron en la generación de inflamación crónica, a pesar de que el microorganismo ya no se encuentre. Una de las técnicas para detectar una aproximación de la concentración de PCR en las muestras fue tomar un grupo representativo, con 6 muestras que tuvieron una aglutinación considerable. Se encontraron resultados desde los 12 mg/L hasta los 48 mg/L, que en comparación con el estándar que se tiene, de 6 mg/L en pacientes sanos, indica que un proceso inflamatorio agudo se llevó a cabo en el paciente, y que aún se encuentra bajo los niveles detectables.

De manera general, el factor reumatoide, una IgM dirigida contra las IgG humanas como respuesta autoinmune, está presente en el 80% de los casos de artritis reumatoide y ha sido utilizado para diferenciar entre los distintos tipos de artritis. Concordando con la bibliografía, de los 19 muestras positivos analizados, 14 fueron de artritis reumatoide. De las 65 muestras en total, las 29 pertenecientes a artritis reumatoide tuvieron una aglutinación positiva. La presencia de factor reumatoide en ha sido utilizada como una prueba confiable para la detección de enfermedades reumáticas, por lo que los resultados obtenidos concuerdan con lo esperado. Una manera de obtener un estimado, fue la observación de una concentración aproximada de FR en líquido sinovial, obteniendo resultados desde las 100 UI/mL hasta una concentración tan alta como 3200 UI/mL. Concordando con los diagnósticos reportados, así como con la presencia de micoplasma en ciertas pruebas, aporta evidencia acerca la detección de anti – micoplasma (IgM e IgG).

Las diferentes causas por las que una persona puede desarrollar artritis reumatoide tienen diversas fuentes, por lo que no puede centrarse en una sola. Mucha de la etiología de la enfermedad sigue siendo potencial de estudio, sin embargo, es posible decir que los micoplasmas tiene un papel vital en ella. Los mecanismos por los cuales actúan se desconocen, pero el análisis de pruebas aisladas para detección de anticuerpos relacionados con una posible infección de micoplasmas

ayuda a brindar perspectivas diferentes, apoyándose de resultados del diagnóstico molecular en conjunto (14).

Los resultados positivos en 25 de las 67 muestras sobre la presencia de micoplasmas demuestran la evidencia de una infección con *Micoplasma*, principalmente de *M. pneumoniae* y *M. fermentans*. El rol de micoplasmas en la artritis ha representado un debate controversial, pero se ha demostrado que éstas especies de micoplasmas han sido encontradas en fluido sinovial de pacientes inmunocomprometidos. Estudios como *Gilroy et al* (29), han detectado la presencia de DNA de *M. fermentans* en pacientes con artritis reumatoide, sugiriendo la posibilidad de que los antígenos de micoplasmas persisten incluso por años, generando una respuesta inmune que estimula inflamación crónica en pacientes. En el estudio llevado a cabo por *Gil et al* (11) se estudia la presencia en sangre de *M. fermentans*, encontrando resultados negativos en el cultivo de bacteria, sin embargo, obteniendo resultados favorables en la detección por medio de PCR; de igual manera, reportaron la detección de anticuerpos anti – *M. fermentans* (IgM e IgG), sugiriendo que la bacteria entra por el tracto respiratorio y sangre, para posteriormente alcanzar las articulaciones, donde induciría respuesta inmune inflamatoria.

De acuerdo con el estudio de *Ramírez et al* (14), la asociación entre *M. pneumoniae* y artritis reumatoide lanzó resultados significativos acerca de la probabilidad de que la gente que tuvo contacto previo con el microorganismo esta más expuesta a sufrir de artritis reumatoide contra la gente que nunca ha sufrido una infección por la misma, mientras que *Haier et al* (30) detectó la presencia de micoplasmas (*M. fermentans* en más del 50% de las muestras) en leucocitos sanguíneos en pacientes con artritis reumatoide, apuntando a la relación de infecciones crónicas por micoplasmas con otras enfermedades crónicas, tales como AR.

Los resultados del presente trabajo, como en *Ramírez et al* (14) y *Gil et al* (11) sugieren que la presencia de una infección llevó a la generación de anticuerpos anti-micoplasma, por lo que se demuestra que el paciente estuvo en contacto con la bacteria en algún momento. Esta hipótesis se apoya también del hecho de que,

aunque el cultivo y detección de Micoplasmas se vea obstaculizado en distintos experimentos, la detección de anticuerpos relacionados con una infección de esa índole es positiva, y que puede dar una nueva perspectiva de la unión de conocimientos sobre biología molecular con las técnicas de diagnóstico serológicas para la determinación de presencia de Ig en pacientes. Las detecciones de anticuerpos se han llevado a cabo en su mayoría en muestras de sangre de pacientes, al contrario, en el presente estudio se realizaron las pruebas en líquido sinovial, debido a que es el fluido que se encuentra sintetizado en la membrana sinovial, sitio en donde se lleva a cabo, principalmente, todo el proceso relacionado con la inflamación crónica y la síntesis de anticuerpos. Diversos estudios, además (11, 14, 26, 29) han reportado el aislamiento de micoplasma en líquido sinovial desde los años 1960s, relacionándolo con la posible relación de la artritis por mecanismo autoinmune inducido.

