



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

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología y laboratorio clínico
Trabajo de grado
Bogotá, 2019**



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

Estudiante

Lina Marcela Riaño Parra

Asesora

Claudia Andrea Cruz Baquero.

Docente Facultad Ciencias de la Salud

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Bacteriología y laboratorio clínico

Bogotá, 2019

DEDICATORIA

A Dios por fortalecer mi carácter cada día e impulsarme cada vez a ser mejor, por guiarme y darme fuerza en cada decisión. A mis padres, Miryam y Arisaldo, por ser mi apoyo incondicional, mi base y guía, por su confianza y entereza, su amor y protección. A mis hermanos, Miguel y Roberto, por su compañía incondicional y su forma de enseñarme a creer en los sueños. A mi cuñada, Bibiana, por ser mi consejera y amiga. A Valeria, el motor de nuestra familia, nuestra niña.

También a mis amigas Melissa, Blanyfer, Evelyn y Daniela Ortiz; por su apoyo e incondicionalidad, por su fuerza y amistad. Por acompañarnos en momentos de dificultad y sobre todo por afianzar nuestro compromiso como colegas. A la profesora Gladys Pinilla y Andrea Cruz por guiarme en el proceso del desarrollo de mi proyecto investigativo, por su apoyo e interés.

A la Sra. Geywitz, esposo e hijos por brindarme su mano durante el tiempo que estuve en Chile, por su acogida y cariño.

¡GRACIAS TOTALES!

Lina Riaño P.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por brindarme un gran camino de aprendizaje y oportunidades, a todos y cada uno de los maestros que hicieron parte de mi proceso formativo, para el desarrollo de habilidades y destrezas en la carrera.

A la universidad Austral de Chile, Laboratorio de Polímeros por permitirme vivir una faceta tanto de crecimiento profesional como personal.

Al Semillero de investigación REMA, profesora Gladys Pinilla, Andrea Cruz y Tatiana Durán, Laboratorio de Biotecnología por permitirme llevar a cabo el desarrollo de mi proyecto de investigación.

Al laboratorio *Animed*, Dra. Andrea Castillo por guiar mi gusto hacia la Biología Molecular.

Tabla de contenido

Resumen	12
Introducción.....	13
2. Objetivos.....	15
2.1 Objetivo general	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3. Marco teórico	16
3.1 Antecedentes	16
3.2 Candidiasis generalidades	19
3.3 Epidemiología.....	24
3.4 Diagnóstico.....	26
3.5 Tratamiento.....	26
3.6 Fisiopatología e inmunidad de <i>Candida albicans</i>	27
3.7 Los neutrófilos	30
3.8 Mieloperoxidasa	31
3.9 Deficiencia de MPO y susceptibilidad a infecciones	36
3.10 Tipos de polimorfismos genéticos	40
3.11 Diagnóstico deficiencia de MPO.....	43
3.11.1 Técnicas citoquímicas.....	43
3.11.2 PCR convencional	43
3.11.3 Secuenciación de ADN.....	45
4. Metodología.....	47
4.1 Tipo de investigación.....	47
4.2 Población	47
4.3 Muestra	47
4.4 Recolección de la muestra	48
4.5 Diseño de primers y análisis Bioinformático	48
4.6 Extracción de ADN	49
4.7 Estandarización PCR convencional para amplificación gen <i>mpo</i>	50
4.7.1 Titulación de ADN	50
4.7.2 Titulación de MgCl ₂	51
4.7.3 Titulación de primers	51

4.7.4 Temperatura de anillamiento	52
4.8 PCR convencional	52
4.9 Purificación de ADN	54
4.10 Secuenciación	54
4.11 Tinción citoquímica de peroxidasa leucocitaria	55
4.12 Cuadro hemático y FSP	55
5. Resultados.....	56
5.1 Estandarización PCR convencional para amplificación gen <i>mpo</i>	56
5.1.1 Titulación de ADN	56
5.1.2 Titulación de MgCl ₂	57
5.1.3 Titulación de primers.....	58
5.1.4 Temperatura de anillamiento	60
5.1.5 PCR convencional	62
5.2 Resultados secuenciación	63
5.2.1 Alineamiento de las secuencias con programa bioinformático BLAST	63
5.2.1.1 Muestra N° 1: Paciente con diagnóstico candidiasis bucal.....	63
5.2.1.2 Muestra N° 2: Control negativo.....	65
5.2.1.3 Muestra N° 3: Paciente con diagnóstico candidiasis vaginal.....	67
5.2.2 Comparación de alineamientos de secuenciaciones con programa Multalin .	69
5.2.3Análisis de electroferogramas de los productos de amplificación de PCR secuenciados de cadenas complementarias	71
5.3 Análisis bioinformático de la región del gen <i>mpo</i> amplificado, para determinar la ubicación del polimorfismo hallado en la base de datos NCBI.....	73
5.4 Comparación de tinción citoquímica y FSP de las muestras en estudio	77
6. Discusión.	81
7. Conclusiones	85
8. Referencias.	86
9. Anexos.....	95

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Polimorfismos asociados a la deficiencia de MPO.....	39
Tabla 2. Identificación muestras de estudio	47
Tabla 3. Características de los primers para amplificación del gen <i>mpo</i>	48
Tabla 4. Titulación ADN	50
Tabla 5. Titulación de MgCl ₂	51
Tabla 6. Titulación de primers	51
Tabla 7. Condiciones químicas de amplificación gen <i>mpo</i>	50
Tabla 8. Programa perfil térmico para amplificación gen <i>mpo</i>	53
Tabla 9. Cuantificación ADN obtenido por kit Wizard Genomic DNA purification.....	57
Tabla 10. Cuantificación ADN obtenido por kit Wizard Ultra clean blood spin DNA	57
Tabla 11. Tinción citoquímica para MPO y FSP	78
Tabla 12. Cuadros hemáticos muestras problema y control negativo.....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía electrónica de formas representativas de <i>C. Albicans</i>	20
Figura 2. Descarga vaginal de una mujer con Candidiasis vulvovaginal.....	22
Figura 3. Presentaciones clínicas de candidiasis bucal.....	23
Figura 4. Mecanismos de patogenicidad presentes en <i>C. albicans</i>	27
Figura 5. Respuesta inmune innata frente a infecciones por <i>C. albicans</i>	29
Figura 6. Pasos involucrados en síntesis de la enzima MPO.....	31
Figura 7. Componentes de reacciones catalizadas por MPO dentro del fagosoma.....	33
Figura 8. Activación sistema antimicrobiano MPO- H ₂ O ₂ -Cl.....	34
Fig 9. Ineficaz acción microbicida por Deficiencia de MPO.....	37
Figura 10. Tipos de polimorfismos según su localización en regiones del gen	41
Figura 11. Técnicas para identificación de polimorfismos... ..	43
Figura 12. Etapas de amplificación de ADN por medio de la técnica PCR.....	44
Figura 13. Diluciones seriadas ½, ¼, 1/6 de ADN.....	50
Figura 14. Programa de ciclaje PCR convencional para amplificación gen <i>mpo</i>	53
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa 1.8% de productos de amplificación de PCR convencional de titulación de ADN	57
Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa 1.8% de productos de amplificación de PCR convencional para determinación de concentración adecuada de MgCl ₂	58
Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa 1.8% de productos de amplificación de PCR convencional para determinación de concentración adecuada de primers	60
Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa 1.8% de productos de amplificación de PCR convencional para determinación temperatura de anillaje adecuada según T _m de primers.	61

Figura 19 .Electroforesis en gel de agarosa 1.8% de productos de amplificación de PCR convencional muestras problemas con parámetros finales de estandarización	62
Figura 20. Alineamiento del producto de amplificación del <i>gen mpo</i> secuenciado para cadena antisentido de muestra 1	63
Figura 21. Alineamiento del producto de amplificación del <i>gen mpo</i> secuenciado para cadena sentido de muestra 1	64
Figura 22 . Alineamiento del producto de amplificación del <i>gen mpo</i> secuenciado para la cadena sentido del control negativo.....	65
Figura 23. Alineamiento del producto de amplificación <i>gen mpo</i> secuenciado para cadena antisentido del control negativo.....	66
Figura 24 . Alineamiento del producto de amplificación <i>gen mpo</i> secuenciado para cadena sentido de la muestra 3	67
Figura 25. Alineamiento del producto de amplificación <i>gen mpo</i> secuenciado para cadena antisentido de la muestra 3	68
Figura 26 . Alineamiento entre los productos de amplificación secuenciados para el gen de la MPO de las cadenas complementarias	69
Figura 27. Alineamiento entre los productos de amplificación secuenciados para el gen de la MPO de cadenas sentido.....	70
Figura 28 . Electroferogramas de los productos de amplificación de PCR secuenciados, cadenas complementarias.	71
Figura 29. Análisis bioinformático para la ubicación de polimorfismos en el <i>gen mpo</i>	74

LISTA DE ANEXOS

Anexo A: Consentimiento informado para autorización toma de muestra.....	95
Anexo B: Protocolo de extracción ADN a partir de muestra de sangre total kit The Wizard Genomic DNA Purification Kit- Promega corporation.....	96
Anexo C: Protocolo de extracción de ADN a partir de muestra de sangre total, Kit Ultraclean® Bloodspin DNA isolation	98
Anexo D: Protocolo de purificación de productos de amplificación con kit Invitrogen™ PureLink™ PCR Purification	99
Anexo E. Protocolo Tinción citoquímica para peroxidasa leucocitaria MPO.....	100

RESUMEN

La candidiasis es una infección causada por levaduras del género *Candida spp.* que se presenta de varias formas dependiendo la zona del cuerpo en la que se localice, como la candidiasis bucal y la candidiasis vulvovaginal. Esto ocurre cuando existe un desequilibrio inmunológico entre el huésped y el hongo; por lo tanto, el organismo desencadena un mecanismo de defensa que involucra células como el neutrófilo, quien actúa como principal mediador de la respuesta inmune innata frente a levaduras, dado a que libera sustancias fungicidas como la Mieloperoxidasa (MPO), enzima presente en los gránulos azurófilos.

Sin embargo, se han descrito múltiples causas que pueden generar deficiencia o disfunción de esta enzima como la presencia de polimorfismos en el gen que la codifica; por tal motivo, en este estudio se buscó identificar un posible polimorfismo mediante técnicas moleculares y citoquímicas en muestras de pacientes con antecedentes de candidiasis recurrente, logrando estandarizar la técnica de PCR convencional para la amplificación del gen *mpo*, la secuenciación de la región amplificada y análisis bioinformáticos de los productos de amplificación hallando un cambio en una base nitrogenada (G291T) ubicada en una región no codificante del gen en estudio.

Palabras Claves: Candidiasis, enzima Mieloperoxidasa, polimorfismos , deficiencia enzimática , infecciones recurrentes.

Introducción

La candidiasis es una infección causada por hongos del género *Candida*, que afecta diferentes zonas del cuerpo tales como corazón, sangre, cerebro, entre otros tejidos; siendo la especie *C. albicans* el principal agente etiológico. Se ha observado que es más común la presentación de la infección en pacientes hospitalizados e inmunosuprimidos; a pesar de que *C. albicans* hace parte de la flora normal del cuerpo y se encuentra principalmente en diferentes regiones, como piel, orofaringe, tracto digestivo, uretra y vagina, puede llegar a representar un problema cuando ocurre una ruptura del equilibrio inmunológico entre el huésped y el hongo, donde este logra multiplicarse rápidamente en los tejidos y se instala la infección^{2,18,34}.

Las infecciones que involucran mucosas son muy comunes, entre las que se encuentran la candidiasis vulvovaginal que afecta a un 75 % de las mujeres en edad fértil, siendo el segundo problema ginecológico más frecuente en el mundo después de la vaginosis bacteriana^{1,12}. La candidiasis vulvovaginal es una infección inflamatoria aguda que incluye síntomas como prurito vulvar, descarga vaginal, vulva eritematosa y leucorrea, estos se asocian a factores predisponentes, que pueden direccionar a la recurrencia de la infección denominada *Candidiasis vulvovaginal recurrente* (RVVC) la cual se adquiere una y otra vez con una prevalencia del 7-8%^{12,13}

Por otro lado, la candidiasis orofaríngea posee gran relevancia, ya que afecta principalmente adultos en edad avanzada con una incidencia entre un 7% y 65%; la infección puede desencadenarse por diversos factores como por ejemplo la edad, alteraciones salivales, el uso de prótesis bucales removibles, el tabaco, el estado de salud, medicamentos inmunosupresores e higiene bucal. Esta infección tiene una incidencia entre 0,2 y 0,4 casos por 10000 pacientes/día con una mortalidad del 30-40% de los casos, además posee un impacto en la calidad de vida de pacientes con infecciones crónicas y recurrentes^{1,18,25}.

En respuesta a estas patologías, el organismo debe desencadenar un mecanismo de defensa que va direccionado principalmente a la activación de la inmunidad celular innata, la cual actúa frente a infecciones fúngicas; el neutrófilo participa como célula responsable y mediadora, debido a que libera sustancias fungicidas como especies de oxígeno reactivo (ROS) y componentes de los gránulos en la formación del fagosoma, activando el sistema microbicida MPO-H₂O₂-CL, donde intervienen proteínas antibacterianas como catepsinas, defensinas, derivados reactivos de oxígeno, y enzimas como la mieloperoxidasa⁹.

La mieloperoxidasa representa el 5% de las proteínas de los neutrófilos siendo de gran importancia, ya que está involucrada en el proceso de fagocitosis, desgranulación y producción de ácido hipocloroso; esta es un potente microbicida asociado a un aumento de la actividad respiratoria^{2,16}; además juega un papel importante frente a las infecciones por *Candida spp* al lograr desencadenar su fuerte acción citotóxica en la respuesta inmunológica inespecífica^{9,11,21}. Sin embargo, pueden ocurrir defectos durante el proceso de fagocitosis que incluyen fallas en la producción de neutrófilos, fallas en la vía enzimática oxidativa o deficiencias específicas de gránulos²⁵; uno de estos defectos comprende la deficiencia de MPO que se ha observado en pacientes con candidiasis recurrente; además se ha demostrado que la variación o presencia de algún polimorfismo/s en el *gen mpo* puede conferir susceptibilidad a la infección por *Candida spp*.^{1,25,26}

Actualmente, el diagnóstico para la deficiencia de mieloperoxidasa se lleva a cabo mediante la detección de un posible polimorfismo/s en el *gen mpo*, tinciones citoquímicas o por medio del análisis de citometría de flujo en laboratorios de hematología clínica para la enumeración de PMN con actividad de la enzima mieloperoxidasa⁵⁰. Por lo anterior, se buscó identificar la presencia de un polimorfismo involucrado en la deficiencia enzimática de MPO, que pudiera conferir susceptibilidad hacia diferentes infecciones, siendo de gran interés la Candidiasis.

2. Objetivos

2.1 Objetivo generales

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

2.2 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.

