



Identificación de polimorfismo(s) en el gen de la Mieloperoxidasa asociado a infecciones recurrentes por *Candida albicans*.

LINA MARCELA RIAÑO PARRA

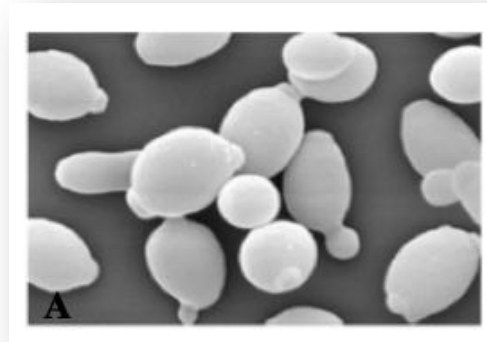
ASESORA

CLAUDIA ANDREA CRUZ BAQUERO

DOCENTE FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C 2019**

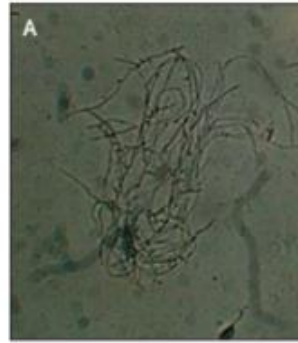
Introducción



Candidiasis

Características Generales

- Levadura comensal y patógena oportunista.
- Desequilibrio inmunológico.
- *Candida albicans*.



Candidiasis vulvovaginal (CVV)

Factores de riesgo.

- Uso de anticonceptivos orales.
- Embarazo
- Antibiótico
- Cambios en la microbiota vaginal normal

Incidencia entre los 20 y 40 años, 75% de mujeres en edad fértil.



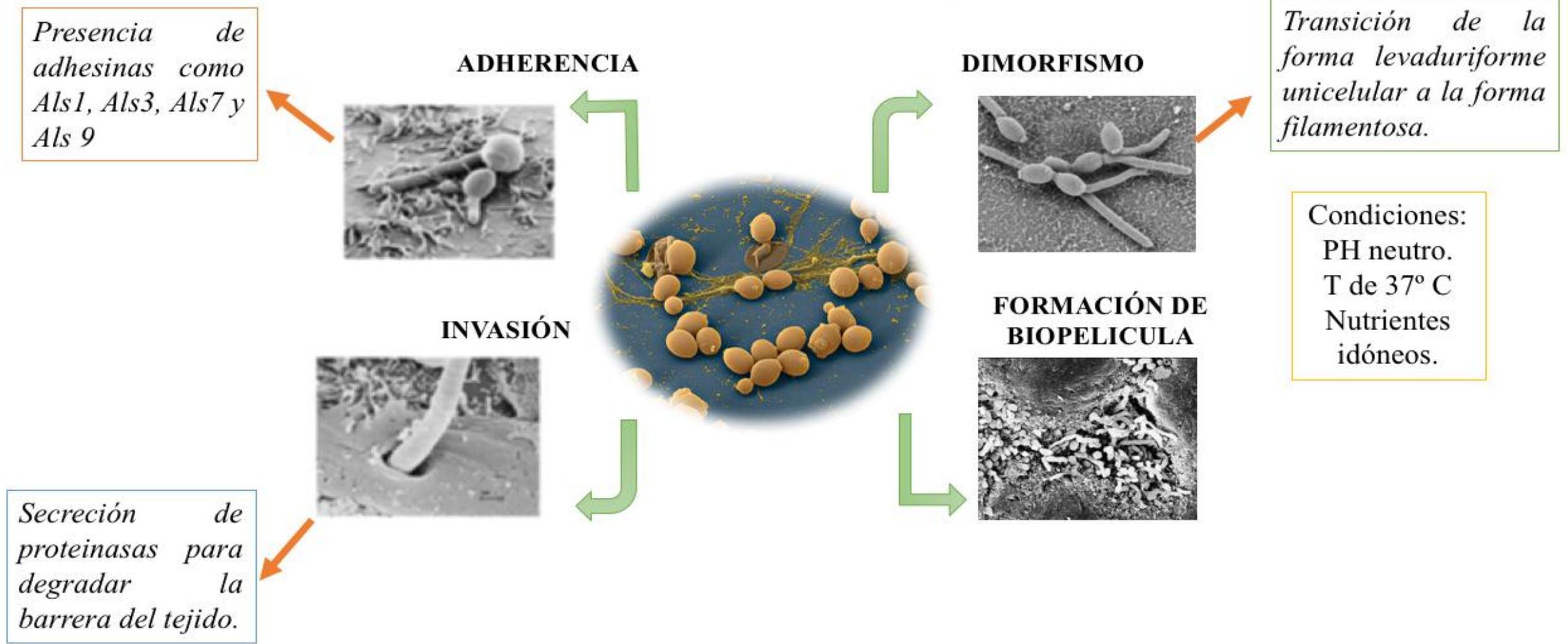
Candidiasis bucal

Factores de riesgo.

- Uso de prótesis bucales
- Tabaco, el estado de salud,
- Medicamentos inmunosupresores.
- Higiene bucal

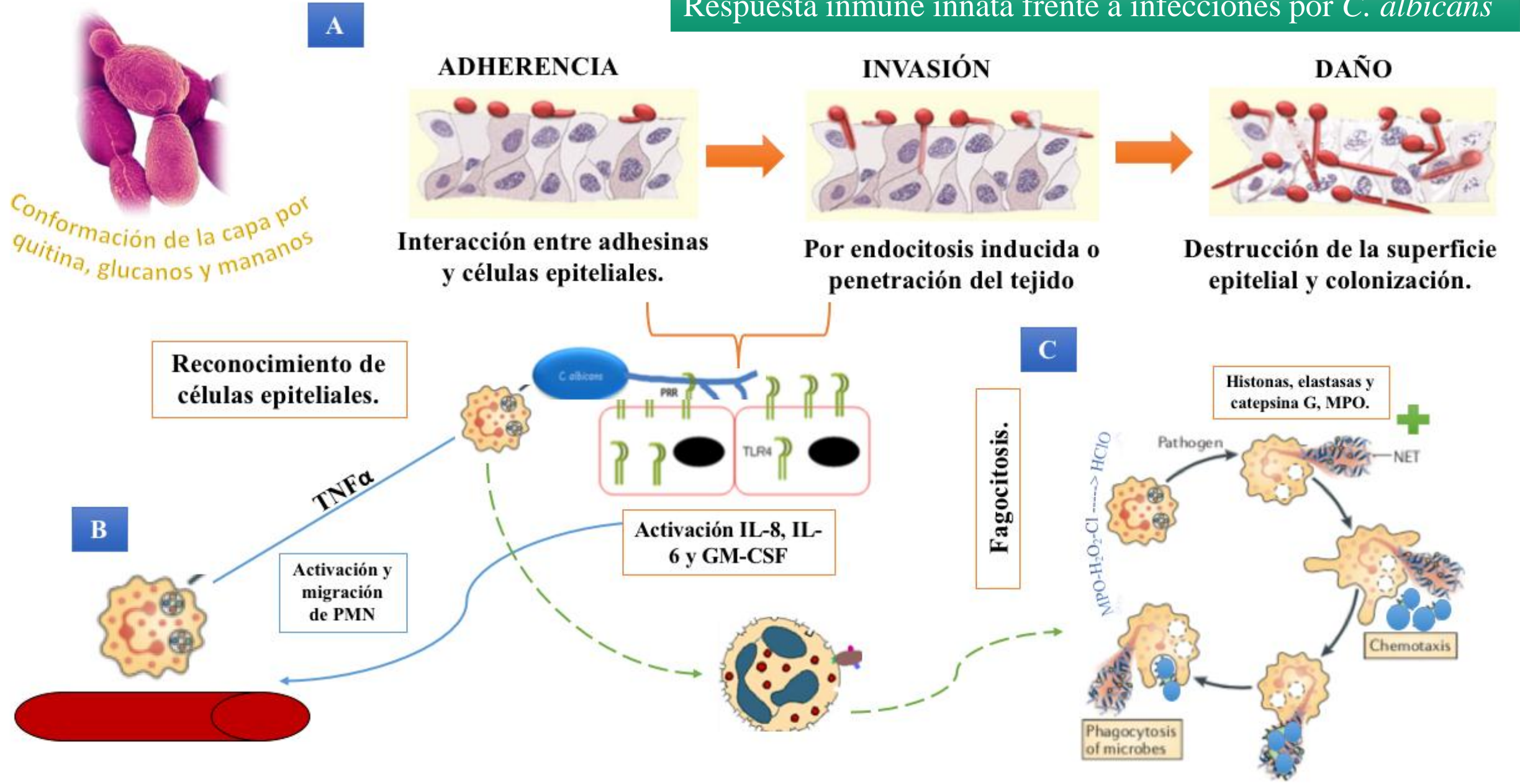
Prevalencia anual de la candidiasis oral de 50 en 100,000 habitantes