El análisis de líquido sinovial con pruebas serológicas en el presente trabajo es una nueva perspectiva de estudio de los anticuerpos presentes como una técnica de diagnóstico usual para la determinación de una posible relación entre reacción autoinmune que estos pueden tener sobre el sistema del paciente, provocando una exacerbación o inducción de artritis reumatoide. De esta manera, se logró conjuntar con estudios de cultivo y detección molecular para un enfoque multifactorial que comprobara la hipótesis sugerida para la investigación. Los resultados de las pruebas demuestran que, si bien, la presencia de micoplasmas no puede ser comprobada en las muestras de todos los pacientes, la remanencia de una infección pasada es evidente, misma que contribuye, junto con investigaciones previas, al hecho de que micoplasmas tienen un papel bastante importante en el desarrollo de este padecimiento. Esta relación se puede fundamentar por la capacidad de generación de respuesta autoinmune inespecífica de los micoplasmas, involucrando células de respuesta inmune innata como adaptativa y que conlleva a una inflamación crónica en el organismo.

CONCLUSIONES

A pesar de los avances en la investigación enfocados en el discutido papel entre la infección por micoplasmas y la artritis reumatoide, muchos aspectos continúan siendo un misterio sobre el funcionamiento. Sin embargo, una de las cosas que ha quedado clara con el paso del avance en estas investigaciones es el hecho de que la artritis reumatoide, tanto como otras enfermedades de índole autoinmune, pueden tener como un agente causal a infecciones por microorganismos.

En el presente estudio, los resultados sugieren que la presencia de micoplasmas (principalmente *M. fermentans* y *M. pneumoniae*) y una posterior infección, se dieron en los pacientes, generando una respuesta inmune que dejó como resultado la presencia de anticuerpos contra la bacteria, mismos que pudieron ser detectados mediante técnicas como aglutininas frías, factor reumatoide y proteína C reactiva, que pueden estar relacionados con la presencia de artritis reumatoide por el proceso autoinmune que desencadenaron. Esto lleva a sugerir que la relación es más estrecha, debido a que también se realizó la detección por PCR de micoplasmas en estudios previos en el líquido sinovial, unida con las técnicas tradicionales de serología.

De igual manera, se sustenta la hipótesis de la imposibilidad de detectar la presencia de micoplasmas en líquido sinovial debido a los mecanismos propuestos por los que la bacteria deja como remanente un antígeno que potencia la respuesta inmune, pero que esta no permanece por demasiado tiempo. Es, por lo tanto, una perspectiva a lograr, el estudio de los posibles mecanismos por los cuales esta bacteria tiene un papel en la artritis reumatoide, una vez que se ha detectado una relación importante entre la infección provocada y la generación de una respuesta autoinmune, que desencadenará en la artritis reumatoide.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Mould-Quevedo J, Peláez-Ballestas I, Vázquez-Mellado J, Terán-Estrada L, Esquivel-Valerio J, Ventura-Ríos L, Aceves-Ávila FJ, Bernard-Medina AG, Goycochea-Robles MV, Hernández-Garduño A, Burgos-Vargas R, Shumski C, Garza-Elizondo M, Ramos-Remus C, Espinoza-Villalpando J, Álvarez-Hernández E, Flores-Alvarado D, Rodríguez-Amado J, Casasola-Vargas J, Skinner-Taylor C. **El costo de las principales enfermedades reumáticas inflamatorias desde la perspectiva del paciente en México.** Gac Med Mex 2008; 144 (3) 225-231
- (2) Shanga, O. **Epidemiology of rheumatic diseases.** Rheumatology 2000; 39(2) 3-12.
- (3) Oliva-Gutiérrez, E., Martínez-Godoy, M., Zapata-Zúñiga, M., Sánchez-Rodríguez, S. **Artritis reumatoide: Prevalencia, inmunopatogenia y antígenos relevantes para su diagnóstico.** iMedPub Journals 2012. 8 (13) 1- 7. Doi:10.3823/084
- (4) García-Sevillano, L. **Avances en artritis reumatoide.** An. Real Acad. Farm. 2014. 80 (1) :126-150.
- (5) Izquierdo, E., Pablos, J. **Fibroblastos sinoviales.** Semin Fund Esp Reumatol 2012. 14(4) 121-128
- (6) F. Angelotti, A. Parma, G. Cafaro, R. Capecchi, A. Alunno, I. Puxeddu. **One year in review 2017: pathogenesis of rheumatoid arthritis.** Clin Exp Rheumatol 2017. 35. 368-378.
- (7) Pérez, I., Villaroel, M., Gómez, M., González-Rico, S. **Evaluación de Medios de Cultivo para *Mycoplasma pneumoniae*.** Academia Biomédica Digital. 2009. 38. 1-8.
- (8) Rivera-Tapia, J., Cedillo-Ramírez, M., Vega-Benítez, M. **Micoplasmas y su importancia médica.** Rev Biomed. 2001. 12 (4). 262-271.
- (9) Cervantes, E. **Micoplasmas patógenos para el humano.** Rev Fac Med UNAM. 2009. 52. 253-259.