3. Marco teórico

3.1 Antecedentes

El interés sobre la mieloperoxidasa ha llevado a diferentes investigadores a realizar diversos estudios sobre la función, características y ubicación de la misma, describiéndola como una sustancia presente en los neutrófilos, que en combinación con H₂O₂ y cloruro constituye un potente microbicida.¹⁶ Datos bioquímicos han demostrado que la mieloperoxidasa (MPO) genera toxinas antimicrobianas letales en los neutrófilos siendo activas dentro de los fagosomas, donde se producen oxidantes que reaccionan tóxicamente hacia los microorganismos ingeridos.¹⁶ El papel fundamental de la MPO se da durante la respuesta inmune innata, cuando la cantidad de microorganismos sobrepasa la capacidad de defensa de otros mecanismos en el huésped.¹⁶

Estudios citoquímicos que datan de principios de 1900, sugirieron la presencia de una peroxidasa en los gránulos citoplásmicos de los neutrófilos, en especies como simios, caninos y humanos¹⁶. En el año 1920, Graham, reportó por primera vez la liberación de “peroxidasa” por parte de los gránulos presentes en el citoplasma de los neutrófilos durante el proceso de fagocitosis, los cuales fueron evidenciados mediante coloraciones que permitían teñirlos, ya que anteriormente, en 1900 se había establecido la presencia de peroxidasa en los gránulos citoplasmáticos de granulocitos maduros, específicamente en los gránulos primarios o azurófilos^{9,11}, llegando a la conclusión de que los gránulos desaparecían de los leucocitos progresivamente a medida que aumentaba el número de inclusiones bacterianas en la célula⁹.

En el año 1940, Kjell Agner reportó que los neutrófilos poseían MPO en concentraciones no menores de 1-2% en la célula, pero años más tarde, Schultz definió que la MPO representaba un 5% del peso de los neutrófilos; además, la Mieloperoxidasa fue nombrada inicialmente como verdeperoxidasa debido a su color característico. Posteriormente, Theorell y Akeson lograron purificar una de las peroxidasas de aspecto marrón-verde hallada en leche de vacas, demostrando que está tenía propiedades diferentes a la catalogada verdeperoxidasa, proponiendo los nombres que actualmente se conocen como Mieloperoxidasa y Lactoperoxidasa (LPO).¹¹

En el año 1957, Seymour J. Klebanoff de la Universidad Rockefeller de New York trabajó en el laboratorio Reginald Archibald y encontró que diferentes sustancias estaban involucradas en procesos microbicidas ; tales sustancias eran peroxidasa (LPO y MPO), las cuales podrían desempeñar un papel importante en la catálisis de reacciones dependientes a oxígeno ⁹ , fue entonces cuando surgió una incógnita sobre la función principal de los neutrófilos en la fagocitosis y la destrucción de microorganismos, planteándose la siguiente pregunta: ¿la función de la MPO en los neutrófilos es la destrucción de los microorganismos ingeridos?. En 1967, Klebanoff informó que los iones de MPO, H₂O₂, yoduro, cloruro o bromuro formaban un poderoso sistema antimicrobiano en los neutrófilos ⁹.

Para el año 1960, Hirsch y Cohn describieron el proceso de desgranulación durante la fagocitosis, donde pudieron evidenciar como la membrana de los gránulos se rompía y descargaba su contenido dentro del fagosoma, a partir de allí se estudiaron y aislaron gránulos de granulocitos de conejos, encontrando gran variedad de hidrolasas, así como una proteína antimicrobiana a la que denominaron fagocitina. Posteriormente en 1961, un grupo de científicos, Iyer, Islam y Quastel, explicaron que la explosión respiratoria de los neutrófilos estaba asociada a la formación de H₂O₂, calificándolo con un producto implicado en la actividad antimicrobiana hacia ciertos microorganismos^{9,16}.

En 1969, Lehrer, Cline y Hanifin, describieron a un paciente diabético con deficiencia de MPO y candidiasis sistémica cuyos neutrófilos tenían un defecto candidacidal prolongado in vitro, es decir, la acción microbicida de los neutrófilos era menor, en este momento se consideró la deficiencia de MPO como un evento raro. Años después, un estudio comparó 100 pacientes con deficiencia total o subtotal de MPO con 118 pacientes con niveles normales de MPO, donde hubo una incidencia estadísticamente significativa mayor de infección grave y procesos inflamatorios crónicos en pacientes deficientes ^{9,16}.

Posteriormente, durante un experimento realizado con el fin de comparar la actividad microbicida de neutrófilos normales y deficientes en MPO en diferentes organismos, *Lactobacillus acidophilus*, *Staphylococcus* coagulasa negativa y *Candida tropicalis*; se utilizó azida, la cual actúa como inhibidora de la peroxidasa. Se determinó que la azida disminuyó la actividad microbicida de los neutrófilos normales, mientras que en los

neutrófilos con deficiencia de MPO no tuvo efecto, lo que sugirió que posiblemente esta sustancia ejercía su efecto sobre las células normales mediante la inhibición de la MPO^{9,16}.

Sin embargo, también se comparó la actividad de los neutrófilos normales con los que presentaban deficiencia sin inhibidor alguno, evidenciando menor muerte bacteriana con respecto a los deficientes de MPO. En ratones que carecían de MPO (MPO-knockout), se observó que estos eran más susceptibles a infecciones por *Candida albicans*, esencialmente infecciones pulmonares al ser inoculados intranasalmente por *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Trichosporon asahii*, *Pseudomona auriginosa*, entre otros ⁹. Gracias a estos estudios, se concluyó que cuando la carga fúngica es baja, las especies de oxígeno reactivo (ROS) formados por la NADPH oxidasa de los neutrófilos son suficientes para poder controlar la infección en ausencia de MPO, por el contrario a una carga fúngica alta, se necesitan obligatoriamente productos de estallidos respiratorios y MPO ^{9,16}.

Los informes de deficiencia de MPO fueron poco frecuentes hasta que los laboratorios de hematología adoptaron tinciones con peroxidasa y citometría de flujo para identificar y enumerar células en sangre periférica. En 1954 se describe por primera vez esta deficiencia como un trastorno autosómico recesivo causado por mutaciones en el gen que codifica para esta enzima. Posteriormente, los estudios demuestran que la deficiencia de MPO ocurre comúnmente, afectando a 1 en 2000 a 4000 individuos sanos en América del Norte y Europa, y 1 en 57 000 en Japón ^{9, 16,26}.

Por otro lado, la candidiasis ha sido identificada desde la antigüedad, Hipócrates en su tratado sobre “epidemias” describió dos casos de afta oral y muget en pacientes debilitados. La infección tuvo gran prevalencia en los años 1700 en Francia, por lo que se ofreció un premio al estudio realizado por Véron en 1835, quién expuso que esta infección se adquiría a través del útero, también describiendo los primeros casos de candidiasis esofágica. En el año de 1849, Wilkinson describió por primera vez la candidiasis vaginal en una paciente de 77 años de edad, quien presentaba una secreción vaginal profusa ²⁹.

Las primeras descripciones de otras formas superficiales de candidiasis aparecen al comienzo del siglo XX, cuando se estableció que las enfermedades inmunosupresoras predisponían a los pacientes a la candidiasis; del mismo modo, Zenker en 1861 describió la

candidiasis sistémica como una la enfermedad generalizada causada por diseminación hematógena, observado en un paciente debilitado y con muguet bucal ²⁹.

3.2 Candidiasis generalidades.

La Candidiasis representa la infección fúngica más común en pacientes hospitalizados en el mundo, causada por diversas especies de levaduras del género *Candida spp.* siendo el más común agente etiológico *Candida albicans*. Las candidiasis de mucosas y piel son de mayor frecuencia, mientras que las candidiasis sistémicas son de evolución aguda, crónica y generalmente severas⁴; *Candida spp.* puede causar enfermedades invasoras graves en enfermos ingresados en UCI y en pacientes con neutropenia profunda, prolongada u otras inmunodeficiencias³⁵. La candidiasis surge de la diseminación hematógena o de la inoculación directa de especies de *Candida spp.* A un sitio estéril, principalmente en pacientes inmunosuprimidos quienes son los más propensos a adquirir infecciones cutáneas, subcutáneas y sistémicas ^{1,2}. Esta infección depende del estado inmunitario del hospedero y de la localización de las manifestaciones clínicas, clasificandola como superficial o profunda ³⁰.

El género *Candida spp.* comprende más de 150 especies, las cuales presentan diferentes morfologías y características fisiológicas; entre las especies más virulentas se encuentran *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* ¹. *C. albicans* representa actualmente la mitad de los aislamientos hospitalarios en lo que refiere a este género; sin embargo, en las últimas décadas, se ha observado un cambio epidemiológico con un incremento notable de especies de *Candida* diferentes ^{3,5}; así mismo se ha evidenciado prevalencia de infecciones causadas por especies como *C. glabrata* y *C. krusei*, con informes de resistencia a azoles antimicóticos³.

C. albicans es una levadura comensal y patógena oportunista con gran capacidad de adaptación a diferentes ambientes, la cual tiene la propiedad de experimentar cambios morfogénéticos, desde la forma de levadura típica ovoide (O) a un microorganismo de crecimiento micelial de hifas (Y) y (H), lo que constituye la forma comensal y patógena; las células comensales “Y” son toleradas por el huésped y se mantienen en bajas cantidades, pero cuando “Y” se convierte en la forma “H” esta expresa sus rasgos de

virulencia, ya que este tipo de hifas tienen la capacidad de formar capas robustas de biofilm que se adhieren fuertemente e invaden la capa externa del epitelio, lo que hace posible encontrarla en muestras patológicas obtenidas de tejidos invadidos. *C. albicans* en estado saprófito se encuentra en forma de levadura y se reproduce asexualmente por gemación. Por otro lado, en estado parasitario forma filamentos con extremos redondos hasta la formación de pseudomicelios ^{12,30}.

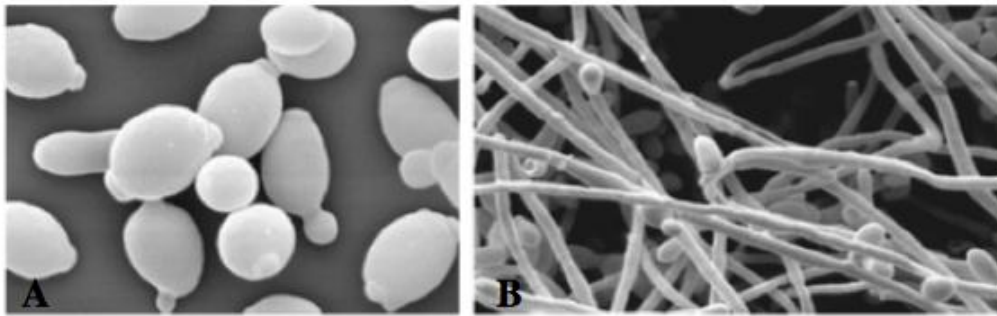


Fig. 1 Micrografía electrónica de formas representativas de *C. Albicans* **A.** Micrografía electrónica de *C. albicans* en forma de levadura típica ovoide. **B.** Micrografía electrónica de *C. albicans* en forma micelial.*

***Tomado de:** Cassone A. Vulvovaginal Candida albicans infections: Pathogenesis, immunity and vaccine prospects. BJOG An Int J Obstet Gynaecol. 2015;122(6):785

C. albicans hace parte de la flora normal del cuerpo y se encuentra principalmente en diferentes regiones como la piel 40%, orofaringe 10%, tracto digestivo 16%, uretra y vagina 34%. La flora bacteriana beneficiosa y el sistema inmunitario limitan el crecimiento de esta levadura y frenan su excesiva proliferación, generando equilibrio microbiológico. Sin embargo, cuando ocurre una ruptura del equilibrio inmunológico entre el huésped y el hongo, este logra multiplicarse rápidamente en los tejidos y se instala la infección².

La infección por *C. albicans* puede ser endógena o exógena, una infección endógena está dada por la pérdida del balance de la flora normal debido a factores como inmunosupresión y traslocación bacteriana; por otro lado, una infección exógena es adquirida, a través de fuentes contaminadas³⁴. Este patógeno afecta principalmente a pacientes hospitalizados, con estadía prolongada en UCI, tranplante de órganos, tumores, enfermedades

hematológicas, hemodiálisis, presencia de catéter vascular, uso de antibióticos, cambios hormonales, entre otros ; este tipo de pacientes están predispuestos a un cambio en la microbiota normal, permitiendo la colonización por parte de este microorganismo, lo que lo convierte en patógeno oportunista ocasionando infecciones recurrentes ^{1,2}.

La candidiasis puede llegar a presentar un cuadro agudo, subagudo o crónico, superficial o profundo de carácter oportunista; donde se ven involucrados procesos patológicos como inflamación, formación de pus, picazón, descarga de flujo, entre otros. Los lugares más comprometidos son las mucosas orofaríngeas y vaginales, piel, pulmón, tracto gastrointestinal, riñón y corazón, llegando al punto de convertirse en una infección sistémica⁶. La mayoría de infecciones por *C. albicans* son de origen endógeno, dado a la proliferación de la levadura en el sitio blanco, inducida por un factor de riesgo como se mencionó anteriormente; sin embargo, también existe la posibilidad de infecciones exógenas en los entornos hospitalarios, debido a que la levadura se puede transmitir por diversos mecanismos como las manos, equipos de ventilación, sondas y catéteres ⁷.

La candidiasis vulvovaginal (CVV) es una de las infecciones con mayor incidencia, ya que tiene un gran impacto en la calidad de vida de las mujeres, particularmente en pacientes con infecciones crónicas y recurrentes. CVV es una infección inflamatoria aguda que incluye síntomas como prurito vulvar, descarga vaginal, vulva eritematosa, leucorrea y dispareunia, ligada a factores predisponentes como uso de anticonceptivos orales, embarazo, diabetes mellitus no controlada, tratamiento antibiótico e incluso cambios en la microbiota vaginal normal, que logran generar mayor susceptibilidad a contraer la infección ^{12,13}. Cuando la infección se adquiere una y otra vez se determina que la paciente posee una condición clínica más grave a la que se denomina candidiasis vulvovaginal recurrente (RVVC) debido a la aparición constante de los síntomas, determinado por cuatro o más episodios por año, la cual es tratada y controlada con fluconazol que ayuda a prolongar los periodos asintomáticos, pero no contribuye la cura a la infección ^{12,13}.