Mecanismos de patogenicidad

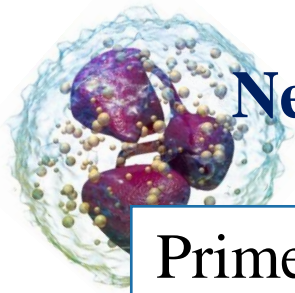


Ilustrado por: Riaño L.

Respuesta inmune innata frente a infecciones por *C. albicans*



Ilustrado por: Riaño L.



Neutrófilos

Primeras células en responder a una infección, forman parte de la respuesta innata.



Crean ambientes capaces de degradar los microorganismos ingeridos y activan el sistema MPO- H_2O_2 -Haluros.

Pueden presentarse defectos como:

Defectos en la producción de neutrófilos.

Defecto en la adhesión leucocitaria.

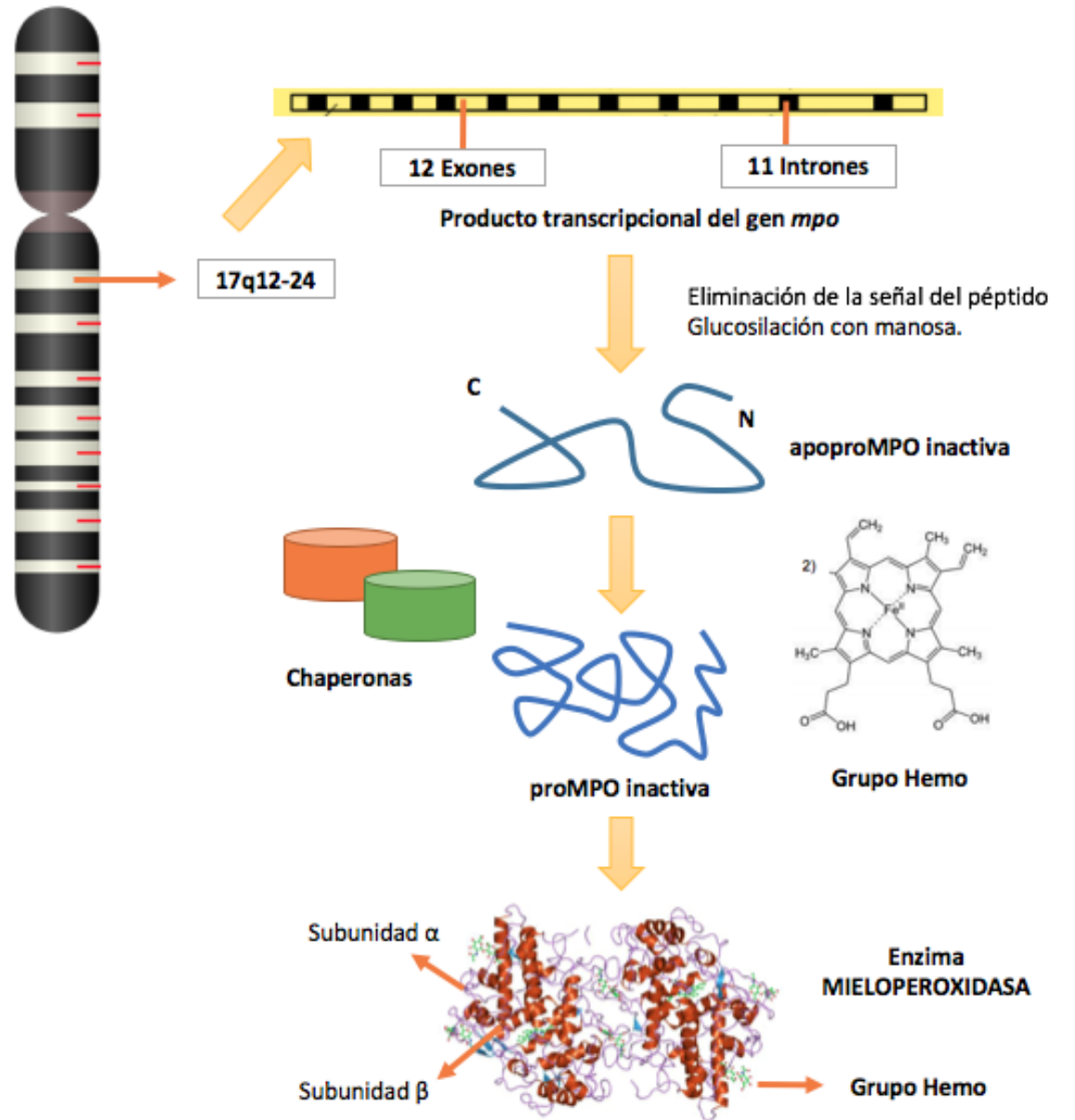
Defecto en la vía enzimática oxidativa.

Deficiencia específica de gránulos.

