



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO**

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Búsqueda de un Perfil Microbiano Asociado a Artritis
Reumatoide en Pacientes Mexicanos”**

TESIS

Que presenta

IBT. VALERIA RAQUEL DÍAZ SABILLÓN

Para obtener el grado de

Maestra en ciencias

En la especialidad de

Genética y Biología Molecular

Director de la tesis:

D. en C. Jaime García Mena

CIUDAD DE MÉXICO

Agosto, 2016

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Referencia y Apoyo para la Caracterización de Genomas, Transcriptomas y Microbiomas del Departamento de Genética y Biología Molecular, bajo la dirección del Dr. Jaime García Mena en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco.



Se agradece el apoyo del Biol. Alberto Piña Escobedo por su asistencia técnica con los reactivos, al Sr. Rodrigo García Gutiérrez por su asistencia con el material del laboratorio y a la Ing. Linda Zuleyma Quijano por su apoyo administrativo.

Se agradece al Dr. en Ciencias Selvasankar Murugesan por su apoyo en la realización del trabajo experimental y al M. en C. Otoniel Maya Lucas por el apoyo en el análisis bioinformático.

Se agradece el apoyo para obtener las muestras de la Dra. María Luisa Pizano Zárate, Instituto Nacional de Perinatología, Ciudad de México, de la Dra. María del Socorro Romero Figueroa, Coordinación de Investigación en Salud, Jefatura Delegacional de Prestaciones Médicas IMSS Toluca, México y del Dr. Gabriel José Horta Baas, Servicio de Reumatología Hospital General Regional 220, Toluca, México.

Para la realización de este trabajo se recibió apoyo del Cinvestav, CONACyT 163235 INFR-2011-01 y FONSEC SS/IMSS/ISSSTE-CONACYT-233361. Beca CONACYT 392813 para Valeria Raquel Díaz Sabillón.

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento al CINVESTAV por el apoyo otorgado durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Jaime García Mena, director de este trabajo por la orientación brindada durante la realización de este proyecto.

A mi comité tutorial, Dr. Bulmaro Cisneros Vega y Dr. Carlos Hoyo Vadillo por el apoyo brindado durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Selvasankar Murugesan y al M en C. Otoniel Maya personal y estudiante del Laboratorio de Referencia y Apoyo Para la Caracterización de Genomas Transcriptomas y Microbiomas, por su apoyo y confianza en la realización de mi investigación, muchas gracias por su tiempo, asesoría y por compartir su experiencia conmigo.

Al personal administrativo del Departamento de Genética y Biología Molecular, en especial a Gabriela Mora por su apoyo y guía en este proceso.

A mis padres porque de ellos aprendí el amor al conocimiento y la importancia del esfuerzo. Por su ejemplo y apoyo en todas las circunstancias. A mis hermanas por hacer mi vida más divertida y siempre tener un consejo para mí.

A Enrique por nuestro camino compartido, por enseñarme la valentía y determinación y siempre tener una razón para seguir adelante.

Contenido

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Artritis Reumatoide	1
1.2 Epidemiología.....	1
1.3 Etiología.....	2
1.4 Clínica y Diagnóstico	3
1.5 Criterios de Clasificación de AR de la American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism de 2010.....	7
1.6 Tratamiento.....	7
1.7 Microbiota Intestinal	8
II. ANTECEDENTES	12
2.1. Microbiota y Artritis Reumatoide	12
III. JUSTIFICACIÓN	15
IV. HIPÓTESIS	15
V. OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
VI. ALCANCE	16
VII. METODOLOGÍA	17
VII.1 PLAN DE TRABAJO	17
VII.2 DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS	17
DESARROLLO	17
Muestreo	17
Extracción de ADN	18
Amplificación de la región V3 del gen 16S.....	18
Preparación de genotecas de la región V3 del gen 16S	20
VIII. RESULTADOS	21
IX. DISCUSIÓN	39
Validación de Hipótesis	45
X. CONCLUSIONES	46
XI. PERSPECTIVAS	46
BIBLIOGRAFÍA	47
ANEXOS	52

Índice de Figuras

Figura 1 Articulaciones afectadas en la Artritis Reumatoide	5
Figura 2 Deformidades en mano.....	5
Figura 3 Tratamiento de la Artritis Reumatoide	8
Figura 4 Proceso Experimental.....	17
Figura 5 Tratamiento farmacológico	24
Figura 6 Fraccionamientos electroforético de ácidos nucleicos	25
Figura 7 Fraccionamiento electroforetico de productos de PCR.....	25
Figura 8 Fraccionamiento electroforético de productos de PCR región V3 ..	26
Figura 9 Genotecas	27
Figura 10 Parámetros de diversidad	28
Figura 11 Beta diversidad	29
Figura 12 Resultados de secuenciación masiva	30
Figura 13 Microbiota intestinal a nivel de género.....	31
Figura 14 Microbiota intestinal de acuerdo a la edad.....	32
Figura 15 Microbiota intestinal de acuerdo a la etapa de la enfermedad	33
Figura 16 Microbiota Intestinal de acuerdo al tratamiento farmacológico	34
Figura 17 Géneros bacterianos estadísticamente significativos	35

Índice de Tablas

Tabla 1 Manifestaciones extra articulares.....	6
Tabla 2 Criterios de Clasificación de Artritis Reumatoide	7
Tabla 3. Condiciones de amplificación.....	19
Tabla 4 Condiciones de amplificación empleando barcodes	21
Tabla 5 Características de pacientes	22
Tabla 6 Parámetros bioquímicos	23
Tabla 7 Actividad de la enfermedad.....	23
Tabla 8 índices de Biodiversidad	28

RESUMEN

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria, crónica, autoinmune de etiología desconocida cuyo principal blanco es la membrana sinovial. En México, un millón 700 mil personas, de entre 20 y 50 años padecen Artritis Reumatoide. Entre los factores ambientales podemos mencionar el tabaquismo, factores asociados a la reproducción femenina, exposición a sílice, la contaminación ambiental e infección por periodontitis. El estudio de la microbiota ha tomado importancia médica pues la proporción de ciertos filos respecto a otros, puede relacionarse a ciertas patologías. Es así que diversos grupos de estudio han reportado microorganismos implicados en el desarrollo de la Artritis Reumatoide como virus, retrovirus, bacterias y micoplasmas, sin embargo, a la fecha no se ha podido identificar el agente etiológico.

El objetivo de este trabajo fue conocer la diversidad de la microbiota intestinal de pacientes con artritis reumatoide y compararla con la microbiota intestinal de pacientes sanos, en busca de un perfil microbiano característico de la enfermedad.

Se reclutaron cien participantes, cincuenta pacientes con Artritis Reumatoide y cincuenta personas sanas, a los cuales se les solicitó una muestra de copro. A partir de esta muestra se construyeron genotecas de la región V3 del gen 16S ribosomal. La secuenciación masiva se llevó a cabo con el equipo Ion Torrent y el análisis de datos bajo la plataforma de Qiime.

Se observó un aumento de *Lactobacillus* en la microbiota intestinal de los pacientes con Artritis Reumatoide de reciente diagnóstico, respecto a personas sanas. Así como una menor diversidad microbiana en pacientes que no incluyen Metotrexato en su tratamiento farmacológico.

Abstract

Rheumatoid Arthritis is a chronic, autoimmune inflammatory disease of unknown etiology whose main target is the synovium. In Mexico, over a million 700 thousand people suffer from rheumatoid arthritis. Many factors have been linked with the development of rheumatoid arthritis such as a genetic background, HLA-DR allele, and environmental factors like smoking, silica exposure, environmental contamination and biological agents such as periodontitis infection caused by *Porphyromonas gingivalis*.

The study of the microbiome and microbiota has gained medical importance, as an association between certain genera abundance and a healthy state has been shown. Thus, many study groups have reported probably microorganisms involved in the development of rheumatoid arthritis as viruses, retroviruses, bacteria and mycoplasmas, however, to date the etiologic agent remains unknown.

The aim of this study was to determine the diversity of the intestinal microbiota of Rheumatoid Arthritis patients and compared it with the intestinal microbiota of healthy people, in order to determine a specific microbial-profile associated with the disease.

Stool samples of patients and healthy people were collected, libraries of the V3 region of 16S ribosomal gene were constructed then, massive sequencing was carried out with Ion Torrent equipment and data analysis under Qiime platform.

We identified an increased in *Lactobacillus* in patients with newly diagnosed rheumatoid arthritis, compared to healthy people. A decreased in diversity in patients whose treatment does not include Methotrexate is reported.

INTRODUCCIÓN

1.1 Artritis Reumatoide

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria, crónica, autoinmune y sistémica de etiología desconocida cuyo principal blanco es la membrana sinovial. Se caracteriza por inflamación poliarticular y simétrica de pequeñas y grandes articulaciones con posible compromiso sistémico en cualquier momento de su evolución (Secretaría de Salud, 2010).

La membrana sinovial es un tejido conjuntivo que reviste la cara interna de la cavidad articular, interviene en el transporte de sustancias desde el plasma sanguíneo hasta la cavidad articular. El líquido sinovial es un líquido viscoso, amarillo pálido que no coagula y contiene ácido hialurónico (Cabeza Osorio & de la Puente Bujidos, 2014).

La evolución de la AR es variable, desde un proceso oligoarticular breve y con lesiones mínimas, hasta una poliartritis progresiva con deformidades articulares importantes, pero la mayoría de los casos tiene una evolución intermedia (Cabeza Osorio & de la Puente Bujidos, 2014).

1.2 Epidemiología

La prevalencia a nivel mundial es de aproximadamente de 0.2 a 2 % de la población. En América Latina la prevalencia es de 0.4 a 1% siendo mucho más común en mujeres que en hombres, con una relación de seis a ocho mujeres por cada hombre mientras que en Europa y Estados Unidos esta proporción es de 4:1 (Massardo, 2008).

En México, un millón 700 mil personas, de entre 20 y 50 años padecen AR, lo que representa un grave problema de salud pública, al alcanzar costos anuales por más de 600 dólares por paciente (Secretaría de Salud, 2010).

Datos estadísticos demuestran que los síntomas de la artritis reumatoide en América Latina y África del Sur, inician a los 40 años de edad; diez años antes que en Europa y Estados Unidos (Mody & Cardiel, 2008).

La posibilidad de desarrollar artritis reumatoide se incrementa de tres a nueve veces cuando se tiene un familiar en primer grado que también la padece, esto respecto a la población sin historial familiar de artritis (Karlson & Deane, 2012).

Numerosos estudios han demostrado que el tratamiento oportuno puede prevenir la destrucción de las articulaciones y evitar la discapacidad, permitiendo así que los pacientes con artritis reumatoide continúen con un estilo de vida normal (Mody & Cardiel, 2008).

1.3 Etiología

La etiología de la artritis reumatoide es desconocida, sin embargo se cree que los pacientes que padecen esta enfermedad presentan una predisposición genética, que acompañada de ciertos estímulos ambientales desencadenan el desarrollo de la enfermedad (Karlson & Deane, 2012).

Entre los factores ambientales podemos mencionar el tabaquismo, factores asociados a la reproducción femenina, exposición a sílice, la contaminación ambiental y el padecimiento de infecciones como periodontitis (Karlson & Deane, 2012).

Los genes que más se han estudiado en el desarrollo de la artritis reumatoide son aquellos relacionados al Antígeno Leucocitario Humano por sus siglas en inglés HLA (Ruiz-Morales, *et al.*, 2004).

La asociación del alelo HLA-DR con el desarrollo de artritis reumatoide ha sido demostrada en varios grupos étnicos, incluyendo la población Latinoamericana (Mody & Cardiel, 2008). La población Mexicana ha sido asociada al alelo HLA-DRB1*1402. Estos alelos tienen una secuencia en común ubicada en la región 67 a 74 de la cadena polipeptídica de DRB1 correspondiente a los aminoácidos Leu-Leu-Glu-Gln-Arg-Arg-Ala-Ala (Ruiz-Morales, *et al.*, 2004).

La mayoría de los genes estudiados asociados a la artritis reumatoide participan en el reconocimiento inmunológico como HLA y TLRII, quimiotaxis y citosinas como TNF, IL6, factores de crecimiento, ligandos celulares, moléculas de adhesión ICAM1, señalización intracelular PTPN22, NFkB, IL1 y factores de transcripción como RUNX. (Delgado-Vega, *et al.*, 2006). La herencia de la artritis reumatoide es poligénica y no sigue un patrón mendeliano (Quiceno & Vinaccia, 2011).

1.4 Clínica y Diagnóstico

Los estudios bioquímicos basales en el paciente con diagnóstico de artritis reumatoide deben incluir; biometría hemática completa, velocidad de sedimentación globular y proteína C reactiva, transaminasas, fosfatasa alcalina creatinina sérica y examen general de orina con una periodicidad de 3 meses (Secretaría de Salud, 2010)

El factor reumatoide son anticuerpos dirigidos contra determinantes del fragmento Fc de la IgG. Sin embargo los factores reumatoides no son

específicos de la artritis reumatoide y pueden encontrarse en otras enfermedades e incluso en 5% de las personas sanas, aumentando su frecuencia con la edad (Cabeza Osorio & de la Puente Bujidos, 2014).

Los anticuerpos antipéptido citrulinado son muy específicos de la artritis reumatoide, su aparición puede preceder en años a la enfermedad y se relaciona con el pronóstico de la enfermedad. La presencia de anticuerpos antipéptido citrulinado y factor reumatoide en un mismo paciente, alcanza un valor predictivo positivo para artritis reumatoide de 100% (Secretaria de Salud, 2010).

La generación de anticuerpos que reconocen proteínas citrulinadas es un evento característico de la artritis reumatoide. Se cree que los antígenos citrulinados desencadenan la respuesta inmune adaptativa casi exclusiva de la artritis reumatoide (Mikuls, *et al.*, 2014).

Afectación articular: Lo más característico es la simetría y la afectación de las manos, aunque puede haber daño prácticamente en cualquier articulación. En la Figura 1 se muestran las articulaciones más afectadas, al inicio de la enfermedad incluyen las metacarpofalángicas y los carpos (Cabeza Osorio & de la Puente Bujidos, 2014).

Los primeros síntomas incluyen dolor e inflamación en las articulaciones afectadas. La rigidez matutina prolongada (mayor de una hora) es típica de la enfermedad. Si la enfermedad progresa, aparecen las deformidades representadas en la Figura 2.

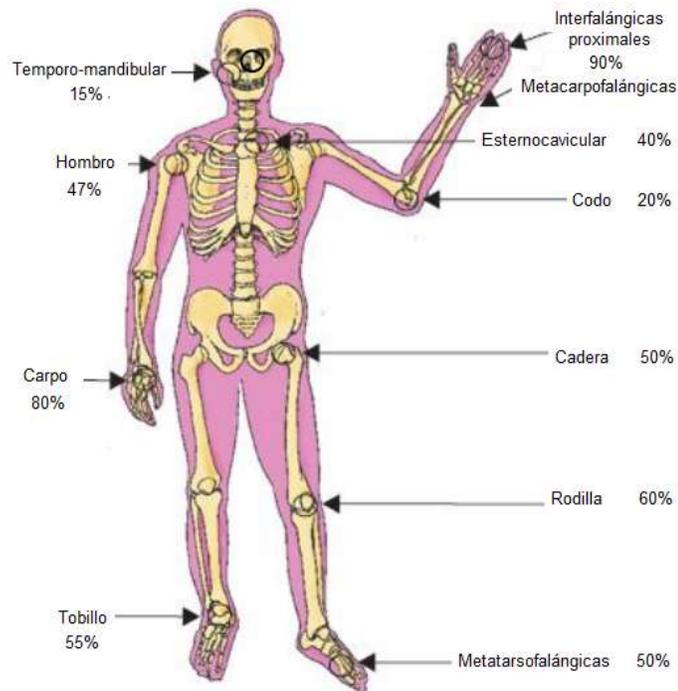


Figura 1. Articulaciones afectadas en la Artritis Reumatoide. *Modificado de (Cabeza Osorio & de la Puente Bujidos, 2014).*

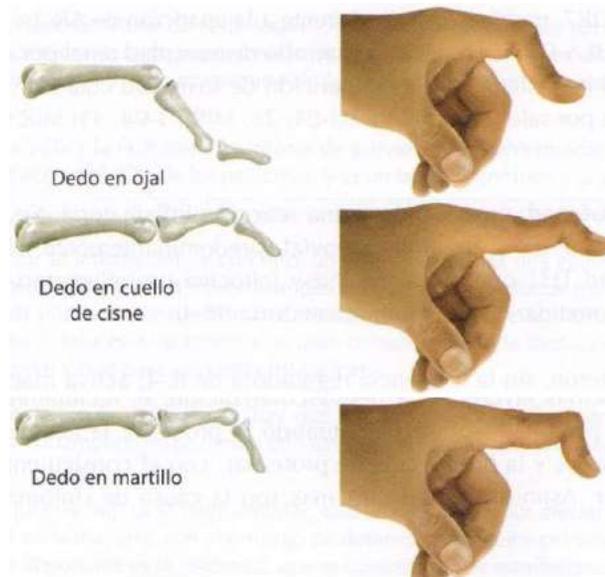


Figura 2. Deformidades en mano en Artritis Reumatoide *Modificado de (Cabeza Osorio & de la Puente Bujidos, 2014)*

Manifestaciones Extra articulares: Aparecen más frecuentemente en pacientes con títulos altos de factor reumatoide (FR). En la Tabla 1 se mencionan las manifestaciones más importantes:

Tabla 1. Manifestaciones extra articulares de la Artritis Reumatoide.