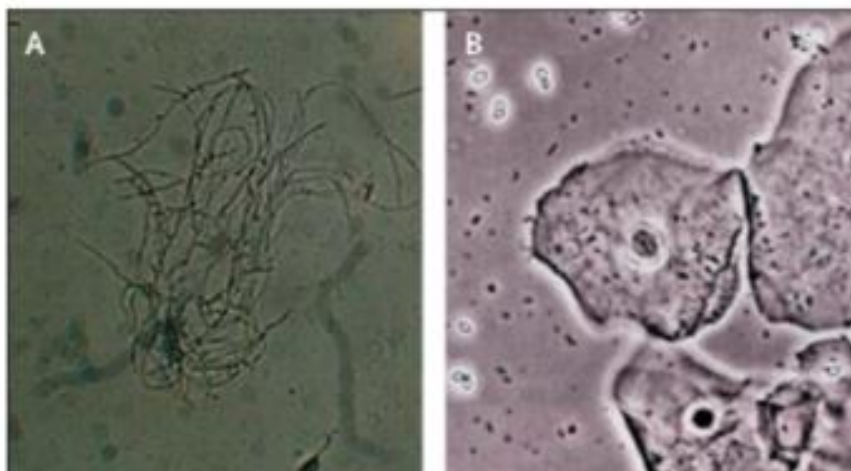


Fig. 2 Descarga vaginal de mujer con Candidiasis vulvovaginal. **A.** Hifas *Candida spp.* 10 x **B.** Blastoconidias de *Candida spp.* *

***Tomado de:** Pappas PG. Invasive Candidiasis. Infect Dis Clin North Am. 2006;20(3):485-506.

RVVC tiene una prevalencia del 7-8% en las mujeres que experimentan un primer episodio, es decir, del total de mujeres que sufrieron una infección inicial de candidiasis vaginal, el porcentaje mencionado presenta Candidiasis vaginal recurrente, con una incidencia anual estimada que oscila entre el 1-2% de todas las mujeres ¹².

Los factores que determinan que una mujer experimente la transición esporádica de CVV a RVVC no está esclarecido; sin embargo, se ha establecido que la persistencia de los factores predisponentes de CVV puede conllevar a recidivas de la misma, pero en la mayoría de los casos la aparición de RVVC es idiopática, cuando no se ha demostrado ningún factor de riesgo conocido. Numerosos estudios clínicos que examinaron mujeres con RVVC no mostraron deficiencias inmunes humorales o mediadas por células, lo que posiblemente puede direccionar a una predisposición genética como por ejemplo la deficiencia de MPO a causa de defecto autosómico recesivo generado por mutaciones en el gen MPO en el cromosoma 17 ^{12,15, 25,26}. En las mujeres, los síntomas de la candidiasis vaginal, particularmente RVVC, se han asociado con un alta y una baja carga de candida, así como con la presencia de un alto y un bajo número de células inflamatorias ¹².

Por otra parte, *C. albicans* puede afectar otras mucosas en el cuerpo, como la zona bucal, encontrando formas clínicas características como pseudomembranosa, eritematosa y estomatitis protética, ubicadas en la palatina y la zona lingual que se caracteriza por la presencia de placas blancas y lesiones rojas²⁴; este tipo de candidiasis constituye un proceso frecuente que afecta a 4/1.000 pacientes con signos de infección, habitual entre personas sanas y en personas mayores con una incidencia entre un 7% y 65% , esto depende de los factores asociados a adquirir la infección como lo son la edad, alteraciones salivales cuantitativas y cualitativas, el uso de prótesis bucales removibles, el tabaco, el estado de salud, medicamentos inmunosupresores, higiene bucal, entre otros. La edad es uno de los factores de mayor predisposición, evidenciando variación en la presentación de la infección, en los neonatos las cifras son bajas con un 16%, se incrementa durante los 18 primeros meses de vida a un 44%, disminuye durante la infancia a un 6%, y ya en la edad adulta ocurre mayor incidencia y afectación; La colonización oral es mayor en los lactantes y niños pequeños, así como en los ancianos, donde esta colonización candidiásica se ve favorecida por el uso de prótesis dentales^{18,25, 31}; también se ha descrito una mayor colonización en la boca y en el aparato digestivo en personas que han recibido tratamiento antibiótico o quimioterapia³⁵.

Este tipo de infección depende de las condiciones del hospedero, pues el desarrollo de esta ocurre cuando se perturba el equilibrio inmunológico y fisiológico en la mucosa o cavidad bucal; lo que provoca la manifestación de diferentes formas y signos como el eritema y los depósitos blanquecinos²³ como se observa en la figura 3.



Fig. 3 Presentaciones clínicas de candidiasis bucal **A.** Candidiasis pseudomembranosa, con placas blancas. **B.** Candidiasis eritematosa aguda o lengua dolorosa antibiótica. **C.** Candidiasis eritematosa crónica de paladar. *³⁷

***Tomado de:** Otero Rey, E., Peñamaría Mallón, M., Rodríguez Piñón, M., Martín Biedma, B., & Blanco Carrión, A. (2015). Candidiasis oral en el paciente mayor. *Avances En Odontoestomatología*, 31(3), 135–148.

3.3 Epidemiología

Las infecciones por *C. albicans*, principalmente la candidemia se ha descrito como la infección más común². En varios estudios realizados se ha reportado que la incidencia de candidiasis se ha mantenido en los últimos años e incluso ha disminuido ligeramente en Australia, Canadá, Europa y EE. UU; del mismo modo se ha determinado que países como Dinamarca y España son los países europeos que presentan mayor incidencia de candidiasis; por otro parte, en Latinoamérica la incidencia ha crecido significativamente y se presentan de 0.28 a 0.96 episodios por 1000 admitidos en hospital, presentando una incidencia mayor que EE. UU⁵. Aproximadamente un 15% de las infecciones asociadas a atención en salud son causadas por hongos; de estas infecciones, el 70-90% son producidas por levaduras del género *Candida spp.* con una mortalidad que va desde un 40 a un 60% según la condición base del paciente³⁶.

Es importante tener en cuenta las características más frecuentes de las diferentes especies de *Candida spp.*, ya que dependiendo a esto se ven asociados diferentes puntos diana de infección; por ejemplo, se ha reportado que *C. glabrata* y *C. krusei* están asociadas con cirugías abdominales, tumores, pacientes mayores de 65 años, trasplantes, entre otros; además, se ha encontrado que *C. glabrata* es la segunda causa de candidemia en EE. UU y países de Europa⁵. Por otro lado, *C. parapsilosis* logra ser aislada en pacientes con cáncer, neonatos hospitalizados en UCI y catéteres, con una incidencia mayor en Latino América, Australia, África y Asia⁵. En América Latina, se encuentran especies de mayor incidencia a *C. albicans* con un 41%, *C. parapsilosis* 25%, *C. glabrata* 6.5 % y *C. krusei* 1%⁵; por ejemplo, según estudios realizados en Brasil para el año 2011 se reportó la candidiasis como la segunda micosis que causó la muerte de pacientes HIV positivos y el octavo agente causante de infección sistémica en España^{8,32,33}.

En Colombia se ha reportado que las candidemias oscilan entre el 3,7 y el 5,2% de todos los aislamientos en los servicios no-UCI y UCI respectivamente, siendo *C. albicans* el microorganismo más frecuente. *C. tropicalis* se ha aislado de pacientes con tumores sólidos o enfermedades hematológicas, informado como el segundo agente etiológico de la candidiasis invasiva en Asia y en algunas partes de América Latina (Colombia y Brasil)⁵.

En un estudio realizado en el Hospital Universitario de la Samaritana en la ciudad de Bogotá, para el año 2009 la incidencia de infecciones por *C. albicans* en las unidades de cuidado intensivo y en ámbito hospitalario había aumentado de forma dramática en las últimas dos décadas siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad. En Colombia, la epidemiología ha cambiado, encontrando variación en las especies aisladas y patrones de resistencia al tratamiento antimicótico lo cual ha implicado nuevos retos en el diagnóstico temprano⁵⁹.

Los estudios epidemiológicos realizados no demuestran la incidencia en Colombia de la infección al no tener claro la población objeto y las características de la misma. En un análisis realizado por el Grupo para el control de la Resistencia Antimicrobiana en Bogotá (GREBO) para diferentes departamentos del país, se determinó que la infección por *C. albicans* tanto en unidades de cuidado intensivo (UCI) como en servicios no UCI se encontró dentro de las 10 primeras causas de infección representando un 3% de las infecciones nosocomiales⁵⁹.

Por otro lado, la candidiasis vulvovaginal (CVV) tiene un alto impacto en la calidad de vida de las mujeres, presentando un pico máximo de incidencia entre los 20 y 40 años, el 75% de mujeres en edad fértil. Los signos y síntomas vaginales constituyen una de las principales causas por las que las mujeres buscan asesoramiento de ginecólogos, con reportes de más de 10 millones de consultas al año ^{5,31}; además, se ha calculado que a los 25 años, el 50% de las mujeres habrá tenido al menos un episodio de CVV, y entre el 5-8 % de las mujeres adquiere una RVVC ^{12,13}; sin embargo la incidencia de la candidiasis vulvovaginal (CVV) no se conoce debido a pocos estudios representativos en la población ^{12,13}.

Del mismo modo, la presencia de *Candida* en la cavidad oral es frecuente y oscila entre un 20% y un 70% según diversos estudios. En Estados Unidos, se ha estimado que la prevalencia anual de la candidiasis oral es de 50 en 100,000 habitantes, mientras que, en poblaciones de alto riesgo, la estimación es de 5% a 7% en recién nacidos, de 9-31% en pacientes con SIDA y cerca del 20% en pacientes con cáncer; también se ha reportado que la incidencia de *C. albicans* aislada de la cavidad oral es de 30-45% de los adultos sanos y de un 50-65% de las personas que usan prótesis removibles^{30,33}.

3.4 Diagnóstico.

Las técnicas diagnósticas empleadas para infecciones producidas por *Candida spp.* dependen del lugar en que se localiza la infección; para infecciones superficiales como es el caso de Candidiasis vulvovaginal y Candidiasis orofaríngea, el diagnóstico incluye examen microscópico o en fresco directamente de la muestra, cultivo microbiológico en medio Sabouraud o CHROM agar para identificar la cepa involucrada, de acuerdo al color de crecimiento del hongo; también se puede emplear la técnica de producción de tubos germinales característica de *C. albicans*. Actualmente, se han desarrollado pruebas serológicas como el Savvycheck Vaginal Yeast Test, un inmunoensayo en el cual los antígenos de *Candida* en las secreciones vaginales interactúan con anticuerpos específicos anti-*Candida* conjugados con partículas de látex teñido. Otra posibilidad es la utilización de pruebas moleculares para la identificación definitiva de *Candida spp* como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)^{21,31}.

3.5 Tratamiento.

El tratamiento para la candidiasis implica corregir factores predisponentes como la buena higiene de las zonas afectadas y las condiciones inmunológicas del paciente; además, se emplea tratamiento farmacológico de acuerdo al tipo de candidiasis, los amidazoles como el clotrimazol y miconazol son buenos agentes tópicos, pero llegan a ser poco activos contra *C. glabrata*; por otro lado, la administración oral de antimicóticos es efectiva, pudiendo emplearse ketoconazol y Fluconazol, que actúan inhibiendo la síntesis del

ergosterol en el hongo, provocando la alteración estructural y funcional de la membrana citoplasmática, aumentando la permeabilidad de la misma; estos antimicóticos tienen una efectividad alrededor del 80% ^{29, 31}.

3.6 Fisiopatología e inmunidad de *Candida albicans*.

La colonización por *C. albicans* en mucosas, como vagina y boca, requiere de mecanismos de patogenicidad, los cuales le permiten a la levadura convertirse en un agente patógeno oportunista capaz de colonizar al huésped. Estos mecanismos incluyen, la adherencia de las levaduras a las células epiteliales por medio de mananoproteínas, para luego producir gliotoxina, la cual inhibe la actividad fagocítica de las células del sistema inmune innato, generando un ambiente ácido óptimo para su crecimiento; luego, a través del desarrollo de blastoconidias y pseudohifas se destruyen células epiteliales por invasión directa; las pseudohifas poseen una proteína denominada Hwp-1 que ayuda a su adherencia en el queratinocito, convirtiéndose en una forma más difícil de fagocitar ^{31,35,36}.



Fig 4. Mecanismos de patogenicidad presentes en *C. albicans*.

Fuente: Riaño L. autor del presente trabajo

Otros factores de virulencia importantes de este microorganismo, son la producción de diferentes enzimas como la aspartil- proteinasa que facilita la penetración en los

queratinocitos y la digestión de moléculas para su nutrición, al igual que la calcineurina, la cual le ayuda a regular diferentes procesos fisiológicos como la progresión del ciclo celular y su crecimiento. *C. albicans* ha logrado desarrollar diferentes mecanismos de resistencia hacia antifúngicos azólicos gracias a una mutación en el gen *ERG11*, que codifica para una enzima que evita la unión levadura-compuesto antifúngico³¹.

La inmunidad celular es el mecanismo más importante de defensa frente a infecciones fúngicas, el neutrófilo es el principal responsable y mediador de la respuesta inmune frente a levaduras, debido a que libera sustancias fungicidas tales como ROS y enzimas lisosómicas; además de ello lleva a cabo el proceso de fagocitosis para lograr muerte intracelular². Otra célula participe en la respuesta inmunitaria hacia levaduras es el macrófago, este posee receptores que reconocen moléculas de diferentes microorganismos, en el caso de *Candida spp.* es la manosa, sustancia presente en la pared celular involucrada en la adhesión a tejidos y protección a ataques químicos y enzimáticos²; cuando el macrófago tiene contacto con el antígeno, libera una serie de sustancias como lisosimas, colagenasas, elastasas, hidrolasas ácidas, óxido nítrico, peróxido de hidrógeno, superóxido, radicales hidroxilo, entre otros².

En el caso de una infección de candidiasis, el entorno debe prepararse para activar la inmunidad innata y establecer respuestas inmunes adaptativas con el fin de eliminar los patógenos. Las mucosas constan de factores celulares y humorales como células dendríticas, linfocitos reguladores y citotóxicos, Naturall Killer que logran producir citocinas y quimiocinas, y la acción de PMN como primeras células que responden a tal infección; por ejemplo, el epitelio vaginal constituye una barrera mecánica, capaz de "detectar" el peligro constituido por el patógeno y responder mediante la activación celular y la secreción de mediadores inmunes que dirigen la inflamación y la respuesta inmune¹²;

Así mismo, los humanos poseen en promedio entre un 50- 70% de neutrófilos del total de leucocitos, los cuales poseen durante el proceso de maduración tres tipos de gránulos: azurofilos (primarios) los cuales contienen MPO, específicos (secundarios) que contienen lactoferrina y gelatinasas (terciarios) los cuales contienen MMP9 (metaloproteína 9)¹⁰.

Para ingerir el microorganismo, se lleva a cabo la formación del fagosoma por parte de los neutrófilos allí se genera el proceso de degranulación seguido de un estallido de consumo de oxígeno lo cual conlleva a la formación de ROS que inducen de inmediato a la muerte del microorganismo ingerido. Entre los sistemas antimicrobianos presentes, se encuentra la acción de la mieloperoxidasa (MPO) la cual es liberada dentro del fagosoma activando el sistema $MPO-H_2O_2-Cl$; los gránulos también pueden ser secretados al espacio extracelular por degranulación o exocitosis^{9,56}.

