



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**



**INSTITUTO DE CIENCIAS  
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS**

**POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA**

**DETECCIÓN DE MICOPLASMAS Y  
ANTICUERPOS CONTRA MICOPLASMAS EN  
PACIENTES REUMÁTICOS.**

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)  
CON OPCIÓN EN: MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

**PRESENTA:**

**Q.B.P. INÉS VALERIA CHAVARRÍA BENCOMO**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**D.C. MARÍA LILIA CEDILLO RAMÍREZ**

**PUEBLA, PUE.**

**NOVIEMBRE, 2019**



Puebla, Pue. a 6 de noviembre 2019.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO  
EN MICROBIOLOGÍA  
CICM-ICUAP  
PRESENTE.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría de la alumna **Inès Valeria Chavarria Bencomo**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

**“Detección de micoplasmas y anticuerpos contra micoplasmas en pacientes reumáticos”**

A nuestro juicio, la alumna **Inès Valeria Chavarria Bencomo** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.


Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.  
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”

  
D.C. Patricia Lozano Zarain

  
M.C. Constantino Gil Juárez

  
Dr. Jorge Antonio Yañez Santos

  
Dr. David Bañuelos Ramírez

## Agradecimientos

### ◆ INSTITUCIONALES

- A la Universidad Autónoma de Chihuahua, mi *alma mater*, y a la Facultad de Ciencias Químicas de la UACH por toda mi formación académica.
- A la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**, por permitirme formar parte de esta prestigiosa institución.
- Al **Instituto de Ciencias**, y todo su personal por todo el apoyo brindado y disponibilidad para todas las gestiones y asuntos solicitados.
- Al **Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas**, por haberme dado la oportunidad de realizar el programa de Posgrado en Microbiología, por la excelente formación académica y conocimiento que recibí durante mi estancia.
- Al **Laboratorio de Micoplasmas**, por abrirme las puertas para llevar a cabo mi trabajo de investigación y por hacerme sentir feliz de ir a trabajar todos los días.
- Al **Centro de Detección Molecular**, por permitirme realizar parte de mi proyecto en sus instalaciones y por hacerme sentir como en casa, por el grupo tan unido que son.
- Se agradece a la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado**, por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del Programa IV. Investigación y Posgrado. Apoyar a los programas de posgrado para lograr su incorporación al Padrón Nacional de Calidad. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2017-2021. Así como por el apoyo otorgado para los gastos de transporte para la asistencia del XLIV Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica en la ciudad de León, Gto.
- Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por la beca otorgada durante los estudios de maestría, con número de becario 846340/628783.

## ◆ ACADÉMICOS

- A mi asesora la **D.C. María Lilia Cedillo Ramírez**, por confiar en mí y elegirme para formar parte dentro de su grupo de trabajo. Por todo el apoyo brindado, por los buenos consejos y por ser una excelente guía durante el curso de la maestría. Me llevo de usted no únicamente el amor por los micoplasmas sino grandes enseñanzas y virtudes como ser humano. La aprecio y le agradezco enormemente.
- Al **D.C. Constantino Gil Juárez**, por enseñarme las técnicas y estar al pendiente de lo que necesitara, por sus valiosos consejos y aportes, por todo el tiempo dedicado a apoyarme en el desarrollo de mi investigación, por la disponibilidad que siempre mostró para auxiliarme en mis dudas y, sobre todo, por los momentos tan agradables que compartimos en el laboratorio. Muchas GRACIAS por todo.
- A la **D.C. Patricia Lozano Zaráin**, por sus enseñanzas en el salón de clases, por ayudarme a dar lo mejor de mí y analizar más allá, por el todo el apoyo brindado para desarrollar el proyecto de la mejor manera posible.
- Al **D.C. José Antonio Yáñez Santos**, por su disponibilidad y tiempo dedicados al proyecto, por los consejos que enriquecieron este proyecto de investigación.
- A la **M.C. Elda Carreón Moreno** y al **M.C. Sergio Tecpanécatl Xihuitl**, por todo el apoyo brindado durante la realización de la experimentación, por el tiempo invertido en escuchar mis resultados y por hacerme sentir parte del equipo de trabajo tan bonito que han formado.
- Al **D.C. Miguel Castañeda Lucio**, por su apoyo para llevar cabo el rápido proceso de la titulación.

## **Dedicatorias**

### ◆ A mi familia

A mi mamá, Quechita, por siempre estar a mi lado en todas las circunstancias buenas y malas de la vida. Gracias por todo el esfuerzo, por los consejos y palabras de aliento que me impulsaron a seguir hasta alcanzar mis objetivos. Te agradezco por apoyarme a continuar estudiando, por enseñarme que el trabajo duro siempre deja grandes satisfacciones.

A mis hermanos Saúl y Ever, por acompañarme en la distancia con sus llamadas, y mensajes que me hicieron sentir cerca de casa, por su preocupación hacia mí y por sus muestras de cariño. Saúl, muchas gracias por los jamoncillos. Ever gracias por las llamadas. A ambos, gracias por apoyarme para realizar esta maestría.

A mi querida Mamá Quecha que, sin darse cuenta, me ayudó tanto en este proceso cada vez que escuché su voz en el teléfono, gracias por todo el cariño y el apoyo.

A toda mi familia, primos y tíos, por permanecer al pendiente de mí, gracias por recibirme con tanto gusto cada vez que volví a Chihuahua. Los quiero mucho a todos.

### ◆ A mi novio

Para ti Eder, porque sin ti, este viaje no lo hubiera concebido, te agradezco por acompañarme en este proceso de formación tan importante para los dos, desde el inicio estudiando juntos para el examen, hasta ahora al concluir. Desde el fondo de mi corazón te doy las gracias por la fortaleza que me has dado, por tus cuidados y tu apoyo incondicional, pero sobre todo hacerme sentir con la confianza de alcanzar mis metas. Gracias por hacerme tan feliz y hacerme fuerte en los momentos de estrés, demostrándome siempre tu buen juicio para enfrentar las adversidades, gracias por el amor y la comprensión que me has brindado y por los momentos que hemos pasado juntos en esta aventura. Quiero que sepas que te amo y que me siento muy orgullosa de ti al verte concluir con tanto éxito tu maestría. Eres una parte fundamental de esta tesis.

◆ A mis amigos y compañeros

A mis amigas, Güera, Anita, Cynthia, Lore, Lety, Macri y Yaco que, a pesar de la distancia, el tiempo y los contratiempos de la vida, permanecemos juntas.

A mis queridos amigos Hilda, Adry, Bichita, Pame T, Gustavo, Oscar, por apoyarme siempre, por sus consejos, por las pláticas enriquecedoras, por las bromas y por los buenos momentos que me han hecho pasar, gracias por mantenerse conmigo y recibirme con cariño.

Al Dr. Jorge Portillo, con mucho cariño y admiración, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo donde aprendí grandes cosas a nivel profesional que me animaron a continuar mi formación, gracias también por los buenos consejos que han sido tan útiles en el ámbito personal y profesional.

A mis amigos y compañeros que gane en Puebla, David, Dulce 1, Dulce 2, Melissa, Diana, Vianey, Víctor, Fabrizio, Iván, Karen, y todos los que me falten, por la amistad brindada, por los conocimientos compartidos, por sus consejos, por su disposición de trabajar en equipo y sobre todo por los momentos tan agradables que compartieron conmigo, gracias a todos.

Agradezco a mi familia, a mi novio, a mis amigos por apoyarme siempre para concluir este proyecto de investigación, sin su ayuda, este viaje y este proyecto profesional no hubiera sido posible. Les agradezco estar a mi lado e impulsarme.

Gracias a todos por todo

**“La ciencia no solo es compatible con la espiritualidad;  
es una profunda fuente de ella”**

*Carl Sagan*

## Índice general

Agradecimientos	I
Dedicatorias	IV
Índice general	I
Índice de tablas	IV
Índice de figuras	V
Abreviaturas	VI
1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1 Características generales de micoplasmas	2
2.1.1 Genoma	2
2.1.2 Membrana plasmática	4
2.1.3 Lípidos	4
2.1.4 Proteínas y lipoproteínas	5
2.2 Respuesta inmune desencadenada por <i>Mycoplasma</i>	8
2.3 Principales especies de <i>Mycoplasma</i> causantes de enfermedad en humanos	10
2.3.1 <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	10
2.3.2 <i>Mycoplasma fermentans</i>	11
2.3.3 <i>Mycoplasma hominis</i>	11
2.3.4 <i>Mycoplasma genitalium</i>	11
2.4 Enfermedades autoinmunes	12
2.4.1 Artritis reumatoide	12
2.4.2 Espondilitis anquilosante	13
2.4.3 Artritis reactiva	13
2.4.4 Eritema nodoso	14
2.5 Asociación entre <i>Mycoplasma</i> y enfermedades autoinmunes	15
2.6 Apolipoproteína E	15
2.7 Relación entre isoformas de Apolipoproteína E, enfermedades autoinmunes y <i>Mycoplasma</i>	16
3. Antecedentes	17
4. Justificación	24
5. Hipótesis	24
6. Objetivos	25

6.1 Objetivo general	25
6.2 Objetivos específicos	25
7. Estrategia metodológica	26
8. Diseño experimental	26
8.1 Criterios de inclusión	26
8.1.1 Grupo de estudio	26
8.1.2 Grupo control	26
8.2 Criterios de exclusión	27
8.3 Criterios de eliminación	27
8.4 Consideraciones éticas	27
9. Materiales y métodos	27
9.1 Sujetos de estudio	27
9.2 Especímenes	27
9.3 Recolección de muestras	27
9.4 Cultivo microbiológico para micoplasmas	28
9.5 Cultivo microbiológico para bacterias aerobias facultativas	29
9.6 Extracción de ADN de muestras clínicas	29
9.7 Extracción de ADN de cultivos en caldo Eaton	29
9.8 Cuantificación y determinación de pureza de ADN	30
9.9 Determinación de micoplasmas por PCR	30
9.10 Visualización de productos de PCR	31
9.11 Purificación de productos de PCR	32
9.12 Secuenciación y análisis de secuencias	32
9.13 Test de Inhibición Metabólica para detección serológica de <i>Mycoplasma</i>	32
9.13.1 Preparación de cultivo de micoplasmas	33
9.13.2 Inactivación de muestras clínicas	33
9.13.3 Ensayo de Inhibición metabólica (IM)	33
9.14 Detección de anticuerpos contra LAMP	36
9.14.1 Obtención de antígenos LAMP con Triton X-114	36
9.14.2 PAGE-SDS	36
9.14.3 Tinción con solución fijadora de Coomassie	37
9.14.4 Técnica de Western blot	37
9.14.5 Inmunodetección	38



9.15 Determinación de genotipo ApoE	38
9.16 Análisis estadístico	39
10. Resultados	39
10.1 Muestras y sujetos de estudio	39
10.2 Detección de micoplasmas por cultivo microbiológico	40
10.3 Búsqueda de bacterias aerobias facultativas	42
10.4 Determinación del género <i>Mycoplasma</i> por la técnica de PCR	42
10.5 Comparación entre método de cultivo y detección por PCR para búsqueda de micoplasmas	44
10.6 Identificación para especies de micoplasmas por PCR	45
10.7 Distribución de micoplasmas en enfermedades reumáticas	47
10.8 Detección de anticuerpos contra micoplasmas en muestras de pacientes y testigos por inhibición metabólica.	49
10.9 Determinación de anticuerpos anti-LAMP por Western-blot.	51
10.10. Genotipos de ApoE en pacientes reumáticos e individuos sanos y su asociación con la presencia de micoplasmas y anticuerpos contra micoplasmas.	55
11. Discusión	59
12. Conclusiones	67
13. Perspectivas	68
ANEXOS	76

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Lipoproteínas inmunomoduladoras de especies de <i>Mycoplasma</i> .....	9
<b>Tabla 2.</b> Componentes y concentraciones utilizados para las PCR realizadas para determinación de género y especies de <i>Mycoplasma</i> .....	31
<b>Tabla 3.</b> Número de muestras positivas por cultivo para ambos grupos en relación al número de muestras cultivadas.....	42
<b>Tabla 4.</b> Número de muestras positivas de pacientes de acuerdo al tipo de muestra.....	43
<b>Tabla 5.</b> Identificación de micoplasmas en muestras de paciente e individuos sanos por cultivo y PCR.....	44
<b>Tabla 6.</b> Frecuencia de aislamiento de micoplasmas en muestras clínicas de pacientes con enfermedades reumáticas.....	48
<b>Tabla 7.</b> Anticuerpos de inhibición metabólica contra <i>M. fermentans</i> , <i>M. penetrans</i> y <i>M. pirum</i> en muestras clínicas.....	49
<b>Tabla 8.</b> Anticuerpos anti-LAMP de <i>M. fermentans</i> en muestras de pacientes con enfermedades reumáticas y testigos.....	53
<b>Tabla 9.</b> Asociación de padecimiento con LAMP de <i>M. fermentans</i> detectadas y especies de micoplasmas.....	55
<b>Tabla 10.</b> Frecuencia de genotipos de ApoE en muestras de pacientes e individuos sanos con presencia y ausencia de micoplasmas y anticuerpos.....	57
<b>Tabla 11.</b> Relación de muestras positivas a <i>Mycoplasma</i> por cultivo y/o PCR, anticuerpos de inhibición metabólica contra <i>M. fermentans</i> , <i>M. penetrans</i> y <i>M. pirum</i> y anticuerpos IgG e IgM contra <i>M. fermentans</i> .....	57

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Distribución de genes ortólogos en el genoma de cuatro especies de <i>Mycoplasma</i> .....	3
<b>Figura 2.</b> Estructura de las lipoproteínas.....	7
<b>Figura 3.</b> Placa para inhibición metabólica.....	35
<b>Figura 4.</b> Gráfica del porcentaje de muestras recibidas para cada una de las enfermedades reumáticas.....	40
<b>Figura 5.</b> Muestras positivas en caldo y agar Eaton.....	41
<b>Figura 6.</b> Cultivo en agar BHI para búsqueda de bacterias aerobias facultativas de interés...	42
<b>Figura 7.</b> Electroforesis en gel de agarosa para visualización de productos de PCR para <i>Mycoplasma</i> spp.....	44
<b>Figura 8.</b> Gráfica del número de muestras positivas para cada especie de <i>Mycoplasma</i> .....	45
<b>Figura 9.</b> Electroforesis en gel de agarosa para <i>Mycoplasma fermentans</i> .....	46
<b>Figura 10.</b> Electroforesis en gel de agarosa para <i>Mycoplasma penetrans</i> .....	46
<b>Figura 11.</b> Electroforesis en gel de agarosa para <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .....	46
<b>Figura 12.</b> Electroforesis en gel de agarosa para <i>Mycoplasma hominis</i> .....	47
<b>Figura 13.</b> Especies identificadas por enfermedad reumática.....	48
<b>Figura 14.</b> Placas para determinación de anticuerpo IM contra <i>M. fermentans</i> , <i>M. pirum</i> y <i>M. penetrans</i> .....	50
<b>Figura 15.</b> Porcentaje de anticuerpos de inhibición metabólica por padecimiento.....	51
<b>Figura 16.</b> Western blot para detección de anticuerpos específicos contra LAMPs de <i>M. fermentans</i> .....	52
<b>Figura 17.</b> Porcentaje de anticuerpos Anti-LAMP de <i>M. fermentans</i> detectados por enfermedad.....	54
<b>Figura 18.</b> Distribución de genotipos de ApoE entre pacientes e individuos sanos.....	56

## Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ALS	Amyotrophic Lateral Sclerosis (Esclerosis lateral amiotrófica)
APS	Antiphospholipid Syndrome (Síndrome antifosfolípido)
Apo E	Apolipoproteína E
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
AR	Artritis reumatoide
BHI	Brain Heart Infusion (Infusión cerebro corazón)
BET	Bromuro de etidio
°C	Grados centígrados
CL	Cardiolipina
CIs	Cardiolipin sintasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
Cys	Cisteína
dNTP	Deoxi-nucleótido trifosfato
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (Ácido etilendiaminotetraacético)
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
EY	Eaton- yema de huevo
FG	Fosfatidilglicerol
G	Gravedades
G-C	Guanina-citocina
Gr	Gramos
HLA	Human leukocyte antigen (Antígeno leucocitario humano)
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleucina
IM	Inhibición metabólica
Kb	Kilobases
LAMP	Lipid-associated membrane proteins (Proteínas de membrana asociadas a lípidos)
LDL	Low-Density Lipoprotein (Lipoproteína de baja densidad)
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
Lnt	N-aciltransferasa
MAM	Mitógeno de <i>Mycoplasma arthritidis</i>
MF	<i>Mycoplasma fermentans</i>

Mg	Miligramos
MG	<i>Mycoplasma genitalium</i>
MH	<i>Mycoplasma hominis</i>
MHC	Major Histocompatibility Complex (Complejo principal de histocompatibilidad)
Min	Minutos
μl	Microlitro
ml	Mililitro
μm	Micrómetro
MN	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
MO	<i>Mycoplasma orale</i>
MP	<i>Mycoplasma penetrans</i>
MPi	<i>Mycoplasma pirum</i>
NBT-BCIP	Nitro blue tetrazolium -5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (Nitro azul de tetrazolium- 5 bromo-cloro-3- indolfosfato)
NLRP	NOD-Like Receptors (Receptores tipo NOD)
Nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAGE-SDS	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio)
Pb	Pares de bases
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampón de fosfatos salino)
PBS-T	Tampón de fosfatos salino-Tween
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PPLO	Pleuropneumonia-Like Organisms (Organismos similares al agente causal de pleuropneumonia)
Rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Dodecilsulfato de sodio)
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
Spp.	Especies
TAE	Tris Acetato EDTA
TLR	Toll-Like Receptors (Receptores tipo Toll)
Tm	Temperature melting (Temperatura de fusión)
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
UCC	Unidades de Cambio de Color
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

## 1. Resumen

Las enfermedades reumáticas son causantes de la pérdida de movilidad y calidad de vida en los pacientes que las padecen; existen diferentes factores predisponentes, las causas no se conocen exactamente. Se ha asociado a *Mycoplasma* en la inducción y/o exacerbación de enfermedades reumáticas, pero los estudios al respecto han sido poco claros. Por otro lado, ApoE se ha visto implicada en la facilitación de la infección de microorganismos con requerimientos de colesterol. El propósito de este estudio fue detectar micoplasmas y anticuerpos contra micoplasmas y contra lipoproteínas y determinar genotipos ApoE en líquido sinovial y suero de pacientes con padecimientos reumáticos para establecer la asociación con las enfermedades reumáticas.

Ochenta y cinco muestras de pacientes con enfermedades reumáticas e individuos sanos se analizaron por cultivo y PCR para identificar micoplasmas, se detectaron anticuerpos de inhibición metabólica para *M. fermentans*, *M. penetrans* y *M. pirum* y anticuerpos IgG e IgM contra LAMP de *M. fermentans* por Western-blot.

Las muestras de individuos sanos fueron negativas por cultivo, mientras que en los pacientes 4 fueron positivas. Por PCR se detectó a micoplasmas en el 11% de individuos sanos y en el 34% de pacientes. El 55% de las muestras positivas fueron pacientes con artritis reumatoide. *M. fermentans* fue la especie más frecuentemente identificada entre los pacientes. Se identificaron anticuerpos de inhibición metabólica en el 86% de los pacientes y en el 30% de los individuos sanos. Se encontraron anticuerpos IgG contra LAMP de *M. fermentans* en el 68% de los pacientes y en el 18% de los individuos sanos, e IgM en 7% de los pacientes. El genotipo de ApoE4 se encontró en el 20% de pacientes y en el 7% de individuos sanos. El 87% de los genotipos ApoE4 fueron positivos a micoplasmas o sus anticuerpos.

Se concluyó que el aislamiento de *Mycoplasma*, la presencia de anticuerpos contra micoplasmas y anti-LAMP, y el genotipo ApoE4, están relacionados con pacientes con enfermedades reumáticas en comparación con los individuos sanos.

## 2. Introducción

### 2.1 Características generales de micoplasmas

El primer reporte del que se tiene registro sobre el cultivo exitoso de micoplasmas fue en el año de 1898 por los investigadores Nocard y Roux, aunque ya antes habían sido asociado con la pleuroneumonía bovina, por lo que posteriormente se asignó el nombre *Mycoplasma* a todos los microorganismos parecidos a los causantes de pleuroneumonía (Pleuroneumonia like organisms o PPLO) (Cedillo & Yañez, 2003).

Actualmente se conocen más de 200 especies distintas que infectan plantas, animales y humanos (Adamu *et al.*, 2013; Borchsenius *et al.*, 2019). Hasta el momento está bien documentado que siete especies tienen capacidad de colonizar y llegar a causar enfermedad en humanos: *M. pneumoniae*, *M. fermentans*, *M. salivarium*, *M. hominis*, *M. penetrans*, *Ureaplasma parvum* y *U. urealyticum* (Citti & Blanchard, 2013).

Estos microorganismos se clasifican dentro del filo *Tenericutes*, clase *Mollicutes*, orden *Mycoplasmatales*, familia *Mycoplamataceae* y género *Mycoplasma* (Cedillo & Yañez, 2003; Maniloff *et al.*, 1992). Son considerados los organismos procariones más pequeños que conservan la capacidad de replicarse y vivir de forma independiente. El diámetro dependiendo de la especie, va de los 200 nanómetros (nm) a los 800 nm aproximadamente (da Rocha Sobrinho *et al.*, 2011; Nolan *et al.*, 2016).

#### 2.1.1 Genoma

Debido a un proceso de evolución degenerativa a partir de una bacteria Gram positiva hace aproximadamente 600 millones de años, los micoplasmas han perdido parte de su genoma por lo que el tamaño del mismo es reducido, midiendo entre 580 y 2200 kilobases (kb) con un contenido de citosina-guanina (C-G) bajo, entre 24% y 33% (Chaudhry, Ghosh, & Chandolia, 2016; Roachford, Nelson, & Mohapatra, 2019).

Dada la escasa cantidad de genes, también poseen pocos sistemas enzimáticos y algunos de ellos se encuentran incompletos para la síntesis de precursores,

volviéndolos dependientes de los nutrientes provistos por el hospedero. A pesar de su poca capacidad metabólica, los micoplasmas suelen ser exitosos en diferentes ambientes y se debe, entre otras cosas, a la adaptación de su material genético manteniendo sistemas transportadores en su membrana para la captura de carbohidratos, oligopéptidos, ADN, coenzimas y lípidos (Rivera-Tapia, Cedillo, & Giono, 2006), además de ciertas vías enzimáticas para su conversión en energía o su utilización en la producción de precursores como purinas, pirimidinas, ácidos grasos y aminoácidos necesarios para el metabolismo (Figura 1) (Nicholas, Rosales, & Loria, 2017; Roachford, Nelson, & Mohapatra, 2017).

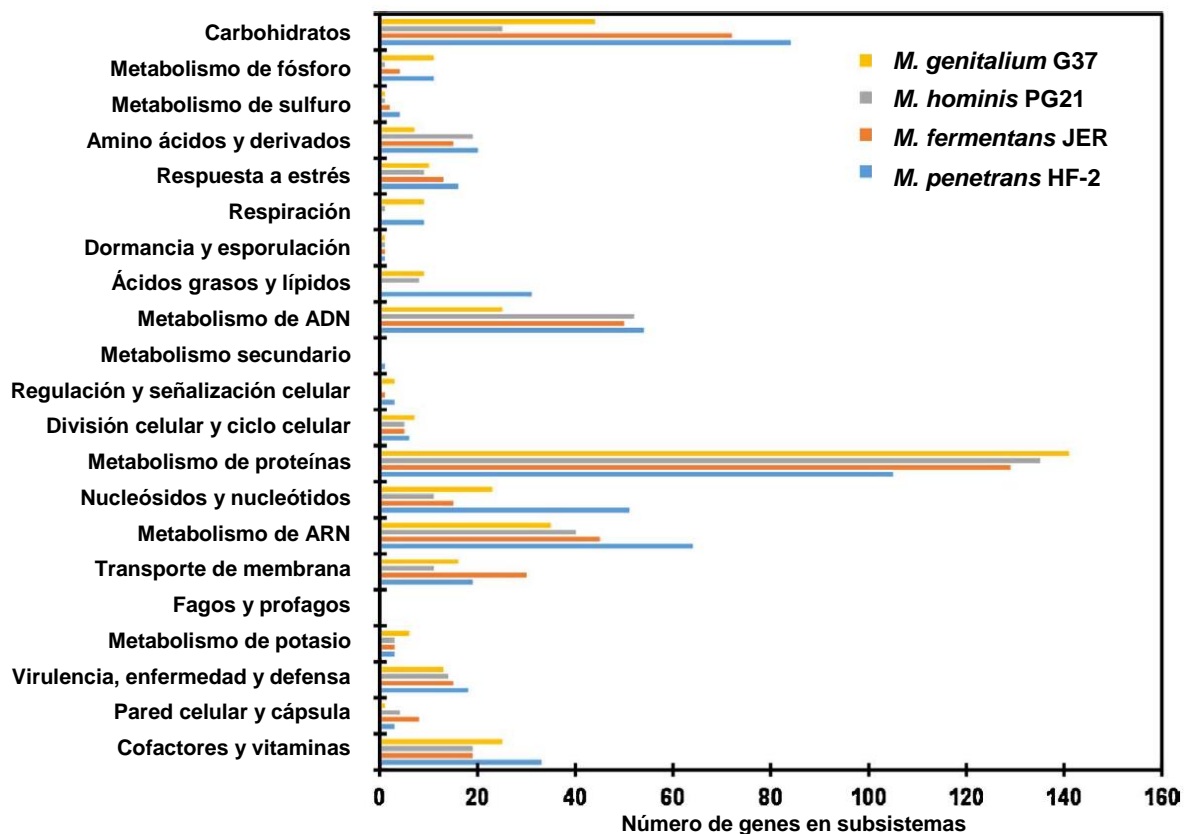


Figura 1. Distribución de genes ortólogos en el genoma de cuatro especies de *Mycoplasma*.

(Tomado de Roachford *et al.*, 2017).

Dentro de los genes ortólogos que se conservan entre las especies de micoplasmas, predominan aquellos implicados en el transporte de nutrientes como el sistema para glucosa CUT-2, o para oligopéptidos *Opp* que comparten al menos



parcialmente *M. pneumoniae*, *M. pulmonis*, *M. penetrans*, *M. genitalium*, *M. gallisepticum*, *M. mycoides*, *U. urealyticum*, *M. hyopneumoniae*, *M. mobile* y *M. synoviae*, genes implicados en replicación, transcripción, traducción y metabolismo de ácidos nucleicos y proteínas, sobre todo para la producción de lipoproteínas de membrana (Masukagami *et al.*, 2017; Roachford *et al.*, 2017).

Debido a la necesidad de suplir sus deficiencias metabólicas, son considerados microorganismos parasíticos de las células hospederas, pero pueden crecer en medios libres de células suplementados con azúcares, arginina, urea, esteroides, lipoproteínas y ácidos grasos, siendo por estas razones microorganismos fastidiosos para cultivar (Cedillo & Yañez, 2003; Román, 2002).