La mieloperoxidasa

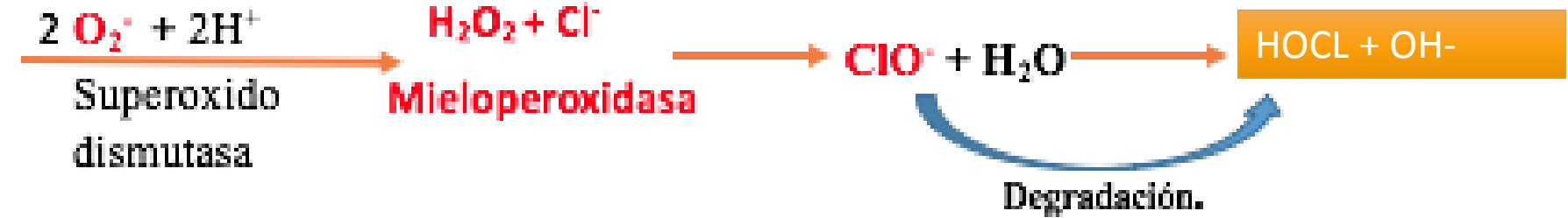
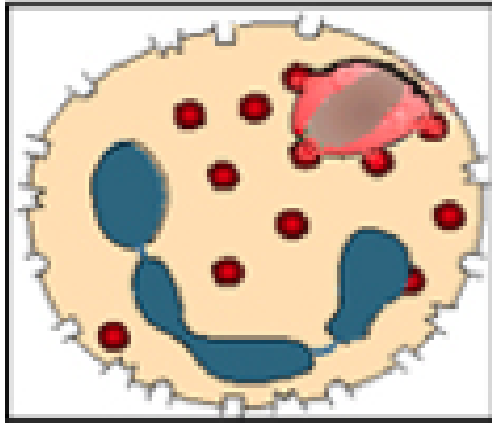
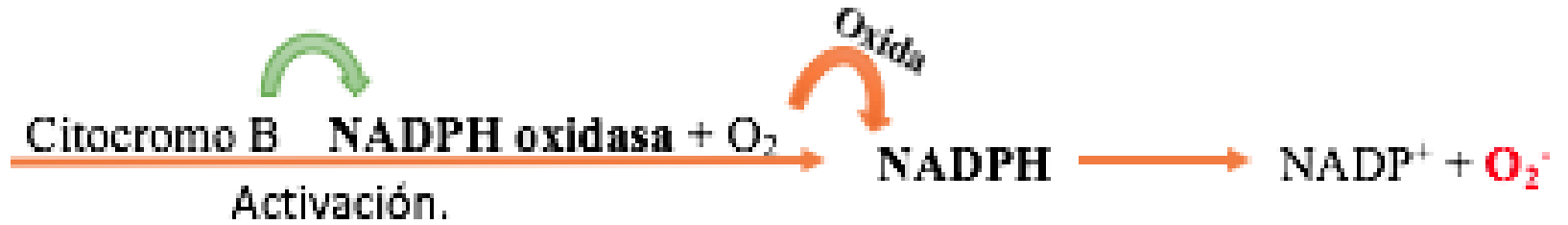
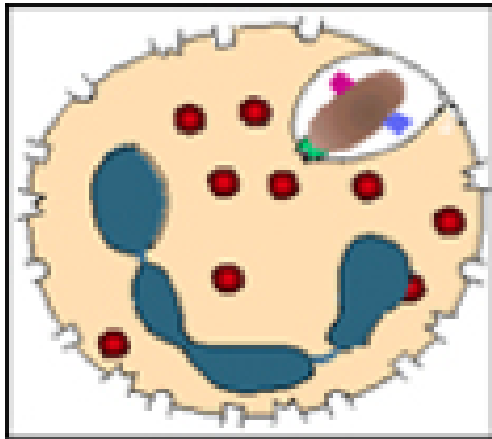
Características Generales

- Hemoproteína presente en los gránulos azurófilos de los neutrófilos.
- Su síntesis inicia durante el estadio de promielocito del neutrófilo.
- Producto de un gen localizado en el brazo largo del cromosoma 17.
- Actividad catalítica enzimática.

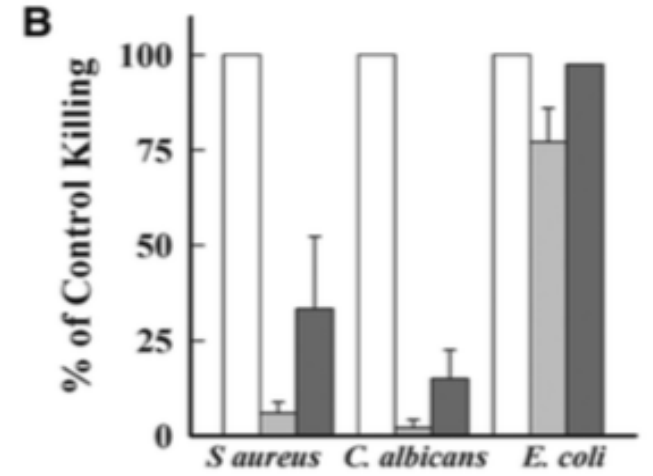
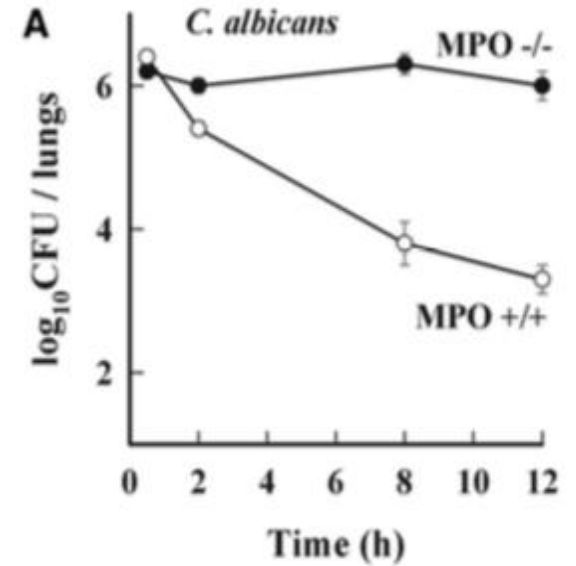


Estallido respiratorio sistema oxígeno dependiente, mieloperoxidasa dependiente.

A.

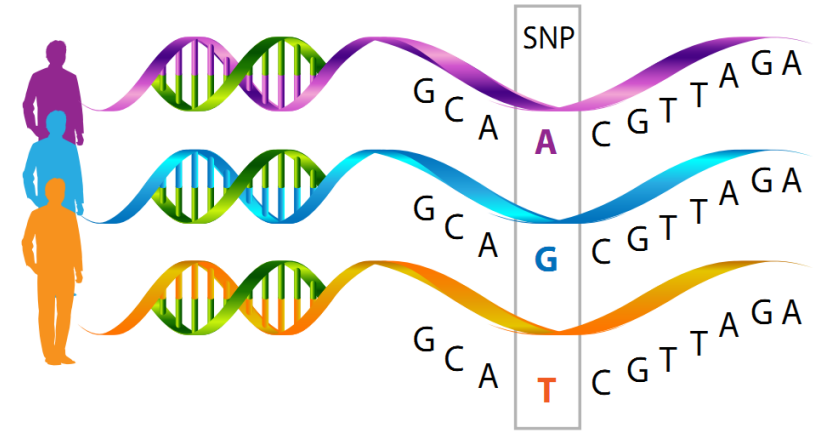


Deficiencia de MPO



Polimorfismos

Puede presentarse por errores en los mecanismos de replicación, reparación de ADN y factores ambientales.



<https://francis.naukas.com/2016/05/16/francis-rosavientos-fracaso-escolar-no-esta-los-genes/>

Polimorfismos reportados : **R569W, Y173C, M251T, R499C y delección de 14 bases (D14) en el exón 9 del gen *mpo*.**

El 50% de los pacientes con deficiencia de MPO presentan complicaciones infecciosas, el 40% son asintomáticos y solo el 10% de los pacientes sufre complicaciones.

Objetivo general

Identificar polimorfismo/s en el gen de la enzima Mieloperoxidasa, en pacientes con susceptibilidad a infecciones recurrentes por *Candida albicans*.