Sitio Afectado	Manifestación	Características
Cualquier órgano, principalmente zonas de presión (codos, rodilla).	Nódulos Reumatoides	20 a 30% Consistencia firme, están adheridos a planos profundos y no suelen ser dolorosos.
Oculares	Queratoconjuntivitis	20% Inflamación de la conjuntiva por sequedad.
	Escleritis	1% Inflamación de la esclera con afectación de capas más profundas, puede causar perforación del globo ocular.
Pleuropulmonares	Pleuritis	Asintomática.
	Neumonitis Intersticial	En casos graves y empeora el pronóstico.
	Nódulos pulmonares	Únicos o múltiples, se localizan en lóbulos superiores
	Hipertensión Pulmonar	En casos graves y empeora el pronóstico.
Cardíacas	Pericarditis, miocarditis o endocarditis	Inflamación de las capas del corazón
Neurológicas	Síndrome del túnel del carpo	Compresión de nervios por las deformidades articulares
Óseas	Osteoporosis	Por la inmovilidad, tratamiento corticoideo y por la actividad de la enfermedad
Hepática	Cirrosis biliar primaria	Elevación enzimas hepáticas

(Cabeza Osorio & de la Puente Bujidos, 2014)

1.5 Criterios de Clasificación de AR de la American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism de 2010.

Población objetivo: Pacientes que tengan:

- 1) Al menos una articulación con inflamación.
- 2) Que la inflamación no se explique por otra enfermedad.

Puntuación mayor o igual a 6 es diagnóstico de AR.

Tabla 2. Criterios de Clasificación de Artritis Reumatoide

Criterio	Característica	Valor
Articulaciones Afectadas	1 grande	0
	2-10 grandes	1
	1-3 pequeñas	2
	4-10 pequeñas	3
	>10 articulaciones	5
Serología	FR negativo	0
	FR bajo	2
	FR alto	3
Reactantes de Fase Aguda	PCR y VSG normal	0
	PCR y VSG anormal	1
Duración de los síntomas	< 6 semanas	0
	>6 semanas	1

(Aletaha, *et al.*, 2010)

1.6 Tratamiento

El principal objetivo del tratamiento en el paciente con AR es la remisión de la enfermedad o al menos alcanzar un bajo nivel de actividad clínica. La meta obligatoria en todo paciente es controlar la actividad de la enfermedad con el fin de mejorar los síntomas, disminuir el daño articular, prevenir la limitación funcional y mejorar la calidad de vida (Cardiel *et al.*, 2013).

La calidad de vida de los pacientes con AR se ve severamente disminuida debido a los síntomas que este padecimiento les causa, lo que a su vez les ocasiona problemas laborales y pérdidas económicas.

Además, estos pacientes tienen una disminución en la expectativa de vida comparada con la de la población general (Gibofsky, 2012).

En la Figura 3 se muestra el tratamiento en general de la AR de acuerdo a Guía Mexicana para el Tratamiento Farmacológico de la Artritis Reumatoide del Colegio Mexicano de Reumatología.

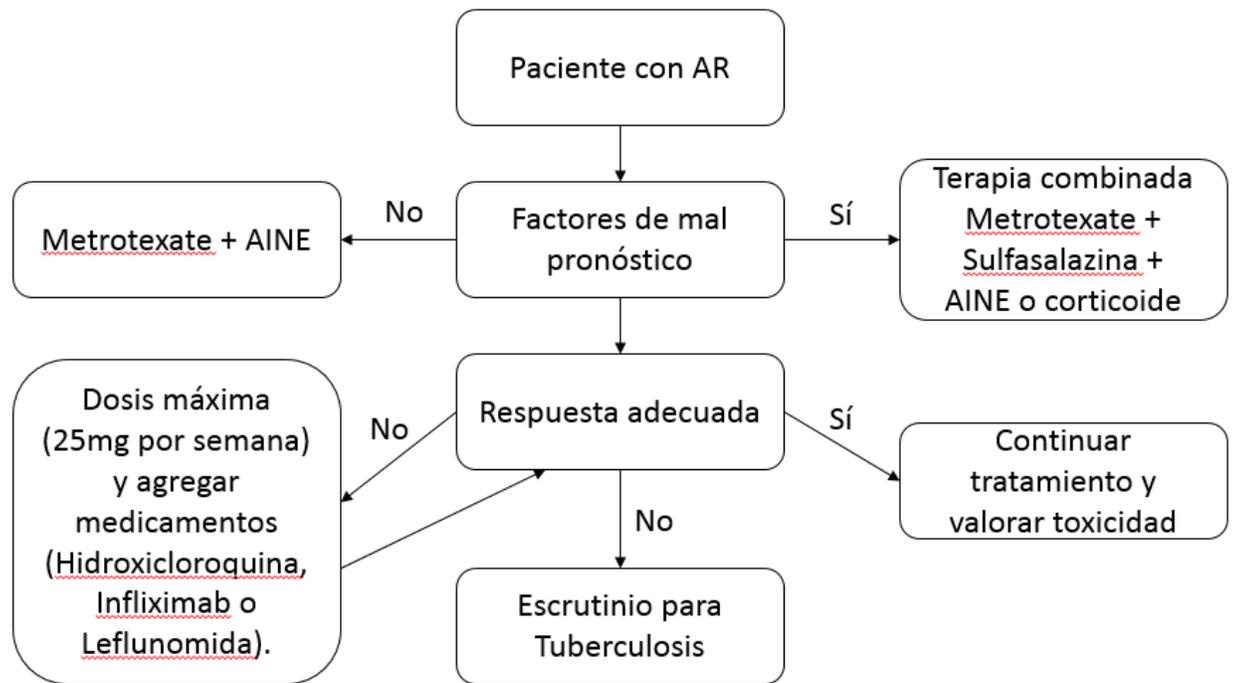


Figura 3. Tratamiento de la Artritis Reumatoide (Cardiel et al., 2013).

1.7 Microbiota Intestinal

Al nacer, el cuerpo humano rápidamente es colonizado por una gran variedad de microorganismos. Poblando boca, fosas nasales, piel, estómago, el tracto digestivo y el tracto urogenital. En cada órgano de nuestro cuerpo se establecen nichos que favorecen la supervivencia y el crecimiento de bacterias

específicas. Sin embargo existe una gran diferencia entre el número y tipo de bacterias que habitan cada órgano. Esta variabilidad está influenciada por diversos factores, entre los que se encuentran material genético, dieta, consumo de antibióticos y medicamentos y factores ambientales (Francescone, *et al.*, 2014).

La microbiota del tracto gastrointestinal está conformada por bacterias, arqueas, levaduras, hongos filamentosos y virus. Entre las bacterias que habitan el intestino se identifican cuatro *phylum* dominantes, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria y Proteobacteria (Rajilic-Stojanovic, *et al.*, 2007).

La colonización del tracto gastrointestinal empieza cuando el recién nacido entra en contacto con el medio ambiente que lo rodea. La composición de la microbiota, que se encuentra en desarrollo, se influye de la forma de nacimiento, canal vaginal o cesárea, la dieta compuesta por leche materna o fórmula, ingesta de probióticos y antibióticos. Los eventos de colonización moldean al sistema inmune y potencialmente afecta el desarrollo de diversas enfermedades (Nylund, *et al.*, 2013).

El intestino del recién nacido es colonizado por bacterias anaeróbicas facultativas como *Streptococci* spp. *Staphylococci* spp. y *Enterobacteriaceae*, a pesar de que estas bacterias pueden llegar a ser patogénicas, no provocan enfermedades en el recién nacido y se encargan de preparar el ambiente anaeróbico característico del intestino que requieren las Bifidobacterias y los Bacteroides al producir metabolitos y consumir el oxígeno del intestino (Marques, *et al.*, 2010).

La composición de la primera microbiota puede tener implicaciones nutricionales e inmunológicas. En un parto natural la microbiota vaginal, compuesta principalmente de *Lactobacillus* spp., *Prevotella* spp. o *Sneathia* spp. es transmitida al bebé, la función de esta microbiota es la de proteger;

colonizando distintos nichos del cuerpo e impidiendo la colonización de otros microorganismos, entre ellos algunos patógenos. No obstante, los niños nacidos por cesárea presentan comunidades microbianas que asemejan a la microbiota de la piel de sus madres, siendo de especial abundancia *Staphylococcus* spp. *Corynebacterium* spp. y *Propionibacterium* spp (Domínguez-Bello, *et al.*, 2010)

Durante el primer mes de vida la microbiota está compuesta por *Bifidobacterias* que son transmitidas por la madre a través de la leche. Aproximadamente a los seis meses de edad, cuando el niño empieza a ingerir alimentos sólidos la microbiota cambia, dando acceso a *Lachnospiraceae*, *Clostridiaceae* y *Ruminococcaceae*. Finalmente cuando el niño cumple los dos o tres años de edad, su microbiota ha madurado y se asemeja a la de un adulto, rica en *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae*, y *Ruminococcaceae* (Arrieta, *et al.*, 2014).

A lo largo de la vida adulta, la composición de la microbiota intestinal se mantiene relativamente estable, sin embargo cuando se alcanza la vejez la microbiota se hace menos diversa (Mariat, *et al.*, 2009). En la vejez hay un cambio en la relación Firmicutes-Bacteroidetes, haciéndose más predominantes los Bacteroidetes respecto a adultos jóvenes (O'Toole & Jeffery, 2015).

La microbiota intestinal de las personas adultas y los adultos mayores está determinada por la alimentación, el uso de medicamentos y por complicaciones asociadas a la edad; estancia en hospitales y asilos (Power, *et al.*, 2014). Presentándose un cambio en la microbiota más notorio en adultos mayores a sesenta años de edad (Bischoff, 2016).

Las miles de bacterias que habitan el tracto gastrointestinal establecen una relación mutualista con el huésped, mientras éste provee de nutrientes y protección, las bacterias actúan como barrera física contra patógenos, llevan a cabo procesos metabólicos y estimulación del sistema inmunológico (Alegre, *et al.*, 2014).

En un estado de salud, las células inmunológicas tanto de la respuesta innata como de la adaptativa cooperan para mantener la homeostasis fisiológica de la lámina propia intestinal (Scher, *et al.*, 2013).

Existen varios mecanismos que modulan la interacción microbiota-huésped e impiden que microorganismos traspasen la lámina propia y tengan acceso a órganos y tejidos periféricos. Una capa de moco, proteínas con propiedades antimicrobianas como defensinas y catelicidinas, así como células secretoras de inmunoglobulina A forman la primera línea de defensa (Scher & Abramson, 2015).

La barrera de protección también está formada por células epiteliales y enterocitos así como células dendríticas y macrófagos que continuamente circulan por el lumen intestinal en búsqueda de antígenos (Scher & Abramson, 2015).

Cómo los miembros de la microbiota interactúan con el huésped es complejo, y más interesante aún es qué evento lleva a romper esta barrera homeostática; una bacteria puede actuar como comensal en una relación de mutualismo y si las circunstancias cambian como el estado nutricional, un evento de coinfección y el antecedente genético del huésped pueden ocasionar que la bacteria se comporte como un patógeno (Belkaid & Hand, 2014).

Un desbalance en la composición microbiana; estado conocido como disbiosis, no solo favorece la proliferación de ciertos filos bacterianos sobre otros, también activa la respuesta inmune (Francescone, et al., 2014). Cuando la respuesta del sistema inmune es auto-regulada el resultado es la eliminación de microorganismos patógenos, sin embargo cuando el estado de disbiosis persiste, se genera un proceso de inflamación crónico (Scher & Abramson, 2015).

Es así como la proporción de ciertos filos respecto a otros, puede relacionarse a ciertas patologías. En la psoriasis, enfermedad inflamatoria cutánea, hay un aumento de la proporción de *Firmicutes* respecto a *Actinobacteria*, en los adenomas de cáncer de colon hay una mayor presencia de *Fusobacteria* (Francescone, et al., 2014)

Alergias, enfermedades autoinmunes e inflamatorias, surgen de una falla en la respuesta del sistema inmune hacia los componentes propios, a derivados de la microbiota o hacia antígenos ambientales (Belkaid & Hand, 2014).

En la artritis reumatoide se rompe esta homeostasis y hay un aumento de la producción de anticuerpos autoreactivos y linfocitos T proinflamatorios (Scher, et al., 2013).

II.ANTECEDENTES

2.1. Microbiota y Artritis Reumatoide

La participación de microorganismo en el desarrollo de la artritis reumatoide no es una idea nueva. A principios del siglo veinte se propuso que un exceso de metabolitos tóxicos era producido por bacterias Gram negativas que habitaban en el intestino, estos metabolitos se filtrarían al torrente sanguíneo,

llegando a las articulaciones y provocando la inflamación característica de la enfermedad (Brusca, *et al.*, 2014).

En los años setenta, se planteó la idea de que la artritis reumatoide era provocada por *Agalactiae cocci* un estreptococo presente en la leche (Svartz, 1972).

Es así que diversos grupos de estudio han reportado microorganismos implicados en el desarrollo de la enfermedad como virus, retrovirus, bacterias y micoplasmas, sin embargo todos estos intentos han fallado (Scher & Abramson, 2015).

Estudios en modelos murinos también han revelado una relación entre el desarrollo de artritis y la presencia o ausencia de ciertos géneros bacterianos (Brusca, *et al.*, 2015).

En 1970 un estudio de ratones que crecieron en condiciones libres de gérmenes demostró que éstos ratones desarrollaban inflamación de las articulaciones con una penetrancia del 100% en comparación a los ratones que crecieron de manera convencional (Scher & Abramson, 2011).

Entre los mejores modelos de estudio, se encuentra el de inducir la artritis reumatoide a partir de una inmunización con colágeno tipo II y adyuvante completo de Freund. Resultando en una patogénesis similar a la de artritis reumatoide; incluyendo hiperplasia de la membrana sinovial, infiltración de células mononucleares, degradación del cartílago, así como una mayor susceptibilidad a la enfermedad cuando se expresan genes del MHC clase II (Brand, *et al.*, 2007).

La investigación mencionada, contó con dos grupos de estudio, el primero conformado por ratones transgénicos portadores del alelo HLA-DRB1*0401

susceptible a padecer artritis reumatoide y el segundo ratones con el alelo HLA-DRB1*0402 resistente a la enfermedad. Los ratones resistentes a la enfermedad presentan una mayor abundancia de miembros de la familia Porphyromonadaceae, esta familia participa en el mantenimiento de la homeostasis intestinal, activando positivamente citosinas reguladoras de la inflamación (Gomez, et al., 2012).

Mientras que los ratones susceptibles a la enfermedad presentan una correlación negativa entre *Bifidobacterium* y Clostridiales y particularmente las hembras, mostraron una abundancia relativa menor de *Bifidobacterium* sp, y de la familia Porphyromonadaceae lo cual podría ser responsable de la disbiosis y el aumento en la respuesta proinflamatoria (Gomez, et al., 2012).

El estudio de la microbiota intestinal de humanos también ha arrojado resultados interesantes. La microbiota intestinal de pacientes chinos con artritis reumatoide muestra un incremento en el nivel de varias especies pertenecientes al género *Lactobacillus*, como *L. salivarius*, *L. iners*, y *L. ruminis* y la presencia de *L. mucosae* es única de pacientes con artritis reumatoide (Brusca, et al., 2015). También se demostró que pacientes con artritis reumatoide presentan mayor prevalencia de *Clostridium perfringens* (Sandhya, et al., 2015).

Un estudio realizado con pacientes de la Escuela de Reumatología de Nueva York expuso que la microbiota de pacientes con artritis reumatoide de recién diagnóstico se caracterizaba por una mayor abundancia de *Prevotella copri* respecto a la de personas sanas, mientras que la abundancia de esta especie bacteriana era similar en pacientes sanos y pacientes con artritis reumatoide crónica (Scher, et al., 2013).

Varios estudios sugieren que patógenos que participan en el desarrollo de periodontitis podrían estar asociados a la propagación de la artritis reumatoide.

Entre los microorganismos, el de principal interés es *Porphyromonas gingivalis*, debido a su capacidad de expresar peptidil arginina deiminasa, enzima que cataliza la citrulinación de péptidos que contienen arginina (Mikuls, et al., 2014).

El tratamiento de la periodontitis parece disminuir la severidad de los síntomas de la artritis reumatoide, los pacientes también presentan una disminución en las moléculas de inflamación como CRP, TNF IL-1beta (Brusca, et al., 2015).

III. JUSTIFICACIÓN

Cada vez son más los estudios que demuestran la importancia de la microbiota intestinal en el estado de salud y cómo un cambio en la diversidad microbiana puede ser asociado a distintas patologías, entre ellas la artritis reumatoide.