### **2.1.2 Membrana plasmática**

Otra característica de los micoplasmas es la carencia de pared celular y membrana externa, por lo que únicamente están limitados por una membrana plasmática rica en colesterol. La falta de pared les confiere la habilidad de ser pleomorfos, esto es que adquieren diferentes formas (cocoide, ovoide y filamentosa) (Maniloff *et al.*, 1992) y provee las condiciones para que los componentes de la membrana interactúen directamente con las células para facilitar la adhesión, el reconocimiento antigénico y la fusión (Huang *et al.*, 2019).

### **2.1.3 Lípidos**

En la membrana plasmática se encuentran casi todos los lípidos contenidos en los micoplasmas y está conformada por tres clases: esteroides, glicolípidos y fosfolípidos. Los lípidos neutros (principalmente colesterol no esterificado) conforman el 35 a 50% de la fracción lipídica y los lípidos polares constituyen el 50 a 65% (Kornspan & Rottem, 2012).

Los micoplasmas dependen de los ácidos grasos y colesterol del medio para incorporarlos a su membrana y se ha observado que preferentemente toman colesterol no esterificado aún con la disponibilidad de mayores cantidades de colesterol esterificado. La forma de captura es tomándolo directamente de las lipoproteínas del hospedero por sus receptores (Toledo & Benach, 2015).

Así mismo, incorporan los fosfolípidos esfingomielina y fosfatidilcolina del medio, la primera sin llevar a cabo modificaciones y la segunda adicionando ácidos grasos a su estructura. En diversas especies de *Mycoplasma* se han encontrado los genes necesarios para la síntesis de fosfatidilglicerol (FG) a partir del cdp-diacilglicerol, mientras que solo en algunas se localizó el gen de la cardiolipina sintasa (cls), lo que implica que en general, los micoplasmas tienen la capacidad de sintetizar de *novo* FG, pero solo algunos producen cardiolipina (CL) (Rottem, 2016).

En el caso particular de *M. fermentans*, la porción de FG y CL en la membrana constituye únicamente el 15-20% del total de lípidos fosforilados debido a la existencia de colin-fosfoglicolípidos sintetizados por él mismo, los cuales representan el 30 a 40% de los lípidos fosforilados, hasta el momento se ha documentado la existencia de seis colin-fosfoglicolípidos: MfGL-I, MfGL-II, MfEL, liso-MfEL, GGPL-I y GGPL-II, los cuales parecen jugar un rol en la patogenicidad al inducir la producción de citocinas como factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) en bajas concentraciones (Kornspan & Rottem, 2012; Rottem, 2016).

### 2.1.4 Proteínas y lipoproteínas

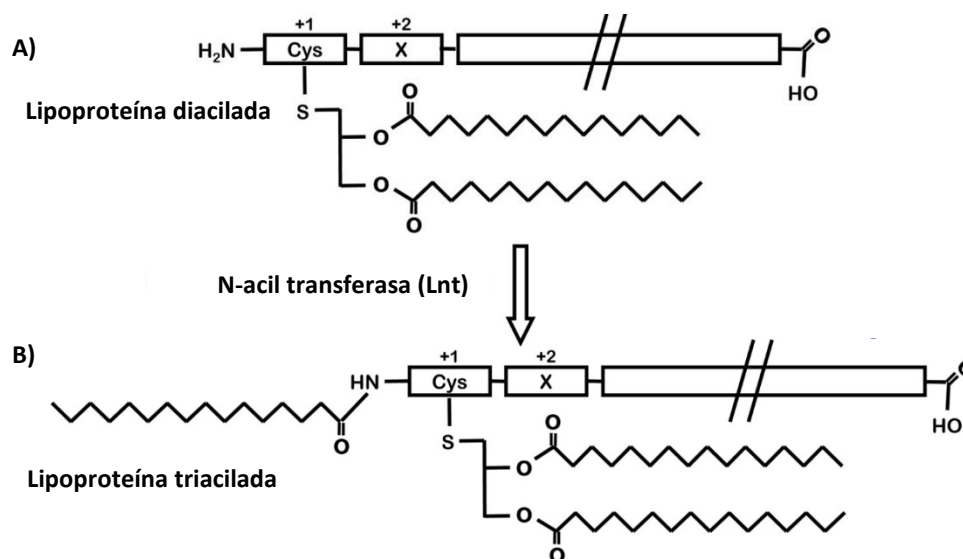
A diferencia de otros procariotes, en los micoplasmas las proteínas constituyen dos terceras partes de la membrana plasmática, las cuales se encuentran divididas en dos categorías, las proteínas integrales, embebidas en la membrana y las proteínas periféricas adheridas por uniones electrostáticas, y dentro de esta porción están las lipoproteínas también denominadas proteínas asociadas a lípidos de membrana o LAMP por sus siglas en inglés (Ni *et al.*, 2015; You, Zeng, & Wu, 2006).

Las LAMP son expresadas en la superficie por lo que, al carecer de pared celular, son las principales estructuras que interaccionan con las células del hospedero. Han ganado importancia en investigación debido a su alta antigenicidad para la inducción de la respuesta inmunológica contra micoplasmas (He *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017). Se asocian con la capacidad de adaptación a diferentes ambientes, transporte de nutrientes, apoptosis y funciones asociadas a la virulencia como adhesión, evasión de la respuesta inmune e inmunomodulación (Kovacs-Simon, Titball, & Michell, 2011; Wang *et al.*, 2017; Xiong *et al.*, 2016).

Un ejemplo de lipoproteína que forma parte de transportadores ABC es OppA en *M. hominis*, se encuentra codificada dentro del operon Opp y funciona como proteína de unión a oligopéptidos, sirve como adhesina y tiene actividad de ATPasa. En otros micoplasmas han sido encontradas proteínas homologas a OppA dentro del mismo operón por lo que parecen tener un papel importante en el crecimiento y virulencia (Browning *et al.*, 2011).

La alta cantidad de lipoproteínas en la membrana de *Mycoplasma* es atribuida en parte a la falta del espacio periplásmico, así las proteínas con señal para ser exportadas quedan ancladas en la membrana a través de la incorporación de ácidos grasos que impiden la liberación al exterior y permiten el ejercicio de la actividad requerida (Razin, Yogev, & Naot, 1998). De hecho, muchas de las lipoproteínas de membrana de *Mycoplasma* cumplen funciones similares a las lipoproteínas periplásmicas de las bacterias Gram negativas (Browning *et al.*, 2011).

Su estructura está constituida por una parte peptídica con una cisteína en el N-terminal, y una parte lipídica conformada por un diacilglicerol unido al residuo tiol de la cisteína del N-terminal. En la mayoría de los casos, el grupo amino de la cisteína no está acilado como en los Gram negativos y algunos Gram positivos donde el grupo amino se encuentra unido a un tercer ácido graso (Figura 2) (Konovalova & Silhavy, 2015; Zückert, 2014). Asimismo, el gen que codifica para la de la N-acil transferasa (Lnt) encargada de realizar dicha unión, no ha sido encontrado en el genoma de *M. pneumoniae* ni *M. genitalium*. Sin embargo, algunos estudios confirmaron la presencia de ambas formas de lipoproteínas en *M. gallisepticum* (Kovacs-Simon *et al.*, 2011). Esto tiene grandes implicaciones ya que las proteínas diaciladas o triaciladas tienen efectos diferentes en el reconocimiento por los receptores tipo Toll (TLR) (Christodoulides *et al.*, 2018; You *et al.*, 2006).



**Figura 2. Estructura de las lipoproteínas.**

A) Lipoproteína madura unida a diacilglicerol en el grupo tiol de la cisteína. B) En algunas especies la lipoproteína madura tiene un ácido graso adicional en el residuo amino de cisteína unido por la N-ácil transferasa Lnt (Tomado de Kovacs-Simon et al 2011).

Las lipoproteínas de membrana tienen la capacidad de proteger a los micoplasmas evadiendo la respuesta inmune y permitiendo su adaptación a diferentes ambientes. Esto lo hacen a través de sistemas que han desarrollado para realizar variación de fase y tamaño sobre la expresión de diferentes familias de genes que codifican para lipoproteínas relacionadas (Christodoulides *et al.*, 2018).

Los principales mecanismos para la variación de fase se basan en el control de la expresión de genes mediante inserciones o deleciones de nucleótidos en secuencias repetidas en tándem ubicadas en los promotores, impidiendo o permitiendo su reconocimiento por la polimerasa. Otra forma es mediante el rearrreglo del material genético con ayuda de una recombinasa sitio específico, la cual ubica un gen delante de un promotor funcional y permite su expresión (Citti, Nouvel, & Baranowski, 2010; Orlov *et al.*, 2018). Un segundo sistema es la producción de variantes de distintos tamaños a partir de un mismo gen. Estas familias de péptidos tienen en común una región conservada en la porción N-terminal y dominios externos divergentes que consisten en secuencias reiteradas que sufren contracción o expansión generando variantes de tamaño (Razin *et al.*, 1998).

De esta manera, a pesar de la poca cantidad de genes, es posible codificar a partir de ellos, un amplio repertorio de antígenos de superficie, evitando la eliminación y jugando un papel importante en la adherencia (Citti *et al.*, 2010).

Por otro lado, las lipoproteínas son capaces de funcionar como antígenos y estimular células epiteliales e inmunes como macrófagos, mediante su reconocimiento por receptores tipo Toll (TLR), induciendo la secreción de citocinas, quimocinas, prostaglandinas y óxido nítrico (Cacciotto *et al.*, 2016; You *et al.*, 2006) y contribuyendo al establecimiento de los micoplasmas (Adamu *et al.*, 2013).

## **2.2 Respuesta inmune desencadenada por *Mycoplasma***

Algunos micoplasmas se establecen en la superficie, e incluso logran penetrar dentro de la célula, para ello emplean una estructura denominada organelo terminal o de adherencia, la cual se forma en un extremo del microorganismo gracias a la organización de fibras y lipoproteínas que funcionan como adhesinas capaces de reconocer y unirse a componentes del hospedero (McGowin & Totten, 2017). Existe una amplia cantidad de lipoproteínas en diferentes especies que auxilian en el proceso, tal es el caso de la P1 de *M. pneumoniae* y P110 y 140 de *M. genitalium* localizadas en la punta del organelo terminal las cuales se adhieren a fibronectina y receptores de ácido siálico (Aparicio *et al.*, 2018; D'Alonzo *et al.*, 2018).

Los micoplasmas activan las respuestas humoral y celular, sin embargo, también poseen la capacidad de evadirlas, exacerbarlas o suprimirlas mediante diferentes mecanismos. Esta habilidad de modulación contribuye a sus propiedades patogénicas permitiéndoles producir infecciones crónicas persistentes y en algunos casos reacciones de hipersensibilidad y autoinmunidad. Por lo tanto, la resolución de la infección depende en buena medida de la eficiencia con que se monte la respuesta del hospedero para evitar la adaptación al nicho ecológico (Borchsenius *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019). En la Tabla 1 se muestran algunas lipoproteínas con capacidad inmunomoduladora entre especies de aisladas de humanos.

**Tabla 1. Lipoproteínas inmunomoduladoras de especies de *Mycoplasma***

Lipoproteína/Gen	Especie de <i>Mycoplasma</i>	Función original	Efecto inmunomodulador
<b>MPN052, MPN162, MPN415, MPN602, MPN611</b>	<i>M. pneumoniae</i>	Subunidad $\beta$ ATP sintasa F0F1	Activación de NF- $\kappa$ B, lipoproteína diacilada proinflamatoria
<b>MPN597</b>	<i>M. pneumoniae</i>	Subunidad $\varepsilon$ ATP sintasa F0F1	Inducción de inflamación, activación de autofagia vía TLR4
<b>MPN611 MPN162</b>	<i>M. pneumoniae</i>	-	Activación de NF- $\kappa$ B a través de TLR
<b>MG-142 MG-149</b>	<i>M. genitalium</i>	-	Activación de NF- $\kappa$ B a través de TLR
<b>MPN372</b>	<i>M. pneumoniae</i>	Toxina ribosilante, toxina CARDS	Induce vacuolización extensiva y muerte celular de células de mamífero, facilita adhesión a proteína A surfactante, activación de inflammasoma
<b>MPN333</b>	<i>M. pneumoniae</i>	Transportador ABC	Activación de autofagia mediada por TLR4
<b>MPN142, MPN447</b>	<i>M. pneumoniae</i>	Citadherencia	Activación del inflammasoma
<b>MPN453, Lp44</b>	<i>M. salivarium</i>	Citadherencia	Activación del inflammasoma
<b>MPN141</b>	<i>M. pneumoniae</i>	Citadherencia, adhesina P1	Inducción de citosinas proinflamatorias

Tomado de Christodoulides *et al.*, 2018

Una vez que ingresan, los antígenos de superficie como lipoproteínas y lípidos de membrana MfGL-II funcionan como patrones moleculares que son reconocidos por las células epiteliales y macrófagos del hospedero mediante TLR1, TLR2, TLR6 y TLR4 (Chaudhry *et al.*, 2016; Naghib *et al.*, 2018; Parrott, Kinjo, & Fujita, 2016), la proteína CD14 facilita el reconocimiento al formar un complejo entre las LAMP y receptor (He *et al.*, 2014). NLRP3 también reconoce las lipoproteínas, llevando al procesamiento y liberación de IL-1 $\beta$  (Saeki *et al.*, 2018).

A partir de la unión a TLR se induce la activación de distintas vías de señalización a través de MyD88 como JNK, ERK, AP-1, p38 y NF- $\kappa$ B (Afriat, Horowitz, & Priel, 2013; Beaudet *et al.*, 2019), que llevan a la expresión y liberación de citocinas IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , entre otras (Fourour *et al.*, 2019; Saraya 2017), induciendo la activación y reclutamiento de polimorfonucleares, macrófagos, linfocitos B y T (Cacciotto *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2019). Por otra parte, el mitógeno de *M. arthritidis* (MAM) tienen el potencial de superantígeno activando linfocitos T (Mu *et al.*, 2016; Shio *et al.*, 2014).

Los micoplasmas logran disminuir la respuesta inmune al inducir la síntesis de IL-10 inhibiendo las funciones de las células presentadoras de antígeno (CPA) y suprimiendo la producción de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-12, dando como resultado la falta de signos clínicos durante la infección (You *et al.*, 2006).

Otro mecanismo empleado para la supresión, es la disminución en la concentración de arginina, nutriente necesario para el desarrollo de las células implicadas en la respuesta inmunológica. Estos microorganismos cuentan con un sistema capaz de hidrolizar la arginina, por lo tanto, las células inmunes no proliferan (Margarita *et al.*, 2016).

Al ser parásitos obligados, necesitan desarrollar mecanismos de sobrevivencia a largo plazo, uno de ellos es la variación antigénica de fase y tamaño de las lipoproteínas mencionadas anteriormente. Por otro lado, gracias a la función de glicosiltransferasas logran glicosilar lípidos, proteínas y lipoproteínas de su superficie, ocasionando en algunos casos, la producción de antígenos que inducen autoinmunidad en el hospedero. Otro mecanismo consiste en la evasión del reconocimiento gracias a la presencia de epítomos antigénicos en su membrana que semejan componentes de superficie de las células hospedadoras, por lo que no son reconocidos como agentes extraños. Este mimetismo está implicado en la formación de autoanticuerpos contra las células epiteliales que desencadenarían enfermedades autoinmunes inflamatorias entre las que se encuentra la artritis reumatoide (Atkinson, 2018; da Rocha Sobrinho *et al.*, 2011).

## **2.3 Principales especies de *Mycoplasma* causantes de enfermedad en humanos**

### **2.3.1 *Mycoplasma pneumoniae***

También conocido como agente de Eaton, mide 1–2  $\mu\text{m}$  de largo y 0.1–0.2  $\mu\text{m}$  de ancho, cuenta con un genoma de 816 394pb y 687 genes, requiere de colesterol para su crecimiento y se caracteriza por poseer un órgano de adhesión con las lipoproteínas P1, P30, P90 y P40. Es un patógeno del tracto respiratorio y afecta principalmente a niños, se caracteriza por producir una neumonía atípica adquirida en la comunidad. La infección suele ser autolimitada, generalmente asintomática,

pero en el 1 a 10% de los pacientes se propaga a sistema nervioso central, causando encefalitis, meningitis e infarto cerebral. También se asocia con aterosclerosis y artritis reactiva (Li *et al.*, 2019; Mélé & Turc, 2018; Parrott *et al.*, 2016).

### **2.3.2 *Mycoplasma fermentans***

Anteriormente había sido considerado un oportunista para el humano, pero se determinó que juega un papel importante como cofactor del VIH, causa infecciones en el tracto genitourinario y respiratorio, artritis reumatoide, síndrome de fatiga crónica, fibromialgia y enfermedades del sistema nervioso. Cuenta con aproximadamente 1 millón de pares de bases y 900 genes, se une e invade a las células hospedadoras y es capaz fusionarse con ellas (Cheng *et al.*, 2017; Kawahito *et al.*, 2008).

### **2.3.3 *Mycoplasma hominis***

Posee aproximadamente 700 000pb y 600 genes, su órgano de adhesión no está bien definido a diferencia de otras especies, aun así, tiene la capacidad de invadir células HeLa. Generalmente se encuentra como parte de la flora normal en el tracto vaginal, aunque se ha visto su asociación con infecciones urogenitales, enfermedad inflamatoria pélvica, partos pretérmino y vaginosis asociada a *Trichomonas*, *Chlamydia* y *Neisseria gonorrhoeae* (Roachford *et al.*, 2017).

### **2.3.4 *Mycoplasma genitalium***

Su genoma mide 580 000pb y cuenta con 518 genes, es un patógeno intracelular facultativo, muy relacionado con *M. pneumoniae*. Está implicado en uretritis en hombres y cervicitis en mujeres. Cuenta con un órgano de adhesión caracterizado por poseer principalmente las lipoproteínas P140 y P110 que funcionan como adhesinas. Después de la adhesión a las células del hospedero, tiene la capacidad de internalizarse para evadir la respuesta inmune y causar infecciones crónicas (Aparicio *et al.*, 2018).



## 2.4 Enfermedades autoinmunes

Se caracterizan por la pérdida de tolerancia sobre los antígenos propios por lo que las moléculas, células y tejidos se convierten en blancos de la respuesta inmune (Zhang *et al.*, 2017).

Existen cerca de 100 diferentes enfermedades autoinmunes, aunque la prevalencia en la población es baja (3-5%), la morbilidad y mortalidad son significativas. El desarrollo de una enfermedad autoinmune se asocia con una predisposición genética, por ejemplo alelos específicos del antígeno leucocitario humano (HLA), nutrición del paciente, microbiota, hormonas, factores externos como agentes xenobióticos como solventes, metales, tabaco y agentes infecciosos (Wang, Wang, & Gershwin, 2015).

Los microorganismos han sido ampliamente estudiados como causantes de enfermedades autoinmunes e inflamatorias posteriormente desarrolladas a una infección. Uno de los mecanismos por el que sucede el desencadenamiento o exacerbación es por el mimetismo molecular, debido a que algunas de las estructuras de los agentes guardan similitud con las del huésped y la respuesta montada también ataca a los antígenos propios (Arleevskaya *et al.*, 2018; Chu *et al.*, 2019).

### 2.4.1 Artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por sinovitis erosiva y persistente e inflamación sistémica que produce daño a las articulaciones y cartílago, discapacidad y decremento de la calidad de vida (Alunno *et al.*, 2017). La etiología aún no es bien conocida pero se sabe que están implicados factores ambientales, hormonales, herencia e inmunidad (Horta-Baas *et al.*, 2017; Shokrollahi *et al.*, 2017).

Entre los factores externos desencadenantes se han estudiado varios agentes infecciosos incluyendo bacterias, hongos y virus. Han sido asociados *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Mycoplasma*, enterobacterias citomegalovirus, virus de Epstein Barr, entre otros (Arleevskaya *et al.*, 2018; Atee *et al.*, 2015).

Por otro parte, esta enfermedad está estrechamente ligada al incremento en el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular y aterosclerosis. La asociación está dada porque tanto la aterosclerosis como AR tienen procesos patológicos similares, un ejemplo de ellos es que ambos padecimientos tienen infiltración de células inmunes como macrófagos y células TH1, la expresión de moléculas de adhesión celular está incrementada, existe neovascularización y hay degradación del cartílago, comparten factores de riesgo genéticos como los polimorfismos en HLA-DRB1 y MHC2TA y factores de riesgo ambientales como ser fumador, padecer obesidad y diabetes. En la artritis reumatoide hay un desbalance en los niveles de lípidos, donde el HDL se reduce significativamente en comparación con el LDL produciendo un índice aterogénico elevado, dando como resultado la generación de placa aterógena. (Mahmoudi *et al.*, 2017; Skeoch & Bruce, 2015).

#### **2.4.2 Espondilitis anquilosante**

Es una enfermedad autoinmune perteneciente al grupo de las espondiloatropatías, se caracteriza por inflamación crónica del esqueleto axial, principalmente las articulaciones sacroiliacas, llevando a la formación de hueso nuevo produciendo la unión de las vértebras, lo cual impide la movilidad. Afecta principalmente a hombres, no se conoce con exactitud las causas pero existen algunos factores predisponentes como la presencia del antígeno leucocitario humano HLA-B27, el medio ambiente, el consumo de alcohol, la dieta e infecciones (Chen *et al.*, 2019; Maksymowych, 2019).

En pacientes con esta enfermedad se ha encontrado mayor cantidad de anticuerpos contra *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia* en comparación con personas sanas (Öğrendik 2017). También ha sido asociada con *Klebsiella* y microorganismos de la microbiota intestinal como *Bacterioides*, *Enterococcus* y *Staphylococcus* (Cypers, Bridges, & Elewaut, 2018).

#### **2.4.3 Artritis reactiva**

También conocida como síndrome de Reiter, es otra forma de espondiloartropatía. Se define como una artritis no purulenta o estéril que es desencadenada por una

infección, generalmente ocurrida en un sitio distante, por tanto, el microorganismo causante casi nunca se aísla del sitio comprometido. Las infecciones pulmonares, gastrointestinales y genitourinarias son las más comunes asociadas al desarrollo del padecimiento. Se caracteriza por producir inflamación asimétrica o en una sola articulación, siendo más vulnerables las extremidades y las uniones sacroiliacas. La enfermedad se manifiesta algunas semanas post-infección y los individuos jóvenes son más susceptibles. Al igual que otras espondiloatropatías, la presencia del HLA-B27 es predisponente para su desarrollo (Bardin, 2018; Schmitt, 2017).

Varios microorganismos funcionan como desencadenantes, por ejemplo se han reportados casos asociados a infecciones con *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Chlamydia*, *Staphylococcus aureus*, *Borrelia burgdorferi*, *Helicobacter cinaedi*, *Clostridium difficile*, *Haemophilus influenzae*, *Ureaplasma urealiticum* y *Mycoplasma pneumoniae* (Harjacek, Ostojic, & Rode, 2006).

#### **2.4.4 Eritema nodoso**

Es un proceso inflamatorio caracterizado por la formación de lesiones nodulares infiltrativas, se presenta principalmente en las piernas, y en menor medida en muslos, tronco y extremidades superiores. Las lesiones suelen ser dolorosas, pero evolucionan en un periodo de 2 a 8 semanas sin dejar cicatriz. La patogenia no se conoce con certeza pero parecen estar implicados diferentes mecanismos como hipersensibilidad retardada tipo IV, depósito de complejos inmunes y formación de anticuerpos (Varas *et al.*, 2016).

La causa del eritema nodoso es difícil de determinar, pero están asociados factores como infecciones, inflamación, autoinmunidad y empleo de fármacos como sulfonamidas, amoxicilina y anticonceptivos orales. Dentro de las infecciones, las más comúnmente asociadas son las respiratorias por estreptococo  $\beta$ -hemolítico del grupo A, seguida de *Mycobacterium tuberculosis*, gastroenteritis por *Yersinia* y *Salmonella enteritidis*, otras por *Bartonella* y *Mycoplasma* (Ibáñez, 2014).

## 2.5 Asociación entre *Mycoplasma* y enfermedades autoinmunes

Con frecuencia los micoplasmas se ven asociados con el desencadenamiento de diferentes enfermedades autoinmunes, entre los sitios que comúnmente se encuentran involucrados en la autoinmunidad causadas por estos microorganismos podemos mencionar al sistema nervioso, piel, sistema circulatorio y músculo-esquelético (Atkinson, 2018).

Se ha reportado que las lipoproteínas, lípidos y superantígenos pueden desencadenar o exacerbar artritis reumatoide, artritis reactiva, espondilitis anquilosante, eritema nodoso, esclerosis lateral amiotrófica, entre otras. Los micoplasmas implicados incluyen *M. pneumoniae*, *M. fermentans*, *U. urealyticum* y *M. arthritidis* (George *et al.*, 2015; Gil *et al.*, 2009; Gil *et al.*, 2014; Mu *et al.*, 2016; Scharf *et al.*, 2015).

Como se mencionó anteriormente, la puesta en marcha de los mecanismos patogénicos de *Mycoplasma* en el huésped, desencadena cambios inmunológicos como la liberación desregulada de citocinas, producción de autoanticuerpos y activación de células inmunes (da Rocha Sobrinho *et al.*, 2011; He *et al.*, 2014). A pesar de la relación aparentemente existente, la prevalencia de este microorganismo en líquido sinovial y en sangre de personas con enfermedades autoinmunes o inflamatorias aun no es completamente clara, por lo que se requiere mayor evidencia para determinar dicha relación (Ataee *et al.*, 2015).

## 2.6 Apolipoproteína E

Es una proteína miembro de la familia de las apolipoproteínas humanas, esencial en el metabolismo de lípidos. Es sintetizada principalmente en el hígado y en menor cantidad por cerebro, riñones, macrófagos, adipocitos, células musculares y de la piel. Juega un rol importante en el transporte de lípidos como colesterol y triglicéridos, así como en el metabolismo de lipoproteínas. Se encuentra codificada en el gen APOE ubicado en 19q13. Esta proteína tiene alelos diferentes dependiendo de cambios puntuales en las bases. Las principales tres isoformas E2, E3 y E4 son producidas por polimorfismos de un solo nucleótido en los lugares 112 y 158 del gen, dando como resultado cambios en los aminoácidos cisteína (Cys) y

arginina (Arg). La forma APOE  $\epsilon$ 3 es la más común en la población, presenta Cys en la posición 112 y Arg en la 158, APOE  $\epsilon$ 2 cambia a Cys112/Cys158 y APOE  $\epsilon$ 4 a Arg112/Arg158. Gracias a la combinación de los 2 alelos se obtienen 6 genotipos diferentes: homocigotos para E2/E2, E3/E3, E4/E4 y heterocigotos E2/E3, E3/E4 y E2/E4 (Liehn *et al.*, 2018).

Todos los alelos exhiben diferentes fenotipos, E2 presenta una afinidad disminuida por el receptor de apoE en el hígado, por lo tanto, las personas con este fenotipo tienen una captación disminuida de lipoproteínas ricas en triglicéridos y expresión aumentada de receptores de LDL, por lo tanto, los niveles de triglicéridos en sangre incrementan y las concentraciones de colesterol total y LDL se reducen, induciendo hiperlipidemias tipo III. En el caso del fenotipo E4 la afinidad de apoE por los receptores es ligeramente mayor que en E3, por lo que hay una captura mayor de lipoproteínas ricas en triglicéridos y los receptores para LDL sufren una regulación negativa, ocasionando niveles aumentados en sangre de colesterol LDL y total debido a la pobre recaptura por los hepatocitos y la disminución de triglicéridos. Este fenotipo se asocia con un riesgo alto de enfermedad cardiovascular, aterosclerosis y Alzheimer así como predisposición para contraer infecciones por algunos microorganismos con requerimientos de colesterol (García, 2003; D. Wang *et al.*, 2018).