Objetivos específicos

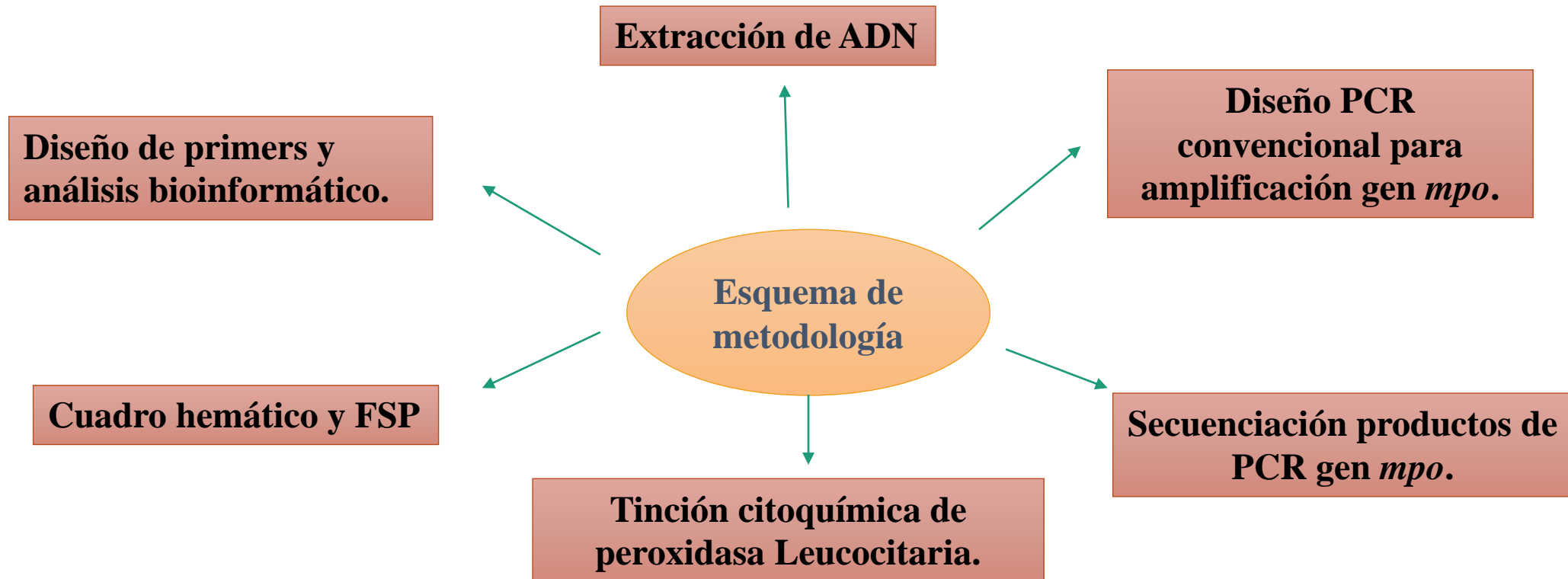
- Caracterizar la extracción de ADN mediante dos protocolos de extracción para los tipos de muestra evaluados.
- Diseñar la técnica PCR convencional para la amplificación del gen *mpo* contemplando parámetros químicos y térmicos.
- Analizar la secuenciación de los productos de PCR y demostrar la presencia de polimorfismo/s en el gen *mpo* en pacientes con candidiasis recurrente.
- Comparar los resultados de la tinción citoquímica para MPO de cada paciente estudiado de forma cualitativa.

Metodología

Población: pacientes de la ciudad de Bogotá con diagnóstico previo de Candidiasis recurrente vulvovaginal y bucal.



Muestra: 2 pacientes de la ciudad de Bogotá con diagnóstico previo de Candidiasis recurrente vulvovaginal y bucal, control negativo.



Resultados y Discusión

Objetivo específico número 1 Resultados
Caracterización dos protocolos distintos de extracción.

Cuantificación ADN obtenido por kit Wizard Genomic DNA Purification.

Muestra	Concentración ADN	A260	A280	260/280	260/230	Tipo de muestra	Factor
1	47,2 ng/μl	0,944	0,521	1,81	2,05	DNA	50
2	169,5 ng/μl	3,39	1,823	1,86	2,26	DNA	50
3	181,7 ng/μl	3,634	1,971	1,89	1,91	DNA	50

Cuantificación ADN obtenido por kit Ultraclean Bloodspin DNA isolation.

Muestra	Concentración ADN	A260	A280	260/280	260/230	Tipo de muestra	Factor
1	64,3 ng/μl	1,285	0,759	1,69	0,65	DNA	50
2	66,4 ng/μl	1,329	0,709	1,75	1,56	DNA	50
3	21,4 ng/μl	0,428	0,221	1,94	0,59	DNA	50

Discusión

Objetivo específico número 1

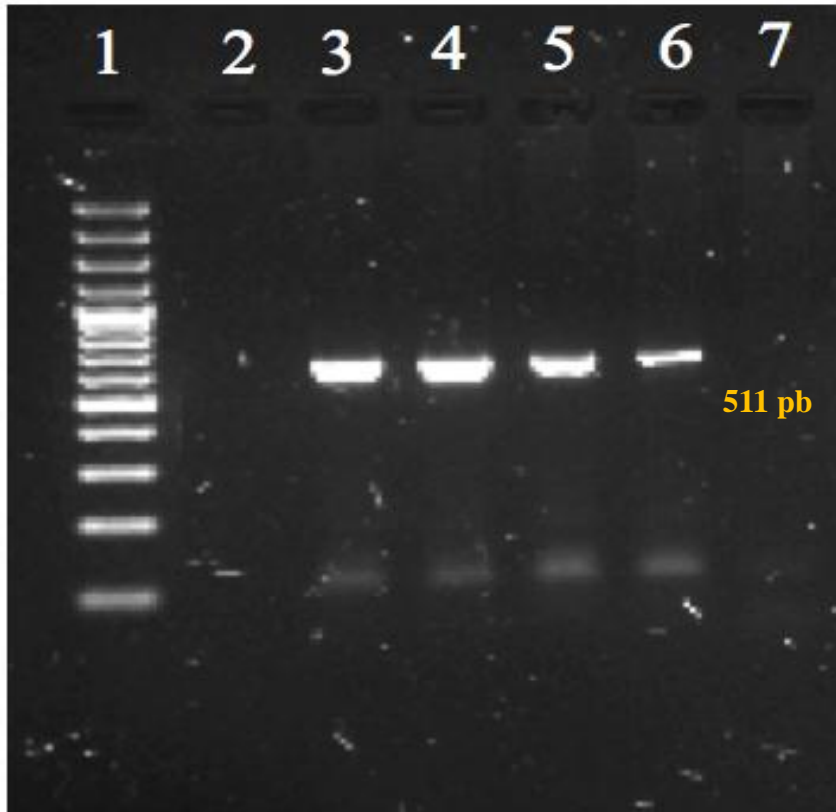
Se verificó cuál de los dos suministraba mejor concentración, estabilidad y pureza del ADN

El kit The Wizard Genomic DNA Purification Kit- Promega corporation mostró mejor rendimiento.

La cuantificación en las densidades D.O.260: D.O.280 para las tres muestras estuvieron entre 1,8 a 2.

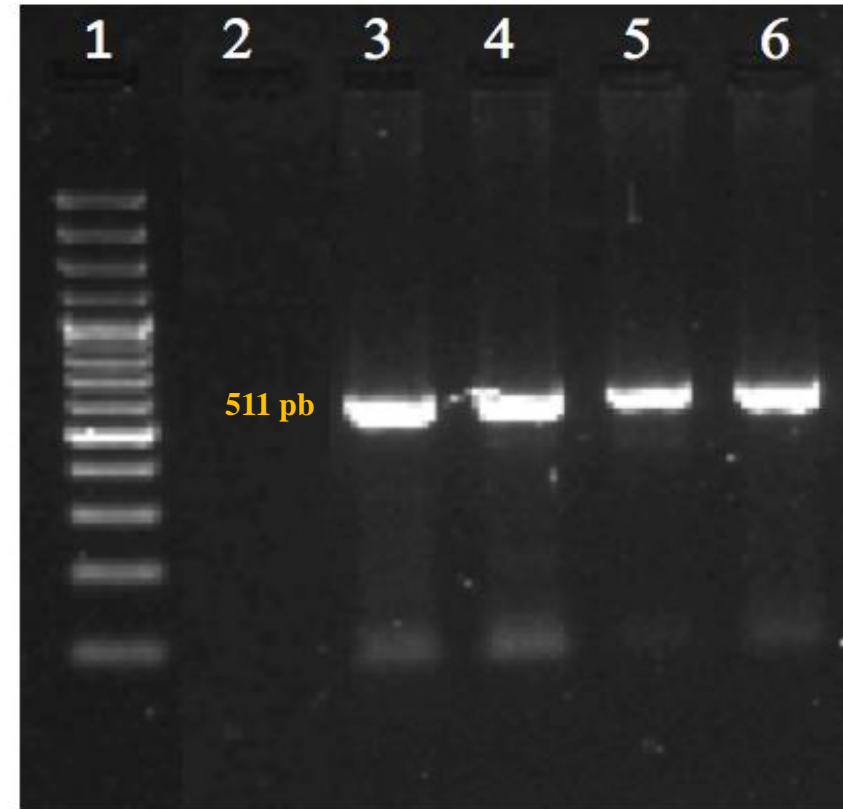
Objetivo específico número 2 Resultados.
Diseño PCR convencional para amplificación gen *mpo*.