A pesar de que la microbiota de pacientes con artritis reumatoide ha sido reportada, la población Mexicana cuenta con información genética y hábitos alimenticios distintos, los cuales afectan la composición de la microbiota intestinal, a su vez la mayoría de las investigaciones se han enfocado al estudio de la diversidad microbiana en etapas tempranas de la enfermedad, por lo que resulta de interés no solo llevar a cabo un estudio representativo de la población mexicana, sino también conocer la microbiota que persiste al tratamiento farmacológico.

IV. HIPÓTESIS

Existe un Perfil Microbiano Asociado a Artritis Reumatoide característico de pacientes mexicanos con esta enfermedad.

V. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la diversidad de la microbiota de colon de pacientes con artritis reumatoide y compararla con la microbiota de colon de pacientes sanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar la diversidad de la microbiota del colon de pacientes con artritis reumatoide.
2. Caracterizar la diversidad de la microbiota del colon de pacientes sanos.
3. Comparar la microbiota de casos respecto a controles

VI. ALCANCE

Estudiar la diversidad de la microbiota de colon distal de 50 casos de artritis reumatoide de 18 a 55 años de edad y 50 controles sanos en el mismo rango de edad.

VII. METODOLOGÍA

VII.1 PLAN DE TRABAJO

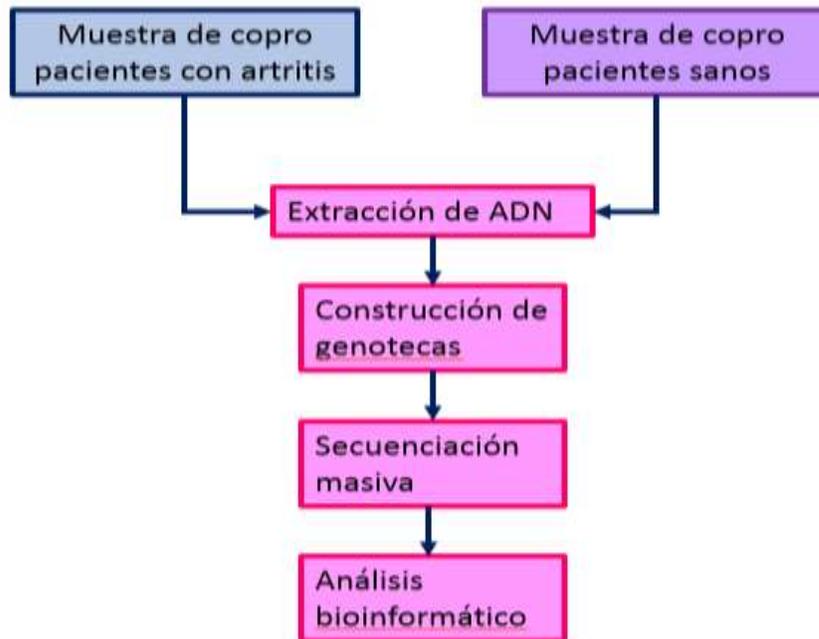


Figura 4. Diagrama del Proceso Experimental

VII.2 DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS

DESARROLLO

Muestreo

Cien muestras de copro de pacientes con artritis reumatoide que asistían a consulta médica al Hospital General Regional No. 220 de Medicina Familiar y Reumatología de la Delegación Estado de México Poniente fueron recibidas, de las cuales cincuenta fueron seleccionadas para participar en la investigación.

Del mismo modo, una muestra de copro fue solicitada a personas sanas, sin un familiar directo que padeciera de artritis reumatoide y cuya edad fuera la misma, o no mayor a tres años que la de los pacientes con artritis reumatoide. Los casos GRE81, RGME91, AGE20 fueron eliminados del estudio ya que no se pudo amplificar a ninguna concentración (10, 50, 100 ng)

Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en el protocolo de "AquaStool®". La cantidad de DNA total fue cuantificada utilizando el equipo NanoDrop Lite Spectrophotometer de Thermo Scientific. La integridad de las muestras se evaluó por fraccionamiento electroforético en 0.5% de agarosa teñido con 0.70 µL de colorante Midori Green advanced (1:15), utilizando el buffer Tris-Borato-EDTA como regulador de corrida, mezclando con 2 µL de buffer de carga (azul de bromofenol, glicerol 2X) por 4 µL de DNA. Aplicando al gel un voltaje de 100 Volts durante 40 minutos y se observó el resultado en el "Molecular Imager® Gel Doc™ XR de BioRad".

Amplificación de la región V3 del gen 16S

La presencia de DNA bacteriano en las muestras, fue corroborada mediante la amplificación de la región variable V3 del gen 16S ribosomal. Utilizando los primers y condiciones de amplificación descritas en la tabla 3, se obtuvo un amplicón de 465 pb. Como control positivo de la reacción, se utilizó la cepa bacteriana de *Escherichia coli*. SK10019 y como control negativo la mezcla de reacción sin DNA molde.

Para llevar a cabo la amplificación del DNA se utilizó el termociclador "2720 Thermal Cycler de Applied Biosystems", tabla 3. Los productos de reacción se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.0% teñido con 0.70 µL de colorante Midori Green advanced (1:15), utilizando el buffer Tris-Borato-

EDTA como regulador de corrida, utilizando 2 μ L de buffer de carga (azul de bromofenol, glicerol 2X) y 5 μ L de DNA, finalmente se utilizó 1 μ L de marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas®). Al gel se le aplicó un voltaje de 100 Volts durante 50 minutos y se observó el resultado en el “Molecular Imager ® Gel Doc™ XR de BioRad”.

Tabla 3. Condiciones de amplificación para la región V3 y V4 del gen 16S.

Primer	Secuencia
CGO 465 Forward	5'- CTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'
CGO 465 Reverse	5'-CTACCACCCTATCTAATCCTG-3'

Concentración de reactivos empleados en una reacción de PCR.

Reactivo	Concentración Final
Buffer 10X	1X
MgCl ₂ 25 mM	2.0 mM
dNTPs 10 mM	0.2 mM
Primer CGO 465 Forward 10 μ M	0.2 μ M
Primer CGO 465 Reverse 10 μ M	0.2 μ M
Taq Polimerasa 5U/ μ L	0.025 U/ μ L
DNA	10 ng por reacción

Programa de Amplificación de PCR

	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desnaturalización inicial	95	5.0
Desnaturalización	94	30seg
Alineamiento	55.3	30 seg 25 ciclos
Extensión	72	30 seg
Extensión final	72	10.0
	10	10.0

Preparación de genotecas de la región V3 del gen 16S

Una vez demostrada la presencia de DNA bacteriano, se realizó la construcción de las genotecas, para esto se llevó a cabo una PCR, consultar las condiciones de esta amplificación en la tabla 4, la cual abarca la región polimórfica V3 y una secuencia de nucleótidos única para cada muestra denominada “barcode”, así como secuencias adaptadoras útiles en la tecnología de secuenciación masiva incluidas en el Anexo IV.

La calidad de los amplicones obtenidos por cada muestra fue verificada por fraccionamiento electroforético analítico en geles de agarosa al 2.0%, utilizando la metodología previamente descrita. Obteniendo un amplicón de 281 pb.

Para la preparación de la genoteca, los productos de la PCR fueron mezclados a una concentración equivalente y analizados en un gel preparativo de agarosa al 2.0%, bajo las condiciones descritas previamente.

El amplicon de aproximadamente 281 pb fue cortado del gel y purificado utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR CleanUp System de la casa comercial Promega, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Tabla 4. Condiciones de amplificación empleando barcodes para la región V3 del gen 16S rDNA.

Primer	Secuencia
V3 341Forward	5'- CCTACGGGAGGCAGCAG-3'
V3 518 Reverse	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'

Concentración de reactivos empleados en una reacción de PCR.

Reactivo	Concentración Final
Buffer 10X	1X
MgCl ₂ 25 mM	2.0 mM
dNTPs 10 mM	0.2 mM
V3 341 Forward 10 µM	0.2 µM
V3 518 Reverse 10 µM	0.2 µM
Taq Polimerasa 5U/ µL	0.025 U/ µL
DNA	10 ng por reacción

Programa de Amplificación de PCR

	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desnaturalización inicial	95	5.0
Desnaturalización	94	30seg
Alineamiento	62	30 seg 25 ciclos
Extensión	72	30 seg
Extensión final	72	10.0
	10	10.0

VIII. RESULTADOS

Sesenta y cinco personas sanas fueron reclutadas, de las cuales 8 tuvieron que ser eliminadas de la investigación por tener un familiar con Artritis Reumatoide y 7 por haber consumido algún antibiótico en los tres meses previos al estudio.

A la vez, cincuenta pacientes con Artritis Reumatoide fueron invitados a participar en la investigación. Dos pacientes con artritis reumatoide tuvieron que ser eliminados del estudio debido a un número de lecturas insuficiente por el equipo de secuenciación masiva para asignar un orden taxonómico.

Finalmente, a los 98 participantes se les solicito información relevante a su peso, talla y edad, indicados en Tabla 6. Los participantes se encuentran en un rango de edad de 25 a 65 años, siendo la media de 47 años de edad para ambos grupos de estudio. No se encontró diferencia significativa en la proporción de hombres y mujeres ni en la edad promedio de los pacientes de artritis reumatoide y los controles.

Un índice de masa corporal mayor a 25 hace referencia a sobrepeso, estado nutricional prevalente en ambos grupos de estudio. Sin embargo aunque la media indica sobre peso en ambos grupos, este es más frecuente en pacientes con artritis reumatoide 29 vs 19 controles con sobrepeso, siendo el estado nutricional que prevalece en los controles el de normo peso (21 personas vs 4 pacientes de artritis reumatoide).

Tabla 5. Características de pacientes.

Parámetros	casos	controles	p-value
Muestra n= 98	48	50	
Sexo (M/F)	5 / 43	5 / 45	0.971 ^a
Edad (años)	47.5 ± 10.9	47.48 ± 11.07	0.993 ^b
IMC	28.68 ± 3.4	26.021 ± 4.19	0.001 ^b

^a-Prueba Chi-cuadrada, ^b- ANOVA dos factores

El diagnóstico de la artritis reumatoide se hizo en base a los criterios establecidos por el *American College of Rheumatology* (ACR) 2010. La velocidad de sedimentación globular y la proteína C reactiva fueron las pruebas serológicas con las que se determinó el nivel de inflamación en los pacientes con artritis reumatoide, así como la presencia de anticuerpos a partir

del Factor Reumatoide, los resultados de estas pruebas se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Parámetros bioquímicos de los pacientes con Artritis Reumatoide.

Parámetro	Media
Factor Reumatoide	131.8 ± 184
VSG	26.81 ± 15.21
PCR	1.17 ± 1.47

La tabla 7 muestra cinco de las seis herramientas recomendadas por el *American College of Rheumatology* y *European League Against Rheumatism* (EULAR) para determinar el nivel de actividad de la enfermedad. La mayoría de los pacientes con Artritis Reumatoide que participaron en el estudio, presentan un estatus moderado de la enfermedad.

Tabla 7. Actividad de la enfermedad de acuerdo a distintos parámetros.

Parámetro	Media	Actividad de la enfermedad
DAS28VSG	3.53 ± 1.37	Moderada
DAS28PCR	2.60 ± 1.16	Baja
CDAI	10.21 ± 9.07	Moderada
SDAI	11.20 ± 9.56	Moderada
RAPID3	3.60 ± 2.18	moderada

El tratamiento farmacológico de los pacientes con artritis reumatoide es a base de analgésicos y antiinflamatorios no esteroideos (AINES), Fármacos Antirreumáticos Modificadores de la enfermedad (FARME) y medicamentos biológicos.

El primer fármaco de elección para tratar los síntomas de Artritis Reumatoide es el Metotrexato, por lo general acompañado de un antiinflamatorio no esteroideo. El médico especialista evalúa la respuesta del paciente y la actividad de la enfermedad. Cuando la respuesta no es la esperada se inicia una terapia combinada en la que se agrega un segundo FARME comúnmente Leflunomida o Sulfasalazina, si el pronóstico de la enfermedad sigue siendo negativo se inicia una terapia acompañada de medicamentos biológicos.

En este estudio, solo el 8.0% de los pacientes de Artritis Reumatoide no consume Metotrexato, el 25% de los pacientes consumen Metotrexato acompañado del glucocorticoide Prednisona, el 25% de los pacientes consumen Metotrexato, un FARME distinto de Metotrexato y un glucocorticoide, y el 18% de los pacientes incluye además un medicamento biológico.

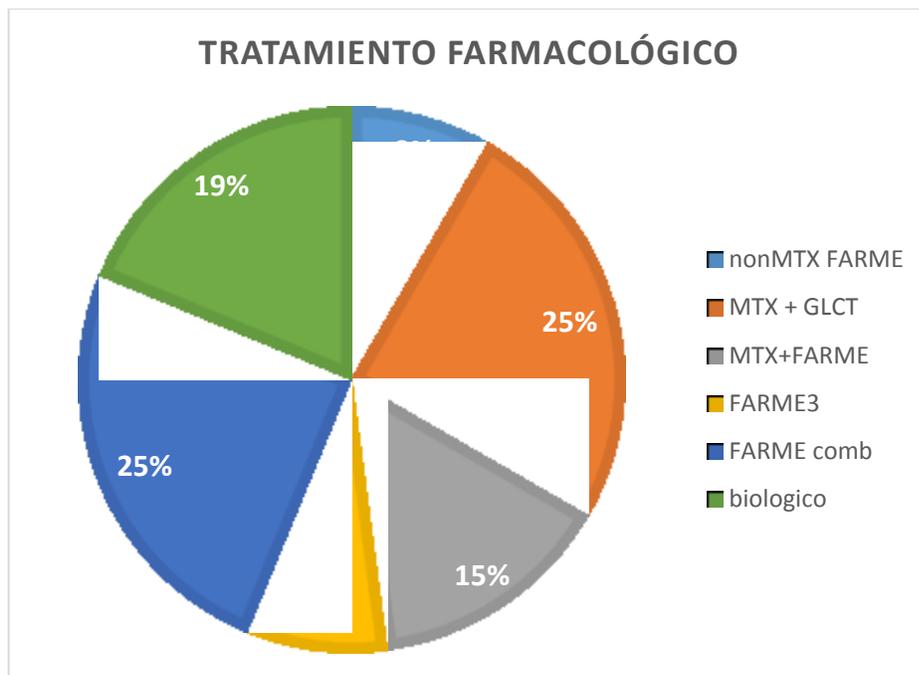
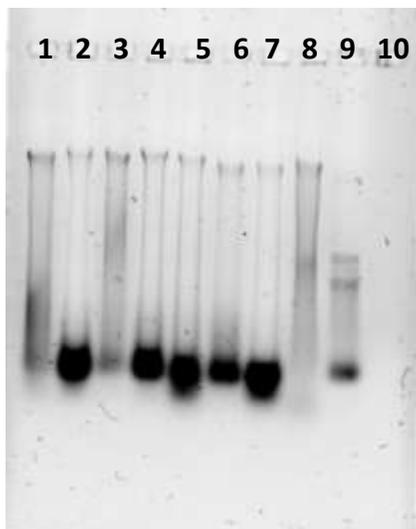


Figura 5. Tratamiento farmacológico de los pacientes con artritis reumatoide. FARME: Fármaco Antirreumático Modificador de la Enfermedad (Leflunomida, Sulfasalazina, Cloroquina) nonMTX FARME: FARME distinto a Metotrexato. MTX+GLCT: Metotrexato y Prednisona, MTX+FARME: Metotrexato y un FARME, FARME3: Metotrexato acompañado de dos o tres FARME, FARME comb: terapia combinada Metotrexato, FARME y Prednisona. Biológico: medicamento biológico.

Para llevar a cabo el estudio de la microbiota intestinal, se recolectaron 50 muestras de copro de pacientes con Artritis Reumatoide y 50 muestras de copro de pacientes sanos. La extracción de ADN de cada muestra se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en el protocolo de “AquaStool®”.

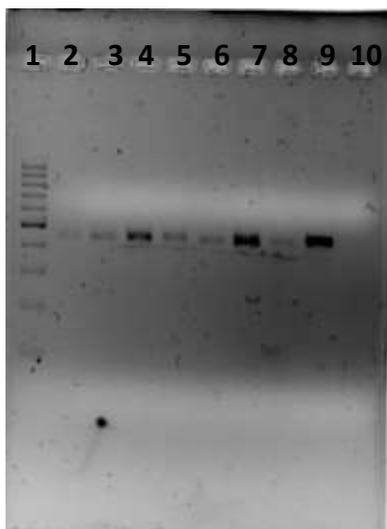
El DNA extraído fue amplificado con el uso de primers específicos de la región V3 y V4, comprobando así la presencia de DNA bacteriano en las muestras.

A partir de este diagnóstico se inició con la construcción de las genotecas. Se construyeron dos genotecas, cada una conformada por cincuenta muestras; veinticinco controles y veinticinco casos.