## **2.7 Relación entre isoformas de Apolipoproteína E, enfermedades autoinmunes y *Mycoplasma***

Como se veía anteriormente, la artritis reumatoide y algunas formas de espondiloatropatías son multifactoriales, muchas de ellas son desencadenadas después de una infección. Sin embargo es bien conocido que no todos los individuos que tienen una infección desarrollarán una enfermedad autoinmune, esto depende del fondo genético de cada uno de los individuos, uno de los principales genes asociados al desarrollo de la enfermedad es el antígeno leucocitario humano HLA-B27, y es posible que otros genes también estén involucrados (Gérard *et al.*, 1999; Toms *et al.*, 2012).

Las diferentes isoformas de ApoE producen cambios en el perfil de lípidos, sobre todo E4, que incrementa el colesterol y LDL. Se ha visto que E4 facilita la colonización de microorganismos como *Chlamydia pneumoniae*, debido a su requerimiento de lípidos y a su vez esta bacteria lleva a la producción de artritis reactiva o reumatoide (Gérard *et al.*, 2008). *Mycobacterium leprae* también ve favorecida su supervivencia en macrófagos por el aumento de lipoproteínas y colesterol en el fenotipo E4 (Wang *et al.*, 2018). Por otro lado, los micoplasmas también requieren colesterol para su crecimiento y son posibles causas de inducción de artritis y otras enfermedades reumáticas. Sin embargo, aún faltan más trabajos para dilucidar el papel que juegan en el desarrollo de enfermedades reumáticas y la relación que guardan con las isoformas de apolipoproteína E.

### 3. Antecedentes

Desde hace tiempo se ha estudiado la asociación entre la infección y la inflamación. La Organización Mundial de la Salud (OMS), con el propósito de lograr un mayor entendimiento de la relación entre infección y compromiso articular realizó una clasificación en cuatro categorías principales: artritis séptica, artritis post infecciosa, artritis reactiva y síndrome articular inflamatorio (Espinoza & García-Valladares, 2013).

El desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular, genéticas e inmunológicas ha permitido la identificación de los agentes infecciosos causales así como de sus antígenos, por lo que la información respecto a la relación existente entre infección y enfermedades reumáticas debe ser constantemente actualizada (Espinoza & García-Valladares, 2013).

A nivel mundial se ha estudiado la asociación entre *Mycoplasma* y la artritis y otras enfermedades reumáticas. En 2015, Ataee y colaboradores diseñaron una PCR múltiple para la detección simultánea de *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycoplasma arthritidis* en líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide. Se utilizaron 131 muestras a las que se les realizó extracción de ADN, PCR y secuenciación de los productos obtenidos. Se encontró a *M. pneumoniae* en 30 muestras (22.9%), *M. hominis* en 23 (17.5%) y a *M. arthritidis* en 13 (9.9%). En

total los microorganismos fueron identificados en el 53.4% de líquidos sinoviales de pacientes, lo que sugiere un posible rol de los micoplasmas en la fisiopatología de la artritis reumatoide (Ataee *et al.*, 2015).

En otro estudio, Buchsel y colaboradores reportaron un caso de artritis séptica causada por *Mycoplasma salivarium* en un paciente con leucemia linfocítica crónica de células B, el cual fue sometido a quimioterapia con rituximab y bedamustin. La identificación se realizó por medio de PCR de 16S y la susceptibilidad mediante test *in vitro*, resultando ser una cepa resistente a ciprofloxacino y claritromicina. Aun cuando *M. salivarium* no es asociado comúnmente como agente causal en pacientes inmunocomprometidos, la enfermedad precedente y el tratamiento pudieron jugar un papel predisponente para causar la enfermedad infecciosa (Büchsel *et al.*, 2016).

En 2017, un grupo de investigación identificó a *M. pneumoniae* en líquido sinovial de niños con artritis mediante cultivo, serología y PCR. Se estudiaron 73 pacientes de los cuales 18 (25.4%) fueron diagnosticados con artritis séptica. 50 pacientes con cultivo negativo para micoplasmas se sometieron a serología y PCR para la detección de *M. pneumoniae*. Dos pacientes (4%) mostraron un resultado positivo por PCR, indicativo de infección activa y posible causa de la artritis, 17 pacientes (33.3%) fueron positivos para IgG, lo cual pone de manifiesto un contacto previo con *Mycoplasma*, y 2 pacientes (4%) positivos para IgM, sugiriendo una infección actual o muy reciente (Shokrollahi *et al.*, 2017).

Así mismo se han realizado diversos estudios en América donde también se pone de manifiesto la posible relación existente entre *Mycoplasma* y enfermedades reumáticas. En Brasil, da Rocha y colaboradores detectaron anticuerpos contra el superantígeno MAM y contra LAMP de *M. hominis* y *M. fermentans* en suero de pacientes afectados por artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico (LES). Se detectaron anticuerpos IgG contra MAM en 27.5% de pacientes con AR, en 18.8% en pacientes sanos y en 21.7% de pacientes con LES. Un alto número de LAMP de *M. fermentans* y *M. hominis* fueron reconocidas por el suero de pacientes y controles siendo mayor en pacientes con artritis reumatoide, aunque las diferencias no fueron significativas (da Rocha Sobrinho *et al.*, 2011).

En 2015, en Filadelfia, fue documentado el caso de una paciente de 21 años con artritis idiopática juvenil y artroplastias de cadera tratadas con rituximab y adalimumab, quien desarrollo infecciones urogenitales y abscesos de tejido suave y posteriormente artritis en una rodilla con cultivos de rutina negativos. *Ureaplasma spp.* fue identificado de líquido sinovial en dos ocasiones diferentes mediante PCR del gen 16S ribosomal. El tratamiento con azitromicina redujo los síntomas, después de la suspensión del tratamiento la artritis se esparció a la prótesis de cadera, donde nuevamente la PCR del 16S ribosomal fue positiva para *Ureaplasma spp.* En este caso, una planeación de tratamiento antibiótico a largo plazo fue implementada para contrarrestar las recaídas posteriores. *Ureaplasma spp.*, no suele ser asociado comúnmente con el desarrollo de artritis séptica pero en algunos casos las condiciones precedentes de los pacientes suelen tener un papel importante en la susceptibilidad, como es el caso de hipogamaglobulinemias, tratamiento con fármacos que disminuyen la respuesta inmune, corticoesteroides, implantes de prótesis, trasplante de órganos y traumas (George *et al.*, 2015).

En Alaska, describieron el caso de un cazador de focas que desarrolló infección en un dedo después de una mordida y posterior artritis séptica de cadera. Después de varios cultivos negativos, determinaron por PCR del gen 16S ribosomal la presencia de una bacteria de la familia *Mycoplasmataceae*. Se determinó género y especie por PCR a partir de muestras de sangre periférica, tejido de cadera y líquido sinovial. Las muestras de sangre periférica resultaron negativas mientras que las de tejido y líquido sinovial mostraron la misma secuencia del 16S. El análisis filogenético indicó una nueva especie no cultivable, taxonómicamente cercana a *Mycoplasma equigenitalium/Mycoplasma elephantis*. En esta revisión se destaca el hecho que el paciente no presentaba inmunodeficiencia o ninguna condición predisponente para la diseminación del microorganismo (Westley *et al.*, 2016).

En México también hay estudios sobre la relación entre *Mycoplasma* y enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide. En 2002, se realizaron estudios para determinar la habilidad de *M. fermentans* para inducir artritis en conejos después de inocular la bacteria en tráquea y articulaciones de rodillas. Encontraron que *M. fermentans* produjo artritis aguda tras la infección por ambas



vías. La inflamación de las rodillas se observó primero y con mayor severidad en conejos inoculados con la cepa P-140 en comparación con la cepa P-18 posiblemente debido a la pérdida de virulencia en esta última por pases sucesivos en el laboratorio. Ambas cepas tuvieron la capacidad de migrar desde la tráquea hasta tejidos y articulaciones no inoculados. Los cambios más severos en el tejido articular se vieron al final del experimento y se caracterizaron por infiltración de neutrófilos y la sustitución de tejido adiposo por tejido conectivo. Los conejos que se inocularon por vía intratraqueal con P-140 mostraron artritis inducida y la bacteria se pudo aislar de pulmón, sangre, corazón, riñón, bazo, cerebro y articulaciones. Gracias a este experimento se pudo concluir que *M. fermentans* aislado de humanos es capaz de inducir artritis en conejos sin importar la ruta de inoculación. Este hecho sustenta la posibilidad de que el mismo fenómeno ocurra en las articulaciones de humanos posterior a la infección con *M. fermentans*, además de que permite avanzar en la identificación de la forma en que los micoplasmas son capaces de llegar desde los sitios primarios de infección hasta el tejido sinovial (Rivera *et al.*, 2002).

En 2009 Gil y colaboradores estudiaron 219 muestras sanguíneas de pacientes con artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, síndrome antifosfolípido y de pacientes sanos en busca de *M. fermentans* a través de cultivo y PCR, detectaron anticuerpos IgG e IgM contra la cepa PG18 por ELISA e inmunoblot. Los pacientes con síndrome antifosfolípido y pacientes sanos dieron negativo en cultivo y PCR para *Mycoplasma*. En los pacientes con lupus eritematoso se detectó por PCR a *M. fermentans* en 2/50 (2%), *M. hominis* en 2/50 (2%) y *Ureaplasma urealyticum* en 1/50 (0.5%). En los pacientes con artritis reumatoide se detectó por cultivo a *M. fermentans* en 13/87 muestras y en 13/87 por PCR, pero sólo hubo concordancia entre cultivo y PCR en 6 muestras, por lo tanto, se identificó en total a la bacteria en 20/87 (23%). IgM se detectó en 40/87 pacientes con AR e IgG en 48/87 sueros con AR. Por inmunoblotting se determinó IgM en 35 muestras e IgG en 34 de un total de 87 sueros de pacientes con AR. Los resultados revelaron que los pacientes con AR expuestos a *M. fermentans* llegan a desarrollar bacteremias en un alto porcentaje en contraposición a los individuos sanos y pacientes con otras enfermedades

autoinmunes, además los individuos con AR presentan mayor reactividad contra los antígenos de *M. fermentans*. Una razón para su ocurrencia es el hecho de que los pacientes toman gran cantidad de esteroides u otros inhibidores de la respuesta inmune que los vuelve más susceptibles a infecciones. Existen varias teorías que tratan de explicar cómo los micoplasmas están correlacionados con enfermedades reumáticas y sinovitis, por un lado una de ellas considera que los micoplasmas funcionan como un cofactor en personas genéticamente predispuestas para el desarrollo de enfermedades autoinmunes, otra propone que la infección primaria por micoplasmas se produce en un lugar alejado por ejemplo en vías respiratorias o urogenitales y trasladarse hasta llegar al tejido sinovial donde se reproducen y liberan sustancias tóxicas que inducen la producción de citocinas y el desencadenamiento de la inflamación, y otra propuesta donde la infección por micoplasmas es una consecuencia debido a que los pacientes con enfermedades reumáticas suelen estar bajo tratamiento que favorece infecciones sistémicas, y a su vez, al llegar a la sinovia, exacerban la enfermedad predecesora (Gil *et al.*, 2009). Por otro lado, también se ha investigado la asociación de los micoplasmas con otras enfermedades autoinmunes, un ejemplo es el trabajo realizado en 2012 donde determinaron la presencia de anticuerpos anti *M. penetrans* en pacientes con síndrome antifosfolípido (APS) y LES. Identificaron IgM e IgG mediante ELISA y Western blot. En sus resultados, en pacientes con APS primario, encontraron IgG en el 44% (método de ELISA) y en el 72% (método de Western blot) e IgM en 78% por ELISA y en 72% por Western blot. Para el caso de pacientes con APS secundario, IgG por ELISA se obtuvo en 77% y por Western blot en 55%, IgM por ELISA en 85% y por Western blot en 68%. Para LES IgG se encontró en 45% por ELISA y en 54% por Western blot; IgM se determinó en 75% por ELISA y en 67% por Western blot. A diferencia de pacientes con APS y LES, en pacientes sanos solo se obtuvo 4% de identificación tanto para IgG como para IgM por ambos métodos. Los anticuerpos contra *Mycoplasma penetrans* encontrados en alta proporción en pacientes con LES y APS sugieren que la presencia de la bacteria no es casual y puede ser que los micoplasmas jueguen un rol en el desarrollo de estas enfermedades (Herrera-Saldivar *et al.*, 2012).

En 2014, se investigó la presencia de micoplasmas en sangre de pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS), enfermedad de origen desconocido, pero en la que están relacionados diversos factores como defectos genéticos, traumas en la cabeza, toxinas ambientales, respuesta autoinmune e infecciones bacterianas o virales. La detección de *Mycoplasma* se realizó por cultivo y PCR directa además de la búsqueda de anticuerpos IgM e IgG contra LAMPs de estos microorganismos por Western blot. En total se analizaron 13 muestras de pacientes con ALS y 44 sanos. *Mycoplasma* spp. se detectó por cultivo o PCR en 46% de las muestras con ALS y en 9% de las muestras de pacientes sanos. Así mismo se encontró IgM contra LAMP en 46% de muestras de pacientes y en 30% de individuos sanos. IgG fue detectada en 31% de muestras con ALS y en 7% de personas sanas. Estos resultados mostraron que los micoplasmas parecen jugar un papel en el origen o progresión de la ALS debido a la diferencia encontrada tanto en la presencia de micoplasmas, así como en los anticuerpos contra las lipoproteínas de la membrana de los microorganismos entre los pacientes y los individuos sanos, habiendo mayor presencia en pacientes. Las actividades biológicas de los micoplasmas para su supervivencia dentro del hospedero podrían ser un desencadenante del daño causado a las neuronas motoras, células gliales y astrocitos y por tanto del desarrollo de ALS (Gil *et al.*, 2014).

En otras investigaciones se ha estudiado la relación entre la presencia del alelo E4 de la apolipoproteína E y la adhesión de los cuerpos elementales de *Chlamydomphila pneumoniae* a la célula. Se encontró que el aumento en la expresión de ApoE4 en células transfectadas con plásmidos cargados con el gen apoE4 favorece la unión a la superficie celular en comparación con células transfectadas con el gen apoE3. Asimismo, la detección de la cantidad de ADN de *C. pneumoniae* se vio incrementada en células con ApoE4 en comparación con células ApoE3. Por lo tanto, la presencia del alelo ApoE4 parece favorecer la adherencia de este microorganismo a las células de huésped, el mecanismo aun no es conocido pero podrían estar implicados los receptores para la proteína ApoE o bien los péptidos producidos por los alelos, por otra parte, la desestabilización en los niveles de

lípidos, sobre todo el incremento en el colesterol favorecería el desarrollo del microorganismo (Gérard *et al.*, 2008).

La relación entre ApoE y la artritis reumatoide fue estudiada entre pacientes con la enfermedad y un grupo control sin AR, se detectó que no hubo diferencias significativas en la distribución de los tres principales alelos (ApoE2, ApoE3 y ApoE4) entre ambos grupos. Dentro del grupo con artritis reumatoide, el colesterol total, LDL y apolipoproteína B fueron mayores en los genotipos ApoE4 y menores para ApoE2. En el caso de los marcadores inflamatorios, los valores de velocidad de sedimentación globular, proteína C reactiva y actividad de la enfermedad fueron más bajos para ApoE4 comparada con ApoE3. A pesar que no hubo asociación de los alelos E2 y E4 con enfermedad cardiovascular sí se observó una tendencia. Estos resultados sugieren a pesar de que los porcentajes de los alelos de ApoE en AR no varían en relación con la población general los diferentes genotipos están ligados al grado de inflamación y niveles de lípidos. Por lo tanto ApoE podría ser aplicado como un marcador predictor de artritis y daño vascular en AR (Toms *et al.*, 2012).

En el laboratorio de micoplasmas se ha estudiado el vínculo entre la presencia de micoplasmas en pacientes con enfermedades reumáticas y las isoformas de ApoE, para ello se consideraron muestras de líquido sinovial provenientes de un grupo de pacientes diagnosticados y muestras de suero de un grupo testigo sano. Se identificó al género *Mycoplasma* por cultivo y PCR, encontrando que el 57% de los pacientes eran positivos, de este porcentaje, en el 22% se identificó a *M. fermentans*, en el 12% a *M. penetrans* y en el 5% a *M. genitalium*. Los genotipos de ApoE no presentaron diferencias con la población general obteniéndose 90% para E3/E3, 6% para E3/E4 y 3% para E2/E3. En general no hubo asociación entre los alelos de ApoE y la presencia de micoplasmas en los pacientes con enfermedades reumáticas, no obstante la investigación de un mayor número de muestras y la detección de infecciones empleando metodologías que permitan determinar si en algún momento previo el microorganismo estuvo presente podrán ayudar a tener un panorama más amplio de la posible asociación entre genotipos de ApoE y el

establecimiento de *Mycoplasma* en personas con enfermedades reumáticas (Zenteno-Díaz, 2019).

#### **4. Justificación**

El impacto que las enfermedades reumáticas tienen sobre la calidad de vida de las personas que las padecen es muy importante, no únicamente en lo referente a salud, sino también en los ámbitos sociales, familiares, económicos y laborales debido a que muchos pacientes están inhabilitados para moverse con facilidad y sufren de dolor constante.

Los estudios sobre la correlación que existe entre la presencia de *Mycoplasma* en el organismo y el desencadenamiento o exacerbación de enfermedades reumáticas aún no está esclarecida. Por lo que el estudio de la prevalencia de micoplasmas en pacientes con enfermedades reumáticas ayudará a tener un mejor panorama acerca de ésta relación.

Por otra parte, el papel de las isoformas de apolipoproteína E en pacientes con enfermedades reumáticas que presentan evidencia de infección por micoplasmas no ha sido estudiado.

Con base a lo anterior, este trabajo busca contribuir al avance en el conocimiento respecto al papel que juegan los micoplasmas en el desencadenamiento o exacerbación de enfermedades reumáticas. Por lo tanto, el entendimiento de la etiología y patogenia de las enfermedades reumáticas permitirá mejorar el desarrollo de tratamientos más adecuados, así como de medidas que ayuden a prevenir su exacerbación.

#### **5. Hipótesis**

La prevalencia de bacterias del género *Mycoplasma* y anticuerpos contra micoplasmas es mayor en pacientes con enfermedades reumáticas en comparación con individuos sanos. El genotipo de ApoE4 influye en la presencia de dichas bacterias en pacientes y testigos.

## **6. Objetivos**

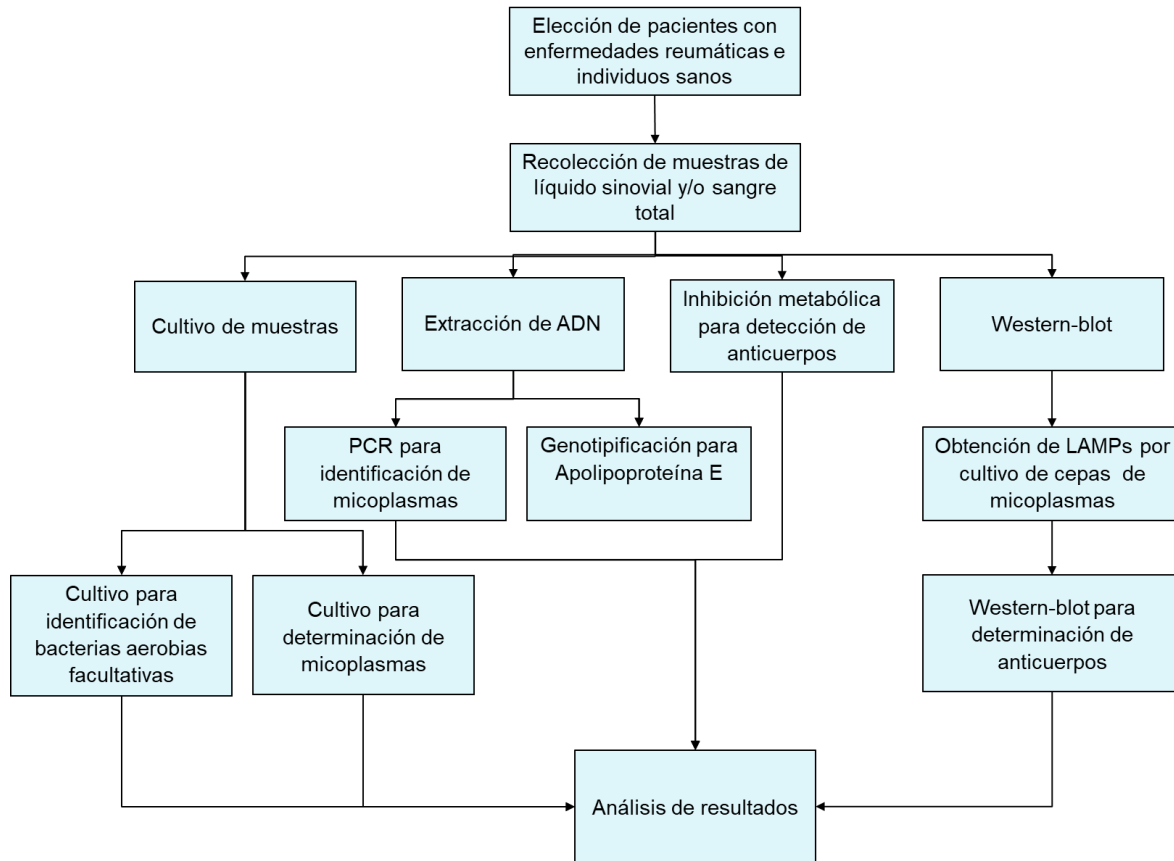
### **6.1 Objetivo general**

Detectar micoplasmas y anticuerpos contra micoplasmas en líquido sinovial y suero de pacientes con padecimientos reumáticos y determinar si existe asociación entre la presencia de micoplasmas y genotipos de apolipoproteína E.

### **6.2 Objetivos específicos**

1. Identificar micoplasmas por cultivo y PCR en líquido sinovial y suero de pacientes y controles.
2. Detectar anticuerpos anti-Mycoplasma en líquido sinovial y suero de pacientes y controles por inhibición metabólica.
3. Estandarizar la técnica de Western-blot para detección de anticuerpos anti-LAMP.
4. Detectar anticuerpos anti-LAMP en líquido sinovial y suero de pacientes y controles por Western-blot.
5. Determinar genotipo de ApoE a pacientes y testigos.

## 7. Estrategia metodológica



## 8. Diseño experimental

### 8.1 Criterios de inclusión

#### 8.1.1 Grupo de estudio

Pacientes con diagnóstico de enfermedades reumáticas de acuerdo a los criterios establecidos por el Colegio Americano de Reumatología como: artritis reumatoide, osteoartritis, artritis reactiva, espondilitis anquilosante, eritema nodoso y gota; cuyo curso de la enfermedad fuera de al menos un año y que no hubieran consumido antibióticos, mínimo siete días antes de la recolección de muestra.

#### 8.1.2 Grupo control

Individuos voluntarios, clínicamente sanos, que no hubieran estado bajo tratamiento con antibióticos por lo menos siete días antes de la toma de muestra.

## **8.2 Criterios de exclusión**

Pacientes y testigos que no cumplieron con alguno de los requisitos anteriores.

## **8.3 Criterios de eliminación**

Pacientes que no desearon continuar participando en el estudio.

## **8.4 Consideraciones éticas**

Todos los participantes accedieron voluntariamente para formar parte de la investigación. La carta de consentimiento (Anexo 1) informado fue obtenida para cada uno de ellos. Los datos personales se resguardaron de forma confidencial.

## **9. Materiales y métodos**

### **9.1 Sujetos de estudio**

53 pacientes que acudieron al Servicio de Reumatología del Hospital Manuel Ávila Camacho del Instituto Mexicano del Seguro Social de Puebla, México fueron incluidos en este estudio. Los participantes fueron diagnosticados por el Dr. David Bañuelos Ramírez, reumatólogo quien dictaminó que cumplían con todos los criterios del Colegio Americano de Reumatología, se hallaban en la fase aguda de la enfermedad y no se encontraban bajo tratamiento con antibióticos.

27 individuos sin padecimientos reumáticos fueron incluidos en el estudio como grupo control. Todos eran clínicamente sanos, sin encontrarse bajo tratamiento con antibióticos.

### **9.2 Especímenes**

Se recolectaron 58 muestras clínicas (líquido sinovial y sangre venosa) pertenecientes a pacientes con enfermedades reumáticas y 27 muestras de sangre venosa de individuos sanos.

### **9.3 Recolección de muestras**

Las muestras de pacientes fueron recolectadas en jeringas estériles (para líquido sinovial) y en tubos con EDTA (para sangre venosa) por el médico reumatólogo. Se trasladaron bajo temperatura ambiente, resguardadas del clima, al Laboratorio de



Micoplasmas del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas para su cultivo. Posterior al cultivo, las muestras se mantuvieron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Las muestras de sangre venosa de individuos sanos fueron recolectadas en tubos con EDTA, se transportaron al Laboratorio de Micoplasmas a temperatura ambiente para su posterior cultivo. Las muestras se mantuvieron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso en el estudio.

Las muestras clínicas obtenidas de pacientes y de individuos sanos se emplearon para la búsqueda de micoplasmas por cultivo y PCR, la detección de anticuerpos totales para *Mycoplasma* y específicos para LAMP y la determinación de genotipo de ApoE.

#### **9.4 Cultivo microbiológico para micoplasmas**

Tubos de ensayo con 1.8 ml de caldo PPLO (Eaton) con glucosa al 0.5%, suero de caballo al 30% y dializado de levadura al 10% (la preparación del medio de cultivo se detalla en el Anexo 2) para el aislamiento de micoplasmas, se inocularon con 200  $\mu\text{l}$  de las muestras clínicas de pacientes e individuos sanos. Los cultivos se dejaron incubar por un periodo de treinta días o hasta la observación del vire del indicador rojo de fenol, de rojo a amarillo, sin la producción de turbidez, lo que manifestó el crecimiento de estos microorganismos. Los cultivos fueron considerados negativos si el indicador no tuvo cambios de coloración en el periodo de treinta días. Como control negativo se utilizó un tubo con caldo PPLO, el cual se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante el mismo periodo de tiempo que las muestras clínicas y no presentó vire del indicador. 200  $\mu\text{l}$  de una cepa de *Mycoplasma fermentans* fue inoculada en 1.8 ml de caldo PPLO como control positivo, se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta observar el cambio del indicador.

Para confirmar el crecimiento de micoplasmas, 10  $\mu\text{l}$  de cada una de las muestras fueron sembrados, por descarga directa con micropipeta, sin estriar, sobre la superficie de agar PPLO (Eaton) (detalles de preparación en Anexo2); se dejaron incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  por siete días para posteriormente ser observados en el estereoscopio en búsqueda de microcolonias características de micoplasmas, las cuales presentan una morfología típica de huevo frito.