Titulación de MgCl₂



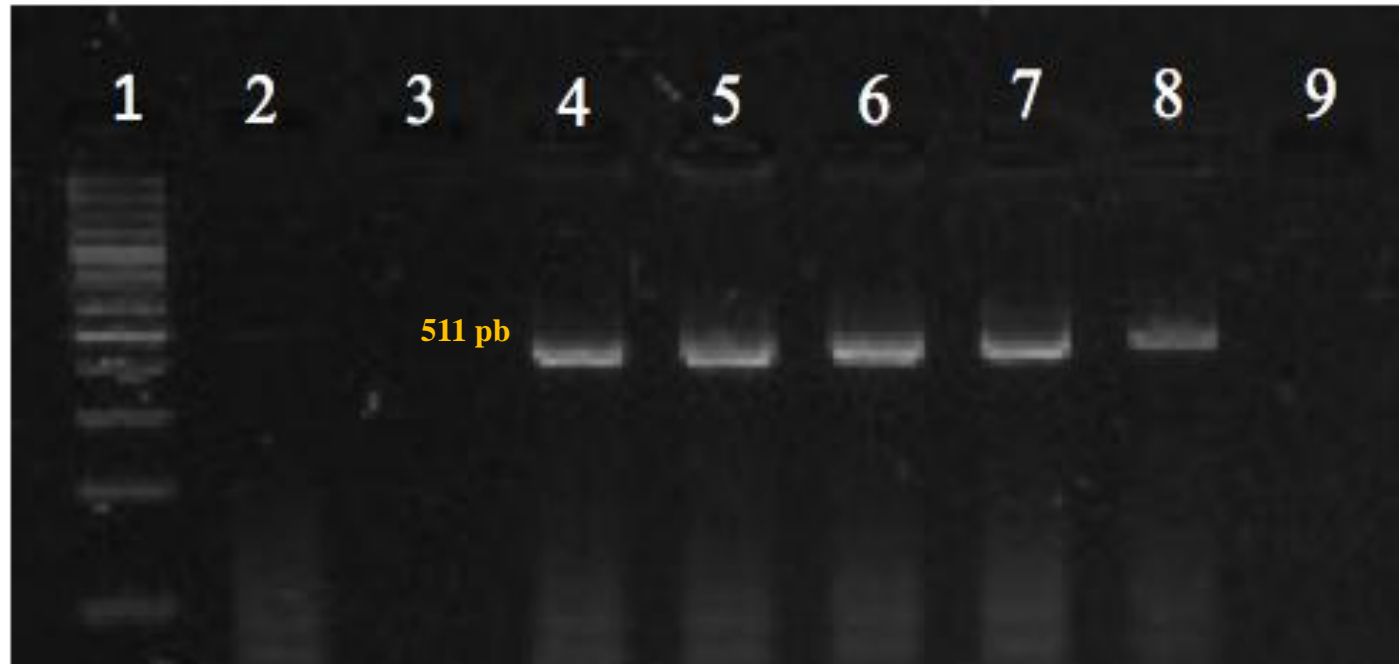
Carril 1. MPM, escalera CorpoGen 100 pb. **Carril 2.** Control negativo. **Carril 3.** MgCl₂ 3 mM **Carril 4.** MgCl₂ 2,5 mM **Carril 5.** MgCl₂ 2 mM **Carril 6.** MgCl₂ 1,5 mM **Carril 7.** MgCl₂ 1 mM

Titulación de primers.



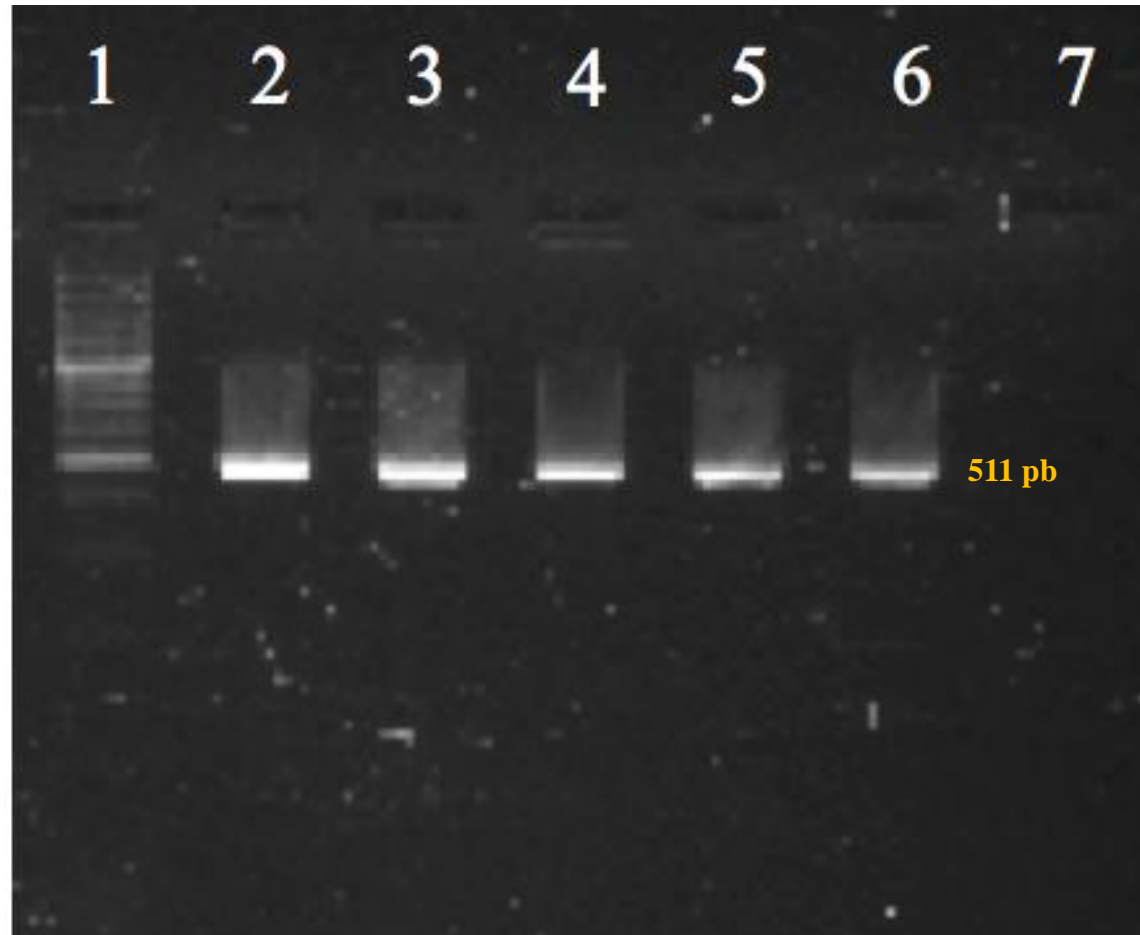
Carril 1. MPM, escalera CorpoGen 100 pb. **Carril 2.** Control negativo. **Carril 3.** [] Primers 0,4 μM **Carril 4.** [] Primers 0,3 μM **Carril 5.** [] Primers 0,2 μM **Carril 6.** [] Primers 0,1 μM.