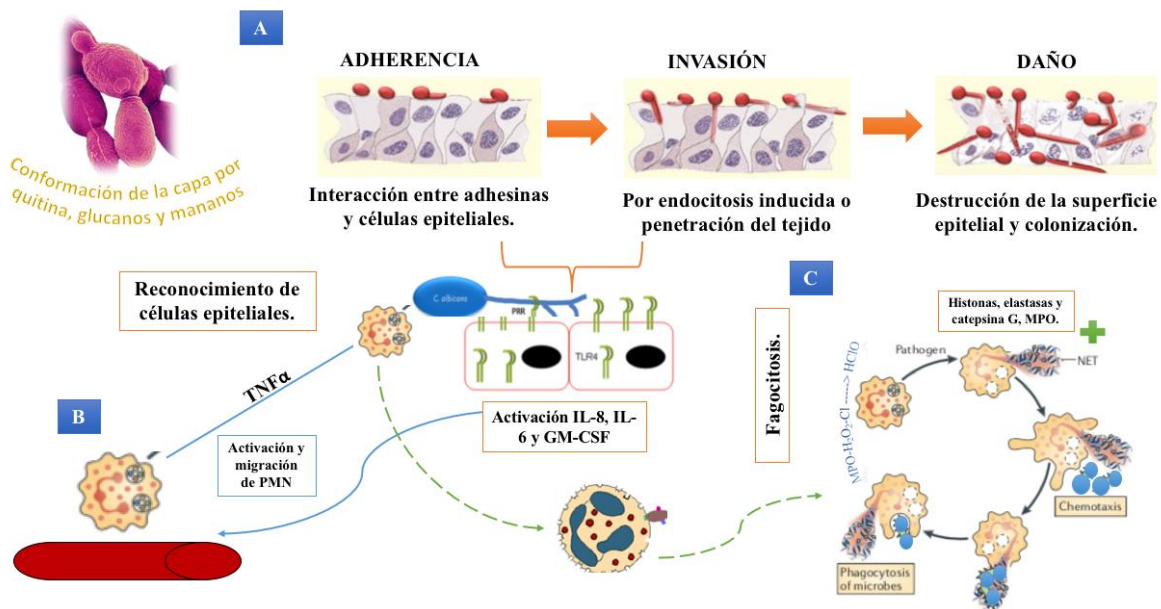


Fig 5. Respuesta inmune innata frente a infecciones por *C. albicans*. **A.** Patogenicidad de *C. albicans* en el huésped. **B.** Activación de la respuesta inmune innata por parte de células epiteliales y PMN. **C.** Proceso inmunológico desarrollado por PMN frente a *C. albicans*.

3.7 Los Neutrófilos.

Los neutrófilos representan los leucocitos más predominantes en circulación y son las primeras células en responder a una infección, forman parte de la respuesta innata y constituyen un eficiente mecanismo de protección no específica contra diferentes agentes infecciosos²⁵; una vez se desencadena la respuesta inmune, los microorganismos son ingeridos por el fagocito, ligandos asociados al mismo agente, como anticuerpos y/o complemento, se unen a los receptores de membrana a medida que esta se invagina para

formar el fagosoma, el cual crea condiciones que matan y degradan los microorganismos ingeridos, debido a la activación de la NADPH oxidasa y la degranulación^{11,16}; así mismo, se liberan ROS y los componentes respectivos de los gránulos en el fagosoma. La NADPH oxidasa transfiere electrones al fagosoma, generando anión superóxido y peróxido de hidrógeno a partir de oxígeno molecular¹¹, este proceso crea un espacio entre los componentes liberados por los gránulos y los ROS quienes reaccionan en conjunto en el microorganismo. En este proceso se ve involucrada la presencia de MPO, la cual puede unirse a la superficie cargada negativamente del microorganismo y reaccionar allí con H₂O₂, para iniciar la formación de oxidantes dependientes de MPO en proximidad al microbio ingerido⁹; del mismo modo, se ve involucrado en el proceso Cl⁻, el cual entra al fagosoma por medio de un regulador de conductina (CFTR), para posteriormente ser catalizado por la reacción entre MPO y H₂O₂, y producir HOCl el cual genera una serie de productos, que incluyen monocloraminas (NH₂Cl), proteínas cloraminas (PNHCl) complementando la actividad microbicida en el sistema MPO- H₂O₂-Cl⁻¹¹.

Sin embargo pueden ocurrir defectos durante el proceso de fagocitosis que incluyen:

1. Defectos en la producción de neutrófilos.
2. Defecto en la adhesión leucocitaria.
3. Defecto en la vía enzimática oxidativa.
4. Deficiencia específica de gránulos.

Estos defectos causan deficiencias en la actividad inmunológica de los neutrófilos, desencadenando mayor susceptibilidad a la adquisición de infecciones y enfermedades²⁵.

3.8 Mieloperoxidasa.

La mieloperoxidasa es una hemoproteína presente en los gránulos azurófilos de los neutrófilos y en menor proporción en los lisosomas de los monocitos, involucrada en la actividad microbicida hacia un amplio grupo de microorganismos. La MPO es capaz de catalizar la producción de ácidos hipohalogenosos, como el ácido hipocloroso e interactuar con oxígeno singlete, cloraminas y aldehídos; así mismo, actúa en la regulación de la

inflamación, limita el daño tisular y facilita el cambio de la inmunidad innata a la adaptativa.^{9,25,56,61}

La síntesis de mieloperoxidasa inicia durante el estadio de promielocito del neutrófilo y finaliza en el estadio de mielocito, donde es contenido en los granulos azurófilos o primarios de tamaño heterogéneo, distribuidos por toda la célula. Los monocitos también contienen gránulos que contienen MPO pero en menor cantidad; sin embargo, estos gránulos se pierden cuando hay diferenciación a macrófagos tisulares^{9,61,63}.

Según la literatura, se ha establecido que la enzima mieloperoxidasa es el producto de un gen de 11 kb de tamaño, compuesto por 11 intrones y 12 exones, localizado en el brazo largo del cromosoma 17 en el segmento q12- 24, consta de dos cadenas pesadas (subunidades α), dos cadenas ligeras subunidades β y dos átomos de hierro. El producto de traducción inicial es una proteína de 80 kD, que tras un proceso de eliminación proteolítica de un péptido de 41 aminoácidos sufre glucosilación con la incorporación de cadenas laterales ricas en manosa, generando un producto de MPO enzimáticamente inactivo el cual forma un complejo en el retículo endoplásmico con proteínas de unión al calcio, calreticulina y calnexina, las cuales actúan como chaperonas moleculares, con la inserción de un grupo hemo, que se une a las cadenas pesadas de la molécula, para posteriormente convertirse en una enzima activa y así llevar a cabo su función microbicida en la célula^{54,56,57}.

La MPO tiene una masa molecular de aproximadamente 150 kD, siendo una proteína fuertemente básica con un punto isoelectrico de 10 y con avidez a las superficies de carga negativa; además, esta conformada por 1146 aminoácidos donde cada homodimero cuenta con 573 aminoácidos, 466 pertenece a la subunidad pesada y 107 a la subunidad ligera. El sitio activo de la MPO consta de dos regiones fundamentales, la primera involucrada en la unión con el ligando y la segunda relacionada con la actividad catalítica de la enzima^{9,54,56,57}.

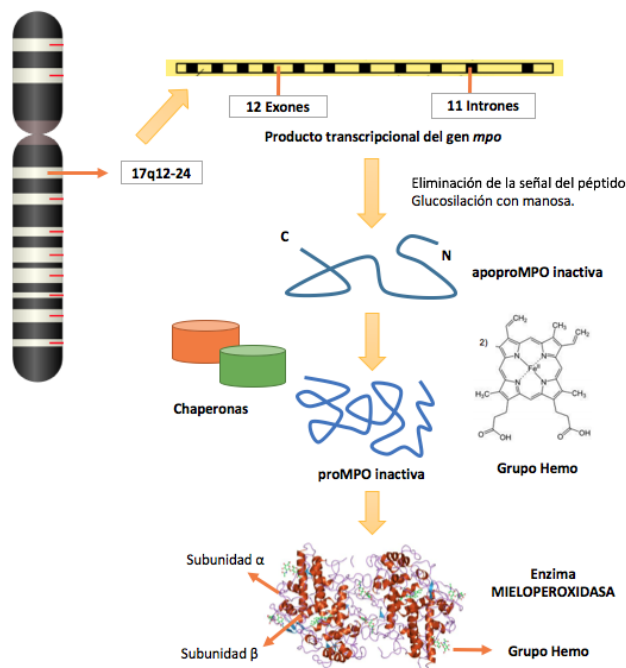


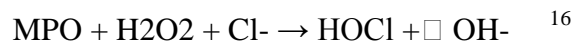
Fig 6. Pasos involucrados en la síntesis de la enzima MPO*

***Tomado y Modificado de:** Khan, A., Alsahli, M., & Rahmani, A. (2018). Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: Recent Biochemical and Pathological Perspectives. *Medical Sciences*, 6(2), 33

La acción antimicrobiana de los neutrófilos hacia diferentes microorganismos depende de la relación entre la enzima azurófila MPO y el H_2O_2 , producto de la acción de la enzima NADPH oxidasa, los cuales actúan en la producción de ácido hipocloroso a partir de cloruros; dándose una reacción microbicida entre enzimas, oxidantes o ROS y subproductos como se menciona anteriormente, debido a que la MPO apoya la producción de cantidades letales de $HOCl^{11}$. Así mismo, la MPO se requiere para finalizar el estallido respiratorio originado por la NADPH oxidasa, con el fin de equilibrar la excesiva producción de ROS, ya que si existe deficiencia y/o ausencia de MPO puede llegar a presentarse acumulación de diversas sustancias, como por ejemplo H_2O_2 el cual se degrada en parte por el sistema MPO, dado a que, al no ser controlado puede llegar a ser tóxico para el mismo organismo^{9,11}.

La mieloperoxidasa posee tres complejos diferentes que pueden darse durante la reacción del estallido respiratorio en el proceso de fagocitosis⁹. Esta enzima utiliza el

potencial oxidativo junto con el H₂O₂ para llevar a cabo los ciclos de peroxidación y halogenación, desencadenando la unión de H₂O₂ con átomos halógenados (Br, Cl, I) por medio de la mieloperoxidasa (MPO), con formación de especies oxidantes citotóxicas y el compuesto HOCl, el cual desarrolla su actividad antimicrobiana en la modificación de lípidos, ADN, aminas, tirosina y cloraminas, ocasionando un daño oxidativo en proteínas de los microorganismos, ya que la acción de MPO también tiene la propiedad de catalizar la oxidación de una gran cantidad de sustratos clásicos de peroxidasa, como los mencionados anteriormente.^{16,22,25, 26,61}



El sistema de MPO- H₂O₂- Haluros representa el más eficiente mecanismo microbicida dependiente de oxígeno en PMN, como se muestra en la anterior reacción química.⁴⁰

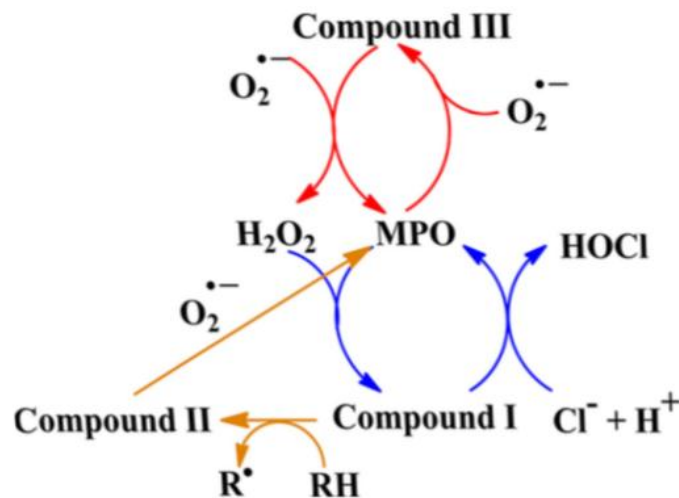


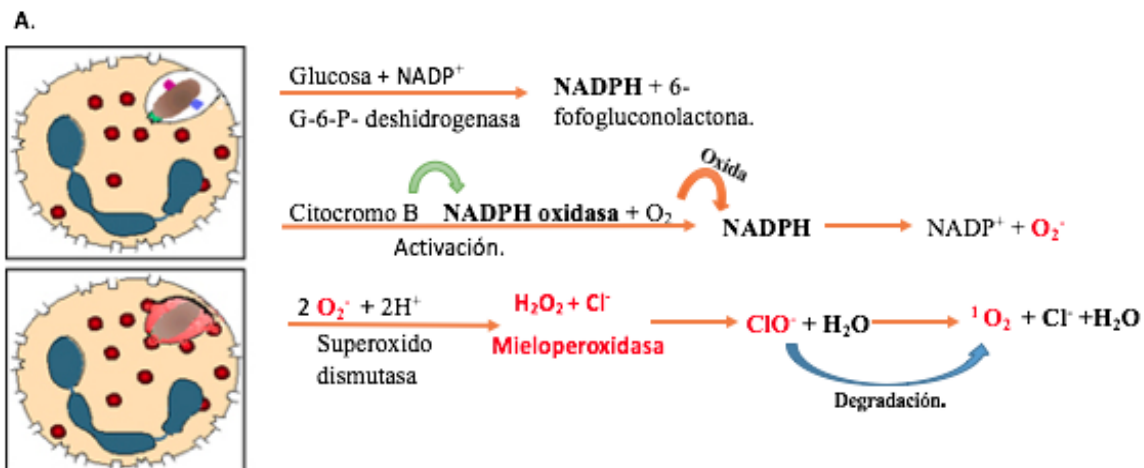
Fig 7. Componentes de reacciones catalizadas por MPO dentro del fagosoma. *

***Tomado de:** Klebanoff SJ, Kettle AJ, Rosen H, Winterbourn CC, Nauseef WM. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2013;93(2):185-198.

La enzima responsable del consumo de oxígeno es un complejo NADPH oxidasa, que logra ensamblarse en la membrana fagosomal y se une con el flavohemocitocromo, un heterodímero que se localiza en la membrana de los gránulos específicos, el cual transfiere

electrones de O_2 a partir de la molécula NADPH para producir O_2^- , dando paso a la formación de aniones superóxido dentro del fagosoma; la transferencia de electrones crea un desequilibrio de carga que logra despolarizar la membrana fagosomal y acidifica el medio intracelular. Después, el H_2O_2 reacciona con el O_2^- dando paso a la formación de oxígeno singlete y radicales hidroxilo (HO); además, el H_2O_2 sirve de sustrato de la MPO, que oxida el cloruro y otros haluros como el bromuro, yoduro y el pseudohaluro tiocianato, para poder generar los respectivos ácidos hipohalosos. En consecuencia, debido a la formación de todos estos compuestos (conocidos como ROS) en el interior del fagosoma se crea un ambiente altamente tóxico para los microorganismos, lo que ocasiona su destrucción y muerte^{16, 38}.

Durante la fagocitosis ocurre un aumento en el consumo de glucosa y oxígeno como consecuencia del estallido respiratorio que desencadena un proceso de muerte intracelular; esto ocurre gracias a la presencia de sistemas antimicrobianos que posee el organismo, donde puede estar involucrada o no la MPO, estos son el sistema dependiente de mieloperoxidasa y el sistema independiente de mieloperoxidasa³⁹, que se describen en la figura 8.