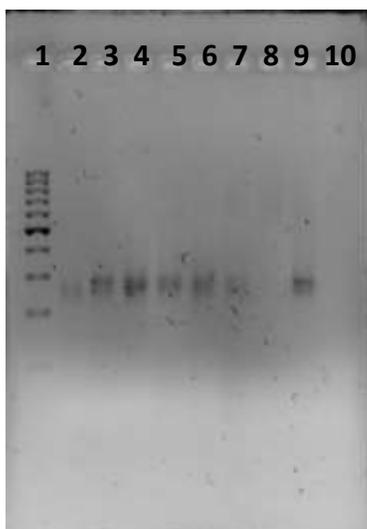
Carril	Muestra
1	ONMD18
2	RMDI24
3	PLYOL25
4	MAJ29
5	GSA52
6	PEA55
7	LUR57
8	LJL58
9	Control <i>E.coli</i>

Figura 6. Fraccionamientos electroforético de ácidos nucleicos. Las muestras de copro corresponden a pacientes sanos. Gel de agarosa al 0.5 % teñido con 0.7 μ L de colorante Midori Green advanced (1:15); electroforesis a 100 V/40 min. Cada pozo se cargó con 4 μ L de muestra, 2 μ L de buffer 2X. En la tabla se describen las muestras de copro en cada carril. Para conocer la concentración de DNA determinada con el equipo NanoDrop Lite consulte el Anexo III.



Carril	Muestra
1	Marcador 100pb
2	ONMD18
3	RMDI24
4	PLYOL25
5	MAJ29
6	GSA52
7	PEA55
8	LUR57
9	Control (+) <i>E.coli</i>
10	Control (-) sin DNA molde

Figura 7. Fraccionamiento electroforético de productos de PCR utilizando iniciadores CGO 465. Gel de agarosa al 2.0% teñido con 0.7 μ L de colorante Midori Green advanced (1:15); electroforesis a 90V /50min. Cada pozo se cargó con 5 μ L de muestra, 2 μ L de buffer 2X. En la tabla se describen las muestras de copro en cada carril, así como el uso de controles positivo, negativo y marcador de peso molecular.



Carril	Muestra
1	Marcador 100pb
2	ONMD18
3	RMDI24
4	PLYOL25
5	MAJ29
6	GSA52
7	PEA55
8	LUR57
9	Control (+) <i>E.coli</i>
10	Control (-) sin DNA molde

Figura 8. Fraccionamiento electroforético de productos de PCR región V3 utilizando iniciadores 341F – V3 518R. Gel de agarosa al 2.0% teñido con 0.7 μ L de colorante Midori Green advanced (1:15); electroforesis a 90V /50min. Cada pozo se cargó con 5 μ L de muestra, 2 μ L de buffer 2X. En la tabla se describen las muestras de copro en cada carril, así como el uso de controles positivo y negativo, marcador de peso molecular. El número de Barcode empleado para cada muestra se puede consultar el Anexo VI.

Una vez asignada cada muestra a un Barcode, se procedió a hacer un “pool” de secuenciación mezclando el volumen necesario de cada muestra para lograr una concentración de 10 μ g de producto de PCR. El producto se corrió en un gel de agarosa y se cortó la banda con un tamaño aproximado de 300 pb. Figura 9. A) El fragmento de gel con el amplicon resultante fue purificado utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR CleanUp System Promega. En un gel de agarosa al 2.0% se comprobó el tamaño del producto purificado cercano a las 300 pb. Figura 9. B)

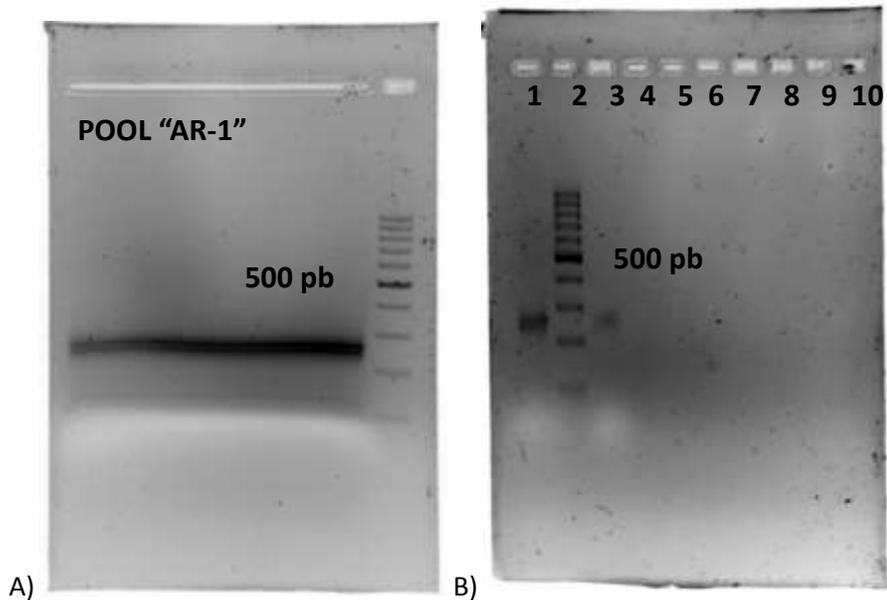


Figura 9. Genotecas de la región V3 de rDNA 16S A) Fraccionamiento electroforético del “pool” de secuenciación, conteniendo las cincuenta muestras con barcode que corresponden a la genoteca 1. Gel de agarosa al 2.0% teñido con 0.7 μ L de colorante Midori Green advanced (1:15); electroforesis a 90V/50min. B) Fraccionamiento electroforético en gel de agarosa al 2% comparando el tamaño de los productos antes y después de purificar. Carril 1 mezcla antes de purificar, carril 3 mezcla después de purificar, carril 2 marcador 100 pb. Concentración “AR-1” 3.9 ng/ μ L

Las tablas 14 y 15 del anexo VI contienen las muestras que conformaron la genoteca uno y genoteca dos respectivamente, cada una cargada en un chip para el análisis utilizando el “software Torrent Suite v4.4.3”. Se asignaron las lecturas a la muestra de origen por medio del “barcode” y las lecturas que no cumplieron con estándares de calidad establecidos fueron excluidas del análisis.

Las lecturas contenidas en archivos FASTA, se analizaron en QIIME v1.9.0. Las secuencias se agruparon en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) y se llevó a cabo la clasificación taxonómica de OTUs representativos.

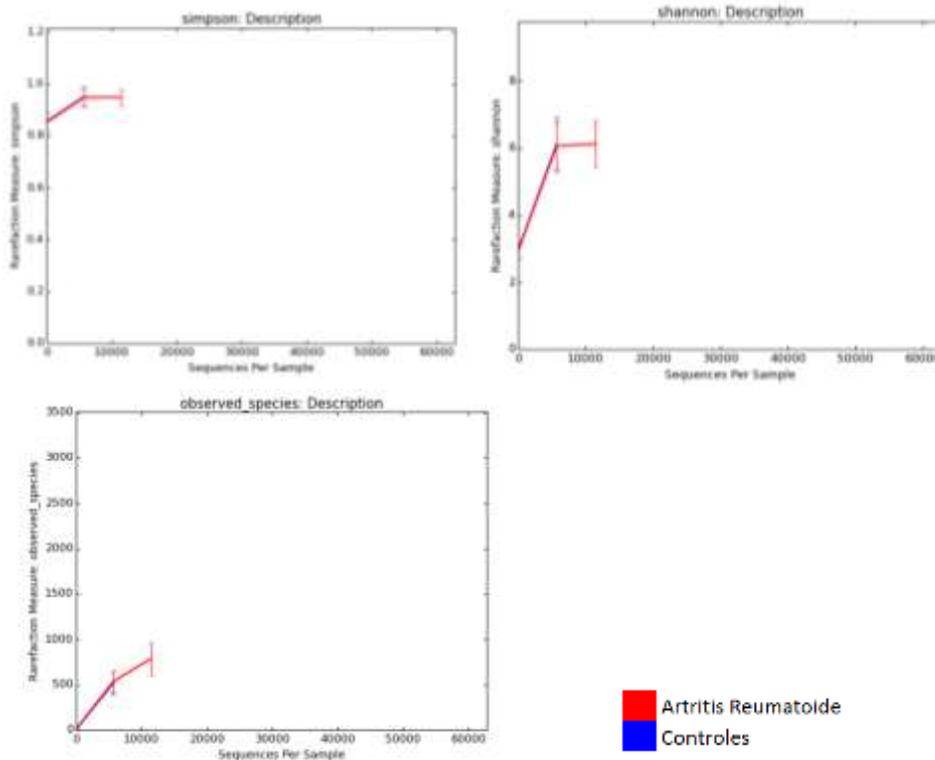


Figura 10. Parámetros de diversidad alfa calculados a partir de la tabla de OTUs de las muestras de copro, agrupadas por pacientes con artritis reumatoide y controles. Se seleccionaron 13,000 secuencias y se calcularon los índices de Shannon y Simpson, las líneas representan la media y las barras de error la desviación estándar

Tabla 8. Índices de Biodiversidad de acuerdo a los grupos de estudio.

Grupo de estudio	Shannon	Simpson
Artritis Reumatoide	5.41	0.98
Controles	5.33	0.98
AR crónica	5.35	0.98
AR temprana	5.21	0.97
nonMTX	4.77	0.96
MTX + GLT	5.27	0.98
MTX + FARME	4.83	0.97
FARME3	5.12	0.97
FARME comb	5.38	0.98
Biológico	4.80	0.97

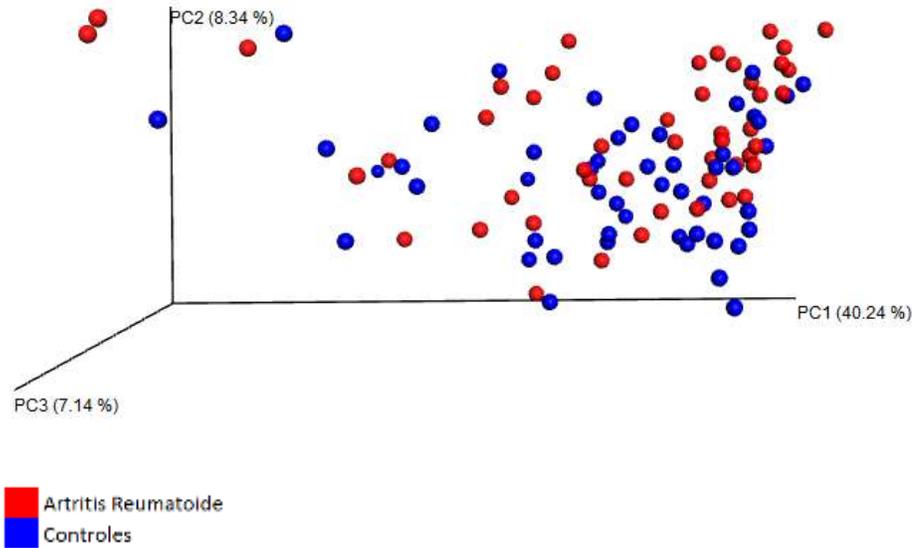


Figura 11. Beta diversidad de las muestras de copro.

La figura 12 muestra las secuencias de los 98 participantes en el estudio tal y como las arroja la línea de procesos Qiime. Del lado izquierdo observamos las secuencias de las personas sanas y del lado izquierdo las secuencias de pacientes con Artritis Reumatoide.

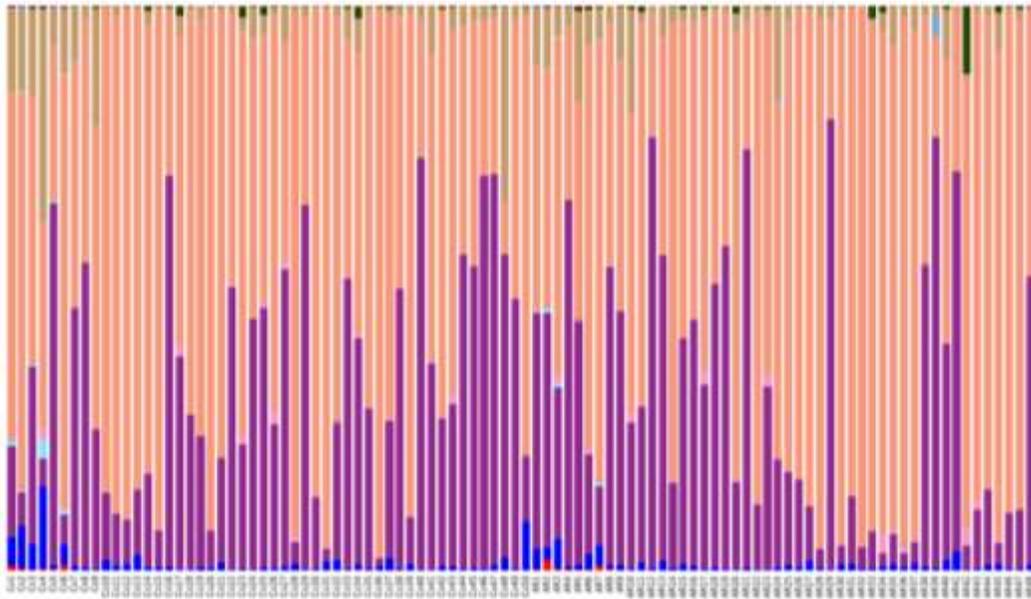


Figura 12. Resultados de secuenciación masiva a nivel de filo. Cada barra representa una persona y la abundancia se presenta en porcentaje de un total de 100%

Para facilitar el estudio se decidió separar las secuencias en dos grandes grupos denominados “Artritis Reumatoide” y “controles” a las personas sin este padecimiento.

El análisis estadístico se realizó empleando el software de Minitab tomando en cuenta todas aquellas variables que tuvieran un valor estadísticamente significativo ($p > 0.05$) a partir de su análisis para variables no paramétricas con la prueba de Kruskal-Wallis y la corrección de Bonferroni.

El primer análisis que se llevó a cabo fue el de “Artritis Reumatoide” contra “controles” Ningún género o familia fue estadísticamente significativo.

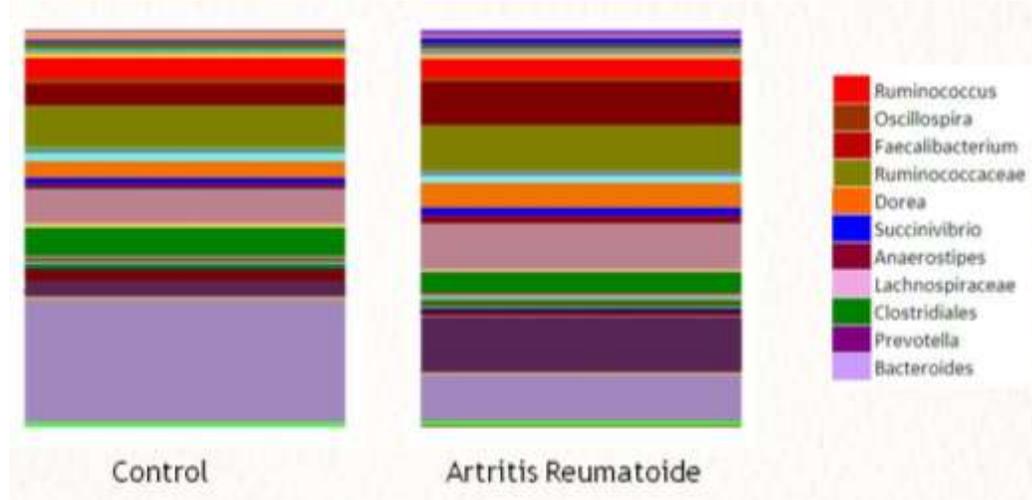


Figura 13. Microbiota intestinal a nivel de género. Comparación entre personas sanas y pacientes con Artritis Reumatoide.

A lo largo de la vida la microbiota intestinal sufre modificaciones, por lo que se decidió analizar la microbiota intestinal de los participantes de acuerdo a su edad.

Se crearon tres grupos de estudio conformados por pacientes con Artritis Reumatoide y personas sanas, el primero integrado por personas de veinticinco a treinta y nueve años, el segundo grupo de cuarenta y uno a cincuenta y nueve años, y el tercer grupo conformado por los mayores de sesenta años figura 14.