Titulación de ADN



Carril 1. Marcador de peso molecular, escalera CorpoGen 100 pb. **Carril 2.** Control negativo. **Carril 4.** Concentración inicial ADN 181,7 ng/ μ l **Carril 5.** Concentración inicial ADN 181,7 ng/ μ l **Carril 6.** Concentración ADN 90,85 ng/ μ l, dil $\frac{1}{2}$ **Carril 7.** Concentración ADN 45,42 ng/ μ l, dil $\frac{1}{4}$ **Carril 8.** Concentración 21,71ng/ μ l, dil. $\frac{1}{6}$ **Carril 9.** Control negativo.

Temperatura de anillamiento

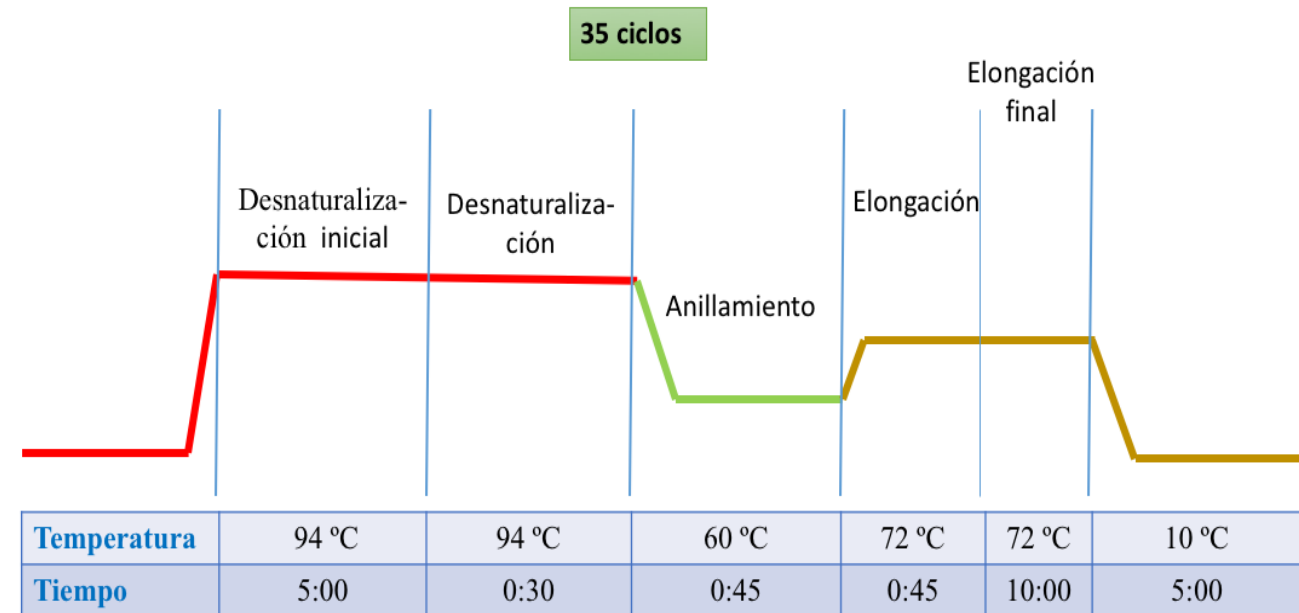


Carril 1. Marcador de peso molecular, escalera CorpoGen 100 pb. **Carril 2.** T de anillaje 55°C **Carril 3.** 57 °C T de anillaje **Carril 4.** T de anillaje 59 °C **Carril 5.** T de anillaje 60° C **Carril 6.** T de anillaje 61 °C **Carril 7.** Control negativo

Condiciones químicas de amplificación para el gen *mpo*.

REACTIVOS	[] INICIAL	[] FINAL	VOL. INICIAL PARA 25 μ L
Agua	----	----	15,5 μ L
Buffer	5X	1 X	5 μ L
MgCl ₂	25 mM	2 mM	2 μ L
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,5 μ L
Primer F	10 μ M	0,2 μ M	0,5 μ L
Primer R	10 μ M	0,2 μ M	0,5 μ L
Taq	5 U/ μ L	0,05 U/ μ L	0,25 μ L
ADN	----	----	0,75 μ L

Programa perfil térmico para la amplificación del gen *mpo*



Discusión

Objetivo específico número 2

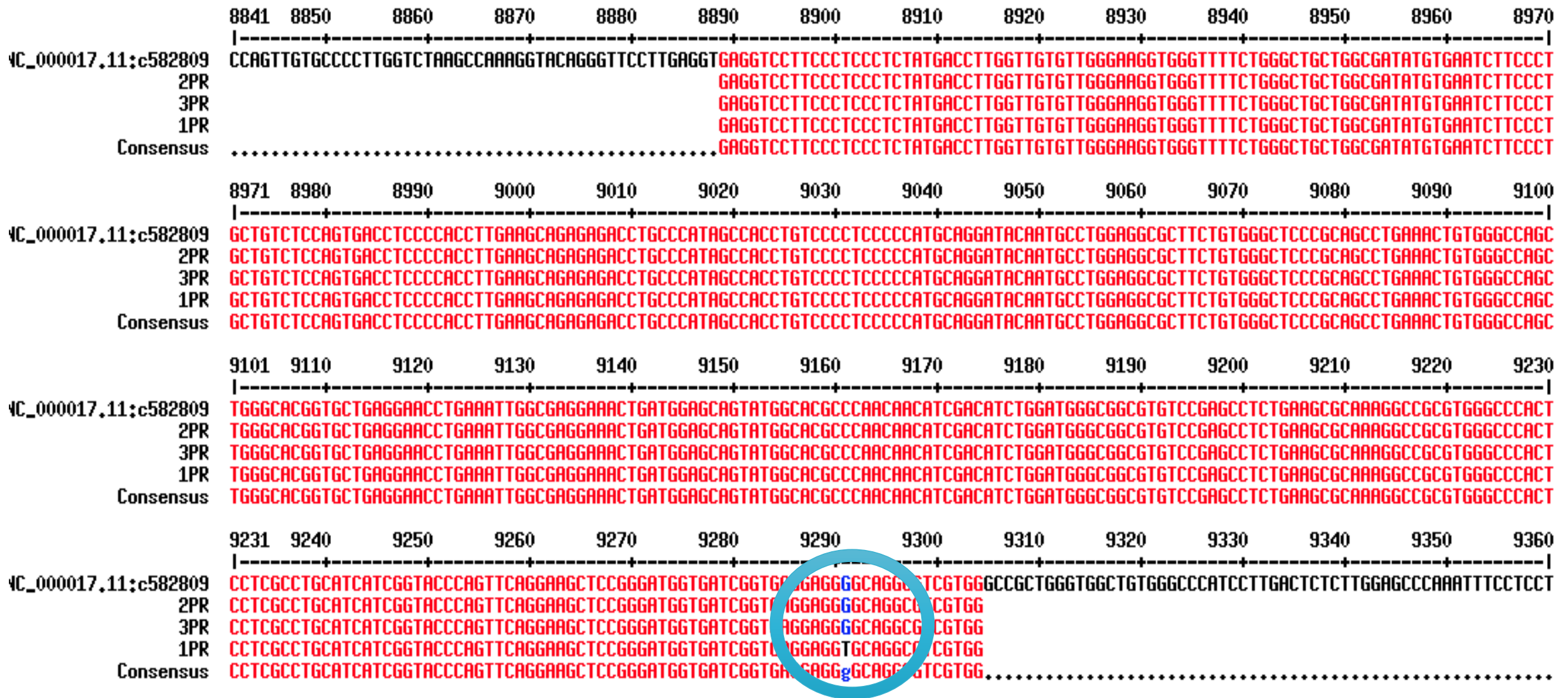
Al tener en cuenta las características de cada reactivo se pudo variar concentraciones a fin de establecer un reacción óptima de amplificación.