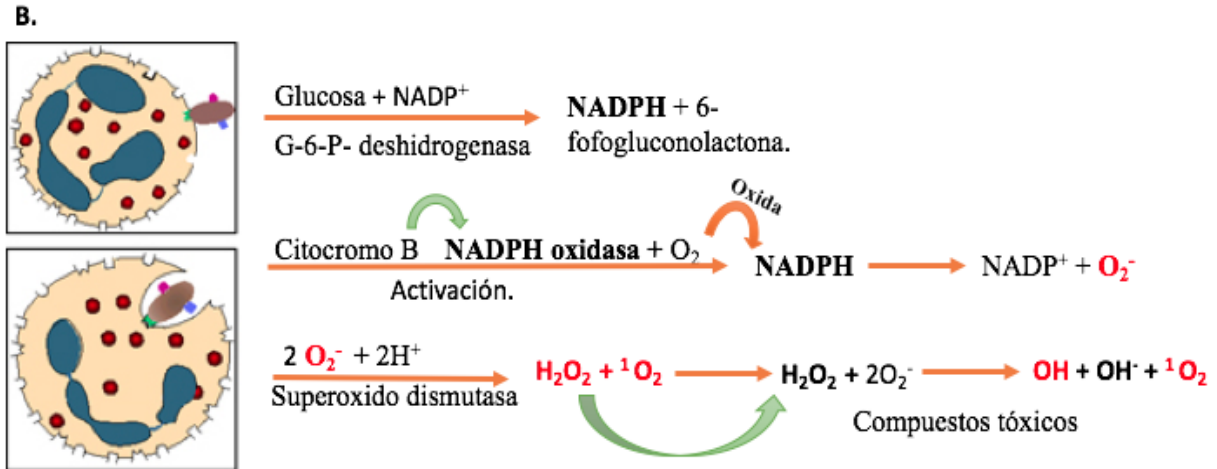


Fig 8. Activación sistema antimicrobiano MPO- H₂O₂-Cl **A.** estallido respiratorio sistema oxígeno dependiente, mieloperoxidasa dependiente. **B.** estallido respiratorio sistema oxígeno dependiente, mieloperoxidasa independiente.

Tomado de: Microbiología e inmunología [internet] México: Universidad de Carolina del Sur, Instituto Politecnico Nacional. Disponible en: <http://www.microbiologybook.org/Spanish-immuno/imm-chapter1.htm>

En enfermedades infecciosas e inflamatorias se ha observado el incremento de la actividad de la MPO, lo cual se asocia a un aumento del riesgo de estrés oxidativo. La MPO y el H₂O₂ también pueden ser liberados al exterior del PMN, elevando el potencial de daño extracelular debido a la producción de HOCl²². El espectro de toxicidad del sistema MPO-H₂O₂- Haluros, incluye bacterias, hongos, virus, células tumorales y se ha demostrado que también está involucrado en la patogénesis de trastornos inflamatorios como aterosclerosis y esclerosis múltiple ⁴².

Por otra parte, la actividad de la mieloperoxidasa ha sido detectada en muestras de fluidos vaginales de la mayoría de las mujeres en cantidades suficientes para inducir un efecto microbicida, debido a la presencia de *lactobacillus* los cuales tienen la facultad de producir H₂O₂ que termina actuando como un mecanismo de defensa del hospedador en la vagina en presencia o ausencia de peroxidasa de origen leucocitario⁹, lo que puede llegar a fortalecer el efecto antimicrobiano tanto en la acción de la MPO como en la producción de H₂O₂ producido por bacterias propias del sistema uterino femenino ^{9,11}.

3.9 Deficiencia de MPO y susceptibilidad a infecciones.

La presencia de MPO durante la respuesta de PMN es importante debido a la producción de ácido hipocloroso como potente microbicida junto a H_2O_2 ^{9,11}. En el sistema MPO- H_2O_2 -Cl las enzimas granulares liberadas en los fagosomas pueden modificarse químicamente y modularse funcionalmente, mejorarse o reducirse, dependiendo del agente en particular¹¹. La ausencia o deficiencia de MPO tiene consecuencias para la acción antimicrobiana, reflejada en la pérdida de la producción y acción de HOCl, lo que resulta en la eliminación de la capacidad antioxidante que ejerce el sistema; tal deficiencia de MPO elimina no solo la capacidad de producir daño letal a los microorganismos, sino también la de modificar la estructura y actividad de otros elementos antimicrobianos presentes en los fagosomas⁵¹. Sin MPO, las proteínas granulares como NE, catepsina G y MMP-7, agentes inactivados por el sistema de cloruro-MPO- H_2O_2 , serán funcionales y ejercerán una acción antimicrobiana que no está presente en los fagosomas de los neutrófilos normales¹¹.

Así mismo, los neutrófilos deficientes en MPO tienen una actividad oxidasa prolongada y llegan a generar más H_2O_2 que los neutrófilos normales^{9,11}; por lo tanto, la ausencia o deficiencia de MPO, que normalmente consume rápidamente H_2O_2 para generar HOCl, conducirá al aumento de la concentración de H_2O_2 , pudiendo causar un efecto tóxico en el organismo. La composición oxidante alterada y el tono en fagosomas deficientes en MPO modifican las moléculas efectoras disponibles y también los sustratos que actúan sobre los microorganismos¹¹. Se ha demostrado que los neutrófilos MPO-deficientes matan diferentes especies de microorganismos más lentamente que las células normales, además los pacientes que cursan con esta deficiencia pueden presentar episodios de neutropenia que los condiciona en mayor proporción a contraer infecciones fúngicas^{11,52}.

En un estudio in vitro realizado por Klebanoff et al. en pacientes con deficiencia de MPO se evidenció la ineficacia para matar microorganismos como *S. aureus*, *C. albicans* y *E. coli*, dado a que los PMN deficientes de la enzima mostraron actividad microbicida más lenta en comparación a los PMN normales; por ejemplo, se estableció que para inducir el mismo grado de destrucción de los microorganismos mencionados se requirió de 3- 4h de

incubación con los neutrófilos deficientes de MPO, donde lo normal llega a ser de 30- 45 min . Del mismo modo, como se observa en la figura 9, se puede evidenciar el retraso en la respuesta inmune y el deficiente control antimicrobiano frente a diferentes microorganismos, puesto que, cuando existe una deficiencia de MPO se observa como la concentración de microorganismos tiende a ser constante y puede disminuir levemente después de un período de tiempo prolongado; así mismo, la destrucción se ve afectada disminuyendo el porcentaje de destrucción de microorganismos, principalmente en agentes como *C. albicans* ¹⁶.

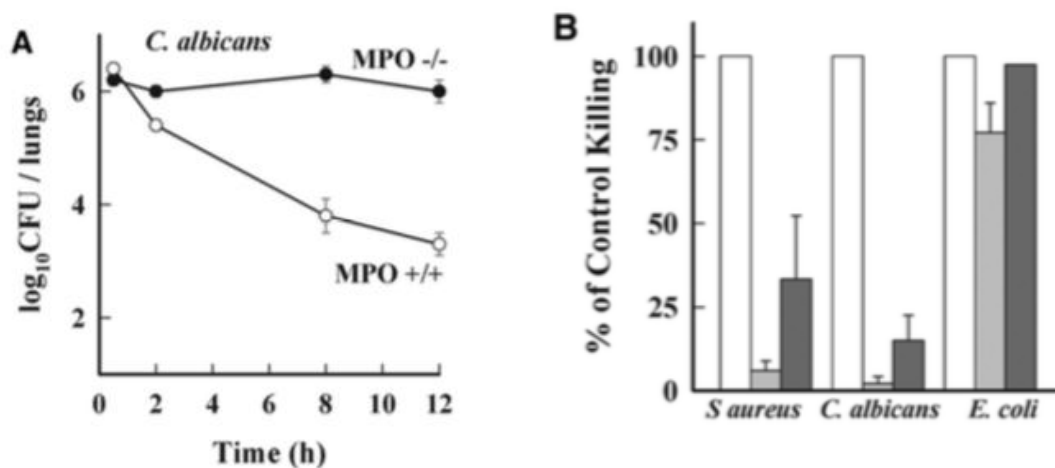


Fig 9. Ineficaz acción microbicida por Deficiencia de MPO **A.**Infección pulmonar por *C. albicans* mediada por neutrófilos con deficiencia de MPO medida en horas **B.** destrucción de microorganismos a los 30 min por neutrófilos normales (barras blancas) y por neutrófilos deficientes (barra gris oscuro).

Tomado de: Klebanoff SJ, Kettle AJ, Rosen H, Winterbourn CC, Nauseef WM. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2013;93(2):185-198.

La deficiencia de MPO fue considerada durante mucho tiempo como una enfermedad rara, solo 17 casos conocidos se habían reportado hasta 1979, pero con el desarrollo de técnicas se ha proporcionado un mejor enfoque para el diagnóstico de este trastorno, convirtiéndose en una condición más común hoy día ²⁶.

Se ha demostrado que la deficiencia de MPO afecta directamente la vía de NADPH y su aparición está relacionada a causas congénitas que obedecen a un patrón heredado autosómico recesivo con una incidencia de 1-4,000 personas siendo heterocigotos, lo que significa que pueden existir diferentes polimorfismos en cada alelo del gen *mpo*. Uno de los defectos génicos descritos, es la presencia de mutaciones de reemplazo de arginina por triptófano en la posición 569 de la cadena peptídica de la MPO, que detiene la maduración del precursor; en este caso el resultado es una actividad microbicida más lenta y deficiente^{25,26}. Además, se han descrito más mutaciones asociadas al procesamiento post-traducciona l de la proteína precursora de la MPO y otras con defectos pre-traduccionales causados por mutaciones en la porción reguladora del gen *mpo*; encontrando mutaciones asociadas con la forma hereditaria como R569W, Y173C, M251T, R499C y una delección de 14 bases (D14) en el exón 9 del gen *mpo*^{26,40,41,48,54}.

Tabla 1. Polimorfismos asociados a la deficiencia de MPO.

Polimorfismos y mutaciones de MPO	Descripción
R569W	Sustitución de arginina por triptófano en la posición 569 de la cadena peptídica de la MPO cuando ocurre la sustitución de una timidina por una citosina en el exón 10 ; esta mutación genera que el grupo “hemo” no se inserte en la proteína MPO y por consiguiente las unidades maduras de MPO no se desarrollen ^{26,40, 41,46,54} .
Y173C	Tipo de mutación <i>Missense</i> , que produce un cambio en un único nucleótido provocando la aparición de un codón que codifica para un aminoácido diferente, está mutación ocurre en el gen MPO en el codón 173 que logra un cambio de tirosina por cisteina (Y173C) afectando la biosíntesis de MPO ^{40,54} .
	Se describió por primera vez en un paciente italiano. Ocurre una mutación <i>Missense</i> donde se reemplaza una metionina

M251T	por una treonina en la posición 251 de la cadena peptídica ^{42,53,54} .
G463A	Sustitución de una guanina por una adenina en la posición 463, que conduce a una disminución de 25 veces la transcripción de MPO, involucrado en enfermedades inflamatorias ^{28, 62} .
R499C	Sustitución de una arginina por una cisteína en la posición 499 de la cadena péptidica, impide la maduración de la enzima MPO. Se encontró en estudios realizados en pacientes japoneses con deficiencia de MPO ⁵⁴ .
Delección de 14 bases (D14) en el exón 9.	La delección se considera un elemento regulador exónico que afecta el empalme del exón 9 en el gen, causando disrupción en el proceso de traducción del mRNA ^{48,53} .

En estudios anteriores se han descrito más polimorfismos en el gen de MPO como rs2071409, rs7208693 que poseen un cambio de la fenilalanina por valina en la posición 53 de la cadena peptídica; sin embargo, se ha demostrado que estos polimorfismos no presentan importancia clínica en el desarrollo de enfermedades e infecciones⁴⁷.

Por otro lado, puede ocurrir una deficiencia secundaria de MPO que puede desarrollarse debido a mutaciones somáticas del gen *mpo*; esta deficiencia logra ser parcial y solo afecta a una proporción de neutrófilos, convirtiéndose en una forma adquirida a causa de diferentes patologías como la diabetes mellitus, ya que se ha demostrado que durante la hiperglicemia aguda la degranulación de los neutrófilos disminuye; además, pueden aparecer anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) dado al desarrollo de enfermedades autoinmunes; de igual forma, la enfermedad granulomatosa crónica, el embarazo, deficiencia de hierro, trasplante renal, enfermedades trombóticas, envenenamiento por plomo, ictericia obstructiva, cánceres diseminados, trastornos

hematológicos y neoplasias como leucemia mieloide aguda y crónica, síndrome mielodisplásico, son enfermedades predisponentes a tal deficiencia de la enzima ^{26,49, 50,56}.

Los pacientes con deficiencia de MPO pueden llegar a ser asintomáticos y no aumentar la susceptibilidad a infecciones; sin embargo, se han observado infecciones graves recurrentes con *Candida albicans* en pacientes que padecen de otras afecciones, como la diabetes mellitus, aunque en estos pacientes no está claro si las infecciones son resultado de la deficiencia de MPO o si otros mecanismos independientes de MPO también pueden ser responsables. En un estudio realizado por investigadores europeos, el 50% de los pacientes con deficiencia de MPO completa tenían complicaciones infecciosas, el resto eran asintomáticos y solo el 10% de los pacientes sufría complicaciones infecciosas potencialmente mortales ²⁶.

Actualmente, el diagnóstico para la deficiencia de mieloperoxidasa se lleva a cabo mediante la detección de un posible polimorfismo en el gen *mpo*, análisis por citometría de flujo en laboratorios de hematología clínica para la enumeración de PMN con actividad de la enzima mieloperoxidasa; además, se ha desarrollado una técnica de ELISA sándwich para la detección de la misma⁵⁰.

3.10 Tipos de polimorfismos genéticos.

El genoma humano contiene aproximadamente entre 30,000 y 35,000 genes, y el 5% de estos participan en la codificación de información. Las diferencias fenotípicas y/o susceptibilidades a ciertas enfermedades, radica en el 0.1% de variación en la secuencia del material genético de un individuo, lo que es denominado polimorfismo, encontrando diferentes tipos como los cambios de nucleótido sencillo (PNS), inserciones, deleciones, secuencias repetidas o re-arreglos cromosómicos, donde pueden ocurrir reorganizaciones cromosómicas, duplicaciones o deleciones; sin embargo las modificaciones en uno o en pocos nucleótidos son más frecuentes¹⁷.

La aparición de un polimorfismo puede deberse a errores en los mecanismos de

replicación, reparación de ADN y factores ambientales, generando la variación alélica entre individuos y diversidad de la misma especie; además, se considera que existe un polimorfismo cuando la variación de una región específica en un gen es superior al 1% en la población. El hallazgo de polimorfismos es de gran importancia dado a que permite explicar orígenes de poblaciones, evolución de las mismas y estudiar enfermedades multigenéticas; estos son usados como marcadores para ayudar a esclarecer ciertos procesos biológicos, determinar el flujo genético de poblaciones y describir susceptibilidad a diferentes enfermedades¹⁷.