### **9.5 Cultivo microbiológico para bacterias aerobias facultativas**

Todas las muestras clínicas inoculadas para búsqueda de micoplasmas, fueron sembradas en agar Infusión Cerebro Corazón (BHI) para la detección de otras bacterias aerobias facultativas. Se colocaron 10  $\mu$ l de las muestras y se distribuyeron sobre la placa mediante la técnica de estría cruzada. Se incubaron a 37°C durante 48 horas y se revisaron para la búsqueda de colonias.

En caso de observación de crecimiento microbiológico, se realizaría la identificación de las especies por pruebas bioquímicas convencionales.

### **9.6 Extracción de ADN de muestras clínicas**

Para la extracción de líquido sinovial y sangre total de pacientes y testigos se empleó el kit comercial High Pure PCR Template Preparation Kit de la marca Roche siguiendo las instrucciones proporcionadas por el proveedor (Anexo 3).

Previo a la extracción de líquidos sinoviales, se realizó la concentración de las muestras por centrifugación a 18,000 rpm por 20 minutos, descartando parte el sobrenadante y utilizando 250  $\mu$ l del fondo para la técnica de extracción. El material genético extraído se conservó a -20°C hasta su uso.

Una muestra de 1.5 ml de líquido sinovial fue adicionada con 100  $\mu$ l de cepa de *M. fermentans*, de la cual, se extrajo el ADN usando la misma metodología que con las muestras clínicas. Esta muestra fue utilizada como control positivo de extracción.

### **9.7 Extracción de ADN de cultivos en caldo Eaton**

La extracción de ADN a partir de cultivos en caldo Eaton se realizó por el método de hervido. A partir de los cultivos incubados para la búsqueda de micoplasmas (con y sin vire del indicador), se tomó 1 ml de cada cultivo en un tubo Eppendorf estéril y se empaquetaron mediante centrifugación a 18,000 rpm durante 20 minutos. Después, el sobrenadante se descartó con ayuda de una micropipeta, cuidando de no perder la pastilla, posteriormente, a cada tubo se agregaron 100  $\mu$ l de agua inyectable estéril para la resuspensión de la pastilla. Los tubos se colocaron en el termomixer Eppendorf a una temperatura de 95°C durante 12 minutos con agitación constante a 800 rpm para la lisis de las células y liberación del ADN; finalizado el

tiempo, los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 15 minutos para separar los restos celulares del material genético; los sobrenadantes se colocaron en tubos Eppendorf estériles y se conservaron en congelación a -20°C hasta su uso posterior.

### **9.8 Cuantificación y determinación de pureza de ADN**

La concentración del ADN de doble cadena obtenido por ambas metodologías se estableció realizando la cuantificación en el fotómetro NanoPhotometer® Pearl de IMPLEN mediante la lectura de las muestras a 260 nm. Posteriormente, las concentraciones se ajustaron a 100 ng/μl para su posterior uso. La pureza del ADN se determinó únicamente para las muestras provenientes de líquido sinovial y sangre venosa que fueron extraídas por kit; la pureza se evaluó tras la obtención del cociente de las absorbancias 260/280 nm, considerando una pureza aceptable aquellas que entraron dentro del rango de 1.7 a 2.0.

### **9.9 Determinación de micoplasmas por PCR**

La detección del género *Mycoplasma*, así como la identificación de las especies, se llevó a cabo a partir del ADN obtenido de las muestras clínicas y los cultivos empleando la técnica de PCR para la amplificación de fragmentos específicos para cada uno de los microorganismos mencionados. Para *Mycoplasma* spp. se amplificó un fragmento conservado entre más de 30 especies de micoplasmas del gen 16S ribosomal, para *M. fermentans*, un elemento IS; para *M. pneumoniae* el gen de una ATPasa; para *M. genitalium* el gen *mpgB* de la adhesina p140; para *M. penetrans*, *M. pirum*, *M. hominis*, *M. salivarium* y *M. orale*, una fracción del gen 16S ribosomal específica para cada una de las especies.

En el Anexo 4 se detallan las secuencias de cada uno de los oligonucleótidos utilizados en las amplificaciones de género y especies, así como el gen o fragmento de ADN que amplifican, el tamaño del producto de PCR, las temperaturas de alineamiento (T<sub>m</sub>) y las referencias donde cada uno de ellos fue probado y validado.

En la Tabla 2 se observan los componentes utilizados para las reacciones de amplificación, así como la concentración original y final para una reacción. La mezcla de reacción se calculó para un volumen final de 10  $\mu\text{l}$ .

**Tabla 2. Componentes y concentraciones utilizados para las PCR realizadas para determinación de género y especies de *Mycoplasma***

Componente	Concentración stock	Volumen por reacción	Concentración final
Agua libre de nucleasas	-	5.7 $\mu\text{l}$	-
Buffer 10X (Thermo Scientific)	10X	1 $\mu\text{l}$	1X
MgCl <sub>2</sub> (Thermo Scientific)	20 mM	Incluido en buffer	2 mM
dNTPs mix (Thermo Scientific)	10 mM	0.2 $\mu\text{l}$	0.2 mM
Iniciador delantero (Oligo T4)	10 $\mu\text{M}$	0.5 $\mu\text{l}$	0.5 $\mu\text{M}$
Iniciador reverso (Oligo T4)	10 $\mu\text{M}$	0.5 $\mu\text{l}$	0.5 $\mu\text{M}$
Dream Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific)	5 U/ $\mu\text{l}$	0.1 $\mu\text{l}$	0.5 U
ADN	100 ng/ $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$	20 ng

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en el termociclador marca Labnet siguiendo las condiciones de reacción: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95°C, 5 min; 40 ciclos de desnaturalización a 95°C, 1 min, alineamiento a la T<sub>m</sub> específica para cada iniciador, 1 min, extensión a 72°C, 1 min; y 1 ciclo de extensión final a 72°C, 5 min.

### 9.10 Visualización de productos de PCR

Para observar los productos de PCR amplificados, se realizó el corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1%, utilizando para su preparación buffer TAE 1X. La electroforesis se llevó a cabo durante 1.0 a 1.5 horas a 70 voltios. Para identificar el tamaño de los fragmentos de ADN amplificados se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler® 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), el cual fue adicionado en el primer pozo de cada gel. Con el fin de evitar que las

muestras de ADN salieran del pozo y visualizar su desplazamiento en el gel, se adicionó buffer de carga a cada muestra.

Al finalizar la electroforesis, los geles se tiñeron con bromuro de etidio BET (4 mg/ml) durante 20 minutos y se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de BET por 1 min. La visualización y captura de la imagen se realizó en el fotodocumentador Kodak con el fin de llevar a cabo el análisis de los resultados obtenidos.

### **9.11 Purificación de productos de PCR**

La purificación de los productos de PCR se realizó con el Agarose Gel DNA Extraction Kit de Roche, siguiendo las instrucciones del fabricante.

La concentración y pureza de los productos purificados se midieron en el fotómetro NanoPhotometer® Pearl de IMPLLEN, mientras que la integridad se determinó colocando 2 µl de los productos purificados en gel de agarosa al 1% para su corrimiento electroforético.

### **9.12 Secuenciación y análisis de secuencias**

La secuenciación se realizó en el Instituto de Biotecnología IBT de la UNAM. Las muestras se enviaron siguiendo los procedimientos y las especificaciones señaladas por el instituto. Para la visualización de la secuencia, se utilizó el programa Chromas versión 2.6.6. Se utilizó la base de datos Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) para comparar la secuencia.

### **9.13 Test de Inhibición Metabólica para detección serológica de *Mycoplasma***

Para determinar la presencia de anticuerpos totales contra *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma penetrans* GTU-54 y *Mycoplasma pirum* en las muestras de pacientes con enfermedades reumáticas y controles (individuos clínicamente sanos) se llevó a cabo la metodología de Inhibición Metabólica (IM) , en la cual, se tomaron en cuenta los cambios de coloración del medio de cultivo debido al cambio de pH producido por la actividad metabólica de los micoplasmas, los cuales liberan al medio ácido láctico provocando el cambio del indicador rojo de fenol a amarillo. Si

existen anticuerpos que inhiban esta actividad metabólica, no habrá liberación de ácido láctico ni cambio del indicador.

### **9.13.1 Preparación de cultivo de micoplasmas**

Para llevar a cabo la metodología, se preparó una suspensión de cultivo fresco de cada una de las especies de *Mycoplasma* a partir de un inóculo de las cepas, el cual se adicionó a caldo Eaton y se incubó a 37°C hasta lograr el vire del indicador a amarillo. El medio de cultivo fue titulado para tener una concentración de 10<sup>3</sup> Unidades de Cambio de Color (UCC), 10<sup>2</sup> UCC y 10<sup>1</sup> UCC.

### **9.13.2 Inactivación de muestras clínicas**

Todas las muestras clínicas de pacientes y controles utilizadas en este ensayo fueron colocadas en baño María a 56°C por 30 minutos para la inactivación de los componentes del complemento, con el propósito de lograr que la inhibición se produjese por anticuerpos y no por complemento.

### **9.13.3 Ensayo de Inhibición metabólica (IM)**

Se evaluaron 33 muestras de pacientes y 27 muestras de controles. El ensayo se realizó en placas de microtitulación, siguiendo la metodología descrita por Velleca y colaboradores. Como control positivo se utilizó suero de un paciente diagnosticado positivamente para infección por *Mycoplasma*, mientras que como control negativo fue usado el suero de un individuo negativo a *Mycoplasma*. Las placas de microtitulación fueron etiquetadas como se muestra en la Figura 3.

Las filas para la detección de anticuerpos de muestras clínicas (líquido sinovial y plasma) así como los controles se prepararon adicionando 25µl de caldo Eaton a todos los pozos, excepto en el primero de cada fila; enseguida, se adicionaron 50µl de cada una de las muestras y controles en el primer pozo de la fila apropiada. A partir del primer pozo se tomaron 25µl del contenido y se adicionaron en el pozo consecutivo para realizar diluciones dobles hasta llegar a la dilución 1:512 (en total 10 pozos por cada una de las muestras y controles). Se agregaron 50 µl del cultivo

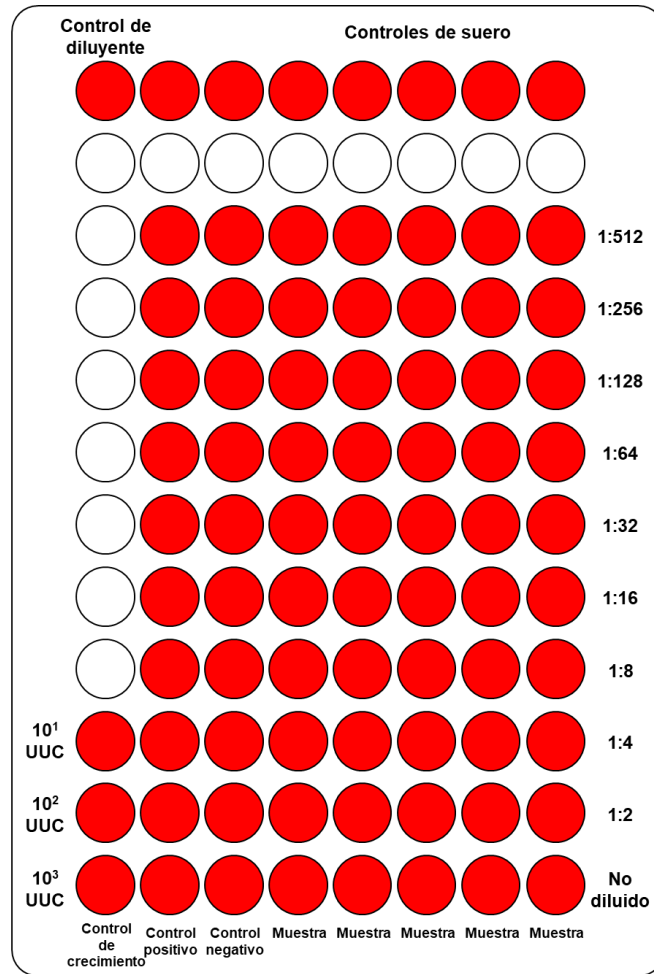
de micoplasmas previamente titulado a  $10^3$  UCC a cada uno de los pozos. Finalmente se adicionaron 100  $\mu$ l de caldo Eaton a todos los pozos.

Para la preparación de los controles de muestra, se agregaron 25  $\mu$ l de cada muestra y 175  $\mu$ l de caldo Eaton. Estos controles tuvieron la finalidad de detectar si el vire del indicador no era debido a otros componentes de las muestras clínicas y no propiamente al crecimiento de micoplasmas.

Los controles de crecimiento se prepararon colocando 50  $\mu$ l de cada cultivo titulado a  $10^3$  UCC,  $10^2$  UCC y  $10^1$  UCC en los pozos correspondientes según la Figura 3 y posteriormente agregando 150  $\mu$ l de caldo Eaton. Estos controles se emplearon para verificar el adecuado crecimiento de los micoplasmas y como punto de referencia para determinar el momento de lectura de la placa.

El control de diluyente se preparó colocando 200  $\mu$ l de caldo Eaton, con el propósito de identificar una posible contaminación del caldo usado como diluyente, debido a que este pozo no debió presentar vire del indicador.

La lectura del ensayo se realizó cuando los controles de crecimiento cambiaron la coloración del indicador rojo de fenol de rojo a amarillo, indicativo del apropiado crecimiento de los micoplasmas. Para la interpretación de los resultados, el título de anticuerpos productores de inhibición metabólica fue considerado en la máxima dilución donde no se observa cambio de pH, por lo tanto, el indicador no vira a amarillo como en el caso de los controles de crecimiento.



**Figura 3. Placa para inhibición metabólica.**

Etiquetado de los pozos y distribución de las muestras y controles para la realización de la técnica de inhibición metabólica.



## **9.14 Detección de anticuerpos contra LAMP**

### **9.14.1 Obtención de antígenos LAMP con Triton X-114**

La cepa de *Mycoplasma fermentans* P-140 se cultivó en caldo Eaton, medio SP4 y medio EY (Anexo 2) hasta obtener un volumen de aproximadamente 500 ml. La metodología se realizó de acuerdo a lo reportado por Román y colaboradores con ligeras modificaciones. La preparación de las soluciones empleadas se detalla en el Anexo 5. El cultivo se centrifugó a 6,000 rpm durante 30 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante mientras que el precipitado se resuspendió en 250 ml de buffer de fosfatos salino (PBS) 0.015M pH 7.2, se realizó por triplicado el lavado de las células, centrifugando a 6,000 rpm por 20 minutos a 4°C en cada paso de lavado. El precipitado se resuspendió en 10 ml de PBS 0.015M pH 7.2 y se agregaron 200 µl de Tritón X-114 para lograr una concentración final de 2%. La mezcla se incubó a 4°C en agitación durante 1 hora. Pasado el tiempo, la cepa se centrifugó a 6,000 rpm durante 20 minutos, el sobrenadante se colocó en otro tubo y el precipitado se descartó. Al sobrenadante recolectado se agregaron 2.5 ml de solución de sacarosa 0.6% y Tritón X-114 0.06% en PBS y fue incubado por 5 minutos a 37°C para la separación de fases. Después, se centrifugó a 6,000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente para lograr una mejor separación de las fases. Posteriormente, la fase superior acuosa fue removida, mientras que la fase inferior detergente fue adicionada con 2.5 ml de metanol-cloroformo (4:1) para la solubilización del Tritón X-114 y la precipitación de las proteínas LAMP. Se centrifugó a 5,000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se decantó y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente para resuspenderse en 2 ml de PBS. La solución se guardó a -20°C hasta su uso.

### **9.14.2 PAGE-SDS**

Las LAMP obtenidas de la extracción fueron mezcladas con solución reguladora 4X (las soluciones empleadas para la realización de PAGE-SDS se detallan en el Anexo 5) en una proporción de 3:1 y se hirvió por 5 minutos para desnaturalizar las proteínas y realizar el PAGE-SDS.

Los geles de poliacrilamida (al 12%) utilizados fueron pre-fabricados por la marca RunBlue® Gels Expedeon. A cada uno de los geles se adicionaron 5 µl de marcador de peso molecular PageRuler® Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) en el primer pozo y 250 µl de solución de proteínas con 80-100 µg por ml. La electroforesis se realizó a 70 voltios hasta salir del gel de apilamiento y continuó a 90 voltios por 2 a 3 horas hasta llegar al borde del gel de corrimiento. Los geles resultantes fueron teñidos con solución de azul de Coomassie o transferidos a membranas de nitrocelulosa.

#### **9.14.3 Tinción con solución fijadora de Coomassie**

Después de la electroforesis, los geles fueron sumergidos en solución de Coomassie (Anexo 5) por 1 hora. Pasado el tiempo, se destiñeron con una solución de metanol/agua destilada/ácido acético (5:5:1), cambiando la solución frecuentemente hasta observar las bandas de proteínas.

#### **9.14.4 Técnica de Western blot**

Las soluciones empleadas para Western blot e inmunodetección se encuentran en el Anexo 6. La electrotransferencia se realizó según lo reportado por Román y colaboradores. Las membranas utilizadas fueron de nitrocelulosa de la marca Immobilon-NC Millipore®, de poro 0.45 µm. Se cortaron del tamaño del gel y se introdujeron en metanol por 15 segundos, se enjuagaron con agua destilada por 2 min y se sumergieron en regulador de transferencia por 10 min. Por otro lado, los geles y el papel filtro se humedecieron en regulador de transferencia por 10 min. En el cassette del equipo se colocaron en orden: la esponja, dos papeles filtro, el gel, la membrana, dos papeles filtros y una segunda esponja, cuidando de no formar burbujas entre cada uno de ellos. El cassette se colocó en la cámara de transferencia cubierto por regulador de transferencia. La transferencia se efectuó en cámara húmeda por dos horas a 180 voltios. Al finalizar la membrana se tiñó con amido negro por 5 min y se enjuagó con agua destilada durante 5 min para visualizar las proteínas transferidas.

### 9.14.5 Inmunodetección

Las membranas se bloquearon con una solución de leche descremada 5%-PBS-Tween 20 0.05% (PBS-T) durante toda la noche en agitación a 4°C. Después se lavaron tres veces con PBS-T por 5 minutos y se cortaron tiras de 5 mm.

Los anticuerpos IgG e IgM fueron detectados para 42 muestras de pacientes y 27 muestras de testigos, como control positivo se utilizó suero de un paciente diagnosticado como positivo para *Mycoplasma*. Se incubaron 2 tiras de nitrocelulosa en una dilución 1:50 de cada muestra clínica de pacientes y testigos en PBS-T a 37°C por 2 horas. Las tiras se enjuagaron 7 veces con PBS-T por un minuto, y se colocaron en una dilución 1:5000 de conjugado de fosfatasa alcalina-anticuerpo en PBS-T para cada uno de los isotipos, se incubaron a temperatura ambiente por dos horas en agitación, se lavaron 7 veces con PBS-T. La reacción antígeno-anticuerpo se visualizó al agregar el reactivo de nitroazul de tetrazolio combinado con 5-bromo-4-cloro-3'-indolfosfato (NBT-BCIP) y agitando hasta la aparición de bandas. Finalmente, las tiras se enjuagaron en agua destilada y se secaron.

### 9.15 Determinación de genotipo ApoE

La determinación del genotipo de ApoE se realizó mediante la técnica de PCR tiempo real utilizando el protocolo provisto por el fabricante, se usaron sondas específicas que detectan los polimorfismos únicos en los codones 112 y 158. El kit utilizado fue Light Cycler® ApoE Kit C112R R158C que proporciona un sistema para identificar el genotipo de estas dianas en un extracto de ácidos nucleicos proveniente de las muestras de líquido sinovial y sangre de pacientes y testigos. Un fragmento de 228 pb del gen ApoE humano fue amplificado con oligonucleótidos específicos. Los fragmentos de la PCR se analizaron con la sonda SimpleProbe para el polimorfismo ApoE C112R y fue detectada en el canal 530, y con las sondas LightCycler Red 640 para ApoE R158C, que fue detectada en el canal 640. El codón ApoE 112 exhibió T<sub>m</sub> de 55.0°C en el canal 530 para el alelo 112C y T<sub>m</sub> de 64.0°C para la variante 112R. El codón ApoE 158 tuvo una T<sub>m</sub> de 63.0°C en el canal 640 para el alelo 158R y una T<sub>m</sub> of 53.0°C para la variante 158C. La metodología se detalla en el Anexo 8.

### **9.16 Análisis estadístico**

Se realizó análisis de Chi cuadrada para comparar la presencia de micoplasmas en pacientes y controles, para asociar la presencia de anticuerpos contra micoplasmas y lipoproteínas en pacientes e individuos sanos y para comparar el hallazgo de micoplasmas por cultivo y PCR.

## **10. Resultados**

### **10.1 Muestras y sujetos de estudio**

Un total de 53 pacientes de la Ciudad de Puebla, Puebla con enfermedades reumáticas fueron incluidos en el estudio durante el periodo de febrero a junio de 2018. Todos los individuos cumplieron con los criterios del Colegio Americano de Reumatología para su diagnóstico y aceptaron formar parte del estudio a través de la carta de consentimiento informado presentada en el anexo 1. La duración y severidad de las enfermedades reumáticas fueron variables. El rango de edad de los pacientes comprendió de los 16 a 72 años, con un promedio de 47 años.

Se recibieron en total 58 muestras clínicas pertenecientes a los 53 pacientes, las cuales estuvieron conformadas por el 89% (n=52) de líquidos sinoviales y 11% (n=6) de muestras de sangre total con EDTA. Un paciente tuvo ambas muestras de sangre y líquido sinovial.

Los padecimientos estuvieron conformados por artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante, artritis reactiva, eritema nodoso, gota y LES. La cantidad de muestras recibidas para cada uno de los padecimientos se detalla en la Figura 4, siendo las más prevalentes artritis reumatoide (47%) seguida por osteoartritis (19%), las demás enfermedades se encontraron en un porcentaje menor, 6 muestras presentaron conjuntamente dos enfermedades: 2 pacientes gota y artritis reumatoide, 3 pacientes artritis reumatoide y LES y 1 con artritis reumatoide y osteoartritis.



**Figura 4.** Gráfica del porcentaje de muestras recibidas para cada una de las enfermedades reumáticas. (n=58).

Asimismo, como grupo control se incluyeron a personas clínicamente sanas. Se recibieron 27 muestras de sangre total con EDTA, correspondientes a 27 individuos; los cuales, cumplieron con los criterios de inclusión y aceptaron de forma voluntaria participar en este trabajo. El rango de edad fue de 21 a 34 años, con un promedio de 22.

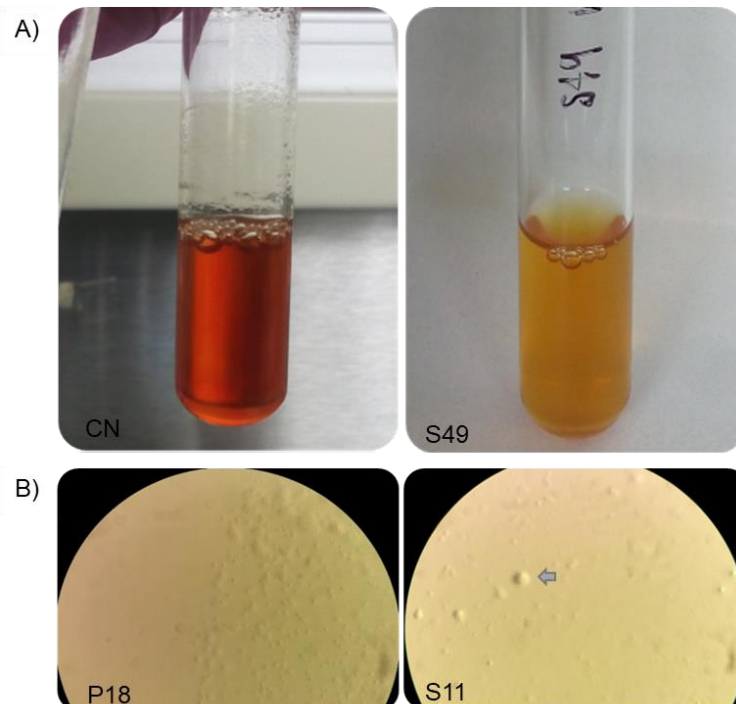
### 10.2 Detección de micoplasmas por cultivo microbiológico

Un total de 54 muestras clínicas de pacientes se cultivaron en caldo y agar Eaton; 4 muestras fueron descartadas para siembra debido a que tenían volumen insuficiente para realizar el inóculo. En el caso de los individuos sanos se cultivaron 27 muestras para la detección de micoplasmas.

Dentro del grupo de pacientes, 4 muestras de las 54 sembradas, se consideraron con un resultado positivo debido al cambio del indicador de rojo a amarillo: 3 líquidos sinoviales y 1 sangre total. Adicionalmente, 2 de ellas fueron confirmadas por la

formación de colonias puntiformes, con bordes redondeados y algunas de ellas con la forma característica de huevo frito en agar Eaton (Figura 5). Las muestras positivas por vire del indicador y por crecimiento de microcolonias pertenecieron a pacientes con artritis reumatoide, mientras que las muestras positivas por cambio de coloración fueron de pacientes con artritis reumatoide y LES. Por el contrario, ningún cultivo de individuos sanos mostró vire del indicador ni formación de microcolonias en el agar (Tabla 3).

Todos los cultivos (incluyendo positivos y negativos) fueron resguardados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , con el propósito de someterlos a extracción de ADN para verificación de la presencia/ausencia de micoplasmas.



**Figura 5. Muestras positivas en caldo y agar Eaton.**

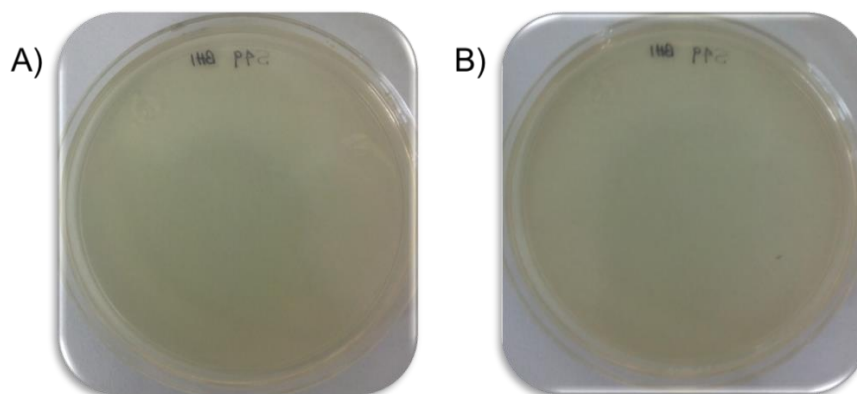
A) Izquierda: caldo Eaton sin vire del indicador; derecha: caldo Eaton positivo. B) Presencia de microcolonias con características fenotípicas de *Mycoplasma* en dos muestras de cultivo. Se observaron colonias puntiformes, con bordes redondeados y en algunas de ellas, la forma de huevo frito (señalado con flecha).