Se recalca la importancia de modificar tanto parámetros químicos como térmicos.

Las modificaciones para la PCR convencional diseñada funciona para posteriores ensayos.



Carril 1. Marcador de peso molecular, escalera CorpoGen 100 pb. **Carril 2.** Control negativo **Carril 3.** Muestra problema 1 **Carril 4.** Muestra problema 2 **Carril 5.** Muestra problema 3.



Alineamiento entre los productos de amplificación secuenciados para el gen de la MPO de las cadenas complementarias.

El alineamiento de la secuencia complementaria de la muestra 3 en la que se halló el polimorfismo, permitió establecer que este estaba situado en la posición 9291 pb de la secuencia trabajada

Homo sapiens myeloperoxidase (MPO), RefSeqGene (LRG_84) on chromosome 17
 [223555956]ref[NG_009629.1]

Function class:

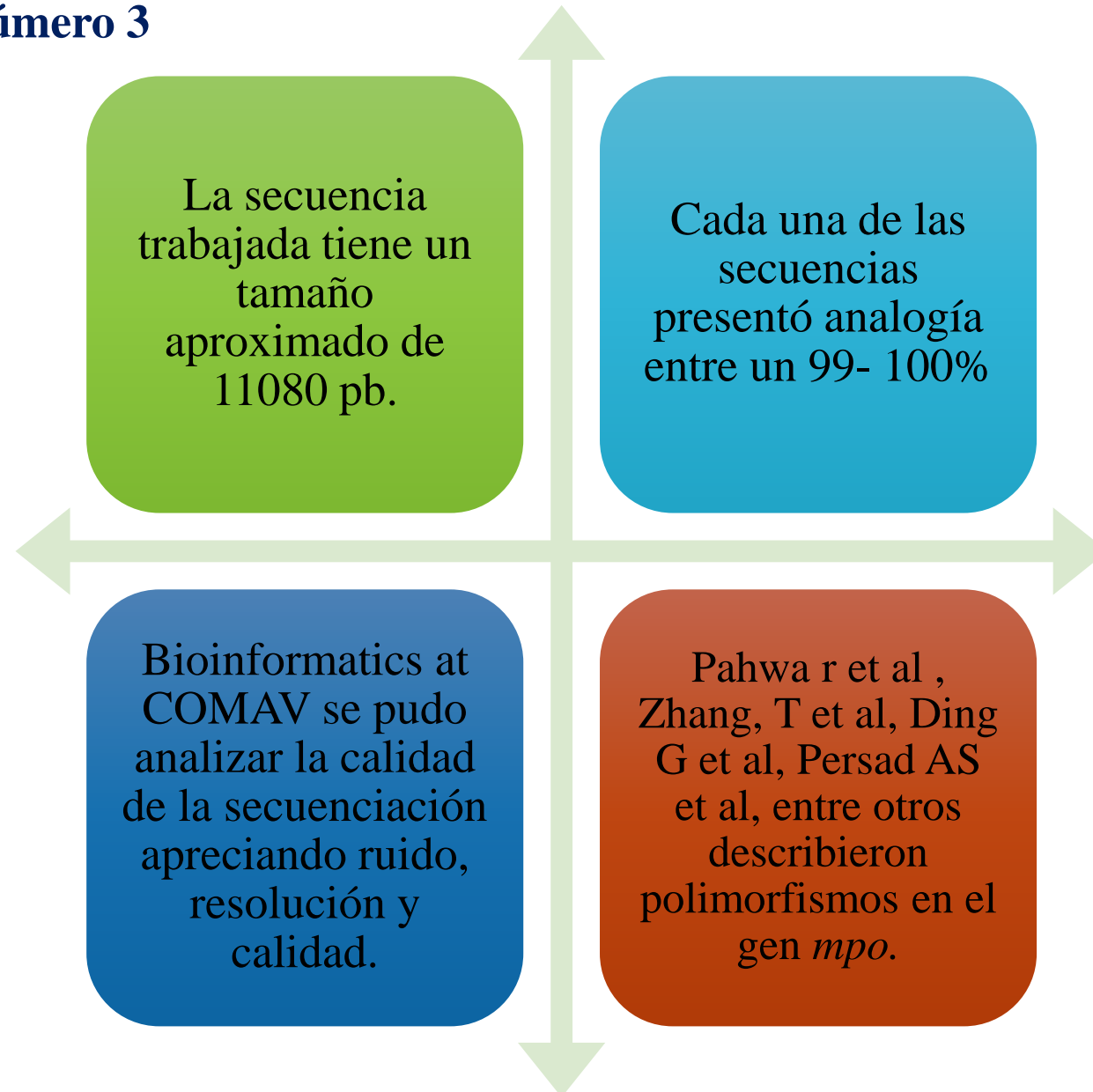
[rs1450589448](#) is located in the intron region of [NM_000250.1](#).

The screenshot displays the NCBI RefSeq browser interface for the MPO gene. The top track shows the gene structure with exons in black and introns in green. A red box highlights a specific SNP, rs1450589448, located in an intron region. Below the sequence, various other SNPs are listed. The MPO gene details panel on the right shows the gene name, title, location, length, and gene position (9,292). The Allele information panel on the right shows the variation class as SNV (single nucleotide variation) and the RefSNP Alleles as C/T (FWD).