Según la base pública de datos “dbSNP”, se han descrito más de 9 millones de variantes en la secuencia de ADN; los polimorfismos de nucleótido sencillo (PNS) son los más frecuentes, estos se deben a la sustitución de una base nitrogenada por otra, presentándose uno cada 200 pares de bases en el genoma humano. Los PNS pueden estar presentes en regiones codificantes provocando algún cambio en un aminoácido lo que afecta directamente la función de la proteína, a estos se les denomina “no sinónimos”; además estos polimorfismos pueden estar localizados en diferentes partes del gen como en la región promotora (rSNP), intrones (iSNP), exones (cSNP), sitios de “splicing” (sitios donde se eliminan intrones y se unen exones) o regiones intragénicas (gSNP)¹⁷.

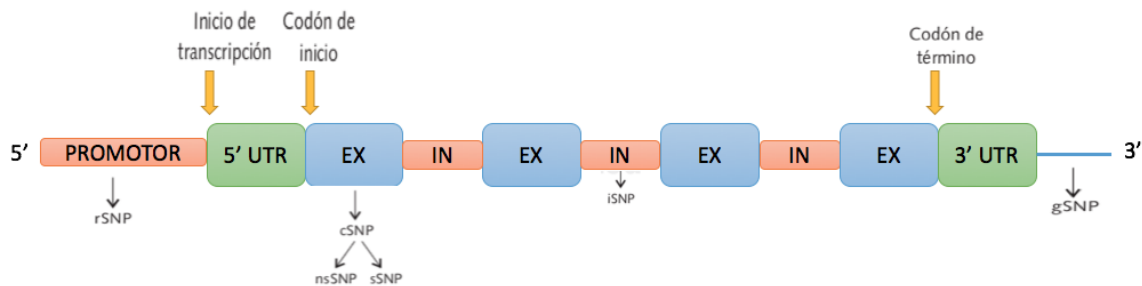


Fig. 10. Tipos de polimorfismos según su localización en regiones del gen.

Tomado y modificado de: Caratachea MAC. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. Rev del Inst Nac Enfermedades Respir. 2007;20(3):213-21.

Otro tipo de polimorfismo son los de secuencias repetidas conocidos como VNTR- minisatélites y VNTR- microsátélites, los cuales presentan un número variable de

repeticiones. Los VNTR-minisatélites son secuencias de ADN de pocas decenas de nucleótidos repetidos, estas repeticiones varían de cromosoma a cromosoma y cada loci puede presentar muchos alelos distintos, cuya máxima aplicación se da en la determinación de paternidad e identificación genética en el ámbito judicial. Por otro lado, los VNTR-microsatélites corresponden a la repetición de secuencias de entre 2 y 5 nucleótidos, estos pueden estar distribuidos de forma homogénea por todo el genoma, llegando a presentar un número elevado de alelos con frecuencias similares entre sí ¹⁷.

Existen diferentes métodos para la identificación de polimorfismos, uno de ellos es el análisis de ligamento donde se hace una búsqueda aleatoria en el genoma para tratar de encontrar genes asociados a una enfermedad, este método utiliza generaciones familiares con el fin de genotipificar el ADN para detectar alguna enfermedad, como por ejemplo la artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria sistémica y crónica o tuberculosis pulmonar. Por otro lado, se llevan a cabo estudios de asociación genética, donde se buscan polimorfismos individuales de genes implicados en la aparición de enfermedades, los cuales son comparados con niveles de expresión génica en tejidos normales o con patologías ¹⁷.

Se han informado varios polimorfismos que predisponen a adquirir Candidiasis, incluidos polimorfismos de nucleótido único (SNP) en genes que codifican lectina de unión a manosa, interleucina IL-4, receptor Dectin-1, CARD 9, una subunidad del complejo inflamasa NLPR3 y, más recientemente, las variantes genéticas de IL-22 y la enzima indoleamina 2,3-dioxigenasa en las células T reguladoras^{11,15}. En general, la evidencia actual respalda la suposición de que los polimorfismos genéticos deben incluirse como un factor predisponente a adquirir infecciones recurrentes por *C. albicans* ¹².

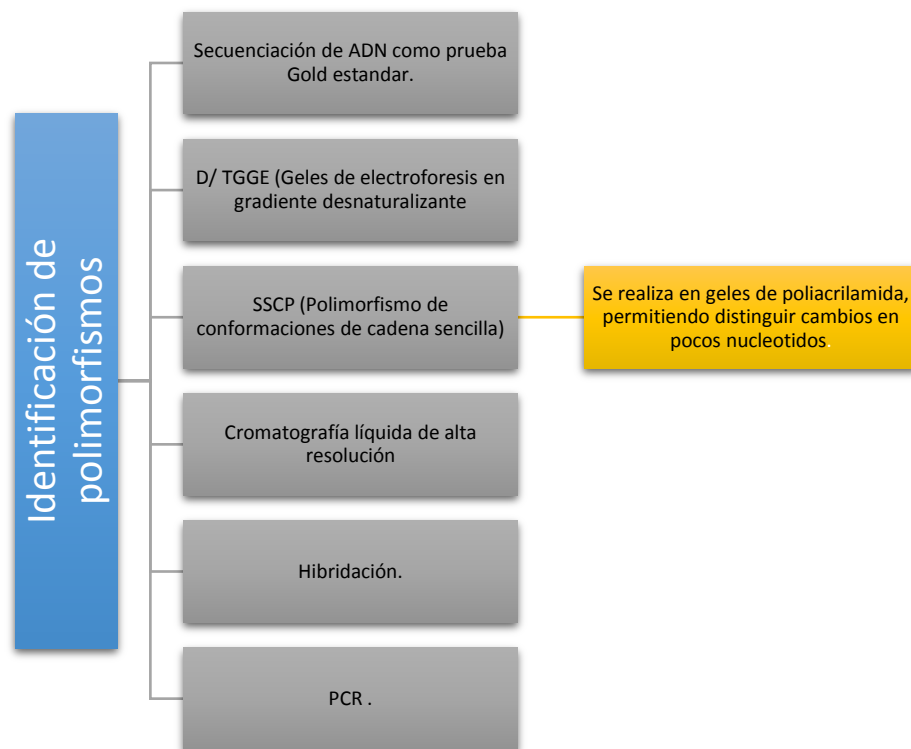


Fig 11. Técnicas para identificación de polimorfismos.

Fuente: Caratachea MAC. Polimorfismos geneticos: Importancia y aplicaciones. Rev del Inst Nac Enfermedades Respir. 2007;20(3):213-21.

3.11 Diagnóstico deficiencia de MPO.

3.11.1 Técnicas Citoquímicas.

La deficiencia de MPO se puede determinar mediante el uso de técnicas como tinción citoquímica de leucocitos, inmunocitoquímica o citometría de flujo las cuales permiten evaluar la presencia de la MPO funcional dentro de los neutrófilos ²⁶.

Para determinar la presencia de mieloperoxidasa en los neutrófilos es posible emplear la tinción citoquímica de peroxidasa leucocitaria, que demuestra la presencia de mieloperoxidasa mediante la acción oxidante de la misma sobre el sustrato bencidina en presencia de H₂O₂, observando la actividad de la MPO por medio de la tinción de los gránulos de un color rojo- marrón dentro de las células, dado a que la MPO está localizada

en los gránulos azurófilos presente en todos los estadios de los neutrófilos; sin embargo, actualmente se utilizan reactivos no cancerígenos alternos a la bencidina⁵⁵.

3.11.2 PCR Convencional

Es una técnica molecular que permite la amplificación *in vitro* de una molécula de ADN para obtener millones de copias de la misma; esta técnica se basa en la replicación de material genético donde se ven involucradas diferentes proteínas que sintetizan nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde; así mismo, se ven involucradas sustancias que cumplen un papel importante en el proceso de amplificación como la enzima polimerasa, los primers o iniciadores que son fragmentos de ADN de 15-30 nucleótidos que flanquean la región a amplificar, desoxinucleótidos (dNTPs), cloruro de magnesio el cual actúa como co-factor de la enzima polimerasa y una solución amortiguadora que logra mantener el PH apropiado²⁷.

La amplificación de ADN mediante PCR consta de tres etapas que involucran condiciones químicas y de temperatura. Esta técnica inicia por la separación de las hebras de ADN (desnaturalización) que es expuesto a altas temperaturas, posteriormente ocurre la unión de los iniciadores o primers a la secuencia complementaria o molde de ADN (alineamiento) y finaliza con la síntesis semiconservativa de una nueva cadena por adición de nucleótidos debido a la acción de la ADN polimerasa (extensión)²⁷.

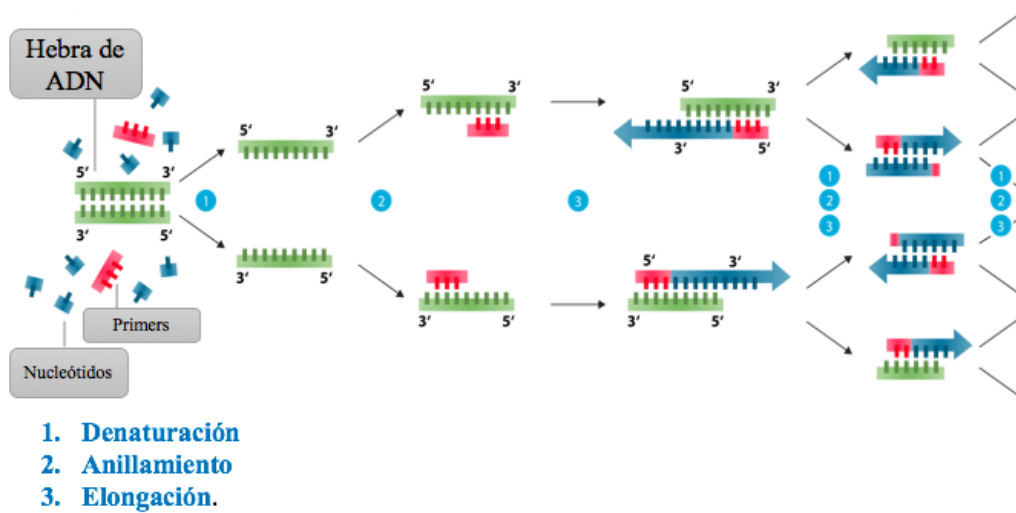


Fig 12. Etapas de amplificación de ADN por medio de la técnica PCR.

Tomado y modificado de: Serrato Díaz A, Flores Rentería L, Aportela Cortez J, Sierra Palacios E. PCR : reacción en cadena. Herramientas Mol Apl en Ecol Teor y prácticos. 2014;53-74.

3.11.3 Secuenciación de ADN

Los avances en la tecnología de biología molecular, desde la construcción de mapas físicos y genéticos ha permitido obtener la secuencia de ADN de genomas completos de diferentes organismos, desde lo más simple como organélos celulares, hasta lo más complejo, como el genoma humano, genomas de bacterias, hongos, virus, plantas y animales; por lo tanto, una de las aplicaciones de la secuenciación de ADN es su uso como herramienta clínica de diagnóstico, una muestra de ello es la detección de nuevos polimorfismos en cadenas de ADN, dado a que esta técnica permite determinar en qué orden se disponen los nucleótidos Adenina, Timina, Citosina y Guanina^{43,44,45}.

Uno de los métodos más utilizados para secuenciar ADN es el método Sanger, también conocido como método didesoxi, el cual permite determinar la secuencia del molde de ADN a medida que se sintetiza la hebra complementaria; para esta técnica son necesarios diversos componentes como el ADN de cadena sencilla que actúa como molde, primers específicos para dar inicio a la reacción, la enzima ADN-polimerasa, cuatro nucleótidos

(dATP, dGTP, dCTP y dTTP), cuatro didesoxirribonucleótidos trifosfato (ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP) terminadores de cadena marcados fluorescentemente, dado a que cada ddNTP está marcado con un fluoróforo distinto que logra emitir luz con una onda característica. Los ddNTP son utilizados por la ADN-polimerasa para construir la nueva hebra pero, una vez incorporados, impiden la adición de nuevos nucleótidos, estos nucleótidos no poseen el grupo hidroxilo en el carbono 3' del anillo de azúcar, por lo tanto no permite la unión de otro nucleótido, dando fin a la secuenciación de la cadena ⁴³.

Inicialmente, el ADN se somete a altas temperaturas, 96 °C para poder desnaturalizar las cadenas, luego se disminuye la temperatura la cual depende de la T° melting de los primers, para que estos puedan unirse al molde de cadena sencilla; una vez se han unido, la temperatura vuelve a elevarse a 72°C para que la ADN- polimerasa añada los nucleótidos a la cadena, hasta que aleatoriamente agregue un nucleótido didesoxi; cuando esto ocurre, no es posible seguir agregando más nucleótidos y la cadena finaliza con el nucleótido didesoxi; repitiendo múltiples veces este proceso; una vez terminada la reacción, los fragmentos se detectan mediante electroforesis capilar en gel, donde los fragmentos más cortos se mueven rápidamente a través de un poro, mientras los fragmentos más largos se mueven lentamente ⁴³.

Los fragmentos más cortos, que terminan justo un nucleótido después del cebador son los primeros en ser detectados, luego los próximos fragmentos más pequeños que terminan justo dos nucleótidos después del cebador son posteriormente detectados y así sucesivamente. Los datos registrados por el detector se observan como una serie de picos que dependen de la intensidad de la fluorescencia observados en un cromatograma ^{43,45}.

4. Metodología

4.1 Tipo de investigación

Se utilizó un tipo de investigación descriptiva.

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

4.3 Muestra: 2 pacientes de la ciudad de Bogotá con diagnóstico previo de Candidiasis recurrente vulvovaginal y bucal, un control negativo de muestra de paciente sano, sin episodios de candidiasis

Tabla 2. Identificación muestras de estudio.

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA	DIAGNÓSTICO
1	Paciente diagnosticada con Candidiasis bucal, refirió episodios de la infección de aparición repentina, recibió tratamiento con fluconazol durante tres semanas.
2	Paciente control negativo, sin ningún episodio aparente de Candidiasis.
3	Paciente diagnosticada con Candidiasis vulvovaginal, ha referido múltiples episodios de la infección durante su vida, con pronóstico de candidiasis vulvovaginal recurrente; se realiza identificación de microorganismo por sistema VITEK en descarga vaginal hallando <i>C. albicans</i> .

4.4 Recolección de la muestra

Los pacientes que participaron en el estudio fueron informados de los objetivos y procedimientos de este proyecto de manera clara, por medio del diligenciamiento de un consentimiento informado previamente elaborado (Ver anexo A); además de ello, se tuvo en cuenta que las pacientes incluidas en este estudio presentaron más de cuatro episodios de candidiasis en un año, con el fin de correlacionar el diagnóstico con los resultados obtenidos posterior a la amplificación y secuenciación de ADN. Se tomó muestra de sangre periférica en antebrazo, en tubo tapa lila para evitar coagulación con adecuada preservación, posteriormente se almacenan las muestras a 4 °C.

4.5 Diseño de primers y análisis bioinformático.

Se realizó la búsqueda de la secuencia genómica para el gen *mpo* (mieloperoxidasa) en la base de datos NCBI gene: *Homo sapiens* cromosoma 17, GRCh38.p12 Primary Assembly, secuencia de referencia: NC_000017, posteriormente se procede al diseño de primers mediante análisis bioinformático utilizando el software científico Primer 3.0 y confirmando su especificidad mediante el programa BLAST, obteniendo así los respectivos primers (ver tabla 3).