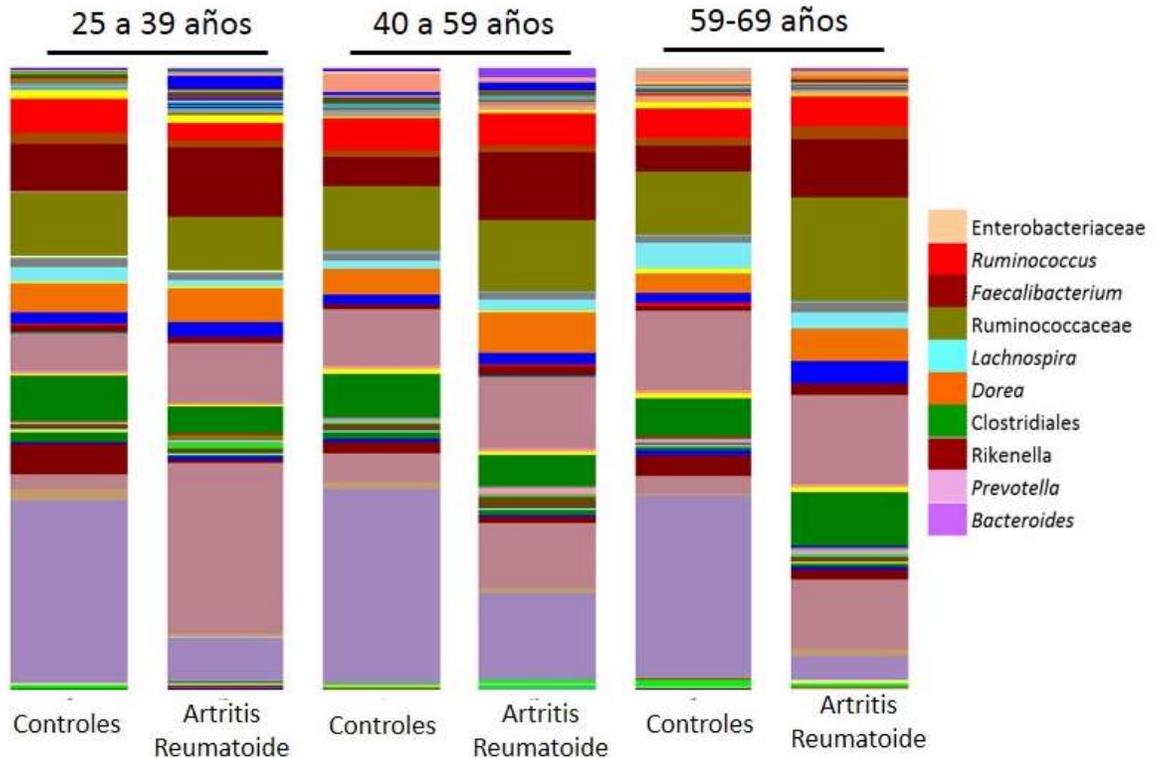


Figura 14. Microbiota intestinal de acuerdo a la edad

Nuevamente, ningún género bacteriano resulto ser estadísticamente significativo entre los grupos de estudio.

El tercer análisis que se llevó a cabo fue de acuerdo a la etapa de la enfermedad, siendo de etapa temprana aquellos pacientes que tuvieron menos de seis meses de haber sido diagnosticados y los pacientes crónicos, los cuales llevan un periodo mayor a seis meses con la enfermedad. Encontrando una mayor abundancia de *Lactobacillus* (OTU 801166, $p= 1.4e-6$) en los pacientes con Artritis Reumatoide de reciente diagnóstico.

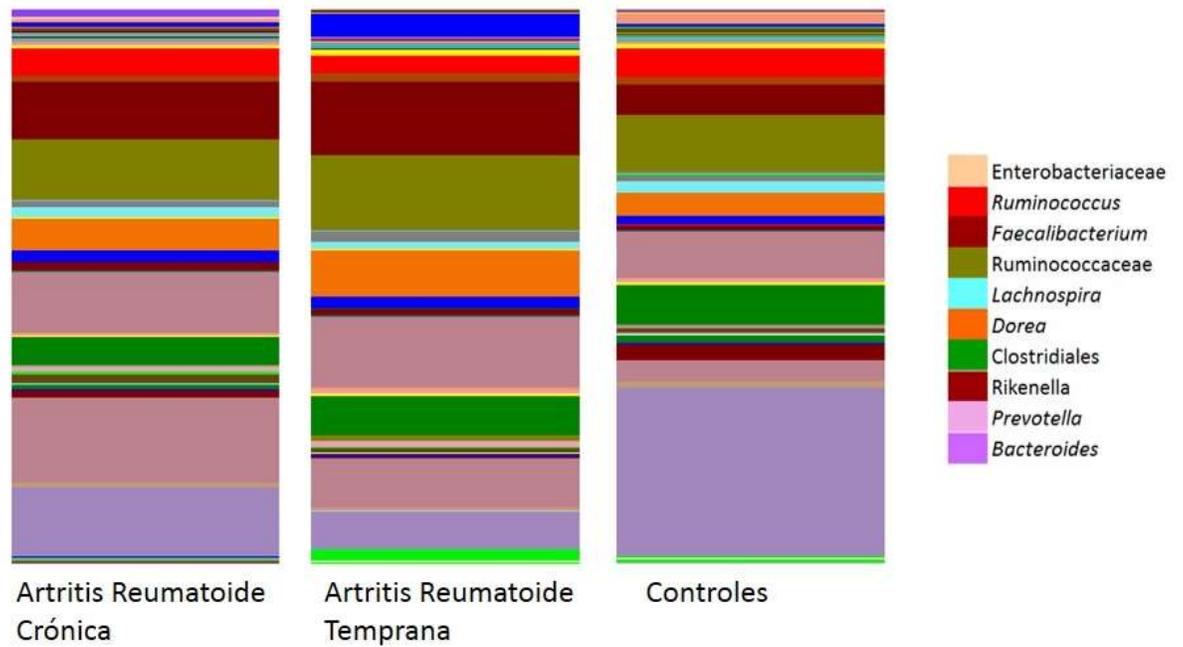


Figura 15. Microbiota intestinal de acuerdo a la etapa de la enfermedad y personas sanas.

Por último, se analizó el efecto del tratamiento farmacológico de los pacientes con Artritis Reumatoide sobre la microbiota intestinal. Encontrando treinta géneros estadísticamente significativos Tabla 10.

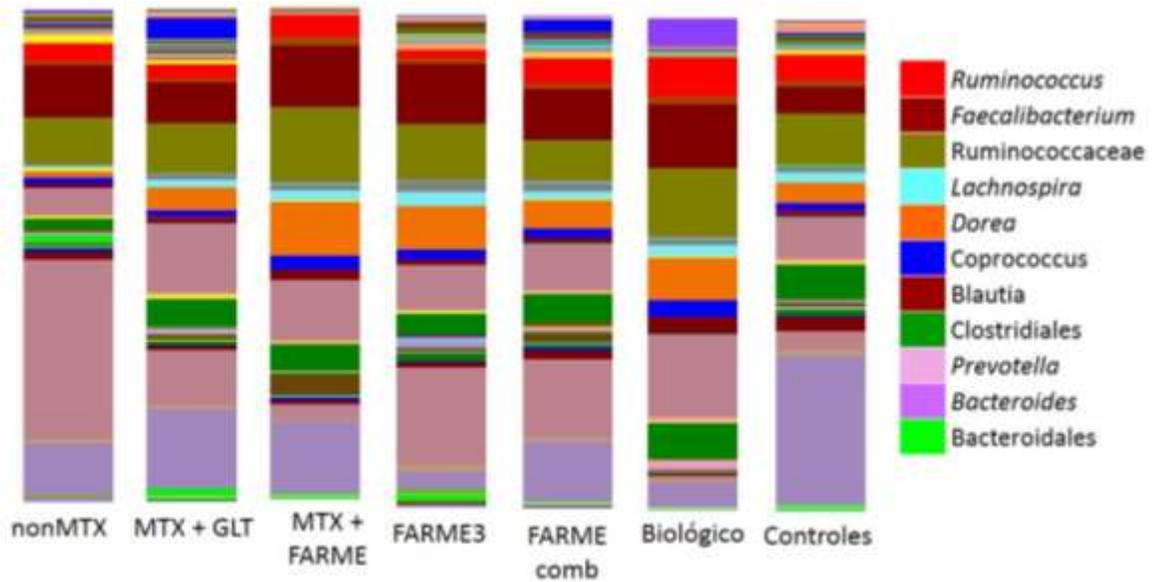


Figura 16. Microbiota Intestinal de acuerdo al tratamiento farmacológico. FARME: *Fármaco Antirreumático Modificador de la Enfermedad* (Leflunomida, Sulfasalazina, Cloroquina) nonMTX FARME: FARME distinto a Metotrexate. MTX+GLCT: Metotrexate y Prednisona, MTX+FARME: Metotrexate y un FARME, FARME3: Metotrexate acompañado de dos o tres FARME, FARME comb: terapia combinada Metotrexate, FARME y Prednisona. Biológico: medicamento biológico.

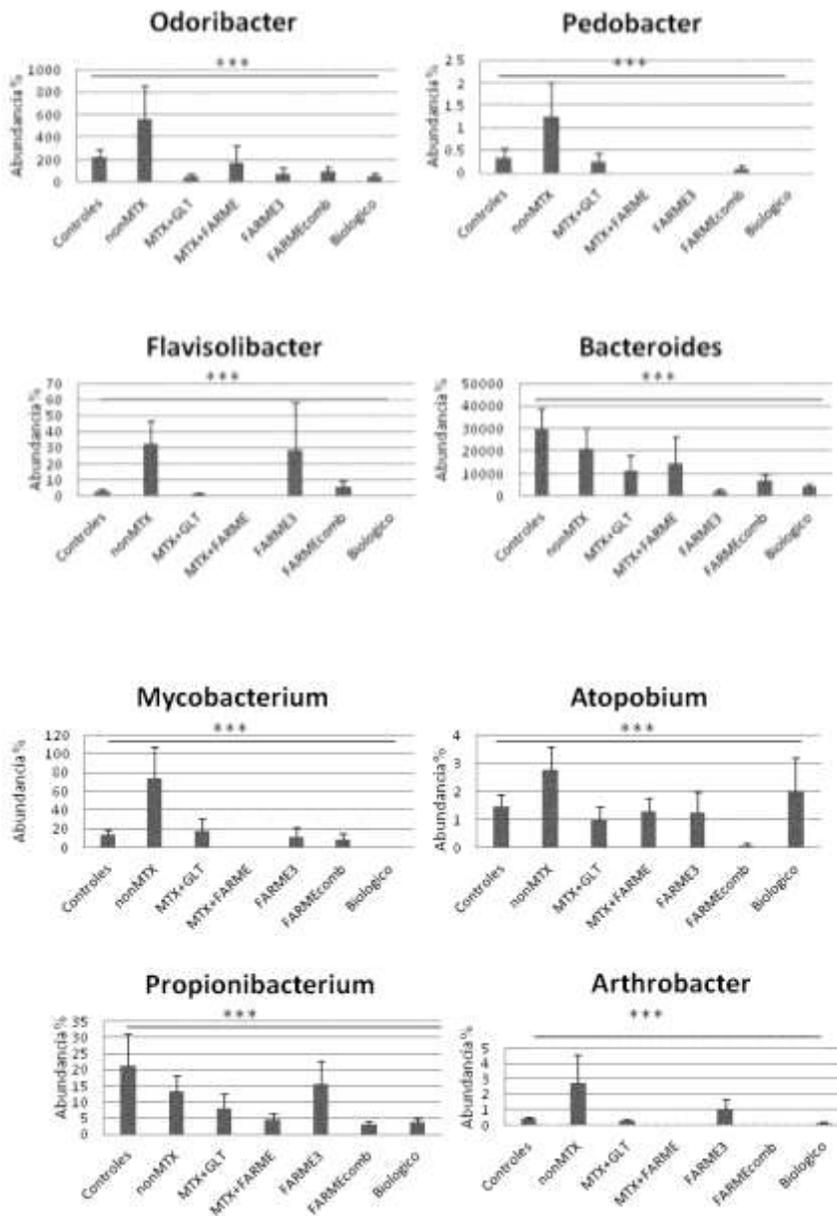


Figura 17. Géneros bacterianos estadísticamente significativos

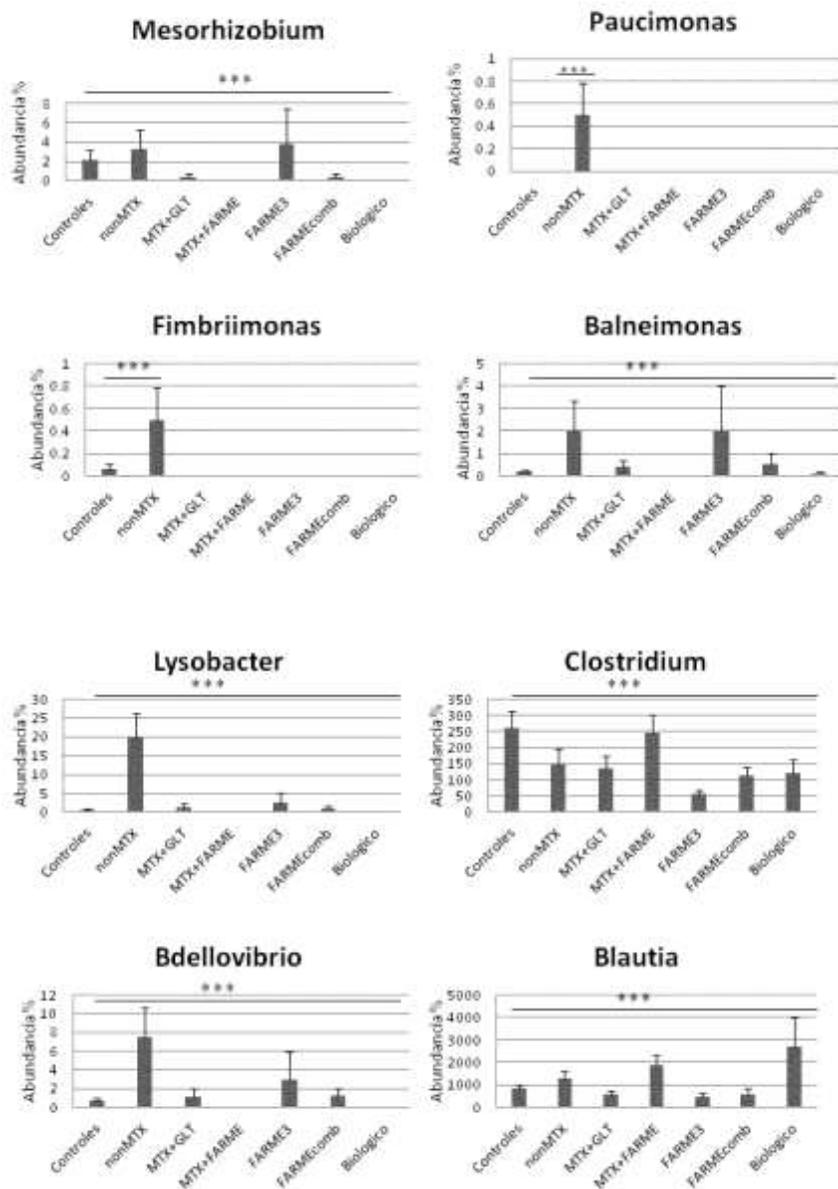


Figura 17. Géneros bacterianos estadísticamente significativos.

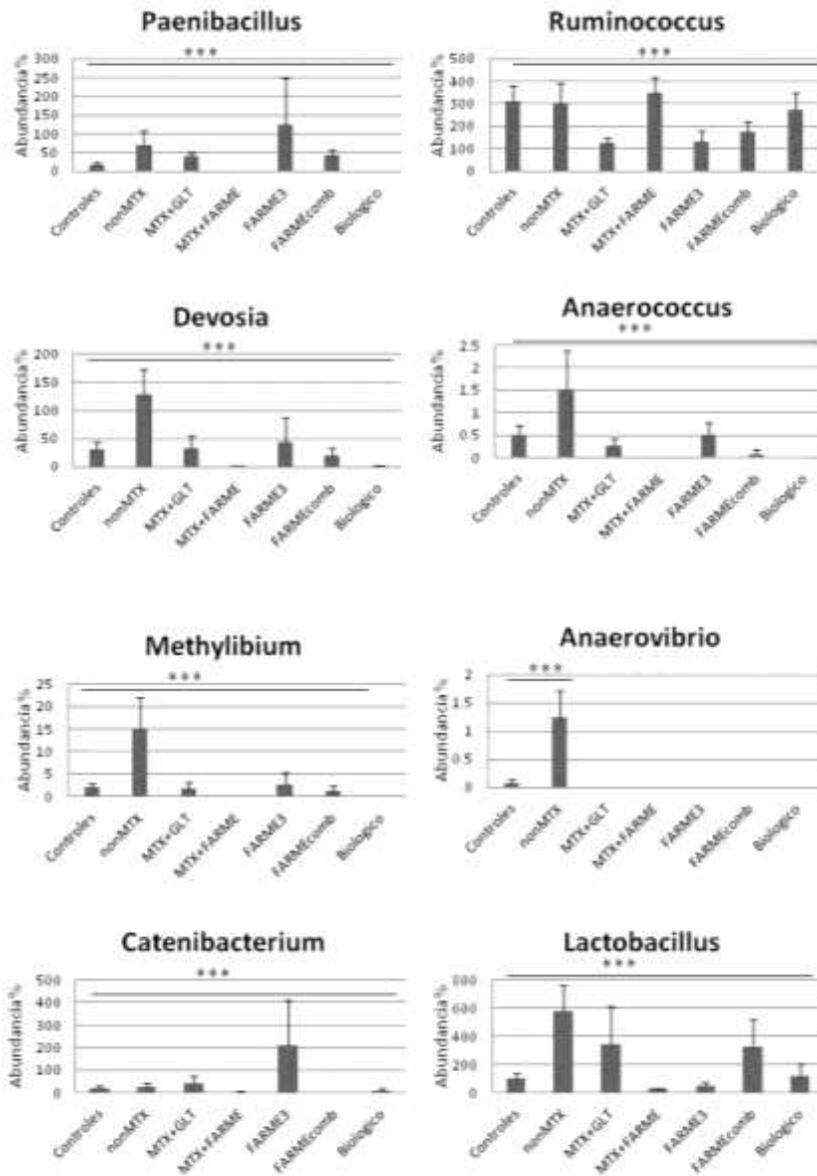


Figura 17. Géneros bacterianos estadísticamente significativos.