**Tabla 3. Número de muestras positivas por cultivo para ambos grupos en relación al número de muestras cultivadas.**

Grupo	Muestras positivas
Controles	0/27
Pacientes	4/54

### 10.3 Búsqueda de bacterias aerobias facultativas

A partir de 54 muestras clínicas de pacientes y 27 de individuos sanos, se realizó la siembra en agar BHI para la búsqueda e identificación bioquímica de otras especies microbianas capaces de desarrollarse en el medio de cultivo, preferentemente bacterias aerobias facultativas, las cuales tienen la habilidad de infectar sinovia y sangre, y desencadenar un proceso inflamatorio, tal es el caso de *Proteus spp*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, entre otros. Ninguna de las muestras cultivadas fue positiva a otro microorganismo diferente de *Mycoplasma* después de la incubación a 37°C por 48 horas (Figura 6).



**Figura 6. Cultivo en agar BHI para búsqueda de bacterias aerobias facultativas de interés.**

A) Placa recién inoculada; B) Placa a las 48 horas de incubación.

### 10.4 Determinación del género *Mycoplasma* por la técnica de PCR

Los oligonucleótidos específicos para el género *Mycoplasma* que amplifican un fragmento del gen 16S ribosomal tras la extracción de ADN, fueron utilizados para la detección de micoplasmas en 58 muestras del grupo de pacientes, las cuales

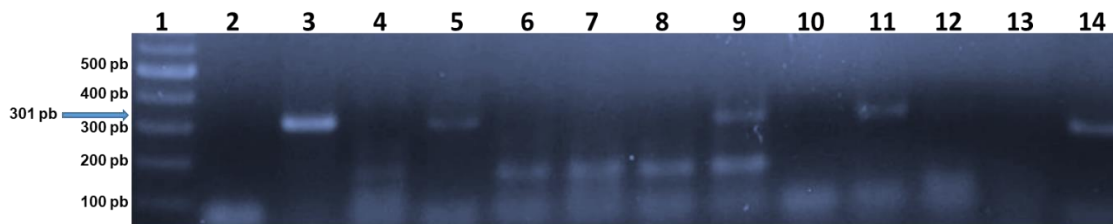
estuvieron conformadas por 4 líquidos sinoviales y sus cultivos, 4 muestras de sangre y sus cultivos, 8 cultivos de líquido, 2 cultivos de sangre y 4 líquidos sinoviales. Además, se buscó a micoplasmas en 27 muestras del grupo de individuos sanos, las cuales estuvieron constituidas por sangre y su respectivo cultivo.

Dentro del grupo de pacientes, la secuencia específica para *Mycoplasma* spp. fue amplificada en 1 líquido sinovial, 2 cultivos de líquido sinovial, 1 cultivo de sangre, en 15 líquidos sinoviales y cultivos y en 1 sangre y cultivo; dando un total de 20 (34%) muestras individuales positivas, las cuales pertenecieron a 17 pacientes. En el grupo control, 3 (11%) muestras fueron positivas, correspondientes a 3 individuos (Tabla 4). Se eligió una muestra de los individuos sanos para ser secuenciada, la cual dio como resultado que se trataba de *Mycoplasma* (Anexo 9). En la Figura 7 se observa el corrimiento electroforético de algunas muestras positivas.

**Tabla 4. Número de muestras positivas de pacientes de acuerdo al tipo de muestra.**

Tipo de muestra	Total de muestras	Positivas para <i>Mycoplasma</i> por PCR
<b>Pacientes</b>		
Líquido sinovial	4	1
Cultivo de líquido sinovial	8	2
Cultivo de sangre	2	1
Líquido sinovial + cultivo	40	15
Sangre + cultivo	4	1
Total	58	20
<b>Individuos clínicamente sanos</b>		
Sangre + cultivo	27	3





**Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa para visualización de productos de PCR para *Mycoplasma* spp.**

Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control negativo, carril 3: control positivo (fragmento de 301 pb), carriles 5, 9, 11 y 14: muestras positivas; carriles 4, 6, 7, 8, 10, 12 y 13: muestras negativas a *Mycoplasma* spp.

### 10.5 Comparación entre método de cultivo y detección por PCR para búsqueda de micoplasmas

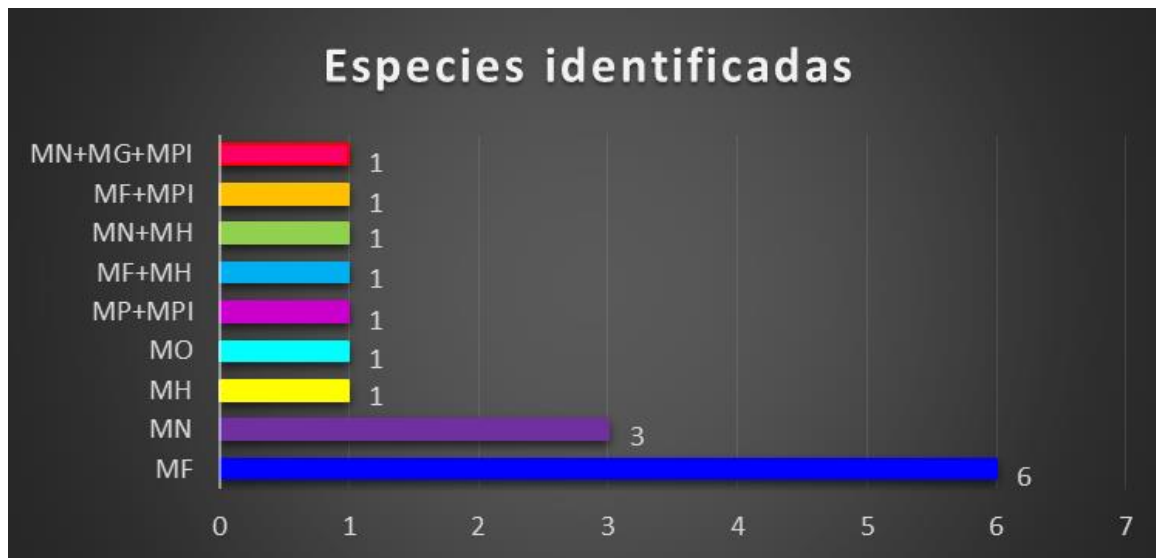
Al realizar la comparación de las dos metodologías utilizadas para la determinación de micoplasmas en las muestras clínicas (Tabla 5), se observó que la técnica de PCR dio un número mayor de resultados, su empleo, combinado con cultivo, produjo una mayor sensibilidad para la detección de los microorganismos. Esto fue debido a que varios cultivos sin vire de indicador fueron positivos a *Mycoplasma* por PCR, posiblemente resultado del desarrollo de bajas cantidades de micoplasmas, insuficientes para producir cambio de color del indicador, pero capaces de detectarse por PCR. Las 4 muestras positivas por cultivo dieron resultados positivos por PCR.

**Tabla 5. Identificación de micoplasmas en muestras de paciente e individuos sanos por cultivo y PCR.**

	Individuos clínicamente sanos	Pacientes
Muestras positivas por cultivo	0/27	4/54
Muestras positivas por PCR	3/27	20/58

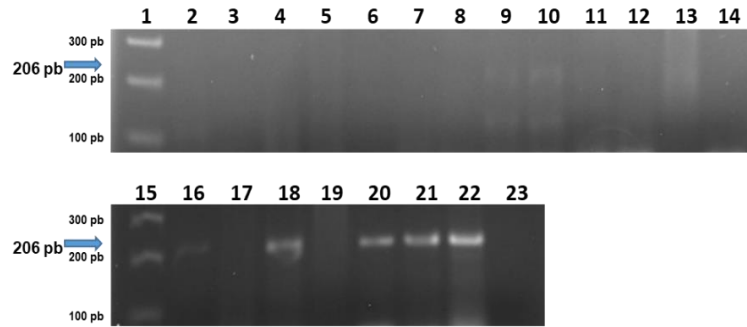
## 10.6 Identificación para especies de micoplasmas por PCR

Iniciadores específicos fueron usados para definir las especies presentes en las 20 muestras individuales de pacientes positivas para género. En la Figura 8 se detallan las especies encontradas, así como el número de muestras en las que se identificaron; *M. fermentans* fue la especie más frecuentemente encontrada sola ( $n=6$ ; 30%) o en conjunto con *M. hominis* ( $n=1$ ; 5%) y *M. pirum* ( $n=1$ ; 5%); seguida por *M. pneumoniae* ( $n=3$ ; 15%) y *M. hominis* ( $n=1$ ; 5%). *M. salivarium* no se encontró en ninguna de las muestras. Un dato importante fue que en 5 de las muestras clínicas (25%), se identificó a más de una especie de micoplasmas, siendo hasta el momento uno de los primeros reportes de infección mixta. En general, 15 muestras fueron provenientes de líquido sinovial y 1 de sangre. En 4 muestras no fue posible determinar la especie, 3 de las cuales provenían de líquido sinovial y 1 de sangre. En el caso de los individuos sanos, no se identificó a ninguna de las especies analizadas. Las Figuras 9-12 muestran los productos de amplificación para las especies *M. fermentans*, *M. penetrans*, *M. pneumoniae* y *M. hominis*.



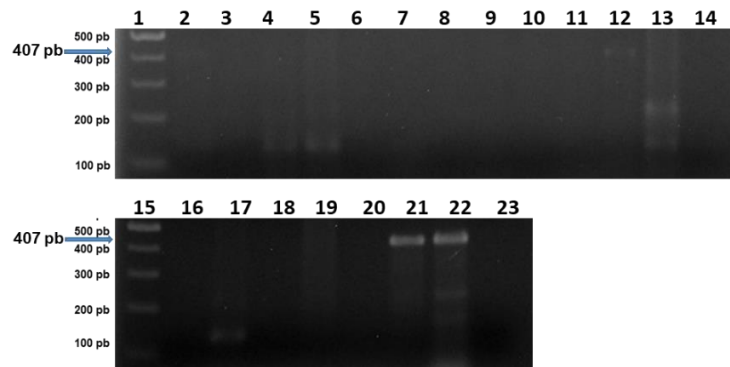
**Figura 8.** Gráfica del número de muestras positivas para cada especie de *Mycoplasma*.

*M. salivarium* no fue identificado y en 4 muestras no se identificó especie, ( $n=20$ ). MF: *M. fermentans*, MP: *M. penetrans*, MN: *M. pneumoniae*, MH: *M. hominis*, MG: *M. genitalium*, MPI: *M. pirum*, MO: *M. orale*.



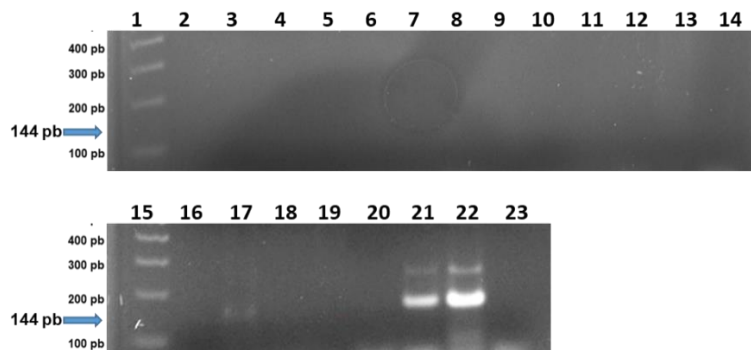
**Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa para *Mycoplasma fermentans*.**

Carriles 1 y 15: marcador de peso molecular; carriles 2-8, 11-14, 17 y 19: muestras negativas; carriles 9, 10, 16, 18 y 20: muestras positivas; carriles 21 y 22: control positivo (fragmento de 206 pb), carril 23: control negativo.



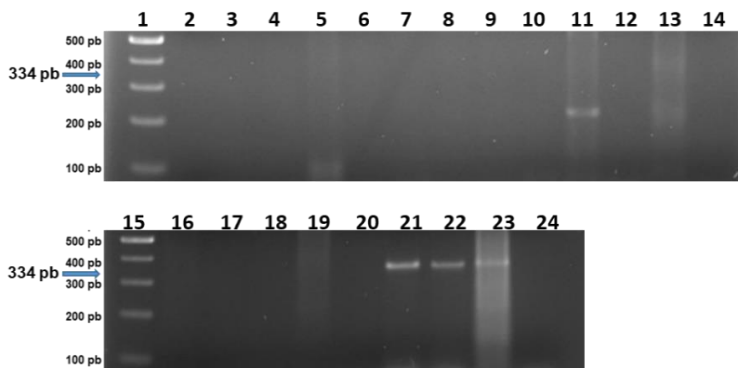
**Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa para *Mycoplasma penetrans*.**

Carriles 1 y 15: marcador de peso molecular; carriles 2-11, 13, 14 y 16-20: muestras negativas; carril 12 muestra positiva; carriles 21 y 22: control positivo (fragmento de 407 pb), carril 23: control negativo.



**Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa para *Mycoplasma pneumoniae*.**

Carriles 1 y 15: marcador de peso molecular, carriles 2-16: muestras negativas, carril 17: muestra positiva, carriles: 20 y 21 control positivo (fragmento de 144 pb), carril 23: control negativo.



**Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa para *Mycoplasma hominis*.**

Carriles 1 y 15: marcador de peso molecular; carriles 2-14 y 16-20: muestras negativas; carril 21 muestra positiva; carril 22 y 23: control positivo (fragmento de 334 pb), carril 24: control negativo.

### 10.7 Distribución de micoplasmas en enfermedades reumáticas

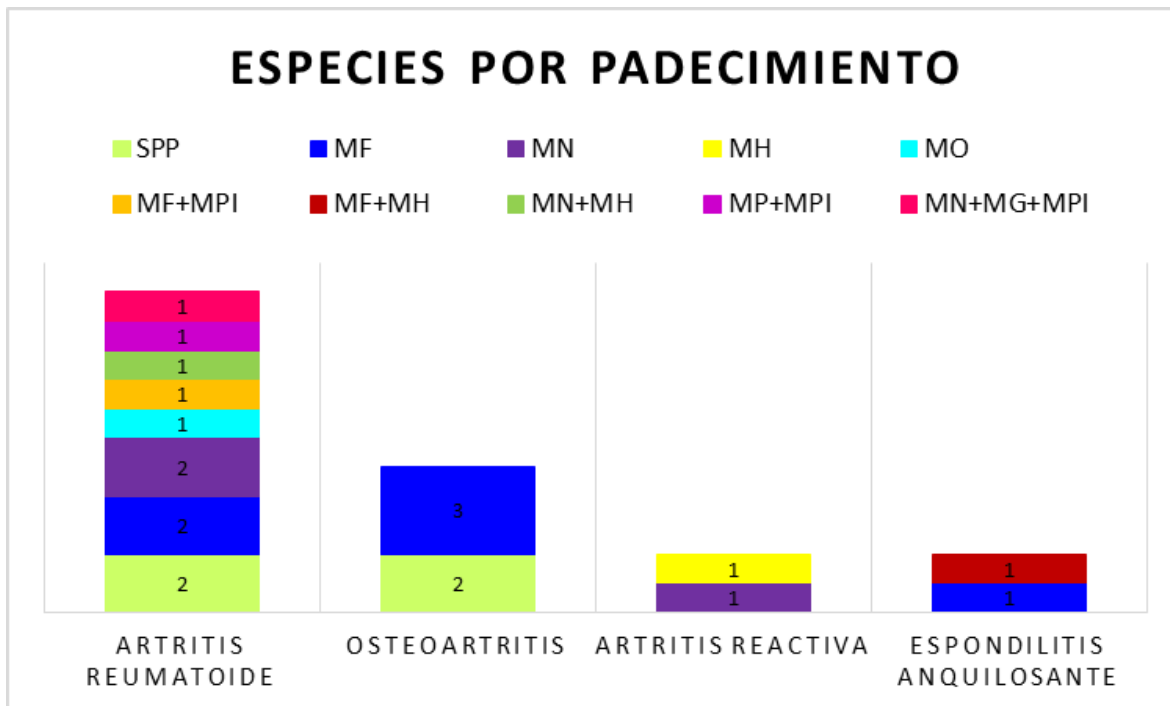
Las muestras pertenecientes a pacientes con artritis reumatoide presentaron un mayor porcentaje de prevalencia de micoplasmas (55%) en comparación con otras artritis no reactivas como espondilitis anquilosante (10%) y artritis reactiva (10%); asimismo, dos de las muestras positivas de artritis reumatoide también estaban asociadas a LES (rhusus). En el caso de gota y eritema nodoso, la presencia de micoplasmas fue nula. Un dato interesante fue la presencia de micoplasmas en 5 (25%) de las muestras de osteoartritis (Tabla 6).

Las especies más frecuentes entre los padecimientos reumáticos fueron *M. fermentans* con 8 aislamientos (6 solo y 2 junto con otras especies) y *M. pneumoniae* con 5 aislamientos (3 solo y 2 acompañado de otras especies). Artritis reumatoide tuvo la cantidad más alta de especies aisladas (6 especies distintas) como se observa en la Tabla 6, y presentó el mayor número de aislamientos con más de una especie de *Mycoplasma* en una misma muestra (4 muestras). Los aislamientos para los padecimientos reumáticos se detallan en la Figura 13.

La presencia de micoplasmas en un alto porcentaje de pacientes apoya la teoría del papel que juegan en las enfermedades reumáticas.

**Tabla 6. Frecuencia de aislamiento de micoplasmas en muestras clínicas de pacientes con enfermedades reumáticas.**

Padecimiento reumático	Muestras positivas (n=20)	Especies encontradas
Artritis reumatoide	11 (55%)	<i>M. penetrans</i> , <i>M. pneumoniae</i> , <i>M. pirum</i> , <i>M. orale</i> , <i>M. hominis</i> , <i>M. fermentans</i> y <i>Mycoplasma spp.</i>
Osteoartritis	5 (25%)	<i>M. fermentans</i> y <i>Mycoplasma spp.</i>
Artritis reactiva	2 (10%)	<i>M. pneumoniae</i> y <i>M. hominis</i>
Espondilitis anquilosante	2 (10%)	<i>M. fermentans</i> y <i>M. hominis</i>



**Figura 13. Especies identificadas por enfermedad reumática.**

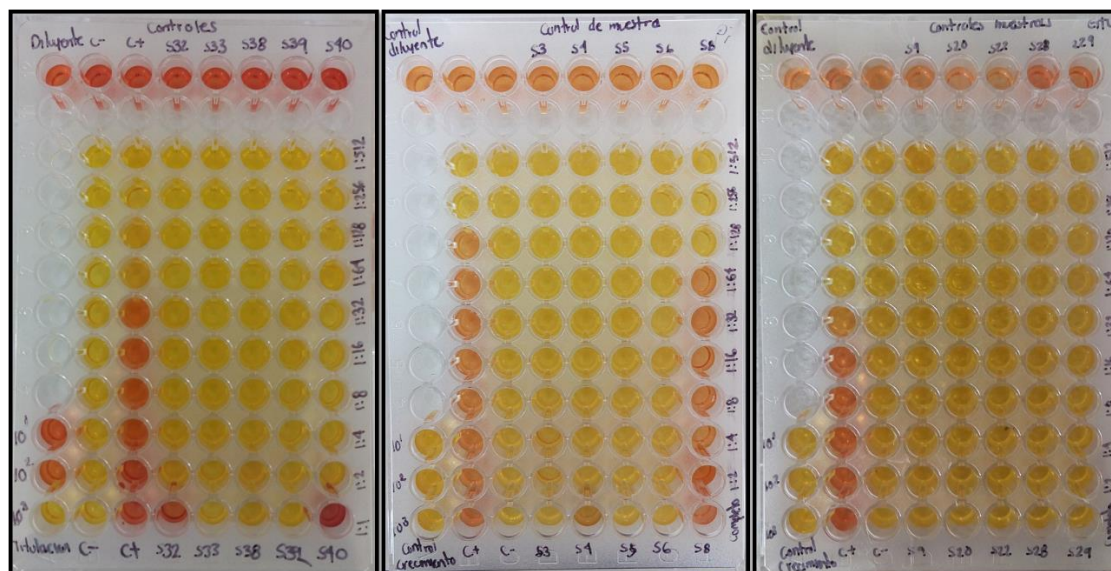
(n=20). MF: *M. fermentans*, MP: *M. penetrans*, MN: *M. pneumoniae*, MH: *M. hominis*, MG: *M. genitalium*, MPI: *M. pirum*, MO: *M. orale*.

### 10.8 Detección de anticuerpos contra micoplasmas en muestras de pacientes y testigos por inhibición metabólica.

Un total de 26 muestras tuvieron un resultado positivo para anticuerpos de inhibición metabólica (IM) contra 3 especies de micoplasmas. Los anticuerpos IM contra *M. fermentans* fueron encontrados en 86% (n=26) de pacientes con enfermedades reumáticas y en 30% (n=3) de individuos sanos. Anticuerpos contra *M. pirum* y *M. penetrans* se encontraron en el 10% (n=3) y 3% (n=1) de las muestras mientras que en individuos sanos no se observaron anticuerpos contra estas dos especies (Tabla 7). El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre el grupo de pacientes y el de individuos sanos. Las muestras donde se detectaron anticuerpos IM contra *M. pirum* y *M. penetrans* coincidieron en su totalidad con muestras que también presentaron anticuerpos contra *M. fermentans*, por lo que se sugiere la existencia de reactividad cruzada entre los anticuerpos generados contra diferentes especies de micoplasmas. La figura 14 muestra placas montadas para la detección de anticuerpos IM contra *M. fermentans*, *M. pirum* y *M. penetrans*.

**Tabla 7. Anticuerpos de inhibición metabólica contra *M. fermentans*, *M. penetrans* y *M. pirum* en muestras clínicas.**

	<i>M. fermentans</i>		<i>M. pirum</i>		<i>M. penetrans</i>		Positivas por PCR
	Positivas	Negativas	Positivas	Negativas	Positivas	Negativas	
Pacientes (n=30)	26	4	3	25	1	27	10/26
Individuos sanos (n=10)	3	7	0	10	0	10	1/3



**Figura 14. Placas para determinación de anticuerpo IM contra *M. fermentans*, *M. pirum* y *M. penetrans*.**

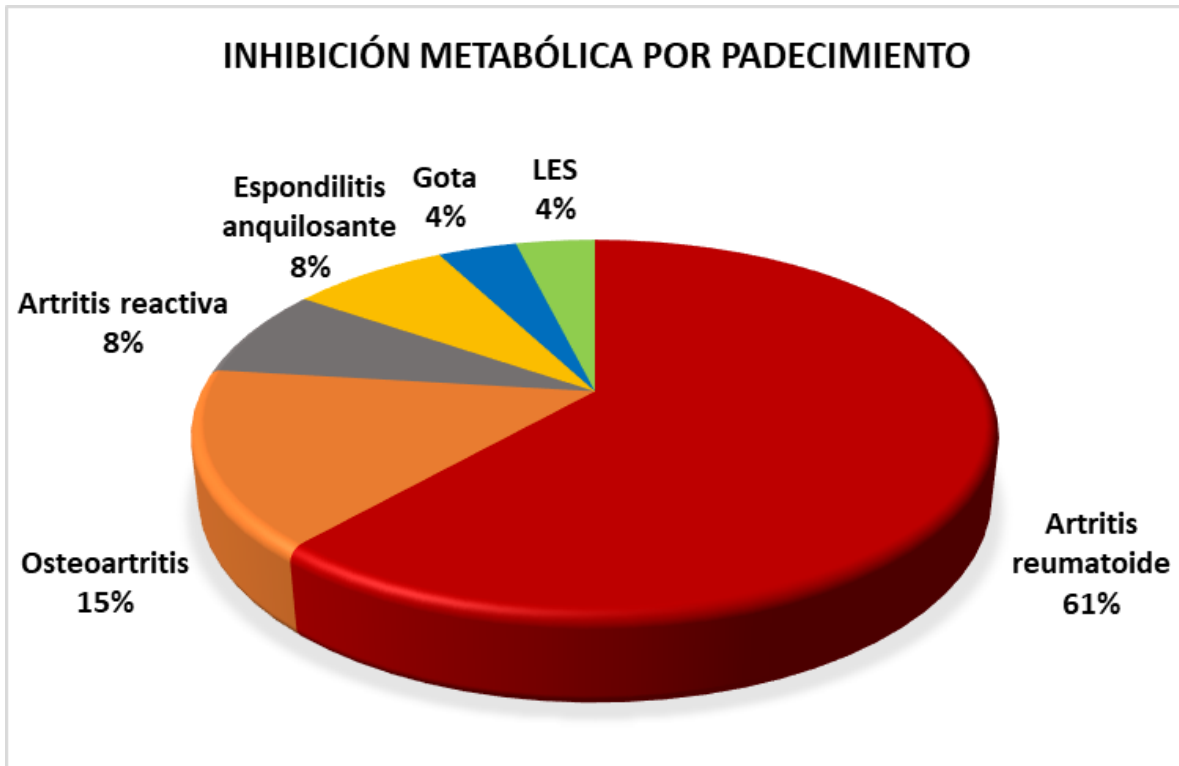
En la primera columna se observa el control de crecimiento, seguido del control negativo donde no hubo inhibición del desarrollo, control positivo con la inhibición del metabolismo, sin vire del indicador, seguido de las muestras. Se observa el control del diluyente y controles de muestras sin vire del indicador.

Por otro lado, dentro del grupo de muestras de pacientes positivas a anticuerpos IM, 10 de las muestras fueron previamente identificadas como positivas a micoplasmas por PCR. *M. fermentans* como especie única se detectó en 4 muestras, *M. hominis* en 1, *M. pneumoniae* en 1, *Mycoplasma spp* en 1 y en conjunto de dos a más especies: *M. fermentans* y *M. hominis* en 1 muestra, *M. pneumoniae* y *M. hominis* en 1 y *M. fermentans* y *M. pirum* en 1 muestra (Tabla 10).

Los porcentajes de muestras positivas a anticuerpos IM de acuerdo al tipo de enfermedad fueron los siguientes: con la mayor prevalencia se encontró a la artritis reumatoide con 61% (n=16) de las muestras analizadas, seguido de osteoartritis con 15% (n=4) y posteriormente las enfermedades no reumatoideas como artritis reactiva con 8% (n=2), espondilitis anquilosante con 8% (n=2), gota con 4% (n=1) y LES con 4% (n=1) (Figura 15).

Los títulos de anticuerpos fueron bajos (menores de 1:16) en la mayoría de los pacientes y controles, únicamente una muestra tuvo un título de 1:128, en la cual, se identificó por PCR del líquido sinovial a *M. fermentans*.

Lo anterior implica, que un alto porcentaje de los padecimientos reumáticos están asociados con la identificación de anticuerpos que reaccionan contra micoplasmas aun cuando el microorganismo no sea detectado, asumiendo su presencia en algún momento.