Tabla 3. Características de los primers usados para la amplificación del gen *mpo*.

	Secuencia 5' → 3'	Long	Tm	%GC	Tamaño producto
Forward Primer	AGGGTTCCTTGAGGTGAGGT	20 pb	60,5 °C	52,38	511pb.
Reverse primer	ACTCCCTCCAGTCCTTCAACT	21 pb	61,3 °C	55, 21	511pb.

4.6 Extracción de ADN

Se realizó la comparación de dos protocolos de extracción de ADN de diferente fundamento, Ultraclean Bloodspin DNA isolation kit y Wizard Genomic DNA Purification Kit-Promega corporation, en cada una de las muestras clínicas para evidenciar cuál suministraba ADN con mejores condiciones para su posterior amplificación.

Para el kit The Wizard Genomic DNA Purification Kit- Promega corporation se utilizó el método de salting out, el cual se fundamenta en la lisis de glóbulos rojos y glóbulos blancos para la liberación de ADN de estas últimas células, luego se administran altas concentraciones de sales que disminuyen la solubilidad de las proteínas, precipitándolas; finalmente, el ADN genómico se concentra por precipitación con isopropanol. Inicialmente se realizó un pretratamiento con solución de lisis y se dejó incubar a temperatura ambiente por 10 minutos (ver anexo B), se siguieron las indicaciones suministradas en el kit.

Por otro lado, para el Kit Ultraclean® Bloodspin DNA isolation se utilizó un método de columna, el cual emplea una membrana de sílice que facilita la unión del ADN a esta, mientras se eliminan proteínas y sales mediante múltiples lavados para posteriormente eluir el ADN en tampón Tris 1 mM EDTA. Inicialmente se realizó un pretratamiento con 10 µl de proteinasa K (1,15 mg/ml), se incubó en baño seco a 65°C por 1° min con el buffer de lisis B1 en el que estaba resuspendido el exudado (ver anexo C), posteriormente se siguieron las indicaciones suministradas en el kit.

Se realizó gel de agarosa al 1.8% teñido con Sybr safe (invtrogen 10.000X), para verificar la integridad del ADN extraído y se realizó cuantificación del ADN en el equipo NanoDrop de Termofisher para evidenciar la pureza mediante la relación de la absorbancia obtenida 260/280, 260/230 y la concentración del ADN con cada método.

4.7 Estandarización de la PCR convencional para amplificación gen *mpo*.

Para la identificación y amplificación del gen *mpo*, mediante PCR convencional se ajustaron los parámetros de reacción con el fin de lograr estandarizar la técnica y por consiguiente la correcta amplificación del producto deseado.

4.7.1 Titulación de ADN

Se realizó la titulación de ADN a partir de una concentración inicial de 181,7 ng/ μ l obtenido de la muestra que mostró mejor calidad de ADN probando las siguientes concentraciones (ver tabla 4):

Tabla 4. Titulación de ADN

	[] INICIAL	[] FINAL	VOL INICIAL
ADN Inicial	181,7 ng/ μ l	181,7 ng/ μ l	3 μ l
ADN dil. 1/2	181,7 ng/ μ l	90,85 ng/ μ l	1,5 μ l
ADN dil. 1/4	90,85 ng/ μ l	45,42 ng/ μ l	0,75 μ l
ADN dil. 1/6	45,42 ng/ μ l	22,71 ng/ μ l	0,37 μ l

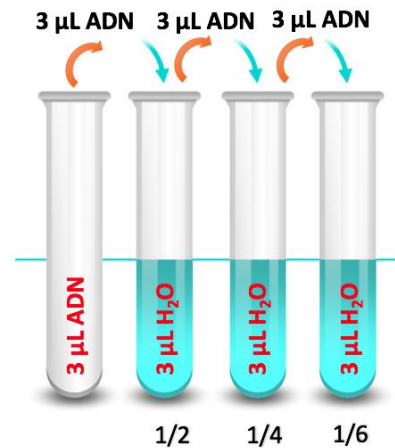


Fig. 13. Diluciones seriadas $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{6}$ de ADN

4.7.2 Titulación de MgCl₂

Se evaluaron diferentes concentraciones de MgCl₂: 3mM, 2,5 mM, 2 mM, 1,5 mM, 1 mM, con el fin de determinar cuál concentración era óptima para la reacción. Las concentraciones y volúmenes de MgCl₂ se observan en la tabla 5.

Tabla 5. Titulación de MgCl₂

	[] INICIAL	[] FINAL	VOL. INICIAL PARA 25 uL
MgCl ₂	25 mM	3 mM	3 µL
	25 mM	2,5 mM	2,5 µL
	25 mM	2 mM	2 µL
	25 mM	1,5 mM	1,5 µL
	25 mM	1 mM	1 µL

4.7.3 Titulación de primers

Para la titulación de Primers se utilizaron concentraciones de 0,5 mM, 0,4 mM, 0,3 mM, 0,2 mM, 0,1 Mm, con el fin de establecer que concentración era la adecuada para lograr una correcta amplificación evitando la formación de productos inespecíficos. Las concentraciones y volúmenes de primers empleados se observan en la tabla 6.

Tabla 6. Titulación de primers.

	[] INICIAL	[] FINAL	VOL. INICIAL PARA 25 uL
Primer R	10 mM	0,4 mM	1 µL
Primer F	10 mM	0,4 mM	1 µL
Primer R	10 mM	0,3 mM	0,75 µL
Primer F	10 mM	0,3 mM	0,75 µL
Primer R	10 mM	0,2 mM	0,5 µL

Primer F	10 mM	0,2 mM	0,5 µL
Primer R	10 mM	0,1 mM	0,25 µL
Primer F	10 mM	0,1 mM	0,25 µL

4.7.4 Temperatura de anillamiento

Se realizó la variación de temperaturas en la fase de anillamiento, se probaron temperaturas de 55 °C, 57°C, 59 °C, 60 °C y 61 °C teniendo en cuenta que de ella depende la especificidad de unión de los primers utilizados al gen blanco.

4.8 PCR convencional.

Una vez optimizadas las condiciones descritas anteriormente se procede a realizar la amplificación del gen *mpo* en el ADN de las muestras clínicas a evaluar. Las condiciones químicas para la amplificación se muestran en la tabla 7 y el perfil térmico optimizado se observa en la tabla 8.

Tabla 7. Condiciones químicas de amplificación para el gen *mpo*.

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

Tabla 8. Programa perfil térmico para la amplificación del gen *mpo*

FASE	TEMPERATURA	TIEMPO	No CICLOS
Denaturación inicial	94°C	5 min	1
Denaturación	94°C	30 s	35
Hibridación	60°C	45 s	
Elongación	72°C	45 s	
Elongación final	72°C	10 min	1
Conservación	10°C		∞

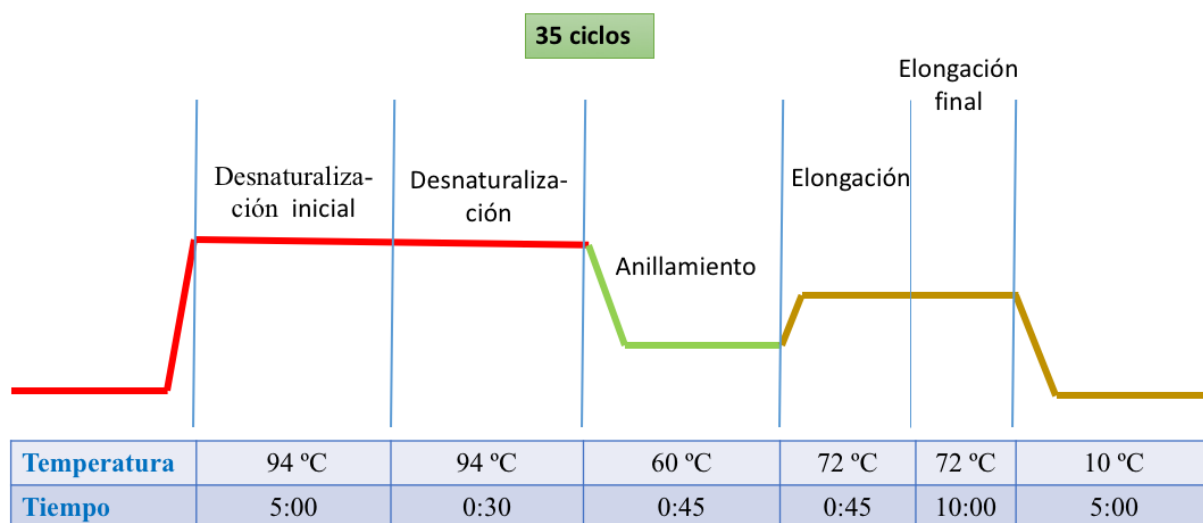


Fig 14. Programa de ciclaje PCR convencional para amplificación gen *mpo*.

Fuente: Riaño L. autor del presente trabajo.

La reacción se lleva a cabo en el termociclador AXIGEN MAXYGEN y una vez se obtienen los productos de amplificación, se procede a hacer corrida electroforética en gel de agarosa al 1,8%, el cuál es preparado con TBE al 1% y para revelar las bandas se utiliza el intercalante de bases Syber Safe. Se cargan las muestras en el gel (6 µl en cada pozo) y se procede a la realización de la electroforésis, dejando migrar las muestras durante 30-45 min, a 100 v. Una vez terminada la corrida, se visualizan los resultados en el gel con ayuda

del transiluminador de luz UV BioRad, donde se puede observar el resultado de amplificación.

4.9 Purificación de ADN

Los productos de amplificación obtenidos de cada muestra se purificaron con el kit Invitrogen™ PureLink™ PCR Purification Kit, con el fin de obtener una concentración de ADN óptima para realizar la respectiva secuenciación de cada muestra. Este kit proporciona un método de columna de micro-boquilla que permite hasta el 95% de recuperación de fragmentos de ADN, eliminando residuos de cebadores, sales, enzimas y dNTPs. Se siguieron las indicaciones suministradas en el kit (Ver anexo D).

4.10 Secuenciación

Se realizó secuenciación sentido y antisentido de los tres productos de PCR convencional obtenidos de la amplificación de una región del gen *mpo*, mediante método de secuenciación Sanger.

Posteriormente se llevó a cabo el análisis de las secuencias por medio de aplicaciones bioinformáticas, incluyendo Chromas (1996, Technelysium) que es un visor y editor de material genético secuenciado; además, se ejecutó por medio de los programas informáticos blast y Multalin, el alineamiento de cada una de las secuencias obtenidas con la secuencia referente de la base de datos NCBI para mieloperoxidasa *Homo sapiens* cromosoma 17, GRCh38.p12 Primary Assembly, con el fin de realizar el análisis de estas para determinar la presencia de polimorfismos en la región secuenciada del gen *mpo*.

4.11 Tinción citoquímica de peroxidasa Leucocitaria.

Se realizó tinción de mieloperoxidasa para determinar la presencia o deficiencia de la enzima en los PMN, observando los gránulos azurófilos de un color intensamente morado dentro de las células si la enzima está presente, o por el contrario si se observa poco o nula

coloración significa que hay deficiencia de la enzima, debido a que la MPO en presencia de H_2O_2 es capaz de oxidar un análogo de la bencidina, pasando de una forma incolora a un derivado azul o marrón. Se siguieron las indicaciones suministradas en el protocolo Mieloperoxidasa 4-Cloro-1-Naftol estandarizado por el Instituto Nacional de Cancerología (Ver anexo E).

4.12 Cuadro hemático y FSP (coloración de wright)

Se realizó cuadro hemático automatizado en el equipo Sysmex XT- 4000i para cada paciente, el cual emplea el método de impedancia y enfoque hidrodinámico, determinando valores hematológicos de interés como el recuento leucocitario principalmente de neutrófilos.

También se realizaron los respectivos extendidos de sangre periférica para cada muestra, con coloración Wright, la cual nos permite conocer la morfología de las células sanguíneas, diferenciar cada una y determinar alteraciones de la línea roja, blanca y plaquetaria; para ello se utilizó el colorante de wright compuesto por azul de metileno que actúa como colorante básico coloreando las partes ácidas de las células, eosina que actúa como colorante ácido coloreando las partes alcalinas de las células y metanol que logra fijar las células; se manejaron los siguientes tiempos estandarizados en la Fundación Hospital de la Misericordia (HOMI) en el área de hematología, 5 minutos de colorante de Wright y 3 minutos de buffer, posteriormente lavar.

5. Resultados

5.1 Estandarización PCR convencional amplificación gen *mpo*.

El objetivo de estandarizar una PCR convencional para la amplificación del gen *mpo* fue obtener un producto óptimo teniendo en cuenta condiciones químicas y de temperatura favorables, que impidieran la aparición de productos inespecíficos; para ello, se buscó determinar las concentraciones adecuadas del ADN y los reactivos con el fin de lograr un rendimiento idóneo por parte de estos como se describe a continuación, dado a que inicialmente se tuvieron en cuenta concentraciones mayores utilizadas en diferentes ensayos de PCR convencional para la amplificación de diversos genes, con el objetivo de probar diferentes valores hasta obtener las condiciones acordes a la amplificación del gen de interés en este estudio.

5.1.1 Titulación de ADN

Para la titulación de ADN, inicialmente se tuvo en cuenta la concentración y pureza que suministró cada uno de los kits de extracción utilizados, tanto el Ultraclean Bloodspin DNA isolation kit como el Wizard Genomic DNA Purification Kit-Promega corporation; ya que se buscó determinar que kit garantizaba una mayor concentración del ADN de interés y una óptima pureza del mismo; por lo tanto, una vez extraído el ADN de cada muestra empleando los dos kits mencionados, se cuantificó cada uno obteniendo:

Tabla 9. 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

Tabla 10. 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
---	------------	-------	-------	------	------	-----	----

A partir de los resultados obtenidos, se determinó que el kit que proporcionó una mayor concentración de ADN fue el kit Wizard Genomic DNA Purification, como se puede observar en la tabla 9; las muestras 2 y 3 mostraron resultados idóneos con concentraciones de 169,5 ng/μl y 181,7 ng/μl en relación a una buena pureza de 1,86 y 1,89 en D.O. 260/280; dado a que, según la literatura, la relación entre las medidas de densidad óptica de 260 y 280 (D.O.260: D.O.280) proporciona la longitud de onda en la que el ADN puede ser cuantificado, además del estimado de la pureza de la muestra; por lo tanto, muestras puras de ADN deben tener un valor D.O.260:D.O.280 de 1,8 a 2; si por el contrario, se obtienen valores por debajo de este rango son indicativo de contaminación con proteínas o fenol⁵⁸.

En efecto, al analizar los resultados de extracción de ADN obtenidos, se demostró que uno de los kits tuvo más eficiencia por mostrar mejor concentración de ADN para cada muestra y mayor pureza de las mismas como se explicó anteriormente; sin embargo, con el kit Ultraclean Bloodspin DNA isolation como se muestra en la tabla 10, no se obtuvo una alta concentración de ADN y además la pureza del mismo no fue la más adecuada para ser empleado en el estudio, dado a que los valores fueron inferiores al rango de referencia de pureza de material genético sin contaminación.