- (10) Douglas, R. **Immune Responses to Mycoplasma**. Private Practice Infectious Diseases. 2005. 84. 1451-1464. DOI: 10.1016/B978-012491543-5/50088-7
- (11) Gil, C., Rivera, A., Bañuelos, D., Salinas, S., García-Latorre, E., Cedillo, L. **Presence of *Mycoplasma fermentans* in the bloodstream of Mexican patients with rheumatoid arthritis and IgM and IgG antibodies against whole microorganism**. BMC Musculoskeletal Disorders. 2009. 10 (97) 1-17.
- (12) McInnes, I., Schett, G. **The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis**. N Engl J Med. 2011. 365 (23) 2205-2219.
- (13) Baseman, J., Tully, J. **Mycoplasmas: Sophisticated, Reemerging, and Burdened by their Notoriety**. Emerging Infectious Diseases. 1997. 3 (1) 21-32.
- (14) Ramírez, A.S., Rosas, A., Hernández -Beriain, J.A. Orengo, J.C., Saavedra, P., De la Fe, C. Fernández, A; Poveda, J.B. **Relationship between rheumatoid arthritis and Mycoplasma pneumoniae: a case-control study**. Rheumatology. 2005. 44. 912-914.
doi:10.1093/rheumatology/keh630
- (15) Taguchi, Y; Schatzl, H. **Small-scale Triton X-114 Extraction of Hydrophobic Proteins**. Bio Protoc. 2014. 4 (11) 1-5.
doi:10.21769/BioProtoc.1139.
- (16) Deska, K. (2009). **Aglutininas febriles frías en Guía de pruebas diagnósticas y de laboratorio** (19-20): Elsevier Health Sciences.
- (17) Clyde, W., Pacini, D.L., Denny, F.W. **Infecciones respiratorias causadas por Mycoplasma pneumoniae: claves del diagnóstico**. Métodos Diagnóstico. Boletín Escuela de Medicina. Universidad Católica de Chile. 1988. 18 (1). 52-57.
- (18) Reyes, M.A., Aristazábal, G., Leal, F. (2006) Germen causante de posible hipersensibilidad: *Mycoplasma pneumoniae* en **Neumología Pediátrica: Infección, Alergia y Enfermedad Respiratoria en el niño**. (40-41): Editorial Médica Panamericana.

- (19) Aguirre, A., Falla, A., Sánchez, W. **Correlación de los marcadores inflamatorios (proteína C reactiva, neutrofilia y leucocitosis) en las diferentes fases de la apendicitis aguda.** Rev Colombiana de Cirugía. 2014. 29 (2). 110-115.
- (20) Mendoza- Vázquez, G., Rocha, A., Guerra, A., Ramírez, M., González, S., Gámez, J., Nava, A. **Artritis reumatoide y dislipidemias.** 2013. El Residente. 8 (1) 12-22.
- (21) Amezcua, L., Springall, R., Bojalil, R. **Proteína C reactiva: aspectos cardiovasculares de proteína de fase aguda.** Arch Cardiol Mex 2007. 77. 58-66.
- (22) Licon RaPET® PCR. **Prueba de aglutinación de látex en placa para la determinación cualitativa y semi-cuantitativa de Proteína C reactiva en suero no diluido.** Stanbio Laboratory. 2015. USA.
- (23) Kokuina, E., Chico, A., Carballar, L., Gutiérrez, A., Soto, J., Estévez, M., Pérez, D. **Factor reumatoide: asociación con la erosión radiológica y actividad de la artritis reumatoide.** Rev cubana Med. 2008. 47(3) 1-14.
- (24) Lozano, J. **Artritis reumatoide (I) Etiopatogenia, sintomatología, diagnóstico y pronóstico.** Farmacoterapia. 2001. 94-100
- (25) Licon RaPET® FR. **Prueba de aglutinación de látex en placa para la determinación cualitativa y semi-cuantitativa del Factor Reumatoide en suero no diluido.** Stanbio Laboratory. 2015. USA.
- (26) Arango, M., Arenas, M., Martínez, O. **Neumonía por *Mycoplasma pneumoniae* complicada con anemia hemolítica por aglutininas frías.** Acta Médica Colombiana. 2013. 38 (2) 91-94.
- (27) Rivera, J. **Diagnóstico molecular de *Mycoplasma fermentans* en pacientes con artritis.** Gac Med Mex. 2003. 139 (1).
- (28) Mendoza, U., Castro, Z., Jiménez, B., **Factor reumatoideo. Asociación con marcadores de respuesta inflamatoria.** 2010. Rev Méd Electrón. 32 (1).

- (29) Gilroy, C., Keat, A., Taylor-Robinson, D. **The prevalence of *Mycoplasma fermentans* in patients with inflammatory arthritides.** 2001. *Rheumatology*. 40. 1355-1358.
- (30) Haier, J., Nasralla, M., Franco, R., Nicolson, L. **Detection of mycoplasmal infections in blood of patients with rheumatoid arthritis.** 1999. *Rheumatology*. 38. 504-509.