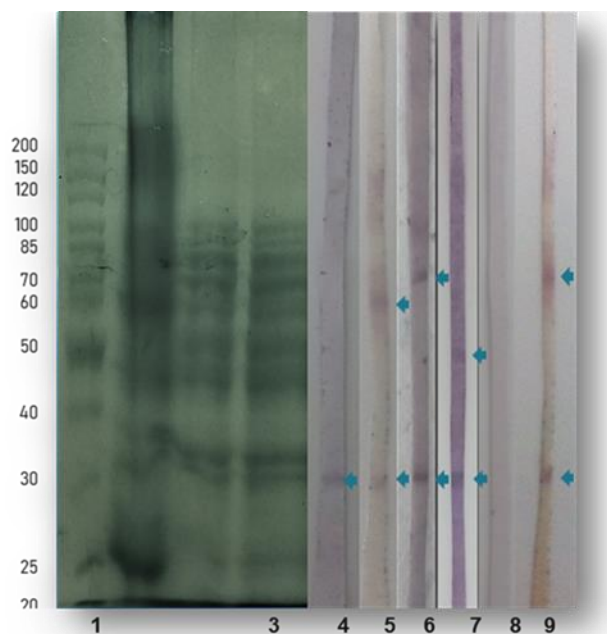
**Figura 15. Porcentaje de anticuerpos de inhibición metabólica por padecimiento.**

Muestras positivas n=26.

### **10.9 Determinación de anticuerpos anti-LAMP por Western-blot.**

Los líquidos sinoviales y sangre de pacientes y de individuos sanos fueron analizados para determinar su reactividad a las proteínas de membrana asociadas a lípidos (LAMP) de *M. fermentans*, mediante la técnica de Western blot. La Figura 16 muestra algunas reacciones representativas del Western blot.





**Figura 16. Western blot para detección de anticuerpos específicos contra LAMPs de *M. fermentans*.**

Gel al 12% con tinción de Coomassie: carril 1, marcador de peso molecular; carril 3, lipoproteínas extraídas por Tritón X114; carril 4-7, muestras representativas positivas; carril 8, muestra negativa; carril 9, control positivo. Las flechas representan la ubicación de las bandas reactivas.

Los anticuerpos IgG contra LAMP de *M. fermentans* fueron detectados en 68% (n=28) muestras clínicas de pacientes con diversas enfermedades reumáticas y en 18%(n=5) individuos sanos (Tabla 7). Hubo diferencias significativas ( $P<0.01$ ) entre el grupo de pacientes y de individuos sanos, siendo mayor el número de muestras con anticuerpos IgG en pacientes en comparación con los individuos sanos, sugiriendo que existe una asociación entre la presencia de anticuerpos contra micoplasmas en los padecimientos reumáticos. Los anticuerpos IgM se detectaron en dos muestras de pacientes y en ninguna de individuos sanos.

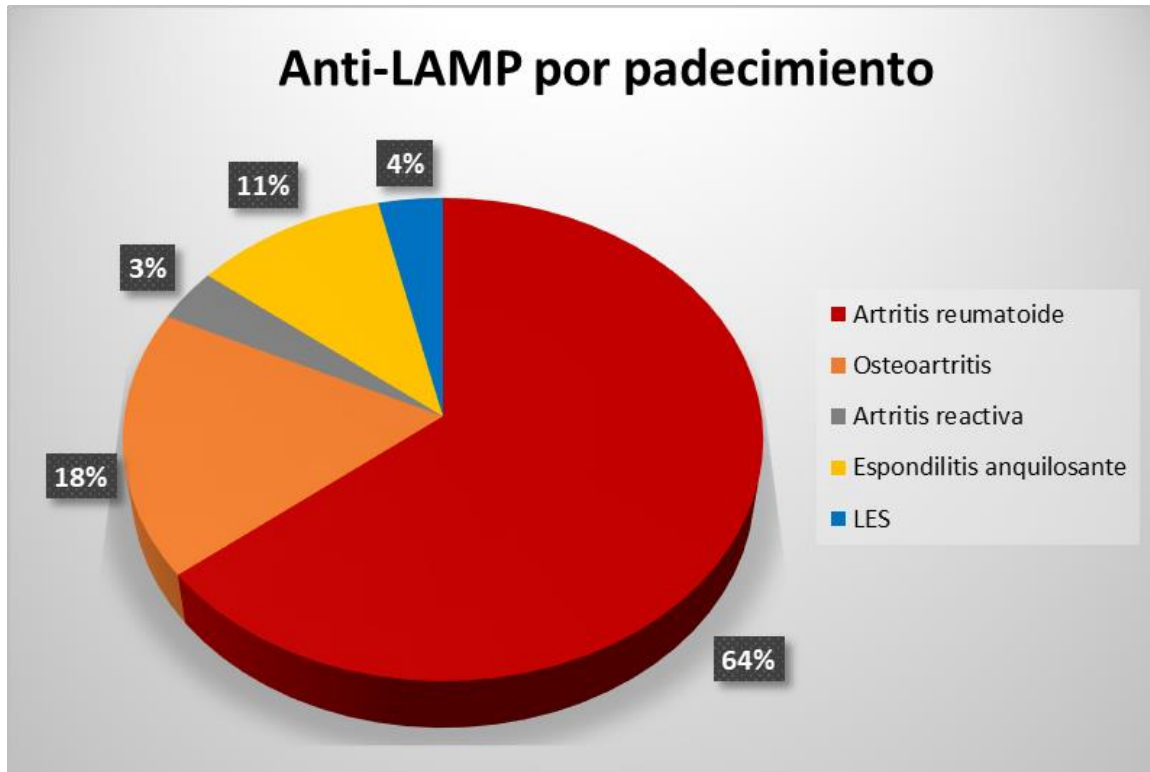
Un dato importante fue que 13 muestras de pacientes, las cuales previamente fueron identificadas como positivas para micoplasmas por PCR y cultivo, tuvieron anticuerpos IgG capaces de reconocer LAMP de *M. fermentans*. Los anticuerpos contra la LAMP p29 se encontraron tanto en pacientes como en individuos sanos, y los anticuerpos contra las LAMP p48, p61 y p70 se observaron únicamente en pacientes (Tabla 8). Quince muestras previamente negativas a *Mycoplasma*, presentaron reacción por anticuerpos IgG o IgM contra LAMP de *M. fermentans*. La

cantidad de la LAMPs identificadas por los anticuerpos en las muestras del grupo de pacientes fue mayor ( $n=4$ ) en comparación con el grupo de individuos sanos donde se identificó 1 LAMP.

**Tabla 8. Anticuerpos anti-LAMP de *M. fermentans* en muestras de pacientes con enfermedades reumáticas y testigos.**

Padecimiento	Muestras positivas		LAMP reactivas	Positivas por PCR
	IgG	IgM		
Individuos sanos (n=27)	5	0	p29	2/5
Pacientes (n=41)	28	2	p29, p48, p61, p70	13/28

De 28 muestras positivas para anticuerpos anti-LAMP, el 64% ( $n=18$ ) perteneció a muestras de pacientes con artritis reumatoide, seguidas de las muestras de osteoartritis con un 18% ( $n=5$ ), espondilitis anquilosante con 11% ( $n=3$ ), artritis reactiva y LES con el 3% ( $n=1$ ) mientras que gota no presentó anticuerpos (Figura 17).



**Figura 17. Porcentaje de anticuerpos Anti-LAMP de *M. fermentans* detectados por enfermedad.**

Muestras positivas n=28.

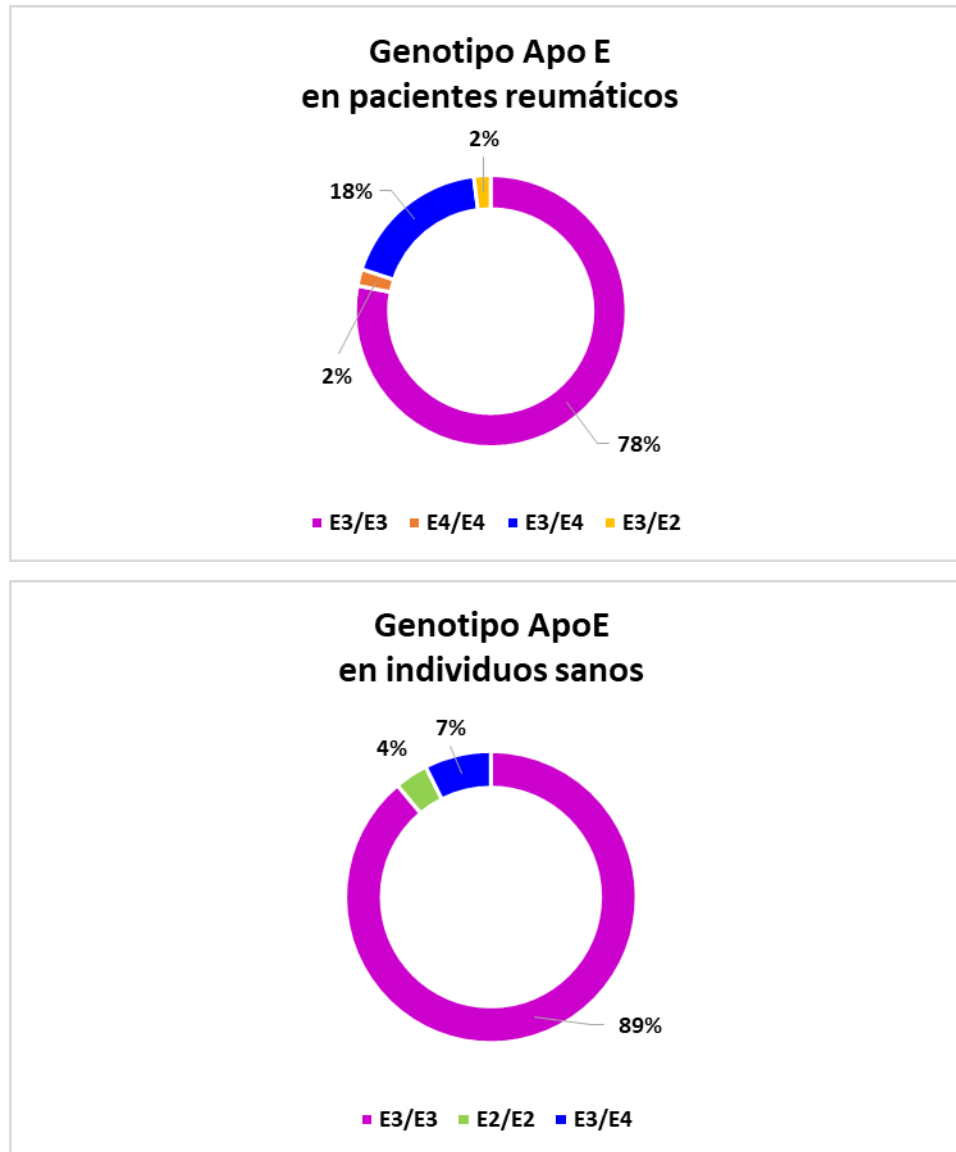
Por otra parte, las muestras de artritis reumatoide también tuvieron la capacidad de reconocer un repertorio más amplio de LAMP (n=4), en comparación con osteoartritis donde se reconocieron 3 LAMP, y de otras enfermedades no reumatoides como artritis reactiva donde se identificaron 2, espondilitis anquilosante (n=1) y gota (n=1). LAMP p29 fue reconocida por todas las muestras de los diferentes padecimientos, mientras que la LAMP p48 se encontró solo en artritis reumatoide (Tabla 9). Es importante destacar que 8 muestras con anticuerpos anti-LAMP positivos, fueron identificadas previamente con *M. fermentans* por PCR, otras especies de micoplasmas también se encontraron y se detallan en las Tablas 9 y 11, lo que implica que existen anticuerpos anti-LAMP de *M. fermentans* que presentan reacción cruzada con componentes de otros micoplasmas.

**Tabla 9. Asociación de padecimiento con LAMP de *M. fermentans* detectadas y especies de micoplasmas.**

Padecimiento	LAMP reactivas	Microorganismos identificados
Artritis reumatoide	p29, p61, p48, p70	<i>Mycoplasma spp</i> , <i>M. pneumoniae</i> , <i>M. fermentans</i> , <i>M. pirum</i>
Osteoartritis	p29, p61, p70	<i>Mycoplasma spp</i> , <i>M. fermentans</i>
Artritis reactiva	p29, p61	<i>M. hominis</i>
Espondilitis anquilosante	p29	<i>M. fermentans</i> , <i>M. hominis</i>
LES	p29	-
Gota	p29	-

#### **10.10. Genotipos de ApoE en pacientes reumáticos e individuos sanos y su asociación con la presencia de micoplasmas y anticuerpos contra micoplasmas.**

Se hizo la determinación del genotipo de ApoE a 50 muestras de pacientes y a 27 muestras de individuos sanos. En el caso de pacientes, se encontró que 39 (78%) muestras fueron genotipo E3/E3; 9 (18%) E3/E4; 1 (2%) E4/E4; y 1 (2%) E3/E2. En el caso de los individuos sanos, el genotipo E3/E3 se identificó en 24 muestras (89%), E3/E4 en 2 (7%) y E2/E2 en 1 (4%) (Figura 18). Con base en las cantidades de cada genotipo se pudo observar que el genotipo E3/E3, el cual mantiene niveles séricos normales de colesterol, fue similar entre pacientes e individuos sanos, los genotipos E3/E4 y E4/E4 tuvieron mayor número en el grupo de pacientes en comparación con el grupo de individuos sanos, dichos genotipos suelen predisponer a niveles de colesterol elevado.



**Figura 18. Distribución de genotipos de ApoE entre pacientes e individuos sanos.**

Pacientes n=50 e individuos sanos n=27.

Por otro lado, para determinar la asociación entre el papel de ApoE en las enfermedades reumáticas y el establecimiento de micoplasmas se dividieron a pacientes e individuos sanos en dos subgrupos: aquellos con presencia de micoplasmas y/o anticuerpos y aquellos sin micoplasmas y/o anticuerpos.

Al comparar los genotipos identificados entre los subgrupos, se detectó que los genotipos E3/E4 y E4/E4 tuvieron un porcentaje mayor (88% y 100% respectivamente) de micoplasmas o anticuerpos contra ellos. De los 12 genotipos con E4, 10 estuvieron vinculados a padecimientos reumáticos (Tabla 10).

**Tabla 10. Frecuencia de genotipos de ApoE en muestras de pacientes e individuos sanos con presencia y ausencia de micoplasmas y anticuerpos.**

Genotipo ApoE	Pacientes		Individuos sanos	
	Presencia de micoplasmas/ anticuerpos	Ausencia de micoplasmas/ anticuerpos	Presencia de micoplasmas/ Anticuerpos	Ausencia de micoplasmas/ Anticuerpos
E3/E3	29 (n=39)	10 (n=39)	7 (n=24)	17 (n=24)
E3/E4	8 (n=9)	1 (n=9)	1 (n=2)	1 (n=2)
E4/E4	1 (n=1)	0 (n=1)	-	-
E3/E2	0 (n=1)	1(n=1)	-	-
E2/E2	-	-	0 (n=1)	1 (n=1)

**Tabla 11. Relación de muestras positivas a *Mycoplasma* por cultivo y/o PCR, anticuerpos de inhibición metabólica contra *M. fermentans*, *M. penetrans* y *M. pirum* y anticuerpos IgG e IgM contra *M. fermentans*.**

Padecimiento	Cultivo	<i>Mycoplasma</i> por PCR	Anticuerpos de inhibición metabólica			Anticuerpos anti-LAMP de <i>M. fermentans</i>		APO E
			<i>M. fermentans</i>	<i>M. penetrans</i> GTU54	<i>M. pirum</i>	IgG	IgM	
Artritis reumatoide	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Artritis reumatoide	-	<i>M. penetrans</i> y <i>M. pirum</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Artritis reumatoide	-	-	+	-	-	+	-	E4/E4
Artritis reumatoide	-	-	+	-	-	-	-	E3/E3
Artritis reumatoide	-	-	+	-	-	+	-	E3/E3
Artritis reumatoide	-	-	+	-	-	+	-	E3/E3
Osteoartritis	-	<i>Mycoplasma</i> spp.	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Osteoartritis	-	<i>M. fermentans</i>	+	+	+	+	-	E3/E3
Artritis reumatoide	-	-	+	-	-	+	-	E3/E4
Artritis reactivo	-	-	ND	ND	ND	-	-	ND
Artritis reumatoide	+	<i>M. orale</i>	ND	ND	ND	-	-	E3/E3
Artritis reumatoide	-	-	ND	ND	ND	+	-	E3/E3
Gota	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Artritis reumatoide	-	<i>Mycoplasma</i> spp.	ND	ND	ND	ND	ND	E3/E3
Osteoartritis	-	-	ND	ND	ND	+	-	E3/E3
Artritis reumatoide/ gota	-	-	ND	ND	ND	+	-	E3/E4
Artritis reumatoide	-	-	ND	ND	ND	+	-	E3/E3
Artritis reumatoide	+	<i>Mycoplasma</i> spp.	ND	ND	ND	+	-	E3/E3
Artritis reumatoide	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	E3/E3
Osteoartritis	-	<i>M. fermentans</i>	+	-	-	+	+	E3/E3
Espondilitis anquilosante	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Artritis reactiva	-	<i>M. hominis</i>	+	-	-	+	-	E3/E3

Artritis reumatoide	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Artritis reumatoide/ LES (rhupus)	-	-	+	ND	ND	-	-	E3/E3
LES	-	-	+	ND	ND	+	-	E3/E3
Espondilitis anquilosante	-	<i>M. fermentans</i>	ND	ND	ND	+	-	E3/E3
Artritis reumatoide	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Osteoartritis	-	<i>M. fermentans</i>	+	-	-	+	-	E3/E3
Artritis reumatoide	-	-	+	-	-	-	-	E3/E3
Artritis reumatoide/ gota	-	-	+	-	-	+	-	E3/E4
Espondilitis anquilosante	-	<i>M. fermentans y M. hominis</i>	+	-	-	+	-	E3/E3
Espondilitis anquilosante	-	-	+	-	-	+	-	E3/E3
Osteoartritis	-	-	-	-	-	-	-	E3/E3
Osteoartritis	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	E3/E3
Artritis reumatoide/ osteoartritis	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	E3/E3
Artritis reumatoide	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	E3/E3
Eritema nodoso	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	E2/E3
Espondilitis anquilosante	-	-	-	-	-	-	-	E3/E3
LES	-	-	-	-	-	-	-	E3/E3
Artritis reactiva	-	<i>M. pneumoniae</i>	+	-	-	-	-	E3/E3
Artritis reumatoide	-	<i>M. pneumoniae y M. hominis</i>	+	-	-	-	-	E3/E3
Artritis reumatoide	-	-	+	-	-	-	-	E3/E3
Gota	-	-	+	-	-	-	+	E3/E3
Artritis reumatoide	-	<i>M. pneumoniae</i>	ND	ND	ND	+	-	E3/E3
Artritis reumatoide	-	-	+	-	-	+	-	E3/E4
Artritis reumatoide	-	<i>M. pneumoniae</i>	ND	ND	ND	+	-	E3/E4
Artritis reumatoide	-	-	+	-	-	+	-	E3/E3
Artritis reumatoide	ND	<i>M. pneumoniae, M. genitalium y M. pirum</i>	ND	ND	ND	ND	ND	E3/E3
Artritis reumatoide/ LES (rhupus)	+	<i>M. fermentans</i>	+	-	-	+	-	E3/E4
Artritis reumatoide	-	<i>M. fermentans y M. pirum</i>	+	-	+	+	-	E3/E3
Artritis reumatoide	-	-	+	-	-	+	-	E3/E3
Artritis reumatoide/ LES (rhupus)	+	<i>M. fermentans</i>	ND	ND	ND	+	-	E3/E4
Artritis reumatoide	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	E3/E3
Osteoartritis	-	<i>Mycoplasma spp.</i>	+	-	+	+	-	E3/E4
Artritis reactiva	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	E3/E3
Osteoartritis	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	E3/E3
Osteoartritis	-	-	-	-	-	-	-	E3/E4
Artritis reumatoide	-	-	+	-	-	+	-	E3/E3

ND: No determinado

## 11. Discusión

En padecimientos reumáticos autoinmunes como la artritis reumatoide y espondilitis anquilosante y otros, existe un riesgo genético que predispone a los individuos a padecer dicha enfermedad, pero se ha visto que existen otros factores ambientales implicados en el desarrollo, tal es el caso de infecciones por bacterias y virus. Desde tiempo atrás, se ha sospechado el papel de los micoplasmas en el desarrollo y/o exacerbación de enfermedades reumáticas. Los micoplasmas se han considerado como agentes putativos del desarrollo de artritis reumatoide en humanos, ya que muchas especies de *Mycoplasma* tienen la capacidad de inducir enfermedades muy similares en animales, se ha visto que una vez inoculados en diferentes sitios anatómicos de animales de laboratorio, como en tráquea, tienen la capacidad de migrar hasta sinovia y producir un proceso inflamatorio artrítico (Rivera *et al.*, 2002). Otros estudios al respecto han sido realizados desde la década de 1970, en los cuales, empleando diferentes técnicas clásicas, como cultivo y serología, y técnicas moleculares como PCR se ha buscado al microorganismo en muestras de pacientes con enfermedades reumáticas (Gilroy, Keat, & Taylor-Robinson, 2001; Johnson *et al.*, 2000; Mårdh, Nilsson, & Bjelle, 1973; Watanabe *et al.*, 1998). Hasta el momento los resultados son inconclusos, debido a la dificultad que representa hacer una asociación causal, ya que se requiere la presencia del microorganismo y la respuesta inmune montada en su contra; resultando complicado, debido a que los micoplasmas son microorganismos fastidiosos y requieren de condiciones nutricionales especiales para su crecimiento.

Debido a las dificultades para determinar con certeza si los micoplasmas están implicados en la etiología de enfermedades reumáticas, este trabajo pretendió demostrar la presencia de *Mycoplasma* y de anticuerpos contra el microorganismo y contra componentes específicos como LAMP mediante diferentes técnicas, en líquido sinovial y sangre de pacientes con padecimientos reumáticos, y de esta manera tener una visión más completa de su papel en las enfermedades reumáticas al correlacionar los hallazgos.

En los resultados obtenidos en este trabajo, se observó el desarrollo de micoplasmas en el cultivo de 4/54 muestras clínicas de líquido sinovial y sangre,



que representa el 7.40% del total de las muestras cultivadas. Estas muestras estuvieron clasificadas dentro de artritis reumatoide. El vire del indicador y la formación de colonias implica que el microorganismo era viable para su reproducción.

Como se mencionó, el aislamiento de estos microorganismos en líquidos biológicos suele ser difícil dadas las características nutricionales que presentan; además, estos tipos de muestras, sobre todo el líquido sinovial proviene de padecimientos artríticos donde la respuesta inflamatoria está exacerbada, y suelen tener inhibidores del crecimiento, como anticuerpos, complemento y enzimas, que forman parte de las defensas del hospedero. Por otra parte, los micoplasmas generalmente están en bajas cantidades y algunas especies como *M. fermentans*, *M. penetrans* y *M. pneumoniae* suelen ser intracelulares, lo que dificulta su desarrollo en los medios de cultivo aun cuando son enriquecidos con los nutrimentos requeridos.

Estas consideraciones pueden explicar la baja frecuencia de aislamientos que se obtuvieron en los cultivos; aun así, resulta un hallazgo interesante, debido a que no existen muchos reportes sobre la identificación de micoplasmas por cultivo en líquido sinovial y sangre. Un estudio respecto al aislamiento en líquido sinovial, fue realizado por Mårdh y colaboradores, en el que cultivaron 129 líquidos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide, artritis juvenil, gota, artritis psoriásica, síndrome de Reiter y osteoartritis, encontrando 6 muestras positivas (4.65%), la mitad de ellas en artritis reumatoide. Sus resultados fueron similares al porcentaje de aislamientos reportado en este trabajo aunque el 100% de los aislados perteneció a pacientes con artritis reumatoide (Mårdh *et al.*, 1973). Por otro lado, uno de los reportes de aislamientos en sangre fue realizado por Gil y colaboradores, encontraron una frecuencia de 13/87 positivos (Gil *et al.*, 2009). Estos resultados representan un porcentaje más alto (14.94%), posiblemente debido a la diferencia del tipo de muestra, dado que la mayoría de las muestras analizadas en este trabajo fueron líquidos sinoviales.

El aislamiento de micoplasmas por cultivo en muestras de sangre y líquido sinovial de personas con padecimientos reumáticos que no han sufrido traumatismo,

permite confirmar la presencia de la bacteria viable y relacionarla con la capacidad de producir bacteremia y alcanzar tejido sinovial.

Por otro lado, la técnica de PCR permite detectar a los microorganismos sin la necesidad de que conserven la capacidad de replicarse o permanecer viables, por esta razón se decidió utilizarla para identificar el material genético de la bacteria. Se emplearon iniciadores específicos para género y especie; los cuales, ya han sido previamente evaluados y reportados. A partir de extractos enriquecidos con ADN provenientes de muestras clínicas y cultivos, se logró la identificación de micoplasmas en el 34.4% de las muestras de enfermedades reumáticas contra el 11.11% de las muestras de individuos sanos. En el caso de las especies encontradas, la principal fue *M. fermentans*, seguida por *M. pneumoniae*, *M. hominis* y *M. pirum*. Dentro de las artritis, la artritis reumatoide obtuvo un porcentaje mayor (55%) de muestras positivas en comparación con espondilitis anquilosante, artritis reactiva y gota. En osteoartritis se identificaron en el 25% de las muestras.

Los resultados obtenidos concuerdan con algunos trabajos reportados como los de Gil y colaboradores donde identificaron por PCR a *M. fermentans* en 20/87 (23%) de las muestras sanguíneas de artritis reumatoide. Gilroy y colaboradores, a partir de muestras de material de articulaciones, identificaron a *M. fermentans* en el 17% de pacientes con artritis reumatoide y el 21% de individuos con artritis seronegativas, lo cual también coincide con este estudio, a pesar de no ser detectado en osteoartritis. Por el contrario, en otros estudios, como el realizado por el grupo de Watanabe, identificaron a micoplasmas a partir de muestras de fluido sinovial proveniente de pacientes con problemas en las articulaciones temporomandibulares; a partir de 36 muestras, se identificaron en 5 (14%) a *M. salivarium*, en 3 (8%) a *M. fermentans* y en 19 (53%) a ambos ((Watanabe *et al.*, 1998). En este caso, el porcentaje de aislamientos positivos fue mayor pero se identificó a *M. fermentans* como uno de los principales agentes detectados, también se identificó a *M. salivarium*, posiblemente debido a la zona de la toma de muestra ya que este microorganismo se encuentra presente en la cavidad oral. Schaeffer y colaboradores detectaron micoplasmas únicamente en dos muestras de fluido sinovial de enfermedades reumáticas y no hubo correlación con

el cultivo realizado (Schaeffer *et al.*, 1997). El grupo de Horowitz detectó a *M. fermentans* en 6/34 muestras de líquido sinovial de artritis reumatoide y en 1/8 de artritis no diferenciado. (Horowitz, Evinson, Borer, & Horowitz, 2000). Por el contrario a estos bajos porcentajes, Johnson y colaboradores reportaron en el 88% de muestras de fluido sinovial de artritis reumatoide a *M. fermentans*, así como en el 88% de artritis no reumatoide (Johnson *et al.*, 2000). En general, a pesar de la diferencia de porcentajes de positividad, es posible observar la presencia de micoplasmas entre las muestras de enfermedades reumáticas. Un dato interesante resulta el hecho que en osteoartritis existe variación respecto al hallazgo de micoplasmas, explicado en parte porque en estos pacientes las barreras que funcionan como defensa pierden la continuidad ocasionando que sean susceptibles a la infección (Xia *et al.*, 2014).