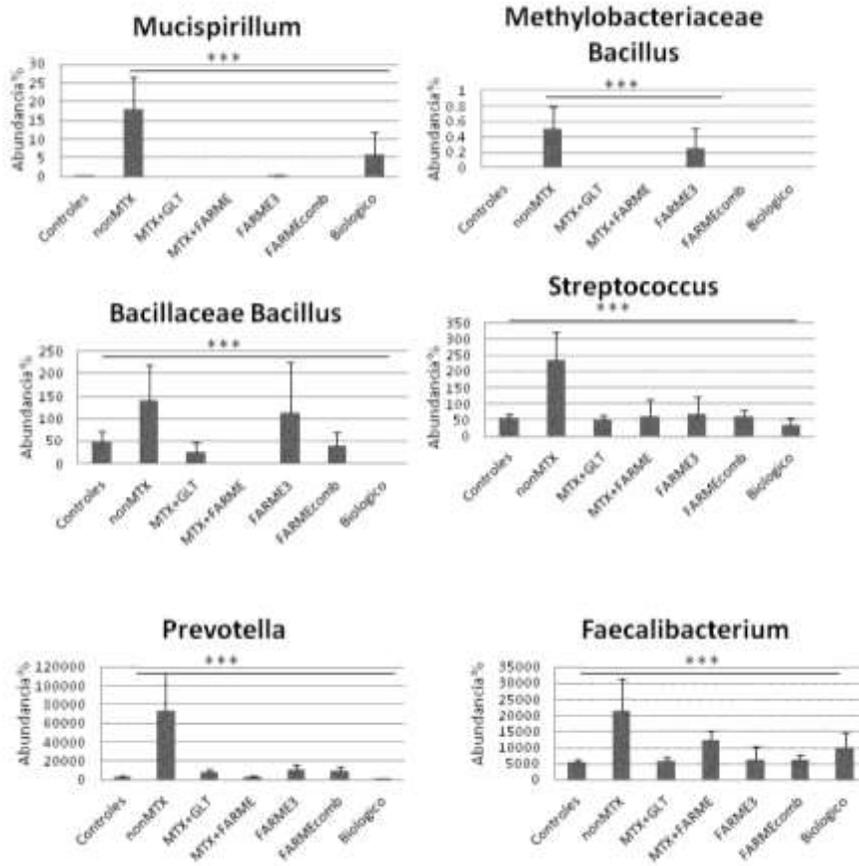


Figura 17. Géneros bacterianos estadísticamente significativos.

IX. DISCUSIÓN

En 2008, el Instituto Nacional de salud de los Estados Unidos de América, lanza el Proyecto del Microbioma Humano. Teniendo como primera meta caracterizar la microbiota de boca, nariz, piel, sistema digestivo y el tracto urogenital. Una vez que se conoció la microbiota normal, o característica de una persona sana, resulto interesante analizar la microbiota en distintos estados patológicos.

Hasta la fecha no existe un trabajo que reporte la microbiota característica de la población mexicana y mucho menos, de pacientes con artritis reumatoide.

Por lo que este trabajo no sólo da a conocer la microbiota de pacientes con Artritis Reumatoide, también presenta, una pequeña muestra, de la microbiota de mexicanos sanos.

Cabe mencionar que los participantes seleccionados como personas sanas, no presentan un estado de salud estrictamente adecuado pues (19/50) participantes presentan sobrepeso y (10/50) obesidad, esto también es reflejo de la situación nutricional que se vive en el país, pues el 70% de los adultos mexicanos padece sobrepeso u obesidad. (ENSANUT, 2012).

Un inadecuado estado nutricio también está presente entre los pacientes con Artritis Reumatoide, 28/48 tienen sobrepeso y 11/48 obesidad. La obesidad y el sobrepeso no sólo se encuentran entre los factores que pueden ayudar a desencadenar la Artritis Reumatoide, los pacientes con esta enfermedad también han reportado una respuesta ineficiente al tratamiento farmacológico (Dairen & Sellam, 2015).

De acuerdo a lo reportado por (Ley, et al., 2006) las personas con obesidad presentan una microbiota más abundante en Firmicutes y una disminución de Bacteroidetes; al comparar la abundancia de estos fila entre pacientes con Artritis Reumatoide y controles observamos una menor abundancia de

Bacteroidetes entre los pacientes con Artritis Reumatoide y obesidad y los pacientes con Artritis Reumatoide que se encuentran normopeso; contrario a las personas sanas en normopeso quienes presentan una abundancia de Firmicutes que decae conforme ganan peso, sin embargo estas diferencias no son estadísticamente significativas.

Los pacientes con Artritis Reumatoide de reciente diagnóstico presentan una mayor abundancia del género *Lactobacillus* respecto a los pacientes con Artritis Reumatoide crónica y personas sanas, como lo reportado por el equipo de trabajo de Liu, desafortunadamente en este estudio no se pudo determinar la especie del género de *Lactobacillus* involucrada. (Liu, et al., 2013)

Distinto a lo observado por Liu, los participantes de artritis reumatoide de reciente diagnóstico de este estudio ya llevaban un tratamiento farmacológico y curiosamente la presencia y abundancia de *Lactobacillus* en este grupo sigue siendo estadísticamente representativa.

Cinco de los diez pacientes de Artritis Reumatoide de reciente diagnóstico llevan un tratamiento a base de metrotexato y prednisona. El efecto de los glucocorticoides en la microbiota ha sido estudiado en modelos murinos utilizando en este caso Dexametasona, reportando un incremento de *Lactobacillus* (Huang, et al., 2016), por lo que el tratamiento con glucocorticoide podría estar involucrado en la participación de *Lactobacillus* en el inicio de la enfermedad.

Los *Lactobacillus* suelen ser comensales, con capacidad de secretar ácido láctico y compuestos bactericidas. También son conocidos por ser utilizados como probióticos y su efecto benéfico en la salud del huésped (Liévin-Le Moal & Servin, 2014). Sin embargo no todas las especies y cepas pertenecientes a este género muestran el mismo comportamiento terapéutico.

Lactobacillus spp. Tienen la capacidad de desencadenar una respuesta pro-inflamatoria activando a receptores tipo Toll y mejorar la respuesta inmune del huésped (Buffie & Pamer, 2013). Si recordamos una de las principales

características de las enfermedades autoinmunes y de la Artritis Reumatoide es el modo anormal en el que el sistema inmune ataca a células propias. En este proceso, la microbiota intestinal juega un papel importante manteniendo la homeostasis y es quizá debido a esta propiedad anti-inflamatoria, el género *Lactobacillus* se encuentra elevado en pacientes en los que la enfermedad va comenzando, en respuesta a tratar de recuperar la homeostasis recientemente perdida.

Uno de los principales moduladores de la microbiota intestinal es el consumo de medicamentos y antibióticos. Al momento de consumir un antibiótico no solo eliminamos a las bacterias patógenas que nos produjeron enfermedad o malestar, también eliminamos géneros bacterianos con efecto benéfico. A partir de este momento inicia un desequilibrio en la composición de la microbiota intestinal, ciertos géneros bacterianos se hacen más abundantes sobre otros y el huésped es susceptible a infecciones subsecuentes.

A partir de esta premisa resulto interesante estudiar la composición de la microbiota de los pacientes con Artritis Reumatoide y observar bajo qué tratamiento está más, o menos alterada la microbiota intestinal.

Las bacterias presentes en el tracto gastrointestinal también participan en el metabolismo de los fármacos. Cuatro de los diez pacientes con Artritis Reumatoide de reciente diagnóstico consumen Sulfasalazina, fármaco metabolizado por bacterias intestinales. Experimentos en ratones libres de gérmenes muestran la incapacidad de estos animales de metabolizar la Sulfasalazina y la facultad de degradarla una vez que son inoculados con *Lactobacillus* (Li & Jia, 2013).

De los pacientes con Artritis Reumatoide participantes en el estudio, solo uno de ellos no incluye en su tratamiento AINES, el 97.9% restante los consume. Estos fármacos son conocidos por dañar el revestimiento del tracto digestivo (Liang, *et al.*, 2015).

La mayoría de las bacterias estadísticamente significativas, son abundantes en el grupo perteneciente a los pacientes con Artritis Reumatoide que llevan un tratamiento farmacológico que no incluye Metotrexato, lo que nos indica que la microbiota de estos pacientes es diferente a la microbiota de personas sanas e incluso de pacientes con Artritis Reumatoide que llevan un tratamiento farmacológico distinto.

Los efectos adversos del metotrexato incluyen náuseas, inflamación de la mucosa bucal, diarrea y entre los síntomas más severos hepatotoxicidad y neumotitis por infecciones oportunistas (Herfarth, et al., 2013). Si recordamos la participación de las bacterias sobre las mucosas y el desequilibrio en la microbiota como causa de infecciones oportunistas, podemos especular que varios de los síntomas adversos del metotrexato son causa directa del efecto que el fármaco tiene sobre la microbiota del huésped.

Curiosamente, los pacientes que no consumen metotrexato presentan un nivel de actividad de la enfermedad moderado, todos son mujeres con Artritis Reumatoide crónica y son quienes reportan el mayor número de articulaciones dolorosas, hasta veinte articulaciones dolorosas. Lo que nos indica que el metotrexato también juega un papel importante y benéfico en la disminución de los síntomas y la actividad de la Artritis Reumatoide y que una mayor diversidad microbiana presente en estos pacientes, no necesariamente es sinónimo de un mejor estado de salud.

Aunque el género *Prevotella* se encuentra presente en todos los grupos de tratamiento y en los controles, los pacientes que no consumen metotrexato presentan la mayor abundancia de éste género.

El papel que juega el género *Prevotella* sobre la salud sigue en debate; una dieta rica en carbohidratos complejos favorece la proliferación de Bacteroidetes, entre ellos *Prevotella*, la microbiota de niños africanos es abundante en *Prevotella* mientras que la microbiota de niños italianos de la misma edad no presentan abundancia en este género (De Filippo, et al., 2010) *Prevotella* también ha sido descrito como uno de los tres enterotipos descritos

para la población humana (Arumugam, et al., 2011). Lo que podría explicar la presencia de este género en las personas sanas.

Sin embargo la participación de *Prevotella* en distintas patologías como esófago de Barret, (Di Pilato, et al., 2016) Vaginosis bacteriana, (Ling, et al., 2010) y Artritis Reumatoide (Vaahtovu, et al., 2009), ha sido reportada.

En este estudio, el género *Prevotella* está presente en todos los tratamientos farmacológicos, en una abundancia mayor a la que presentan las personas sanas, a excepción de los pacientes que consumen medicamentos biológicos, lo que nos indica la participación del género bacteriano en la enfermedad.

No obstante los pacientes que no consumen Metotrexato, presentan una abundancia media de *Prevotella* $x = 73022$ Vs. Media $X = 3635$ en personas sanas. Nuevamente, indicando la importancia del fármaco en el tratamiento de la enfermedad.

El género *Paucimonas*, es específico de los pacientes que llevan un tratamiento farmacológico que no incluye Metotrexato, hasta el momento no hay estudios del efecto de este género bacteriano en la salud humana. La especie *P. lemoignei* es un anaerobio con capacidad de utilizar acetato, piruvato, valerato y butirato como fuente de carbono (Jendrossek, 2001) su presencia podría estar implicada en el metabolismo de metabolitos secundarios.

La microbiota de los pacientes con Artritis Reumatoide que reciben un tratamiento a base de metrotexato y Prednisona son los que tienen un perfil de microbiota intestinal más parecido al de las personas sanas, con abundancia similar en los géneros *Pedobacter* (0.34/0.25), *Blautia* (853/581) *Catenibacterium* (18.02/44.1) *Faecalibacterium* (5300/5734), géneros involucrados en el metabolismo de fructosa y glucosa y carbohidratos complejos (Schnorr, et al., 2014). Estos resultados coinciden con los valores obtenidos en los índices de diversidad, en cuanto a diversidad y dominancia de géneros bacterianos.

La presencia del género *Bdellovibrio* tanto en personas sanas como en pacientes de Artritis Reumatoide podría deberse a su efecto regulador de la población bacteriana intestinal, esto resultado de su capacidad depredadora de bacterias Gram negativas como *E.coli*. Nuevamente, destaca la abundancia del género bacteriano en pacientes que no consumen Metotrexato, contrario a lo reportado por (Lebba, et al., 2013) la mayor abundancia de este género no se encuentra en pacientes sanos.

La enfermedad celiaca, el síndrome de intestino irritable y la artritis reumatoide presentan un componente de autoinmunidad, por lo que era posible un resultado similar en la abundancia de *Bdellovibrio*. En este estudio, la presencia disminuida de *Bdellovibrio* en pacientes sanos podría deberse a los distintos hábitos alimenticios y estilo de vida de la población Italiana respecto a la Mexicana, así como la diferencia de edad en ambos grupos de estudio.

El uso de medicamentos biológicos como parte del tratamiento para la Artritis Reumatoide tiene un efecto interesante en la microbiota intestinal. Los pacientes de este grupo presentan la microbiota intestinal menos diversa, lo cual es reflejo de la ausencia de trece géneros bacterianos en los pacientes que consumen medicamentos biológicos y la presencia de estos géneros en personas sin la enfermedad.

El género bacteriano *Blautia* ha sido descrito como un posible modulador de la respuesta inmunológica, lo cual podría explicar la abundancia de este género en los pacientes que consumen medicamentos biológicos (Jenq, et al., 2015).

Una mayor abundancia del género *Pedobacter* ha sido descrita en pacientes con esclerosis múltiple, enfermedad en la que también hay varios mecanismos autoinmunes involucrados. En este estudio los pacientes que no consumen Metotrexato presentan la mayor abundancia, mientras que pacientes que llevan un tratamiento a base de medicamentos biológicos no lo presentan (Chen, et al., 2016).

De acuerdo a la diversidad microbiana presente en los grupos con distinto tratamiento y las personas sanas podría decirse que el efecto de los FARME sobre la microbiota es acumulativo; incluir en el tratamiento uno, dos o incluso tres FARME afecta la microbiota intestinal, siendo más diversa conforma aumenta el número de FARME. Los pacientes del grupo FARME comb también son los que presentan la actividad más baja de la enfermedad.

Validación de Hipótesis

Al analizar la microbiota de personas sanas y compararla con la de pacientes con Artritis Reumatoide observamos una diferencia en la abundancia relativa de géneros como Bacteroides, Prevotella y Faecalibacterium, sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Pero sí observamos que la microbiota de pacientes con Artritis Reumatoide de reciente diagnóstico es diferente, siendo más abundante en Lactobacillus.

Si bien era de esperar que la microbiota de los pacientes con Artritis Reumatoide fuera distinta a la de personas sanas por el simple hecho de ingerir medicamentos, también era posible que al encontrarse bajo un fuerte tratamiento farmacológico el perfil bacteriano fuera similar al de personas sanas, es decir que una buena respuesta hacia el tratamiento estuviera relacionado a un cambio en la microbiota que tiende a la normalidad.

Resultaría interesante analizar la microbiota de pacientes con Artritis Reumatoide con una actividad de la enfermedad en remisión y ver si estos pacientes tienen un perfil microbiano que asemeja al de personas sanas.

X. CONCLUSIONES

No se encontraron cambios en la microbiota intestinal estadísticamente significativos que nos indiquen que la microbiota de pacientes con Artritis Reumatoide y la de personas sanas es distinta.

La microbiota de pacientes con Artritis Reumatoide de reciente diagnóstico es abundante en *Lactobacillus* spp. respecto a la microbiota de pacientes con Artritis Reumatoide crónica y personas sanas.

La mayor diversidad de géneros bacterianos se presenta entre los pacientes con Artritis Reumatoide que no incluyen en su tratamiento farmacológico al Metotrexato, la presencia del género Paucimonas es exclusivo de estos pacientes.

XI. PERSPECTIVAS

Sería interesante conocer la especie de los géneros bacterianos que mostraron significancia estadística, como el caso de *Lactobacillus* y *Prevotella*, y ver si lo reportado en otros grupos de estudio (*Prevotella copri* y *Lactobacillus mucosae*) aplica para la población mexicana.

Determinar la microbiota intestinal de los pacientes con artritis reumatoide antes de iniciar el tratamiento farmacológico, esto no sólo para determinar un perfil microbiano que no esté influenciado por fármacos, también para conocer el efecto de los fármacos sobre la microbiota, pues desconocemos si la microbiota de los pacientes estaba alterada desde antes de iniciar el tratamiento farmacológico.