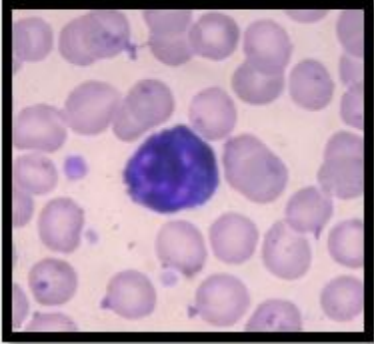
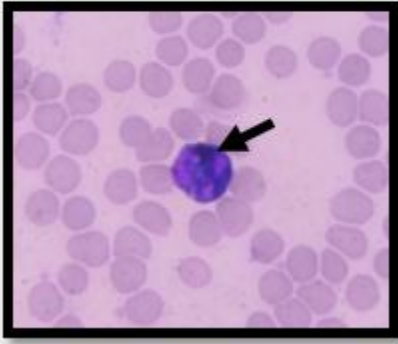
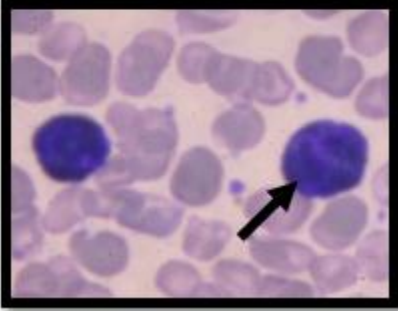
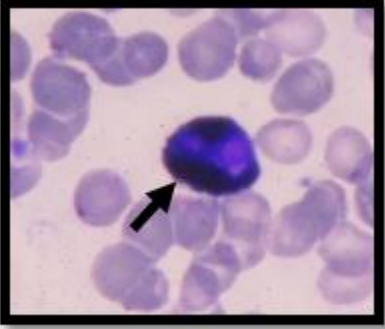
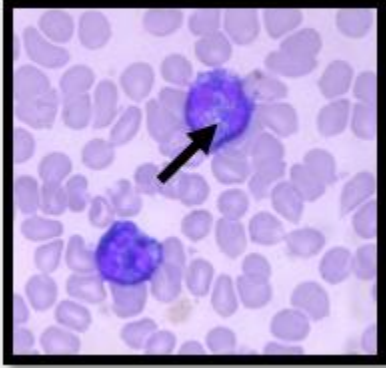
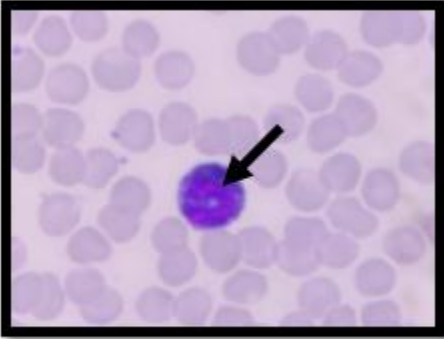
Allele	
Variation Class:	SNV: single nucleotide variation
RefSNP Alleles:	C/T (FWD)
Allele Origin:	
Ancestral Allele:	Not available
Variation Viewer:	VarView
Clinical Significance:	NA
	NA

Discusión

Objetivo específico número 3

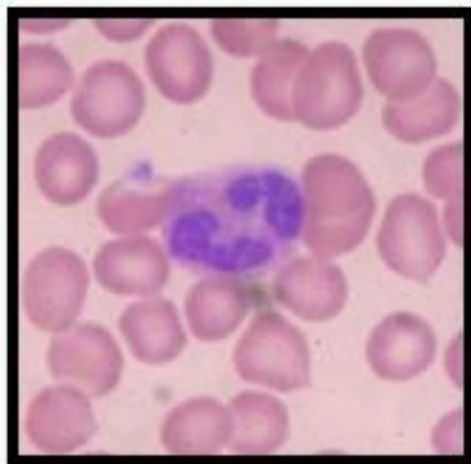
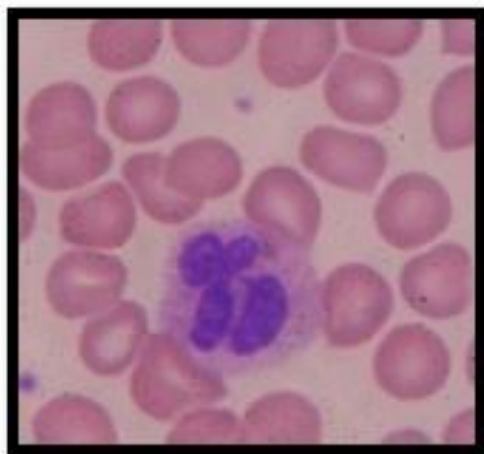


Objetivo específico número 4 Resultados.
Comparación tinción citoquímica para cada paciente

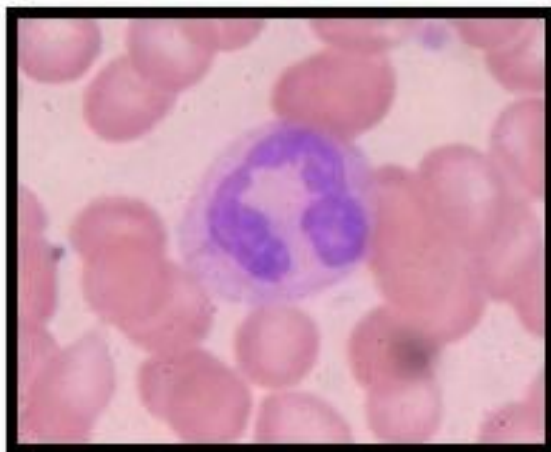
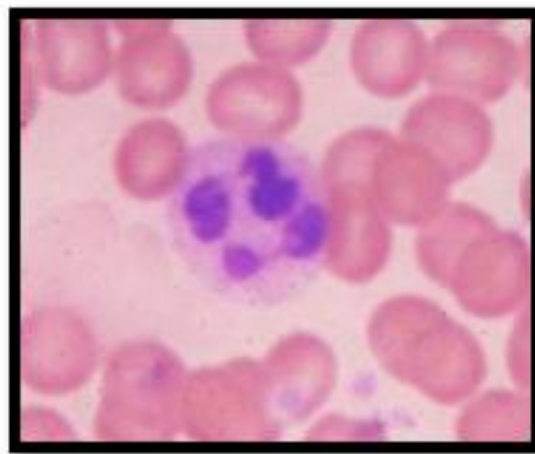
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Tinción citoquímica para MPO	A. 	B. 	
			

FSP

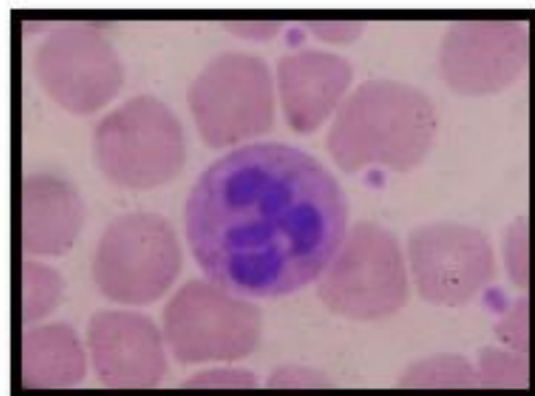
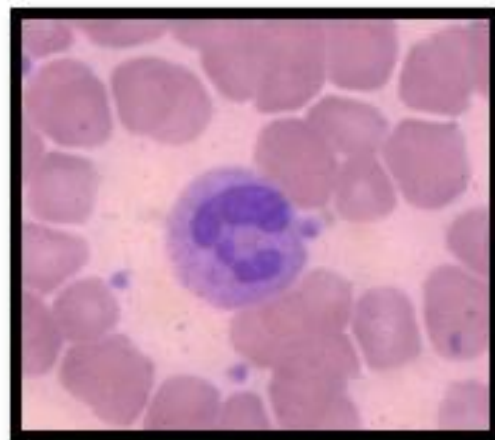
D.



E.



F.



Discusión

Objetivo específico número 4

La presencia de la enzima no llega a ser indicativo de que esta sea funcionalmente activa.

Según Aratani et se esperaría que este tipo de pacientes estuvieran relacionados con casos de neutropenia.

Los frotis de sangre periférica no mostraron alteración alguna.

La tinción citoquímica para MPO mostraron buena cantidad de la enzima MPO.

Conclusiones

1. La mieloperoxidasa juega un papel fundamental en la activación de un sistema microbicida altamente potente.
2. Las técnicas y procedimientos empleados durante el desarrollo del proyecto fueron de gran utilidad para la identificación del gen que codifica para la enzima MPO.
3. Se logró comparar la similitud entre la secuenciación de cadena obtenida con la secuencia disponible en la base de datos NCBI.
4. Se destaca la importancia del uso de herramientas informáticas para estudios tanto prácticos como teóricos.

Recomendaciones

Campo abierto de investigación hacia la búsqueda de polimorfismos involucrados en cambios genéticos que alteran la funcionalidad de la MPO.



Búsqueda de una mayor cantidad de muestras dado a la baja incidencia con que se presentan estos polimorfismos.