Cabe destacar que la identificación molecular de micoplasmas fue mayor en comparación con la obtenida a partir de cultivo (7.40%) debido en parte a que la PCR tiene una sensibilidad mayor, y no es necesario que la bacteria se encuentre viva para su identificación. Esto demuestra la importancia del uso de técnicas moleculares para la detección de microorganismos difíciles de cultivar como los micoplasmas. En 4 muestras fue posible la identificación por PCR a partir de cultivo mientras que no se encontró por PCR directa, posiblemente debido al enriquecimiento en el cultivo de la concentración de micoplasmas presentes en la muestra, pero sin lograr las unidades de cambio de color (UCC) suficientes para inducir el viraje del indicador y clasificarlo como positivo. Por tanto, el uso combinado de ambas metodologías parece incrementar la sensibilidad en la detección de micoplasmas en muestras de origen clínico.

Por otro lado, la detección de anticuerpos contra micoplasmas, permite inferir que estuvo presente en el organismo en algún momento en el tiempo, a pesar de no encontrarse presente en el momento de la toma de muestra. En este trabajo se buscaron anticuerpos de inhibición metabólica contra micoplasmas y anticuerpos específicos contra las LAMP de *M. fermentans* por tratarse del microorganismo más comúnmente identificado en las investigaciones.

Se encontraron anticuerpos de inhibición metabólica en el 86% del grupo de pacientes y en el 30% del grupo de individuos sanos, siendo estadísticamente significativa la diferencia entre ambos grupos ( $P < 0.5$ ). Los anticuerpos detectados fueron principalmente contra *M. fermentans*, sin embargo, también se identificaron en el 10% y 3% de las muestras de pacientes anticuerpos contra *M. pirum* y *M. penetrans*, como dato interesante algunas de estas muestras fueron positivas para otras especies, implicando que algunos de los anticuerpos tienen reacción cruzada entre diferentes especies de micoplasmas. En la bibliografía, no existen muchos reportes de la identificación de anticuerpos por esta metodología, en uno de los pocos trabajos, realizado por Mardh y colaboradores, se encontraron anticuerpos de inhibición metabólica en el 9.2% de los pacientes con artritis reumatoide y en el 4.2% de los individuos sin enfermedades reumáticas, siendo porcentajes bajos en comparación con los detectados en nuestro estudio.

La detección de anticuerpos IgG contra LAMP de *M. fermentans* se logró en el 68.2% de las muestras de pacientes con padecimientos reumáticos y en el 18.5% de los individuos sanos. Mientras que anticuerpos IgM solo se identificaron en el 7% de los pacientes y no se observaron en individuos sanos. Asimismo, 15 muestras donde previamente no pudo ser identificado *Mycoplasma* tuvieron reacción por anticuerpos IgG contra lipoproteínas. Esto sugiere que anteriormente estuvieron en contacto con el microorganismo, a pesar de no haber sido posible su detección en el presente, apoyando la teoría de que los micoplasmas tienen un papel en las enfermedades reumáticas, aun cuando no se detecten todo el tiempo en sinovia.

Dentro del repertorio de lipoproteínas detectadas se encontraron los péptidos p29, p61, p48 y p70. El péptido p29 fue reconocido en pacientes e individuos sanos, mientras que p48 fue reconocido exclusivamente en la artritis reumatoide. Las muestras de artritis reumatoide mostraron mayor reactividad a LAMP ya que reconocieron los cuatro péptidos mencionados arriba, esto se explica por el hecho de que estos individuos presentan una respuesta inmunológica exacerbada, por lo que tienen la capacidad de inducir la formación de un mayor número de anticuerpos contra diferentes componentes del microorganismo.

En una investigación reportada por Horowitz y colaboradores, identificaron por Western-blot, anticuerpos anti-*M. fermentans* en 47% de fluidos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide y en 7.5% de otras artritis; los péptidos que produjeron la reacción antígeno-anticuerpo fueron p107, p48 y p29 (Horowitz *et al.*, 2000). Mientras que Gil y colaboradores encontraron anticuerpos IgG contra *M. fermentans* en el 39.08% de las muestras de sangre de pacientes con artritis reumatoide y en el 7.46% de los individuos sanos. En este caso, los péptidos que se detectaron fueron p70 y p48.

En ambas investigaciones se obtuvieron porcentajes más bajos de anticuerpos en comparación con el presente estudio, aunque en los tres trabajos podemos encontrar diferencias significativas entre los grupos con enfermedades reumáticas y los grupos de individuos sanos. En relación a los péptidos que fueron reconocidos por los anticuerpos podemos notar que algunos de ellos fueron diferentes entre los tres trabajos, esto pudo deberse al tipo de cepa de *M. fermentans* que circula entre la población, debido a que existen ciclos de recambio a lo largo de tiempo.

En un estudio más reciente, llevado a cabo por Da Rocha y su equipo, se identificaron anticuerpos contra LAMP de *M. fermentans* por Western-blot en líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide e individuos sanos, al igual que en nuestro estudio, un alto número de pacientes (33/35) reconocieron las lipoproteínas y los individuos sanos fueron reactivos en una alta frecuencia (33/35), la diferencia entre los grupos radicó en el número de péptidos reconocidos, ya que se identificaron  $4 \pm 2$  en los pacientes contra  $3 \pm 2$  en los individuos sanos, habiendo diferencia estadísticamente significativa. Los péptidos identificados estuvieron en el rango de 58 a 102 kDa (da Rocha Sobrinho *et al.*, 2011).

Por otro lado, en este trabajo se identificaron anticuerpos contra *M. fermentans* en algunas muestras que fueron positivas para otras especies de micoplasmas cuando se les realizó PCR; esto sugiere la existencia de una reacción cruzada entre anticuerpos contra LAMP, producida por la similitud entre antígenos de diferentes especies de *Mycoplasma*. Este resultado concuerda con el observado para los anticuerpos de inhibición metabólica.

El reconocimiento de p29 en una gran cantidad de muestras de pacientes y controles, así como entre muestras con otras especies diferentes a *M. fermentans*, permite inferir que se trata de un péptido con alta capacidad antigénica y podría ser un candidato para ser usado como prueba de diagnóstico de micoplasmas. Los péptidos identificados únicamente en enfermedades reumáticas como p61, p48 y p70, sugieren la posibilidad de identificar péptidos reconocidos principal o exclusivamente por anticuerpos presentes en muestras de artritis reumatoide y otras enfermedades reumáticas.

Otro de los objetivos de este estudio fue la determinación del genotipo ApoE para realizar la comparación de genotipos entre pacientes con enfermedades reumáticas e individuos sanos e identificar la asociación entre un genotipo específico y los padecimientos reumáticos. Se encontró que los genotipos con ApoE4 se presentaron en un porcentaje mayor (del 20%) entre los pacientes reumáticos en comparación con los individuos sanos (7%). El genotipo ApoE4 está asociado con la elevación de los niveles séricos de colesterol, lo cual brindaría condiciones más aptas para el establecimiento de micoplasmas, los cuales requieren de esta sustancia para su crecimiento y reproducción. Al analizar la presencia de micoplasmas y/o anticuerpos entre las muestras de pacientes e individuos sanos con genotipoE4, se encontró que el 83% de ellas tenían micoplasmas o anticuerpos contra micoplasmas, a diferencia del genotipo E3 en el que el 57% de las muestras fueron positivas a micoplasmas y anticuerpos. Esto respalda la hipótesis que el genotipo ApoE4 juega un papel importante en la predisposición a la infección y establecimiento de micoplasmas, los cuales a su vez pueden desencadenar o exacerbar los padecimientos reumáticos. No existen muchos estudios respecto al impacto de los genotipos de ApoE en el establecimiento de micoplasmas. En el trabajo realizado por Zenteno-Díaz, se encontraron resultados similares a nuestro estudio, 3/4 muestras con genotipo E4 fueron positivas a micoplasmas en pacientes reumáticos, mientras que 33/59 muestras con genotipo E3 fueron positivas a micoplasmas, pudiéndose observar una tendencia del genotipo E4 a facilitar la infección por dichos microorganismos (Zenteno-Díaz, 2019). A pesar de lo anterior, el número de muestras con genotipo E4 es bajo para poder realizar una asociación.

Por otro lado, otros trabajos han buscado asociar al genotipo ApoE4 con microorganismos que requieren colesterol para su desarrollo, uno de ellos fue el de Gerard y colaboradores (2000) donde se encontró que el 70% de pacientes reumáticos con infección con *Chlamydia pneumoniae* presentaban genotipos de ApoE4. A pesar de tratarse de un microorganismo diferente es posible observar que ApoE4 parece ser predisponente a infecciones por microorganismos con requerimiento de lípidos que a su vez desencadenan procesos reumáticos.

Existen diferentes teorías de la forma en que los micoplasmas llevan al desencadenamiento o exacerbación de las enfermedades reumáticas. Una de ellas se basa en el hecho de que estos microorganismos tienen la capacidad de modular la respuesta inmune a través de la inducción de liberación de IL-10, mimetismo molecular y variabilidad antigénica que los esconde de las células inmunes, produciendo una infección crónica con baja cantidad de microorganismos pero con inflamación constante que en algún momento favorece el desencadenamiento de la enfermedad reumática. Existe otra teoría conocida como “pega y corre” donde se presenta una infección aguda por micoplasmas que logran atravesar las barreras y llegar hasta el tejido sinovial donde liberan sustancias y enzimas que provocan la inflamación de las articulaciones y posteriormente el desencadenamiento de artritis; en este caso, el sistema inmunológico logra eliminar al microorganismo por lo que no es detectable por cultivo y PCR, pero el cuadro autoinmune permanece.

Por todo lo anterior, el principal aporte de este trabajo fue realizar una correlación entre las diferentes metodologías como cultivo, la cual ayuda a la identificación de microorganismo vivo; PCR, que permite la identificación del material genético sin considerar si la bacteria se encuentra viable, y tiene mayor sensibilidad; identificación de anticuerpos totales o contra lipoproteínas LAMP, que ayuda a inferir la presencia del microorganismo aunque no sea identificable por las metodologías anteriores o ya no se encuentre presente; e identificación del genotipo E4 asociado al incremento de colesterol sérico que podría facilitar la infección por micoplasmas; todo con el propósito de lograr una asociación más evidente entre las enfermedades reumáticas, la presencia de micoplasmas y el genotipo ApoE4.

## 12. Conclusiones

12.1 El aislamiento e identificación de micoplasmas es mayor en pacientes con enfermedades reumáticas.

12.2 Este reporte constituye uno de los primeros en lograr el aislamiento de micoplasmas en líquido sinovial.

12.3 El diagnóstico por PCR tiene una mayor sensibilidad que el cultivo para la detección de micoplasmas en muestras de líquido sinovial y sangre total.

12.4 *M. fermentans* es la especie encontrada con mayor frecuencia en pacientes con enfermedades reumáticas.

12.5 Se identificaron infecciones mixtas, producidas por micoplasmas en pacientes con enfermedades reumáticas.

12.6 Se identificó una alta presencia de micoplasmas en pacientes con osteoartritis.

12.7 La presencia de anticuerpos contra *M. fermentans* y sus lipoproteínas es mayor en pacientes con enfermedades reumáticas.

12.8 Se estandarizó la técnica de Western-blot para la identificación de anticuerpos contra lipoproteínas.

12.9 La p29 de *M. fermentans* es la lipoproteína más reconocida por anticuerpos de pacientes con enfermedades reumáticas e individuos sanos; y la lipoproteína p48 es reconocida únicamente por pacientes con artritis reumatoide.

12.10 La proporción del genotipo ApoE4 es mayor en pacientes con padecimientos reumáticos.

12.11 El genotipo ApoE4 se encuentra en mayor porcentaje en pacientes e individuos sanos con presencia de micoplasmas y anticuerpos contra micoplasmas.



### 13. Perspectivas

- a) Evaluar los valores de colesterol HDL, LDL y VLDL, así como triglicéridos en el suero de los pacientes con enfermedades reumáticas, que puedan influir en la susceptibilidad de estos pacientes a infección por micoplasmas.
- b) Investigar la producción de anticuerpos contra lipoproteínas de otras especies de micoplasmas clínicamente significativas como *M. pneumoniae*, *M. penetrans* y *M. hominis* entre pacientes y controles.
- c) Identificar los epítomos contra los que reaccionan los anticuerpos producidos ante *M. fermentans* en pacientes con enfermedades reumáticas y en individuos sanos.

## 14. Referencias bibliográficas

- Adamu, J. Y., Wawegama, N. K., Browning, G. F., & Markham, P. F. (2013). Membrane proteins of *Mycoplasma bovis* and their role in pathogenesis. *Res Vet Sci*, *95*(2), 321-325. doi:10.1016/j.rvsc.2013.05.016
- Afriat, R., Horowitz, S., & Priel, E. (2013). *Mycoplasma fermentans* inhibits the activity of cellular DNA topoisomerase I by activation of PARP1 and alters the efficacy of its anti-cancer inhibitor. *PLoS One*, *8*(8), e72377. doi:10.1371/journal.pone.0072377
- Alunno, A., Carubbi, F., Giacomelli, R., & Gerli, R. (2017). Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: new players and therapeutic targets. *BMC Rheumatol*, *1*, 3. doi:10.1186/s41927-017-0001-8
- Aparicio, D., Torres-Puig, S., Ratera, M., Querol, E., Piñol, J., Pich, O. Q., & Fita, I. (2018). *Mycoplasma genitalium* adhesin P110 binds sialic-acid human receptors. *Nat Commun*, *9*(1), 4471. doi:10.1038/s41467-018-06963-y
- Arleevskaya, M. I., Albina, S., Larionova, R. V., Gabdoulkhakova, A. G., Lemerle, J., & Renaudineau, Y. (2018). Prevalence and Incidence of Upper Respiratory Tract Infection Events Are Elevated Prior to the Development of Rheumatoid Arthritis in First-Degree Relatives. *Front Immunol*, *9*, 2771. doi:10.3389/fimmu.2018.02771
- Ataee, R. A., Golmohammadi, R., Alishiri, G. H., Mirnejad, R., Najafi, A., Esmaili, D., & Jonaidi-Jafari, N. (2015). Simultaneous Detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma arthritidis* in Synovial Fluid of Patients with Rheumatoid Arthritis by Multiplex PCR. *Arch Iran Med*, *18*(6), 345-350. doi:015186/AIM.004
- Atkinson, P. (2018). *Immunodeficiency and Autoimmunity*. In G. Ragab, T. P. Atkinson, & M. L. Stoll (Eds.), *The Microbiome in Rheumatic Diseases and Infection* (1 ed., Vol. 1, pp. 475).
- Bardin, T. (2018). *Reactive Arthritis*. In G. Ragab, T. P. Atkinson, & M. L. Stoll (Eds.), *The Microbiome in Rheumatic Diseases and Infection* (1 ed., Vol. 1, pp. 475).
- Beaudet, J., Tulman, E. R., Pflaum, K., Canter, J. A., Silbart, L. K., & Geary, S. J. (2019). Immunologic Pathways in Protective versus Maladaptive Host Responses to Attenuated and Pathogenic Strains of *Mycoplasma gallisepticum*. *Infect Immun*, *87*(3). doi:10.1128/IAI.00613-18
- Borchsenius, S. N., Daks, A., Fedorova, O., Chernova, O., & Barlev, N. A. (2019). Effects of *Mycoplasma* infection on the host organism response via p53/NF- $\kappa$ B signaling. *234*, 171–180. doi:10.1002/jcp.26781
- Browning, G. F., Marena, M. S., Noormohammadi, A. H., & Markham, P. F. (2011). The central role of lipoproteins in the pathogenesis of mycoplasmoses. *Vet Microbiol*, *153*(1-2), 44-50. doi:10.1016/j.vetmic.2011.05.031
- Büchsel, M., Pletschen, L., Fleiner, M., Häcker, G., & Serr, A. (2016). A case of septic arthritis caused by a *Mycoplasma salivarium* strain resistant towards Ciprofloxacin and Clarithromycin in a patient with chronic lymphatic leukemia. *Diagn Microbiol Infect Dis*, *86*(1), 115-117. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2016.05.018
- Cacciotto, C., Cubeddu, T., Addis, M. F., Anfossi, A. G., Tedde, V., Tore, G., . . . Alberti, A. (2016). *Mycoplasma* lipoproteins are major determinants of neutrophil extracellular trap formation. *Cell Microbiol*, *18*(12), 1751-1762. doi:10.1111/cmi.12613
- Cedillo, L., & Yañez, J. (2003). Los micoplasmas y el SIDA. In (Vol. 49, pp. 23-27). México: Elementos.
- Chaudhry, R., Ghosh, A., & Chandolia, A. (2016). Pathogenesis of *Mycoplasma pneumoniae*: An update. *Indian J Med Microbiol*, *34*(1), 7-16. doi:10.4103/0255-0857.174112
- Cheng, Q., Wu, L., Tu, R., Wu, J., Kang, W., Su, T., . . . Liu, W. (2017). *Mycoplasma fermentans* deacetylase promotes mammalian cell stress tolerance. *Microbiol Res*, *201*, 1-11. doi:10.1016/j.micres.2017.04.010

- Chen, M., Wu, M., Hu, X., Yang, J., Han, R., Ma, Y., . . . Pan, F. (2019). Ankylosing spondylitis is associated with aberrant DNA methylation of IFN regulatory factor 8 gene promoter region. *Clin Rheumatol*. doi:10.1007/s10067-019-04505-5
- Christodoulides, A., Gupta, N., Yacoubian, V., Maithel, N., Parker, J., & Kelesidis, T. (2018). The Role of Lipoproteins in *Mycoplasma*-Mediated Immunomodulation. *Front Microbiol*, *9*, 1682. doi:10.3389/fmicb.2018.01682
- Chu, K. A., Chen, W., Hsu, C. Y., Hung, Y. M., & Wei, J. C. (2019). Increased risk of rheumatoid arthritis among patients with *Mycoplasma pneumoniae*: A nationwide population-based cohort study in Taiwan. *PLoS One*, *14*(1), e0210750. doi:10.1371/journal.pone.0210750
- Citti, C., & Blanchard, A. (2013). *Mycoplasmas* and their host: emerging and re-emerging minimal pathogens. *Trends Microbiol*, *21*(4), 196-203. doi:10.1016/j.tim.2013.01.003
- Citti, C., Nouvel, L. X., & Baranowski, E. (2010). Phase and antigenic variation in mycoplasmas. *Future Microbiol*, *5*(7), 1073-1085. doi:10.2217/fmb.10.71
- Cypers, H., Bridges, S. L., & Elewaut, D. (2018). *Spondyloarthritis*. In G. Ragab, T. P. Atkinson, & M. L. Stoll (Eds.), *The Microbiome in Rheumatic Diseases and Infection* (1 ed., Vol. 1, pp. 475).
- D'Alonzo, R., Mencaroni, E., Di Genova, L., Laino, D., Principi, N., & Esposito, S. (2018). Pathogenesis and Treatment of Neurologic Diseases Associated With. *Front Microbiol*, *9*, 2751. doi:10.3389/fmicb.2018.02751
- da Rocha Sobrinho, H. M., Jarach, R., da Silva, N. A., Shio, M. T., Jancar, S., Timenetsky, J., . . . Ribeiro-Dias, F. (2011). *Mycoplasma* lipid-associated membrane proteins and *Mycoplasma arthritis* mitogen recognition by serum antibodies from patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*, *31*(7), 951-957. doi:10.1007/s00296-010-1612-1
- Espinoza, L., & García-Valladares, I. (2013). Microbios y articulaciones: la relación entre infección y articulaciones. *9*, 229-238. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.reuma.2012.06.008>
- Fourour, S., Marois-Créhan, C., Martelet, L., Fablet, C., Kempf, I., Gottschalk, M., & Segura, M. (2019). Intra-Species and Inter-Species Differences in Cytokine Production by Porcine Antigen-Presenting Cells Stimulated by *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, and *M. flocculare*. *Pathogens* (Basel, Switzerland), *8*(1), 34. doi:10.3390/pathogens8010034
- García, A. M. (2003). La apolipoproteína E: el polimorfismo genético y su relación con los cambios metabólicos, los hábitos alimenticios y el origen étnico. *10*(4), 189-193.
- George, M. D., Cardenas, A. M., Birnbaum, B. K., & Gluckman, S. J. (2015). *Ureaplasma* septic arthritis in an immunosuppressed patient with juvenile idiopathic arthritis. *J Clin Rheumatol*, *21*(4), 221-224. doi:10.1097/RHU.0000000000000248
- Gérard, H. C., Wang, G. F., Balin, B. J., Schumacher, H. R., & Hudson, A. P. (1999). Frequency of apolipoprotein E (APOE) allele types in patients with Chlamydia-associated arthritis and other arthritides. *Microb Pathog*, *26*(1), 35-43. doi:10.1006/mpat.1998.0242
- Gérard, H.C., Schumacher R., El-Gabalawy H., Goldbach-Mansky R., Hudson, A. P. (2000). *Chlamydia pneumoniae* present in the human synovium are viable and metabolically active. *Microbial Pathogenesis*. *29* (1). 17-24. <https://doi.org/10.1006/mpat.2000.0360>.
- Gérard, H. C., Fomicheva, E., Whittum-Hudson, J. A., & Hudson, A. P. (2008). Apolipoprotein E4 enhances attachment of *Chlamydia* (*Chlamydia pneumoniae*) elementary bodies to host cells. *Microb Pathog*, *44*(4), 279-285. doi:10.1016/j.micpath.2007.10.002
- Gil, C., Rivera, A., Bañuelos, D., Salinas, S., García-Latorre, E., & Cedillo, L. (2009). Presence of *Mycoplasma fermentans* in the bloodstream of Mexican patients with rheumatoid arthritis and IgM and IgG antibodies against whole microorganism. *BMC Musculoskelet Disord*, *10*, 97. doi:10.1186/1471-2474-10-97

- Gil, C., Sánchez, A., Lecona, I., Rivera, A., Santellán, R., & Cedillo, L. (2014). Detection of Mycoplasmas in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *4 44*, 712-719. doi:10.4236/aim.2014.411077
- Gilroy, C. B., Keat, A., & Taylor-Robinson, D. (2001). The prevalence of *Mycoplasma fermentans* in patients with inflammatory arthritides. *Rheumatology (Oxford)*, *40*(12), 1355-1358. doi:10.1093/rheumatology/40.12.1355
- Harjacek, M., Ostojic, J., & Djakovic Rode, O. (2006). Juvenile spondyloarthropathies associated with *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Clin Rheumatol*, *25*(4), 470-475. doi:10.1007/s10067-005-0085-1
- He, J., Wang, S., Zeng, Y., You, X., Ma, X., Wu, N., & Wu, Y. (2014). Binding of CD14 to *Mycoplasma genitalium*-derived lipid-associated membrane proteins upregulates TNF- $\alpha$ . *Inflammation*, *37*(2), 322-330. doi:10.1007/s10753-013-9743-7
- Herrera-Saldivar, E., Yáñez, A., Bañuelos, D., Juárez, C., & Cedillo, L. (2012). Presence of Antibodies Against *Mycoplasma penetrans* in Patients with Antiphospholipid Syndrome. 85-96. doi:10.5772/31405
- Horowitz, S., Evinson, B., Borer, A., & Horowitz, J. (2000). *Mycoplasma fermentans* in rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *J Rheumatol*, *27*(12), 2747-2753.
- Horta-Baas, G., Romero-Figueroa, M. D. S., Montiel-Jarquín, A. J., Pizano-Zárate, M. L., García-Mena, J., & Ramírez-Durán, N. (2017). Intestinal Dysbiosis and Rheumatoid Arthritis: A Link between Gut Microbiota and the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *J Immunol Res*, *2017*, 4835189. doi:10.1155/2017/4835189
- Huang, J., Zhu, H., Wang, J., Guo, Y., Zhi, Y., Wei, H., . . . Chen, X. (2019). Fructose-1,6-bisphosphate aldolase is involved in *Mycoplasma bovis* colonization as a fibronectin-binding adhesin. *124*, 70-78. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.02.010>.
- Ibáñez, M. (2014). Eritema Nodoso. *1*, 151-155.
- Johnson, S., Sidebottom, D., Bruckner, F., & Collins, D. (2000). Identification of *Mycoplasma fermentans* in synovial fluid samples from arthritis patients with inflammatory disease. *J Clin Microbiol*, *38*(1), 90-93.
- Kawahito, Y., Ichinose, S., Sano, H., Tsubouchi, Y., Kohno, M., Yoshikawa, T., . . . Matsuda, K. (2008). *Mycoplasma fermentans* glycolipid-antigen as a pathogen of rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun*, *369*(2), 561-566. doi:10.1016/j.bbrc.2008.02.079
- Konovalova, A., & Silhavy, T. J. (2015). Outer membrane lipoprotein biogenesis: Lol is not the end. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *370*(1679). doi:10.1098/rstb.2015.0030
- Kornspan, J. D., & Rottem, S. (2012). The Phospholipid Profile of Mycoplasmas. *2012*, 8. doi:<http://dx.doi.org/10.1155/2012/640762>
- Kovacs-Simon, A., Titball, R. W., & Mitchell, S. L. (2011). Lipoproteins of bacterial pathogens. *Infect Immun*, *79*(2), 548-561. doi:10.1128/IAI.00682-10
- Li, S., Xue, G., Zhao, H., Feng, Y., Yan, C., Cui, J., & Sun, H. (2019). The *Mycoplasma pneumoniae* HapE alters the cytokine profile and growth of human bronchial epithelial cells. *Biosci Rep*, *39*(1). doi:10.1042/BSR20182201
- Liehn, E. A., Ponomariov, V., Diaconu, R., Streat, I., Ioana, M., Crespo-Avilan, G. E., . . . Cabrera-Fuentes, H. A. (2018). Apolipoprotein E in Cardiovascular Diseases: Novel Aspects of an Old-fashioned Enigma. *Arch Med Res*. doi:10.1016/j.arcmed.2018.08.008
- Mahmoudi, M., Aslani, S., Fadaei, R., & Jamshidi, A. R. (2017). New insights to the mechanisms underlying atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*, *20*(3), 287-297. doi:10.1111/1756-185X.12999

- Maksymowych, W. P. (2019). Biomarkers for Diagnosis of Axial Spondyloarthritis, Disease Activity, Prognosis, and Prediction of Response to Therapy. *Front Immunol*, *10*, 305. doi:10.3389/fimmu.2019.00305
- Maniloff, J., McElhane, R., Finch, L., & Baseman, J. (1992). *Mycoplasmas: Molecular biology and pathogenesis* (1 ed. Vol. 1). Washington, DC, EUA: American Society of Microbiology.
- Mårdh, P. A., Nilsson, F. J., & Bjelle, A. (1973). *Mycoplasmas* and bacteria in synovial fluid from patients with arthritis. *Ann Rheum Dis*, *32*(4), 319-325. doi:10.1136/ard.32.4.319
- Margarita, V., Rappelli, P., Dessì, D., Pintus, G., Hirt, R. P., & Fiori, P. L. (2016). Symbiotic Association with *Mycoplasma hominis* Can Influence Growth Rate, ATP Production, Cytolysis and Inflammatory Response of *Trichomonas vaginalis*. *Front Microbiol*, *7*, 953. doi:10.3389/fmicb.2016.00953
- Masukagami, Y., De Souza, D. P., Dayalan, S., Bowen, C., O'Callaghan, S., Kouremenos, K., . . . Sansom, F. M. (2017). Comparative Metabolomics of *mSystems*, *2*(5). doi:10.1128/mSystems.00055-17
- McGowin, C. L., & Totten, P. A. (2017). The Unique Microbiology and Molecular Pathogenesis of *Mycoplasma genitalium*. *J Infect Dis*, *216*(suppl\_2), S382-S388. doi:10.1093/infdis/jix172
- Mélé, N., & Turc, G. (2018). Stroke Associated With Recent *Mycoplasma pneumoniae* Infection: A Systematic Review of Clinical Features and Presumed Pathophysiological Mechanisms. *Front Neurol*, *9*, 1109. doi:10.3389/fneur.2018.01109
- Mu, H.-H., Nourian, M. M., McKennon, K. B., & Wang, J. (2016). *Mycoplasma* superantigen enhances the severity of K/BxN autoimmune arthritis through TLR4/BCL6/T FH pathway. *196*.
- Naghib, M., Hatam-Jahromi, M., Niktab, M., Ahmadi, R., & Kariminik, A. (2018). *Mycoplasma pneumoniae* and toll-like receptors: A mutual avenue. *Allergol Immunopathol (Madr)*, *46*(5), 508-513. doi:10.1016/j.aller.2017.09.021
- Ni, B., Bai, F. F., Wei, Y., Liu, M. J., Feng, Z. X., Xiong, Q. Y., . . . Shao, G. Q. (2015). Apoptosis induced by lipid-associated membrane proteins from *Mycoplasma hyopneumoniae* in a porcine lung epithelial cell line with the involvement of caspase 3 and the MAPK pathway. *Genet Mol Res*, *14*(3), 11429-11443. doi:10.4238/2015.September.25.10
- Nicholas, R. A. J., Rosales, R. S., & Loria, G. R. (2017). Mycoplasma: the big issues. *1*, 1-4. doi:10.15761/AHDVS.1000102
- Nolan, T. J., Gadsby, N. J., Hellyer, T. P., Templeton, K. E., McMullan, R., McKenna, J. P., . . . Simpson, A. J. (2016). Low-pathogenicity *Mycoplasma spp.* alter human monocyte and macrophage function and are highly prevalent among patients with ventilator-acquired pneumonia. *Thorax*, *71*(7), 594-600. doi:10.1136/thoraxjnl-2015-208050
- Ögrendik, Mesut. (2017). Oral Anaerobic Bacteria in the Etiology of Ankylosing Spondylitis. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord*, *10*. doi: 10.1177/1179544117712992
- Orlov, M., Garanina, I., Fisunov, G. Y., & Sorokin, A. (2018). Comparative Analysis of. *Front Genet*, *9*, 569. doi:10.3389/fgene.2018.00569
- Parrott, G. L., Kinjo, T., & Fujita, J. (2016). A Compendium for *Mycoplasma pneumoniae*. *Front Microbiol*, *7*, 513. doi:10.3389/fmicb.2016.00513
- Razin, S., Yogeve, D., & Naot, Y. (1998). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev*, *62*(4), 1094-1156.
- Rivera, A., Yáñez, A., León-Tello, G., Gil, C., Giono, S., Barba, E., & Cedillo, L. (2002). Experimental arthritis induced by a clinical *Mycoplasma fermentans* isolate. *BMC Musculoskelet Disord*, *3*, 15.
- Rivera-Tapia, J., Cedillo, L., & Giono, S. (2006). Comparación genómica en micoplasmas de interés médico. *51*, 74-79.