Para lograr un estudio más completo, se sugiere llevar a cabo un estudio que correlacione la presencia de los alelos HLA-DR y el perfil microbiano de pacientes con Artritis Reumatoide.

BIBLIOGRAFÍA

Alegre, M. L., Mannon, R. B. & Mannon, P. J., 2014. The microbiota, the immune system and the Allograft. *American Journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplant Surgeons* , 14(6), pp. 1236-1248.

Aletaha, D. y otros, 2010. Rheumatoid Arthritis Classification Criteria. *Arthritis and Rheumatism*, 62(9), pp. 2569-2581.

Alvarez Lario, B., 2003. El diagnóstico. En: *El libro de la Artritis Reumatoide*. Madrid: Díaz de Santos , p. 15.

American College of Rheumatology, 2016. *American College Rheumatology*. [En línea]

Available at: <http://www.rheumatology.org/Practice-Quality/Clinical-Support/Quality-Measurement/Disease-Activity-Functional-Status-Assessments>
[Último acceso: 30 06 2016].

Anderson, J. K., Zimmerman, L., Caplan , L. & Michaud, K., 2011. Measures of Rheumatoid Arthritis Disease Activity. *Arthritis Care and Research*, 63(S11), pp. S14-S36.

Arrieta, M.-C.y otros, 2014. The intestinal Microbiome in Early life: Health and Disease. *Frontiers in Immunology*, 5(427).

Arthritis Foundation, 2014. *The Arthritis Foundation*. [En línea]

Available at: <http://espanol.arthritis.org/espanol/la-artritis/tengo-artritis/pruebas-laboratorio/tengo-artritis-pruebas-analisis-sangre/>
[Último acceso: 17 11 2015].

Arumugam, M. y otros, 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), pp. 174-180.

Balsa, A., 2007. ¿Cómo se evalúa una respuesta inadecuada en un paciente con artritis reumatoide en la práctica clínica?. *Reumatología Clínica*, 3(1), pp. 38-44.

Belkaid, Y. & Hand, T., 2014. Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. *Cell*, 157(1), pp. 121-141.

Belmonte Serrano, M. Á., 2008. ¿Es la puntuación DAS28 el método más adecuado para estimar la actividad de la artritis reumatoide? Consideraciones clinimétricas y escenarios de simulación. *Reumatología Clínica*, 4(5), pp. 183-190.

Bischoff, S. C., 2016. Microbiota and aging. *Curent Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 19(1), pp. 26-30.

Brand, D. D., Latham, K. A. & Rosloniec, E. F., 2007. Collagen-induced arthritis. *Nature*, Volumen 2, pp. 1269-1275.

- Brusca, S. B., Abramson, S. B. & Scher, J. U., 2014. Microbiome and mucosal inflammation as extra-articular triggers for rheumatoid arthritis and autoimmunity. *Current Opinion in Rheumatology*, 26(1), pp. 101-107.
- Buffie, C. G. & Pamer, E. G., 2013. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nature reviews. Immunology*, 13(11), pp. 790-801.
- Cabeza Osorio, L. & de la Puente Bujidos, C., 2014. *Manual CTO de medicina y cirugía: Reumatología*, Madrid: CTO.
- Cabeza Osorio, L. & de la Puente Bujidos, C., 2014. *Reumatología*, México: CTO.
- Chen, J. y otros, 2016. Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Scientific Reports*, Volumen 6.
- Dairen , C. I. & Sellam, J., 2015. Obesity and inflammatory arthritis: impact on occurrence, disease characteristics and therapeutic response. *RMD open*, 1(1).
- De Filippo, C. y otros, 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(33), pp. 14691-14696.
- Delgado-Vega, A. M., Martín, J., Granados, J. & Anaya, J. M., 2006. Epidemiología genética de la artritis reumatoide: ¿qué esperar de América Latina?. *Biomédica*, Volumen 26, pp. 526-584.
- Di Pilato, V. y otros, 2016. The esophageal microbiota in health and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, pp. 1-13.
- Domínguez-Bello, M. G. y otros, 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(26), pp. 11971-11975.
- ENSANUT, 2012. *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012*. [En línea] Available at: http://ensanut.insp.mx/resultados_principales.php#.V59qKfnhDIU [Último acceso: 25 julio 2016].
- Francescone, R., Hou, V. & Grivennikov, S. I., 2014. Microbiome, Inflammation and cancer. *National Institute of Health*, 20(3), pp. 181-189.
- Gibofsky, A., 2012. Overview of Epidemiology, Pathophysiology, and Diagnosis of Rheumatoid Arthritis. *The American Journal of Managed Care*, 18(13), pp. S295-S302.
- Gomez, A. y otros, 2012. Loss of Sex and Age Driven Differences in the Gut Microbiome Characteriza Arthritis-Susceptible *0401 Mice but Not Arthritis-Resistance *0402 Mice. *PLoS ONE*, 7(4).
- González Arboleda, M. L., Rueda Gutiérrez, J., González Buritica, H. & Salcedo Cifuentes, M., 2013. Utilidad diagnóstica del anticuerpo antipeptido cíclico citrulinado

como prueba diagnóstica en pacientes con artritis reumatoide. *Revista Colombiana de Reumatología*, 20(1), pp. 9-18.

González Naranjo, L. A. & Molina Restrepo, J. F., 2010. Evaluación de la inflamación en el laboratorio. *Revista Colombiana de Reumatología*, 17(1), pp. 35-47.

Gutierrez Dávila, J. M. & Latorre Muñoz, M. C., 2003. Semiología Reumatológica. En: J. Alvarado Bestene, ed. *Introducción a la clínica*. Bogotá: Centro Editorial Javeriano, p. 415.

Herfarth, H. H., Long, M. D. & Isaacs, K. L., 2013. Methotrexate: Underused and ignored?. *Digestive Diseases*, 30(03), pp. 112-118.

Huang, E. Y. y otros, 2016. Using Corticosteroids to Reshape the Gut Microbiome: Implications for Inflammatory Bowel Diseases. *Inflammatory Bowel Diseases*, 21(5), pp. 963-972.

Jendrossek, D., 2001. Transfer of [*Pseudomonas*] *lemoignei*, a Gram-negative rod with restricted catabolic capacity, to *Paucimonas* gen. nov. with one species, *Paucimonas lemoignei* comb. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Volumen 51, pp. 905-908.

Jenq, R. R. y otros, 2015. Intestinal *Blautia* is associated with reduced death from graft-versus-host disease. *Biology of blood and marrow transplantation: Journal of the American Society of Blood and marrow transplantation*, 21(8), pp. 1373-1383.

Karlson, E. W. & Deane, K., 2012. Environmental and gene- environment interactions and risk of rheumatoid arthritis. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*, 2(38), pp. 405-426.

Lebba, V. y otros, 2013. Higher prevalence and abundance of *Bdellovibrio bacteriovorus* in the human gut of healthy subjects. *PLoS One*, 8(4).

Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S. & Gordon, J. I., 2006. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature*, Volumen 444, pp. 1022-1023.

Liang, X. y otros, 2015. Bidirectional interactions between indomethacin and the murine intestinal microbiota. *eLife*, Volumen 4.

Liévin-Le Moal, V. & Servin, A. L., 2014. Anti-Infective activities of *Lactobacillus* Strains in the Human Intestinal Microbiota: from Probiotics to Gastrointestinal Anti-Infectious Biotherapeutic Agents. *Clinical Microbiology*, 27(2), pp. 167-199.

Li, H. & Jia, W., 2013. Cometabolism of Microbes and Host: Implications for Drug Metabolism and Drug-induced Toxicity. *Nature*, 94(5), pp. 574-581.

Ling, Z. y otros, 2010. Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis. *BMC Genomics*, 11(488).

Liu, X. y otros, 2013. Analysis of Fecal *Lactobacillus* Community Structure in Patients with Early Rheumatoid Arthritis. *Current Microbiology*, 67(2), pp. 170-176.

- Mariat, D. y otros, 2009. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiology*, 9(123).
- Marques, T. M. y otros, 2010. Programming infant gut microbiota: influence of dietary and environmental factors. *Current Opinion in Biotechnology*, Volumen 21, pp. 149-156.
- Massardo, L., 2008. Artritis Reumatoide temprana. *Revista Médica Chilena*, Volumen 136, pp. 1468-1475.
- Matamoros, S. y otros, 2013. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends in Microbiology*, 21(4), pp. 167-173.
- Mikuls, T. R. y otros, 2014. Periodontitis and Porphyromonas gingivalis in patients with Rheumatoid Arthritis. *Arthritis and Rheumatology*, 66(5), pp. 1090-1100.
- Mody, G. M. & Cardiel, M. H., 2008. Challenges in the management of rheumatoid arthritis in developing countries. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 22(4), pp. 621-641.
- Moreno, J., 2015. Prevotella copri and the microbial pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Reumatología Clínica*, 11(2), pp. 61-63.
- Nylund, L. y otros, 2013. Microarray analysis reveals marked intestinal microbiota aberrancy in infants having eczema compared to healthy children in at-risk for atopic disease. *BMC Microbiology*, 13(12).
- O'Toole, P. W. & Jeffery, I. B., 2015. Gut Microbiota and aging. *Science*, 350(6265), pp. 1214-1215.
- Pincus, T., Yazici, Y. & Bergman, M. J., 2009. RAPID3, an Index to Assess and Monitor Patients with Rheumatoid Arthritis, Without Formal Joint Counts: Similar Results to DAS28 and CDAI in Clinical Trials and Clinical Care. *Rheumatic Disease Clinics*, 35(4), pp. 773-778.
- Power, S. E. y otros, 2014. Intestinal microbiota, diet and health. *British Journal of Nutrition*, Volumen 111, pp. 387-402.
- Quiceno, J. M. & Vinaccia, S., 2011. Artritis reumatoide: consideraciones psicobiológicas. *Diversitas: Perspectivas en Psicología*, 7(1), pp. 27-41.
- Rajilic-Stojanovic, M., Smidt, H. & de Vos, W. M., 2007. Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environmental Microbiology*, 9(9), pp. 2125-2136.
- Ruiz-Morales, J. A. y otros, 2004. HLA-DRB1 alleles encoding the "shared epitope" are associated with susceptibility to developing rheumatoid arthritis whereas HLA-DRB1 alleles encoding an aspartic acid at position 70 of the B-chain are protective in Mexican mestizos. *Human Immunology*, 65(3), pp. 262-269.
- Sandhya, P., Danda, D., Sharma, D. & Scaria, V., 2015. Does the buck stop with the bugs?: an overview of microbial dysbiosis in rheumatoid arthritis. *International Journal of Rheumatic Diseases*.

- Santos- Ramírez, C. y otros, 2011. Estudio de correlacion entre DAS28-VSG y DAS28-PCR en la cohorte valenciana de pacientes con artritis reumatoide precoz (CoAR-SVR). *Rev.Sociedad Val.Reuma*, 4(1), pp. 23-25.
- Scher, J. U. & Abramson, S. B., 2011. The microbiome and rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 7(10), pp. 569-578.
- Scher, J. U. & Abramson, S. B., 2015. The microbiome in Rheumatic diseases. En: M. C. Hochberg, y otros edits. *Rheumatology*. Philadelphia: Elsevier, pp. 145-150.
- Scher, J. U. y otros, 2013. Expansion of intestinal Prevotella copri correlate with enhanced susceptibility to arthritis. *eLife*, Volumen 2.
- Schnorr, S. L. y otros, 2014. Gut microbiome of the Hazda hunter-gatherers. *Nature* , Volumen 5.
- Secretaria de Salud, 2010. *Diagnóstico y tratamiento de Artritis Reumatoide del Adulto*, México: Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud .
- Smolen, J. S. & Aletaha, D., 2014. Scores for all seasons: SDAI and CDAI. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 32(5), pp. S75-S79.
- Svartz, N., 1972. The primary cause of rheumatoid arthritis is an infection-the infectious agent exists in milk. *Acta Medica Scandinavica*, 192(1-6), pp. 231-239.
- Vahtovuori, J. y otros, 2009. Fecal microbiota in early rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*, 35(6).

ANEXOS

I. Criterios de inclusión

Criterios de inclusión pacientes.

1. Derechohabientes entre 18 y 55 años de edad.
2. Ambos géneros.
3. Derechohabientes con reciente diagnóstico de artritis reumatoide mediante criterios del American College of Rheumatology (ACR) 1987 o 2010.
4. Que acepten participar en el estudio mediante firma del consentimiento informado.
5. Medicaciones permitidas para ambos grupos de estudio: prednisona (o equivalente) 5 mg o menos por día (dosis estables al menos por dos meses) metotrexato 15 mg o menos por semana (dosis estable al menos por dos meses) y antiinflamatorios no esteroideos a dosis aprobadas por la FDA.

Criterios de inclusión controles

1. Personas sanas pareados por edad y sexo sin historia personal o familiar de artritis reumatoide y que vivan en la misma zona geográfica.
2. Que acepten participar en el estudio mediante firma del consentimiento informado.
3. No haber ingerido ningún tipo de antibiótico en los últimos tres meses previos al estudio.

II. Pruebas Bioquímicas y Parámetros para el Diagnóstico de Artritis Reumatoide.

** Factor Reumatoide.*

Prueba serológica dirigida a encontrar el anticuerpo que reconoce la región Fc de las inmunoglobulinas IgG. Un resultado que sale del rango de 40-60 UI puede considerarse anormal, los resultados pueden llegar hasta las 2000 UI (Alvarez Lario, 2003).

El 70-80% de los pacientes con artritis reumatoide da positivo a esta prueba, sin embargo el factor reumatoide no es específico de la artritis y un nivel elevado puede presentarse cuando hay otra enfermedad infecciosa. Su ausencia no excluye el diagnóstico y, de hecho, un subgrupo de pacientes presenta AR persistentemente seronegativa (Arthritis Foundation, 2014).

** Proteína C- Reactiva.*

Proteína pentamérica capaz de activar el complemento por la vía clásica y modular la respuesta de las células fagocíticas (Gutierrez Dávila & Latorre Muñoz, 2003).

La Proteína C Reactiva (PCR) es sintetizada principalmente en el hígado en respuesta a la IL-6 y está síntesis es incrementada por la IL-1 β . Es capaz de unirse a células apoptóticas y es importante en la depuración de restos nucleares (González Naranjo & Molina Restrepo, 2010).

La PCR es un marcador muy sensible de inflamación y daño tisular. Se consideran normales valores menores de 0.6 mg/dl, aunque concentraciones hasta 1 mg/dl no son inusuales, posiblemente en relación con pequeños traumas, gingivitis, diabetes, obesidad, pobre acondicionamiento físico,

hipertensión arterial, bajos niveles de HDL, altos niveles de triglicéridos, entre otros (González Naranjo & Molina Restrepo, 2010).

La mayoría de los pacientes con niveles mayores de 15 a 20 mg/dl, tienen infección bacteriana. En varias enfermedades reumáticas hay una buena correlación entre la actividad clínica y la elevación de la PCR. Sin embargo también hay un grupo de enfermedades que no obstante su actividad y severidad, presentan una modesta respuesta de fase aguda como escleroderma, dermatomiositis, enfermedad mixta del tejido conectivo y colitis ulcerativa (González Naranjo & Molina Restrepo, 2010).

* *Anticuerpos anti péptido cíclico citrulinado.*

Marcador inmunológico utilizado para el diagnóstico de la artritis reumatoide. Su aparición puede preceder en años a la enfermedad y se relaciona con el pronóstico de la enfermedad. Si a su vez se asocia con el factor reumatoide la enfermedad suele ser de curso grave (Cabeza Osorio & de la Puente Bujidos, 2014).

La citrulina puede ser generada por modificación postraducciona de residuos de arginina. Esta modificación es catalizada por la enzima peptidil-arginina-deaminasa. Los anticuerpos para proteínas citrulinadas pueden ser detectados en el 80% de los pacientes con artritis reumatoide con una especificidad mayor a 98% (González Arboleda, *et al.*, 2013).

* *Velocidad de Sedimentación Globular.*

Hace referencia a la velocidad con la que los eritrocitos se precipitan en una hora en una muestra de sangre no coagulada. Es una medida indirecta de la concentración de proteínas de fase aguda. La VSG varía con el sexo y la edad. Los valores normales en adultos menores de 50 años son de 0 a 15 mm/hora

en hombres y de 0 a 20 mm/hora en mujeres. La VSG se eleva 48 horas luego de iniciarse el proceso inflamatorio y se normaliza 10 días después de haberse terminado (González Naranjo & Molina Restrepo, 2010).

Si se determina conjuntamente con la PCR, sirve para evaluar la extensión y gravedad de la inflamación, hacer el seguimiento y determinar el pronóstico de los pacientes con artritis reumatoide. Sin embargo un valor normal de la VSG no descarta el diagnóstico de artritis reumatoide (González Naranjo & Molina Restrepo, 2010).