- Roachford, O. S. E., Nelson, K. E., & Mohapatra, B. R. (2017). Comparative genomics of four *Mycoplasma* species of the human urogenital tract: Analysis of their core genomes and virulence genes. *Int J Med Microbiol*, 307(8), 508-520. doi:10.1016/j.ijmm.2017.09.006
- Roachford, O. S. E., Nelson, K. E., & Mohapatra, B. R. (2019). A novel approach for the identification and phylogenetic delineation of human *Mycoplasma* species and strains using genomic segment sequence analysis. *Infect Genet Evol*, 68, 68-76. doi:10.1016/j.meegid.2018.12.002
- Román, C. D. (2002). *Inmunogenicidad de las proteínas de membrana asociadas a lípidos (LAMPS) de Mycoplasma fermentans P-140 en la artritis experimental de conejo*. (Maestría). Instituto Politécnico Nacional, Puebla México.
- Rottem, S. (2016). "Unique choline-containing phosphoglycolipids in *Mycoplasma fermentans*". *Chem Phys Lipids*, 194, 94-100. doi:10.1016/j.chemphyslip.2015.10.003
- Saeki, A., Sugiyama, M., Hasebe, A., Suzuki, T., & Shibata, K. (2018). Activation of NLRP3 inflammasome in macrophages by mycoplasmal lipoproteins and lipopeptides. *Mol Oral Microbiol*, 33(4), 300-311. doi:10.1111/omi.12225
- Saraya, T. (2017). *Mycoplasma pneumoniae* infection: Basics. *J Gen Fam Med*, 18, 118–125.
- Schaefferbeke, T., Renaudin, H., Clerc, M., Lequen, L., Vernhes, J. P., De Barbeyrac, B., . . . Dehais, J. (1997). Systematic detection of mycoplasmas by culture and polymerase chain reaction (PCR) procedures in 209 synovial fluid samples. *Br J Rheumatol*, 36(3), 310-314.
- Scharf, V. F., Lewis, D. D., Wellehan, J. F., Wamsley, H. L., & Richardson, R. (2015). Comparison of synovial fluid culture and 16S rRNA PCR in dogs with suspected septic arthritis. *Aust Vet J*, 93(6), 204-207. doi:10.1111/avj.12329
- Schmitt, S. K. (2017). Reactive Arthritis. *Infect Dis Clin North Am*, 31(2), 265-277. doi:10.1016/j.idc.2017.01.002
- Shio, M. T., Hassan, G. S., Shah, W. A., Nadiri, A., El Fakhry, Y., Li, H., & Mourad, W. (2014). Coexpression of TLR2 or TLR4 with HLA-DR potentiates the superantigenic activities of *Mycoplasma arthritidis*-derived mitogen. *J Immunol*, 192(6), 2543-2550. doi:10.4049/jimmunol.1300591
- Shokrollahi, M. R., Taj, F. E., Noorbakhsh, S., Zarabi, V., Ashouri, S., & Javadinia, S. (2017). Detection of the *M. pneumoniae* in Synovial Fluid of Children with Negative Culture Arthritis: A Cross Sectional Study in Tehran, Iran. *Infect Disord Drug Targets*, 17(1), 52-58. doi:10.2174/1871526517666161121151544
- Skeoch, S., & Bruce, I. N. (2015). Atherosclerosis in rheumatoid arthritis: is it all about inflammation? *Nat Rev Rheumatol*, 11(7), 390-400. doi:10.1038/nrrheum.2015.40
- Staats, C. C., Boldo, J., Broetto, L., Vainstein, M., & Schrank, A. (2007). Comparative genome analysis of proteases, oligopeptide uptake and secretion systems in *Mycoplasma spp.* 30, 225-229. doi:<https://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572007000200009>
- Toledo, A., & Benach, J. L. (2015). Hijacking and Use of Host Lipids by Intracellular Pathogens. *Microbiol Spectr*, 3(6). doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0001-2014
- Toms, T. E., Smith, J. P., Panoulas, V. F., Blackmore, H., Douglas, K. M., & Kitas, G. D. (2012). Apolipoprotein E gene polymorphisms are strong predictors of inflammation and dyslipidemia in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 39(2), 218-225. doi:10.3899/jrheum.110683
- Varas, P., Antunez-Lay, A., Bernuccio, J. M., Cossio, L., GonzálezSERGIO, S., & Eymin, G. (2016). Eritema nodoso: Causas más prevalentes en pacientes que se hospitalizan para estudio, y recomendaciones para el diagnóstico 144, 162-168. doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872016000200003>
- Velleca W., Bird B., Forrester F. (1980). Laboratory diagnosis of mycoplasma infections. *Department of Health and Human Services*.

- Wang, L., Wang, F. S., & Gershwin, M. E. (2015). Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *J Intern Med*, 278(4), 369-395. doi:10.1111/joim.12395
- Wang, Y., Wang, Q., Li, Y., Chen, Y., Shao, J., Nick, N. Xin, J. (2017). TI - Mmm-derived lipid-associated membrane proteins activate IL-1 $\beta$  production through the NF- $\kappa$ B pathway via TLR2, MyD88, and IRAK4. 7. doi:10.1038/s41598-017-04729-y
- Wang, D., Zhang, D. F., Li, G. D., Bi, R., Fan, Y., Wu, Y. Yao, Y. G. (2018). A pleiotropic effect of the APOE gene: association of APOE polymorphisms with multibacillary leprosy in Han Chinese from Southwest China. *Br J Dermatol*, 178(4), 931-939. doi:10.1111/bjd.16020
- Watanabe, T., Shibata, K., Yoshikawa, T., Dong, L., Hasebe, A., Domon, H., . . . Totsuka, Y. (1998). Detection of *Mycoplasma salivarium* and *Mycoplasma fermentans* in synovial fluids of temporomandibular joints of patients with disorders in the joints. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 22(3), 241-246. doi:10.1111/j.1574-695X.1998.tb01212.x
- Westley, B. P., Horazdovsky, R. D., Michaels, D. L., & Brown, D. R. (2016). Identification of a Novel *Mycoplasma* Species in a Patient With Septic Arthritis of the Hip and Seal Finger. *Clin Infect Dis*, 62(4), 491-493. doi:10.1093/cid/civ875
- Xia, B, Di C., Zhang J., Hu S., Jin H., Tong P. (2014). Osteoarthritis pathogenesis: a review of molecular mechanisms. *Calcif Tissue Int*. 95(6), 495-505. doi: 10.1007/s00223-014-9917-9
- Xiong, Q., Zhang, B., Wang, J., Ni, B., Ji, Y., Wei, Shao, G. (2016). Characterization of the role in adherence of *Mycoplasma hyorhinis* variable lipoproteins containing different repeat unit copy numbers. *Vet Microbiol*, 197, 39-46. doi:10.1016/j.vetmic.2016.10.025
- You, X. X., Zeng, Y. H., & Wu, Y. M. (2006). Interactions between mycoplasma lipid-associated membrane proteins and the host cells. *J Zhejiang Univ Sci B*, 7(5), 342-350. doi:10.1631/jzus.2006.B0342
- Zenteno-Díaz, D. (2019). *Papel de la apolipoproteína E y los micoplasmas en las enfermedades reumáticas*. (Maestría en ciencias en microbiología médica). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
- Zhang, Y., Wang, X. G., Zhen, Y., Mi, T. Z., He, H., & Yu, Z. G. (2017). Microbial Diversity and Community Structure of Sulfate-Reducing and Sulfur-Oxidizing Bacteria in Sediment Cores from the East China Sea. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi:10.3389/fmicb.2017.02133
- Zückert, W. R. (2014). Secretion of bacterial lipoproteins: through the cytoplasmic membrane, the periplasm and beyond. *Biochim Biophys Acta*, 1843(8), 1509-1516. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.04.022





# ANEXOS

## Anexo 1

### Carta de consentimiento informado

Mediante la firma de este documento, doy mi consentimiento para participar en el proyecto de investigación “Detección de micoplasmas y anticuerpos contra micoplasmas en pacientes reumáticos”, el cual está realizando la Dra. María Lilia Cedillo Ramírez y su grupo de investigación del instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP-ICUAP), en colaboración con el Dr. David Bañuelos Ramírez del Servicio de Reumatología del Hospital General San José del Instituto Mexicano del Seguro Social de Puebla (IMSS). Este estudio pretende aportar resultados que apoyen la posible participación de los micoplasmas y las isoformas de apolipoproteína E en el desarrollo de la artritis reumatoide y otras enfermedades reumáticas, mismos que servirán para un manejo adecuado de los pacientes con esta enfermedad.

Entiendo que mi participación será permitiendo que los investigadores me tomen una muestra de sangre o de líquido sinovial, esto no repercute en mi integridad física o daño a la salud, ni en lo económico ya que los estudios que se realizarán, serán costeados por la BUAP. Es también de mi consentimiento que los investigadores pueden ponerse en contacto conmigo en el futuro para saber de los resultados obtenidos y a fin de obtener mayor información acerca de la enfermedad, para que estos ayuden a entender el posible papel de los micoplasmas y la apolipoproteína E en los padecimientos reumáticos.

Fui elegido(a) para participar en este estudio porque padezco de artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, síndrome antifosfolípido o gota y seré parte de un grupo de personas que asistimos a consulta periódica a esta unidad de reumatología.

He concedido libremente mi participación en el estudio. Se me ha informado que es totalmente voluntaria y que aun después de iniciado el estudio, puedo rehusarme a participar o contestar preguntas en el momento que yo decida. Se me ha notificado también que los resultados obtenidos en el estudio son confidenciales y que mi nombre no será publicado en ningún informe y que además si rehusó a participar, no me será afectado de ninguna manera.

También he sido informado que mi participación es voluntaria y que no recibiré ninguna compensación económica, así mismo, el tratamiento que recibo no se verá alterado y los resultados de la investigación me serán proporcionados si los solicito a esta Unidad Reumatológica o al ICUAP con la Dra. María Lilia Cedillo Ramírez al teléfono 2295500 ext 2539.

Fecha:

---

Nombre y firma del paciente

Dra. María Lilia Cedillo Ramírez  
Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas  
Instituto de Ciencias BUAP

---

## Anexo 2

### Soluciones para el cultivo de micoplasmas

#### Preparación de dializado de levadura

1. Disolver 100 gramos de levadura seca para panadería en 250 ml de agua destilada.
2. Colocar a 115°C por 5 minutos.
3. Introducir la levadura dentro de membranas de celofán bien cerradas.
4. Cubrir la membrana con 500 ml de agua destilada y dejar dializando a 4°C por 48 horas.
5. Repartir el dializado en alícuotas de 50 ml y esterilizar a 121°C por 15 minutos.

#### Preparación de caldo y/o agar Eaton con glucosa

Tabla 1. Reactivos para preparar 100 ml de medio de cultivo:

Reactivo	Caldo Eaton	Agar Eaton	Caldo EY
Agua destilada	60 ml	60 ml	60 ml
Medio base PPLO (Difco®)	2.1 gr	2.1 gr	2.1 gr
Dextrosa anhidra	0.5 gr	0.5 gr	0.5 gr
Agar base	-	2 gr	-
Rojo de fenol 0.4%	1 ml	-	1 ml
Suero de caballo	30 ml	30 ml	-
Yema de huevo	-	-	30 ml
Dializado de levadura	10 ml	10 ml	10 ml
Penicilina G	2000 UI	2000 UI	2000 UI

1. Pesar en balanza granataria el medio base PPLO, la dextrosa anhidra y el agar base.
2. Adicionar el agua destilada y el rojo de fenol y homogenizar el polvo. En el caso del agar, calentar la mezcla para disolver el agar cuidando de no quemar la solución o que hierva excesivamente y se derrame.

3. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión, 121°C por 15 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente. El agar no debe gelificar.
4. Pesar la penicilina G en condiciones de esterilidad.
5. Agregar al medio el dializado de levadura, el suero de caballo y la penicilina G, homogenizar perfectamente y colocar en la incubadora por 24 horas a 37°C para prueba de esterilidad. Posteriormente almacenar herméticamente en alícuotas de 50 ml a 4°C.

### **Anexo 3**

#### **Extracción de ADN por el método de High Pure PCR Template Preparation Kit**

1. Iniciar con 250 µl de muestra biológica, y agregar 200 µl de Buffer de Unión y 50 µl de proteinasa K, mezclar e incubar a 70°C por 10 minutos.
2. Adicionar 100 µl de isopropanol, mezclar y transferir a la columna de extracción que contiene un filtro de alta pureza. Centrifugar a 8,000 x g por 1 minuto y descartar sobrenadante y tubo colector.
3. Agregar 500 µl de Buffer Removedor de Inhibidores y centrifugar a 8,000 x g por 1 minuto, descartar sobrenadante y tubo colector.
4. Adicionar 500 µl de Buffer Removedor de Lavado y centrifugar a 8,000 x g por 1 minuto, descartar sobrenadante y tubo colector.
5. Adicionar nuevamente 500 µl de Buffer Removedor de Lavado y centrifugar a 8,000 x g por 1 minuto, descartar sobrenadante y tubo colector.
6. Centrifugar a 13,000 x g 1 minuto para eliminar exceso de buffer.
7. Cambiar la columna a un tubo Eppendorf nuevo estéril y colocar 200 µl de buffer de Elución previamente calentado a 70°C. Esperar un minuto sin mover la columna y centrifugar a 8,000 rpm por 1 minuto para obtener el material genético disuelto.
8. Guardar el ADN obtenido a -20°C hasta su utilización.

## Anexo 4

Tabla 2. Secuencias de iniciadores y temperatura de alineamiento

Especie	Primer	Tamaño	Origen	Tm	Referencia
<i>Mycoplasma</i> spp.	AR1 5' ATGRGGRTGCGGCGTATTAG3' AR2 5' CKGCTGGCACATAGTTAGCCRT3'	301 bp	Gen 16S rRNA	60°C	Shidu <i>et al</i> , 1995
<i>M. fermentans</i>	RW004 5' GGACTATTGTCTAAACAATTTCCC3' RW005 5' GGTTATTTCGATTCTAAATCGCCT3'	206 bp	Elemento IS	55°C	Wang <i>et al</i> 1992
<i>M. pneumoniae</i>	MP5-1 5' GAAGCTTATGGTACAGGTTGG3' MP5-2 5' ATTACCATCCTTGTTGTAAGG3'	144 bp	Gen ATPasa	55°C	Inamine <i>et al</i> 1988
<i>M. penetrans</i>	MYCPENETP 5' CATGCAAGTCGGACGAAGCA3' MYCPENETN 5' AGCATTTCTCTTCTTACAA3'	407 bp	Gen r16S	55°C	Grau <i>et al</i> 1992
<i>M. hominis</i>	RH1 5' CAATGGCTAATGCCGGATACGC3' RH2 5' GGTACCGTCAGTCTGCAAT3'	429 bp	Gen r16S	60°C	Blanchard <i>et al</i> 1993 (2)
<i>M. genitalium</i>	MycGFw 5' CTGAAGACTTGGAGAGAACC3' MycGRv 5' AAAGCTCTACCGTTGTTATC3'	188 bp	Gen mpgB (Adhesina P140)	54°C	Zenteno 2019
<i>M. orale</i>	OraFw 5' GGAGCGTTTGCTCCGCTAAG3' OraRv 5' TAATCCTGTTTGCTCCCCAC3'	584 bp	Gen r16S	59°C	Timenetsky <i>et al</i> 2006
<i>M. salivarium</i>	MycSaFw 5' TATCTCTAGAGTCTCGACATGACT C3' MycSaRv 5' GATCATTAGTCGGCAGAGAACTG3'	325 bp	Gen r16S	59°C	Kazemiha <i>et al</i> 2009
<i>M. pirum</i>	MycPiFw 5' GTTGGCAGTATCGCTAGACAAA3' MycPiRv 5' TGGATGTTAGATGTCGGGGTAAA3'	325 bp	Gen r16S	59°C	Kazemiha <i>et al</i> 2009

## **Anexo 5**

### **Soluciones para PAGE-SDS**

#### **Regulador de corrimiento Tris-Glicina-SDS**

Para preparar 1 litro de solución disolver:

Tris base	3. gr
Glicina	14.4 gr
SDS	1 gr

Aforar a 1 litro con agua destilada.

#### **Solución de azul de Coomassie para tincion de geles de poliacrilamida**

Para 100 ml disolver:

Azul de Coomassie	0.25 gr
Metanol absoluto	50 ml
Ácido acético glacial	10 ml
Agua destilada	40 ml

#### **Solución decolorante para geles de poliacrilamida**

Para 110 ml agregar:

Metanol absoluto	50 ml
Ácido acético glacial	10 ml
Agua destilada	50 ml

**Anexo 6****Soluciones para Western blot e inmunodetección****Regulador de transferencia Tris-Glicina-SDS**

Para prepara 1 litro disolver en 800 ml de agua destilada:

Tris base	3.03 gr
Glicina	14.24 gr
SDS	1 gr

Adicionar 200 ml e metanol absoluto y almacenar a temperatura ambiente en frasco ámbar.

**PBS 0.015M, pH 7.4, 10X**

Aforar a 1 litro:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	12.5 gr
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.57 gr
NaCl	170 gr

**Solución de amido negro**

Amido negro	0.1 gr
Metanol	45 ml
Ácido acético glacial	10 ml
Agua destilada	45 ml

**PBS-Tween 20 al 0.05%**

A 1 litro de PBS1X agregar 0.5 ml de Tween 20 y mezclar.

## Anexo 7

### Método de Bradford para cuantificación de proteínas

1. En un tubo agregar 20  $\mu\text{l}$  de PBS como blanco.
2. En otro tubo colocar 20  $\mu\text{l}$  de la solución de proteínas.
3. A cada uno de los tubos agregar 1 ml de reactivo de Bradford (Sigma).
4. Mezclar y esperar entre 1 a 3 minutos para realizar la lectura de la absorbancia a 595 nm.
5. El equipo utilizado para realizar la medición fue el fotómetro NanoPhotometer® Pearl de IMPLEN donde se realizó la curva de calibración y se extrapolaron los valores de las muestras problemas.

## Anexo 8

### Genotipificación de ApoE

1. Realizar los cálculos de acuerdo al número de muestras a realizar.
2. Colocar los capilares en la gradilla fría.
3. Preparar una mezcla principal adicionar los reactivos del kit en el orden de la

**Tabla 3. Reactivos para preparación de mezcla de reacción para PCR de ApoE.**

Soluciones	Volumen para 1 reacción
Agua	7.35 $\mu\text{l}$
DMSO	0.9 $\mu\text{l}$
Mezcla de reacción y enzima	1.5 $\mu\text{l}$
Mezcla de sondas y oligonucleótidos	1.5 $\mu\text{l}$
Volumen final	11.25 $\mu\text{l}$

4. Colocar 8 microlitros de la mezcla a cada uno de los capilares.
5. Agregar 3.75  $\mu\text{l}$  microlitros de control negativo, control positivo y muestra en el capilar correspondiente.
6. Centrifugar a 2000 rpm durante 30 segundos.
7. Colocar en el termociclador siguiendo el orden de los capilares.
8. Programar equipo de acuerdo al protocolo de amplificación:



Program Step:	Denaturation	Cycling			Melting			Cooling
<b>Parameter</b>								
Analysis Mode	None	Quantification mode			Melting Curves mode			None
Cycles	1	45			1			1
Target [°C]	95	95	60	72	95	40	85	40
Hold [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:05	00:00:10	00:00:15	00:00:20	00:00:20	00:00:00	00:00:30
Ramp Rate [°C/s]	20	20	20	20	20	20	0.2	20
Acquisition Mode	None	None	Single	None	None	None	Continuous	None

9. La Interpretación de resultados es en base a los picos de fluorescencia obtenidos en las diferentes temperaturas para cada canal:

Type:	112C 158R (ApoE3)	112C 158C (ApoE2)	112R 158R (ApoE4)
Melting temperature of peaks (channel)	49°C (530) 63°C (640)	49°C (530) 53°C (640)	59°C (530) 63°C (640)
Phenotype	normal	<b>Type III Hyperlipidemia</b>	Increased Cholesterol Levels. Homozygote ApoE4: high risk for Alzheimer Disease

## Anexo 9

### Secuenciación de muestra positiva por PCR

Secuencia obtenida:

5'-GGCGATGATGTTTACGCGGGTTGAGAGACTGAACCGCCACACTGGGACTG  
AGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATATTCCACAATG  
GGCGAAAGCCTGATGGAGCGACMCAGCGTGAAGGATGAAGGTCCTATGGAT  
TGTAACCTTCTGTGGTAAGGGAAGAAAAGACAGAATAGGAAATGATTTTGT  
GACGGTACCTTATTAGAAAGCAATGGCTAACT-3'

Alineamiento en BLASTn:

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<a href="#">Mycoplasma conjunctivae strain NCTC10147 genome assembly, plasmid: 7</a>	425	850	100%	6e-115	99.16%	<a href="#">gii1563795960 LR215003.1</a>
<a href="#">Mycoplasma fermentans strain NCTC10117 genome assembly, plasmid: 9</a>	425	850	100%	6e-115	99.16%	<a href="#">gii1563790229 LR214963.1</a>
<a href="#">Mycoplasma fermentans strain NBRC 14854 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	425	425	100%	6e-115	99.16%	<a href="#">gii631252485 NR_113683.1</a>
<a href="#">Mycoplasma fermentans M64, complete genome</a>	425	850	100%	6e-115	99.16%	<a href="#">gii318037813 CP002458.1</a>
<a href="#">Mycoplasma fermentans JER, complete genome</a>	425	850	100%	6e-115	99.16%	<a href="#">gii307624329 CP001995.1</a>
<a href="#">Mycoplasma fermentans PG18 DNA, nearly complete genome</a>	425	842	100%	6e-115	99.16%	<a href="#">gii238809475 AP009608.1</a>
<a href="#">Mycoplasma fermentans strain M39 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence</a>	425	425	100%	6e-115	99.16%	<a href="#">gii209552649 FJ226565.1</a>
<a href="#">Mycoplasma fermentans strain PG-18 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence</a>	425	425	100%	6e-115	99.16%	<a href="#">gii209552648 FJ226561.1</a>
<a href="#">Mycoplasma caviae strain G122 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	420	420	100%	2e-113	98.74%	<a href="#">gii218857473 NR_025061.1</a>
<a href="#">Mycoplasma sp. strain 47975 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	389	389	100%	4e-104	95.82%	<a href="#">gii1589400244 MK615056.1</a>
<a href="#">Mycoplasma fermentans strain PG18 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	388	388	100%	1e-103	94.98%	<a href="#">gii602267024 NR_044666.2</a>
<a href="#">Mycoplasma sp. strain Mpeng 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	384	384	100%	2e-102	95.40%	<a href="#">gii1589400250 MK615062.1</a>
<a href="#">Mycoplasma sp. strain Sp18b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	384	384	100%	2e-102	95.40%	<a href="#">gii1589400233 MK615045.1</a>
<a href="#">Mycoplasma sp. 30L partial 16S rRNA gene, isolate 30L</a>	384	384	100%	2e-102	95.40%	<a href="#">gii340343130 FR869692.1</a>
<a href="#">Mycoplasma lipofaciens isolate ML 64-Berlin-03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	384	384	100%	2e-102	95.40%	<a href="#">gii109716227 DQ653410.1</a>
<a href="#">Mycoplasma lipofaciens strain R171 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	384	384	100%	2e-102	95.40%	<a href="#">gii219857477 NR_025065.1</a>
<a href="#">Mycoplasma sp. 27639 partial 16S rRNA gene, strain 27639</a>	379	379	100%	2e-101	94.98%	<a href="#">gii215414331 FM878636.1</a>
<a href="#">Mycoplasma sp. strain 1111B1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	375	375	100%	9e-100	94.56%	<a href="#">gii1589400263 MK615075.1</a>