* *DAS, disease activity score.*

Sistema de puntuación para evaluar la actividad de la enfermedad reumatoide, recomendado por la “European League Against Rheumatism” (EULAR). El índice DAS combina información relativa a 28 articulaciones tumefactas, dolorosas, reactantes de fase aguda y una medición global del estado de salud estimado por el mismo paciente (Santos- Ramírez, *et al.*, 2011).

Utilizado para la toma de decisiones sobre el tratamiento de pacientes con artritis reumatoide, especialmente para valorar la necesidad de iniciar el tratamiento de fármacos biológicos y para la evaluación de su eficacia, así como la catalogación del paciente en remisión o con actividad clínica (Belmonte Serrano, 2008).

El DAS28-VSG está basado en el empleo de la velocidad de sedimentación globular, mientras que DAS28-PCR se basa en el uso de la proteína C reactiva (PCR) (Santos- Ramírez, *et al.*, 2011).

- * *SDAI, Simplified disease activity index y CDAI clinical disease activity index.*

Índice clínico de actividad de la enfermedad, es una herramienta sencilla que permite evaluar la actividad de la enfermedad en la artritis reumatoide. Consta de cuatro apartados: número de articulaciones inflamadas, número de articulaciones dolorosas y valoración global de la actividad de la enfermedad por parte del paciente y del médico. El SDAI, a diferencia del CDAI, toma en cuenta el nivel de proteína c reactiva (Balsa, 2007).

El índice SDAI puede adquirir valores que oscilan entre el 0.1 y el 86 donde el 0.1 corresponde al mínimo de actividad y 86 al máximo de actividad. Los valores de el índice CDAI se encuentran en el rango de 0 a 76 donde 0 corresponde al mínimo y 76 al máximo de actividad (Smolen & Aletaha, 2014).

- * *RAPID 3, Routine assessment of patient index data 3.*

Índice que incluye tres evaluaciones, la función física de las articulaciones, el dolor y el estado de salud general del paciente. Cada uno de estos apartados es valorado en una escala de 0 a 10 dando un total de 30 puntos, la severidad de la enfermedad puede clasificarse como mayor a 12 severa, de 3.1 a 6 moderada y menor o igual a 3 un estado de remisión (Pincus, *et al.*, 2009).

- * *PASII, Patient Activity Score.*

Índice en el que el propio paciente califica en una escala de 1 a 10 el dolor, la actividad de la enfermedad y su estado de salud general. Los resultados son interpretados de la siguiente manera menor a 1.25 remisión de la enfermedad, mayor a 1.9 actividad leve, entre 1.9 y 5.3 actividad moderada y mayor a 5.3 actividad severa (Anderson, *et al.*, 2011).

Tabla. 11. Parámetros para determinar la actividad de la enfermedad

<i>Parámetro</i>	Actividad de la enfermedad				
	Rango	Remisión	Baja	Moderada	Alta
<i>DAS28 VSG</i>	0-9.4	< 2.6	≥ 2.6 - < 3.2	≥ 3.2 - ≤ 5.1	> 5.1
<i>DAS28 PCR</i>	0-9.4	< 2.6	≥ 2.6 - < 3.2	≥ 3.2 - ≤ 5.1	> 5.1
<i>CDAI</i>	0-76	≤ 2.8	> 2.8 - 10.0	> 10.0 - 22.0	> 22.0
<i>SDAI</i>	0-86	0.0 - 3.3	3.4 - 11.0	11.1 - 26.0	26.1 - 86.0
<i>RAPID3</i>	0-10	0 - 1.0	> 1.0 - 2.0	> 2.0 - 4.0	> 4.0 - 10
<i>PAS</i>	0-10	0.00 - 0.25	0.26 - 3.70	3.71 - 7.99	8.00 - 10.00
<i>PAS II</i>	0-10	0.00 - 0.25	0.26 - 3.70	3.71 - 7.99	8.00 - 10.00

(American College of Rheumatology, 2016)

III- Tabla 12. Concentración de ADN total purificado y cociente de absorción A260/280

CONTROLES				
Muestra	Barcode	A260	A260/280	ng/μL
CRC1	F35	NA	1.74	68.8
RMMP2	F24	6.90	1.56	345.4
DSRH5	F25	2.39	1.59	119.7
SGR6	F6	8.49	1.59	425.0
DFM8	F4	19.38	1.52	437.7
EPN9	F20	NA	1.67	196.1
UVB10	F31	10.32	1.55	516.1
MMG11	F33	12.17	1.65	608.8
DSP13	F13	2.22	1.57	111.0
LMLC14	F22	18.51	1.58	925.5
ONO17	F27	NA	1.89	28.6
ONMD18	F11	NA	1.74	110.6
HCC19	F19	NA	1.82	250.3
DTE22	F44	14.55	1.57	727.5
RMDI24	F10	12.68	1.82	634.1
PLYOL25	F12	19.05	1.80	952.8
MFL26	F42	8.81	1.57	440.9
HMMA28	F43	13.83	1.83	691.7
MAJ 29	F8	11.24	1.78	562.3
MST30	F21	NA	1.86	18.4
HCC31	F48	6.40	1.74	320.2
IT32	F49	14.4	1.95	720.8
IRSJ33	F50	11.38	1.88	569.3
VGM35	F39	NA	1.69	49.7
JGAM36	F46	NA	1.87	25.2
LSA37	F2	4.78	1.62	239.1
MVM38	F36	NA	1.92	17.1
RRS39	F47	8.59	1.70	429.7
RVA43	F45	9.07	1.58	453.8
LSC44	F29	6.96	1.51	348.3
MGJ46	F9	NA	1.85	17.9
OSE47	F1	8.41	1.89	353.0
ERN48	F30	9.6	1.72	482.6
ROV49	F34	4.26	1.41	213.1
PHM50	F5	NA	1.94	27.5
ARN51	F17	NA	1.96	13.9
GSA52	F3	NA	1.98	4.1
OBR53	F23	NA	1.77	21.3
SOA54	F40	NA	1.75	53.5
PEA55	F14	NA	1.86	61.7
GBKM56	F26	NA	1.76	83.8
LUR57	F18	NA	1.62	168.2
LJL58	F7	NA	1.98	21.8
CSI59	F16	NA	1.73	336.4
VSV60	F15	NA	1.65	93.2
HCML61	F28	NA	1.63	98.5
NHMV62	F37	NA	1.66	317.6
RCPI63	F38	NA	1.78	325.7
UBB64	F41	NA	1.84	255.2
POG65	F32	NA	1.82	301.4

Tabla 13. Concentración de ADN total purificado y cociente de absorción A260/280

CASOS				
Muestra	Barcode	A260	A260/280	ng/μL
SQA1	F42	10.4	1.40	653.9
RPR3	F34	17.42	1.20	871.5
GHN16	F15	15.08	1.59	754.3
RMS17	F30	6.72	1.53	336.0
ASMR18	F16	5.28	1.52	264.4
GGI22	F20	11.3	1.61	543.8
RRL24	F21	7.40	1.56	370.4
PCE26	F1	16.58	1.62	829.2
MOE27	F22	4.72	1.82	236.0
MGM28	F9	8.35	1.61	417.8
ADG29	F2	4.76	1.17	238.4
MON31	F8	18.38	1.52	919.3
MOGDA32	F23	11.3	1.68	372.1
LSFL34	F43	5.34	1.35	267.1
AFM35	F47	21.17	1.61	694.5
LVY36	F25	14.68	1.19	734.0
OLE37	F10	13.89	1.61	694.5
LGM42	F27	13.28	1.52	664.4
CGS43	F26	12.88	1.54	644.3
SSC44	F12	9.86	1.25	493.0
MML48	F28	12.28	1.45	614.4
DCMDA49	F48	9.23	1.84	461.8
RJVM50	F40	12.54	1.43	627.1
MFP51	F7	9.048	1.52	452.4
PAD53	F29	12.48	1.61	624.4
CRM54	F14	4.63	1.60	231.5
SCMS55	F35	10.15	1.54	507.5
HEMG56	F17	NA	1.84	100.9
LEB59	F4	4.02	1.66	201.0
AMR62	F3	7.91	1.74	395.6
AVC63	F36	NA	1.56	6.2
MML66	F33	14.95	1.66	747.9
RCL71	F45	9.84	1.60	492.4
VZJ73	F46	10.57	1.48	528.7
NEE74	F41	8.71	1.47	435.9
AEA77	F32	6.66	1.53	333.3
FFV80	F50	4.40	1.33	220.1
RUM 82	F38	8.08	1.65	404.1
MSV83	F49	6.08	1.29	304.2
ZMM85	F24	2.30	1.36	115.2
MMHM86	F39	5.11	1.56	255.5
NHGG88	F31	14.18	1.42	709.3
NMP90	F6	8.63	1.66	431.8
RLS100	F5	4.32	1.65	216.5
CCG101	F18	10.04	1.67	502.1
ASJ102	F44	4.33	1.61	216.5
AAJ105	F19	11.53	1.74	576.7
PCNE106	F11	9.06	1.50	453.0
EJMJ107	F37	8.78	1.57	439.3
VMV109	F13	9.96	1.56	498.4

IV. Secuencia de iniciadores y de “barcodes” utilizados para la construcción de genotecas de 16S rDNA de las muestras de copro.

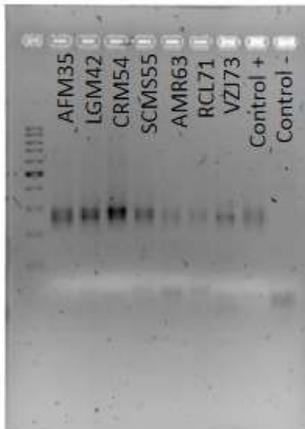
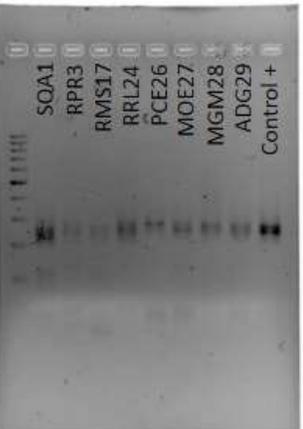
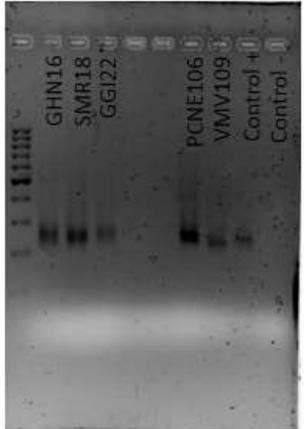
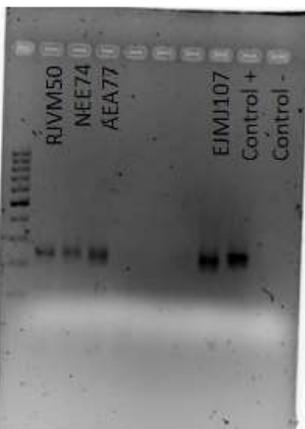
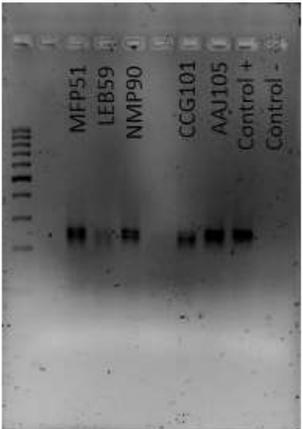
Nombre del iniciador	Ion Torrent “Linker”	Barcode GOLAY	Espaciador	Iniciador 16S rRNA (5'-3')
V3-341 F1	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GATCTGCGATCC	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CAGCTCATCAGC	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CAAACAACAGCT	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F4	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GCAACACCATCC	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F5	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GCGATATATCGC	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CGAGCAATCCTA	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F7	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGTCGTGCACAT	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F8	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GTATCTGCGCGT	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F9	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CGAGGGAAAGTC	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F10	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CAAATTCGGGAT	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F11	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGATTGACCAAC	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F12	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGTTACGAGCTA	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F13	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GCATATGCACTG	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G

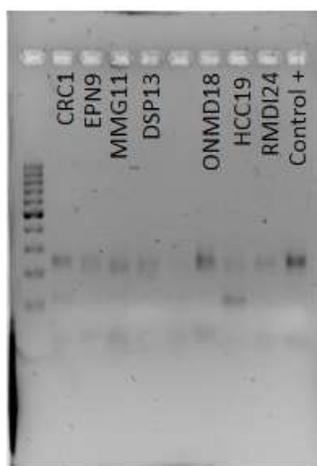
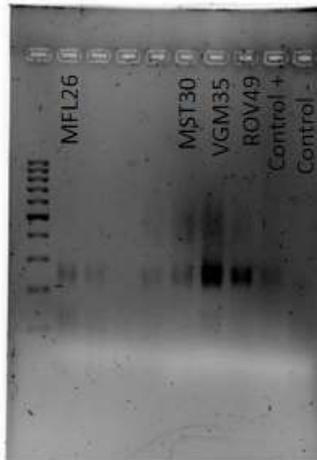
V3-341 F14	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CAACTCCCGTGA	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F15	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TTGCGTTAGCAG	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F16	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TACGAGCCCTAA	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F17	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CACTACGCTAGA	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F18	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TGCAGTCCTCGA	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F19	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACCATAGCTCCG	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F20	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TGGACATCTCTT	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F21	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GAACACTTTGGA	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F22	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TTGGGTACACGT	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F23	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AAGGCGCTCCTT	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F24	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TAATACGGATCG	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F25	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TCGGAATTAGAC	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F26	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TGTGAATTCGGA	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F27	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CATTCGTGGCGT	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F28	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AACGCACGCTAG	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G

V3-341 F29	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACACTGTTTCATG	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F30	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACACTGTTTCATG	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F31	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACCAGACGATGC	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F32	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACGCTCATGGAT	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F33	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACTCACGGTATG	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F34	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGACCGTCAGAC	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F35	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGCACGAGCCTA	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F36	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACAGACCACTCA	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F37	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACCAGCGACTAG	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F38	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACGGATCGTCAG	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F39	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGCTTGACAGCT	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F40	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AACTGTGCGTAC	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F41	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACCGCAGAGTCA	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F42	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACGGTGAGTGTC	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F43	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACTCGATTTCGAT	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G

V3-341 F44	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGACTGCGTACT	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F45	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGCAGTCGCGAT	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F46	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGGACGCACTGT	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F47	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AAGAGATGTCGA	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F48	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACAGCAGTGGTC	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F49	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACGTACTCAGTG	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-341 F50	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACTCGCACAGGA	GT	CCTACGGG AGGCAGCA G
V3-518 R	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTATCCGACTAC CAGGGTATCTAAT	No aplica	CC	ATTACCGC GGCTGCTG G

V. Geles de Agarosa 2%





VI. Muestras que conformaron las dos genotecas

Tabla 14. Muestras utilizadas en la genoteca uno.

CASOS		CONTROLES	
Folio	Barcode	Folio	Barcode
MON31	F8	RMMP2	F24
OLE37	F10	DTE22	F44
SSC44	F12	MFL26	F42
CRM54	F14	HMMMA28	F43
MOGDA32	F23	HCC31	F48
LVIY36	F25	IT32	F49
CGS43	F26	IRSJ33	F50
MML48	F28	LMLC14	F22
RJVM50	F40	SGR6	F6
SCMS55	F35	DFM8	F4
MML66	F33	PHM50	F5
NEE74	F41	ARN51	F17
AEA77	F32	ONO17	F27
RUM82	F38	MVM38	F36
NHGG88	F31	JGAM36	F46
PCNE106	F11	RVA43	F45
EJMJ107	F37	LSC44	F29
VMV109	F13	LSA37	F2
GHN16	F15	RRS39	F47
ASMR18	F16	MGJ46	F9
GGI22	F20	OSE47	F1
MFP51	F7	ERN48	F30
AMR62	F3	ROV49	F34
CCG101	F18	VGM35	F39
AAJ105	F19	MST30	F21

Tabla 15. Muestras utilizadas en la genoteca dos

CASOS		CONTROLES	
Folio	Barcode		
ZMM85	F24	DSP13	F13
AFM35	F47	PLYOL25	F12
MOE27	F22	DSRH5	F25
NMP90	F6	RMDI24	F10
MMHM86	F39	HCC19	F19
RMS17	F30	MMG11	F33
ASJ102	F44	SOA54	F40
MGM28	F9	UVB10	F31
PAD53	F29	LJL58	F7
RCL71	F45	PEA55	F14
VZJ73	F46	LUR57	F18
LGM42	F27	UBB64	F41
RRL24	F21	RCPI63	F38
LEB59	F4	NHMV62	F37
DCMDA49	F48	HCML61	F28
RLS100	F5	VSV60	F15
PCE26	F1	GBKM56	F26
ADG29	F2	CRC1	F35
FFV80	F50	CSI59	F16
LSFL34	F43	OBR53	F23
HEMG56	F17	MAJ 29	F8
SQA1	F42	GSA52	F3
AVC63	F36	ONMD18	F11
MSV83*	F49	EPN9	F20
RPR3*	F34	POG65	F32

*muestras eliminadas por lecturas insuficientes.