A partir de lo anteriormente dicho, se eligió la muestra problema número 3, la cual mostró la mayor concentración 181,7 ng/μl y la mejor pureza 1,89 en longitud de onda de 260/280, durante el proceso de extracción y cuantificación. Posteriormente, se realizaron titulaciones de 1/2, 1/4 y 1/6 con agua desionizada del ADN; realizando PCR convencional para cada dilución. Una vez se obtuvieron los productos de amplificación, se realizó corrida electroforética en gel de agarosa al 1.8% observando cada producto:

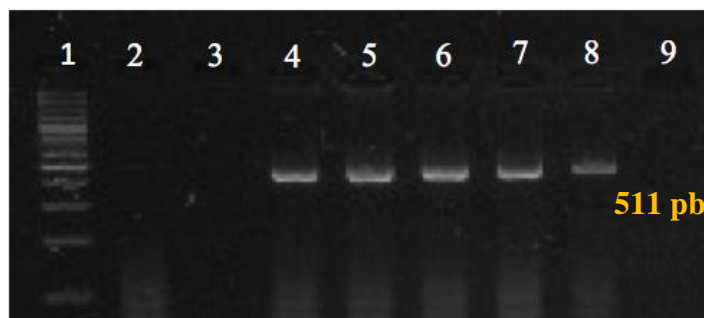


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa 1.8% de productos de amplificación de PCR convencional de titulación de ADN, muestra problema 3.

Carril 1. Marcador de peso molecular, escalera CorpoGen 100 pb. **Carril 2.** Control negativo. **Carril 4.** Concentración inicial ADN 181,7 ng/μl **Carril 5.** Concentración inicial ADN 181,7 ng/μl **Carril 6.** Concentración ADN 90,85 ng/μl, dil ½ **Carril 7.** Concentración ADN 45,42 ng/μl, dil ¼ **Carril 8.** Concentración 21,71ng/μl, dil. 1/ 6 **Carril 9.** Control negativo.

Se pudo observar que en los carriles 4 y 5, los cuales equivalen a una concentración inicial de ADN 181,7 ng/μl, la banda fue definida y se pudo distinguir el tamaño correcto de la misma; sin embargo, se propuso disminuir la concentración inicial de ADN con el fin determinar hasta que concentración inferior se podía observar un buen rendimiento del mismo, posterior a su amplificación; en efecto , se observó una diferencia entre cada dilución empleada, en cada banda se observó que entre mayor era la dilución esta se volvía más delgada dado a la disminución de concentración; en consecuencia , se determinó que la dilución ¼ (carril 7) con una concentración de 45,42 ng/μl fue la más óptima al mostrar una banda delgada, visible, acorde al peso y las características que se buscaban; a partir de allí, se manejó esta concentración para los siguientes ensayos.

5.1.2 Titulación de MgCl₂

Para la titulación de MgCl₂ se quiso establecer la concentración más adecuada de este para su uso en la PCR, dado a que el MgCl₂ proporciona una correcta actividad de la enzima Taq-polimerasa actuando como cofactor de esta. A altas concentraciones de MgCl₂ se puede disminuir la especificidad de la enzima, es decir, este no logra trabajar en conjunto con la Taq-polimerasa, por ende no impulsa la actividad de la misma; por otro lado, a bajas concentraciones, este puede aumentar la especificidad, es decir, el MgCl₂ no logra equilibrar y controlar la actividad de la enzima, permitiendo que pegue todo a la cadena de ADN⁵⁹.

Teniendo en cuenta las anteriores condiciones, se emplearon concentraciones de 3 mM, 2.5 mM, 2 mM, 1.5 mM, 1 mM, con el fin de determinar que concentración de $MgCl_2$ tenía un mejor rendimiento y buena actividad en conjunto con la Taq-polimerasa. En la figura 13, se observa claramente la diferencia entre las bandas obtenidas, mostrando un descenso en el grosor de estas, a causa de la disminución de la concentración de $MgCl_2$, las cuales muestran que una de estas es más acorde al resultado esperado, es decir, las concentraciones empleadas tienen la facultad de trabajar en conjunto con la taq- polimerasa logrando amplificar el ADN; sin embargo, la concentración de 2 mM (carril 5) muestra un adecuado rendimiento que permite observar una banda acorde con el peso molecular del gen de interés y una acorde amplificación del mismo.

Comparando las bandas obtenidas con concentración de 3 mM y 2.5 mM de $MgCl_2$ (carril 3,4) estas se muestran de un mayor grosor dado a la especificidad de la enzima, a causa de las concentraciones manejadas de $MgCl_2$, a diferencia de las concentraciones de 1.5 mM y 1 mM de $MgCl_2$ (carril 6 y 7), donde se va perdiendo el producto de amplificación, lo que podría representar un problema en posteriores ensayos al no obtener un producto óptimo para posterior secuenciación.

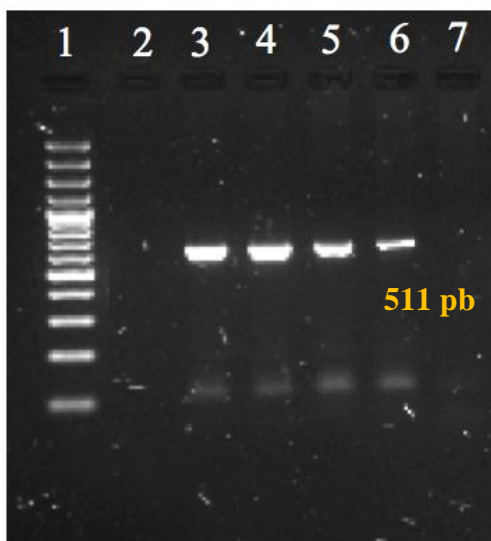


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa 1.8% de productos de amplificación de PCR convencional para determinación de concentración adecuada de $MgCl_2$, muestra problema utilizada N° 3.

Carril 1. Marcador de peso molecular, 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

5.1.3 Titulación de primers.

Se buscó determinar la concentración óptima de los primers, con el objetivo de evitar la formación de productos inespecíficos como dímeros, para dar inicio a la reacción de amplificación. La especificidad de los primers inicialmente se probó mediante un primer-BLAST el cual demostró que los primers diseñados tenían la capacidad de pegarse en una región de la cadena del gen *mpo* cuyo producto final es de 511 pb. A partir de allí, se quiso determinar cuál concentración era la más acorde para obtener un buen producto de amplificación. Como se observa en la figura 14, se manejaron concentraciones de 0,4 μM, 0,3 μM, 0,2 μM, 0,1 μM; en efecto, para las concentraciones de 0,4 μM, y 0,3 μM en los carriles 3 y 4, se observa en la parte inferior de la corrida fragmentos de color blanco indicativos de productos inespecíficos, por lo que se descarta el uso de estas concentraciones.

De tal manera, se estableció como valor estándar de concentración 2 μM (carril 5) al observarse una banda de producto de amplificación clara que permite determinar el tamaño del mismo, sin la formación de productos inespecíficos.

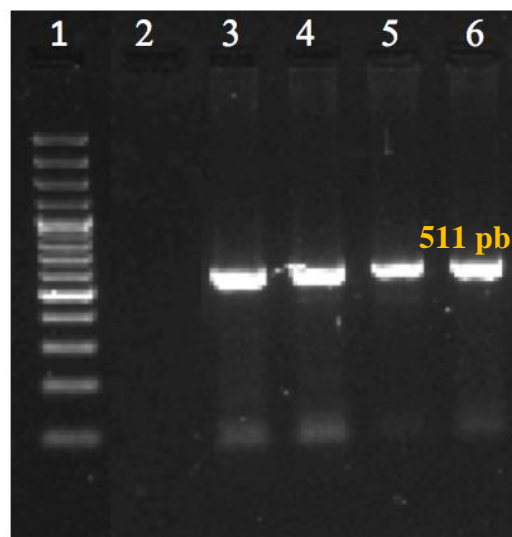


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa 1.8% de productos de amplificación de PCR convencional para determinación de concentración adecuada de primers, muestra problema utilizada N° 3.

Carril 1. Marcador de peso molecular, escalera CorpoGen 100 pb. **Carril 2.** Control negativo. **Carril 3.** [] Primers 0,4 μ M **Carril 4.** [] Primers 0,3 μ M **Carril 5.** [] Primers 0,2 μ M **Carril 6.** [] Primers 0,1 μ M.

5.1.4 Temperatura de anillamiento

A fin de realizar una óptima estandarización de PCR para la amplificación del gen *mpo*, se probaron diferentes temperaturas para establecer la mejor temperatura de anillamiento de la PCR, donde se tuvo en cuenta principalmente la temperatura melting de los primers (primer forward 60,5 °C, primer reverse 61.3 °C) dado a que esto determina la especificidad de cada uno, si la temperatura de anillamiento es muy baja, se obtendrá una PCR menos específica, si por el contrario es muy alta, la especificidad será mayor, aunque si es demasiado alta no se amplificará nada, pues la unión de los oligonucleótidos con sus sitios complementarios será poco estable y la polimerasa no podrá iniciar la síntesis ;se debe tener en cuenta que la temperatura de anillamiento debe ser 5° menos de la temperatura melting de los primers ⁵⁸.

Se amplificó el ADN variando la temperatura de anillamiento, 55 °C, 57 °C, 59 °C, 60 °C y 61 °C, determinando que el mejor rendimiento se observó en las temperaturas de 59 °C y 60 °C, carril 4 y 5 tanto por el tamaño de la banda como por la calidad de la misma ; sin embargo, se eligió la temperatura de 60 °C al mostrar un buen producto de amplificación, dado a que como se explicó anteriormente la especificidad será mejor a una mayor temperatura de anillamiento, lo que exige a los primers dar un buen rendimiento de reacción.

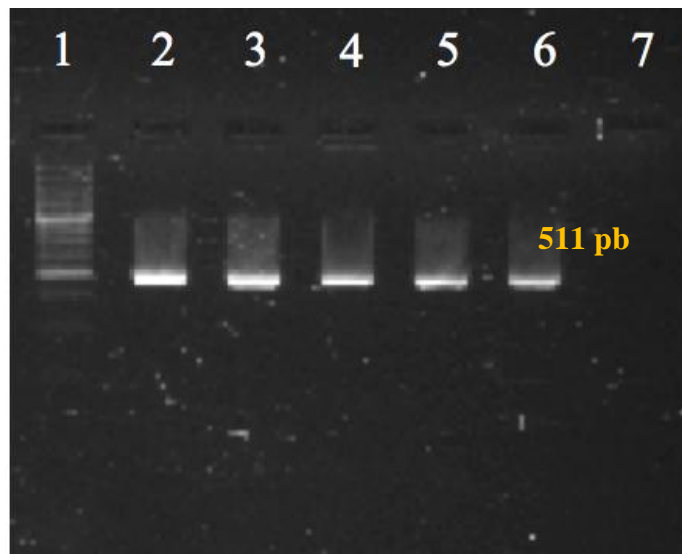


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa 1.8% de productos de amplificación de PCR convencional para determinación temperatura de anillaje adecuada según T_m de primers, muestra problema utilizada N° 3.

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

5.1.5 PCR convencional.

Una vez establecidas las condiciones para la amplificación del gen que codifica para la enzima MPO, se procedió a purificar el ADN de cada muestra en estudio, con el fin de eliminar residuos de sales, cebadores, dNTPs . Como se logra observar en la figura 16, la PCR de las muestras en estudio mostró en buen rendimiento de amplificación, donde se pudo observar el tamaño deseado del gen, la ausencia de productos inespecíficos y una buena definición de la banda de electroforesis.



Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa 1.8% de productos de amplificación de PCR convencional muestras problemas con parámetros finales de estandarización.

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.

Los productos de PCR de las muestras problema mostraron que las condiciones estandarizadas tanto químicas como térmicas fueron adecuadas para lograr una buena amplificación de una región en el gen *mpo*.

5.2 Resultados Secuenciación.

En los alineamientos realizados en los programas bioinformáticos BLAST y Multalin de las secuenciaciones de los productos de amplificación de PCR para el gen *mpo*, se obtuvieron los siguientes resultados:

5.2.1 Alineamiento de las secuencias con programa bioinformático BLAST.

5.2.1.1 Muestra N° 1: paciente con diagnóstico de candidiasis bucal.

Una vez se obtuvieron los resultados de los productos secuenciados se realizó el alineamiento para determinar la calidad e identidad de cada producto; para la muestra número 1, la cadena antisentido, obtuvo el 99% de identidad con relación a la secuencia que proporciona la base de datos Blast como se observa en la figura 19, lo cual demuestra que el producto de amplificación secuenciado fue de buena calidad y es congruente al ser comparado con secuencias halladas en la base de datos, mostrando una adecuada analogía entre cada secuencia, por lo tanto, representa una región del gen que codifica para MPO.

Homo sapiens myeloperoxidase (MPO) gene, complete cds
 Sequence ID: [DQ088846.1](#) Length: 15011 Number of Matches: 1

Range 1: 10884 to 11309 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Pre

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
782 bits(423)	0.0	425/426(99%)	0/426(0%)	Plus/Plus
Query 1	AGGTGAGGTCCTCCCTCCCTCTATGACCTTGGTTGTGTGGGAAGTGGGTTTTCTGGG	60		
Sbjct 10884	AGGTGAGGTCCTCCCTCCCTCTATGACCTTGGTTGTGTGGGAAGTGGGTTTTCTGGG	10943		
Query 61	CTGTGGCGATATGTGAATCTTCCCTGCTGTCTCCAGTGACCTCCACCTTGAAGCAGA	120		
Sbjct 10944	CTGTGGCGATATGTGAATCTTCCCTGCTGTCTCCAGTGACCTCCACCTTGAAGCAGA	11003		
Query 121	GAGACCTGCCATAGCCACCTGTCCCCTCCCCATGCAGGATACAATGCCTGGAGGCGCT	180		
Sbjct 11004	GAGACCTGCCATAGCCACCTGTCCCCTCCCCATGCAGGATACAATGCCTGGAGGCGCT	11063		
Query 181	TCTGTGGGCTCCCGAGCCTGAAACTGTGGGCCAGCTGGGCACGGTCTGAGGAACCTGA	240		
Sbjct 11064	TCTGTGGGCTCCCGAGCCTGAAACTGTGGGCCAGCTGGGCACGGTCTGAGGAACCTGA	11123		
Query 241	AATTGGCGAGGAAACTGATGGAGCAGTATGGCACGCCAACACATCGACATCTGGATGG	300		
Sbjct 11124	AATTGGCGAGGAAACTGATGGAGCAGTATGGCACGCCAACACATCGACATCTGGATGG	11183		
Query 301	GCGGCGTGTCCGAGCCTCTGAAGCGCAAAGGCCGCTGGGCCCACTCCTCGCCTGCATCA	360		
Sbjct 11184	GCGGCGTGTCCGAGCCTCTGAAGCGCAAAGGCCGCTGGGCCCACTCCTCGCCTGCATCA	11243		
Query 361	TCGGTACCCAGTTCAGGAAGCTCCGGGATGGTATCGGTGAGGAGGTGCAGGCGTCGTGG	420		
Sbjct 11244	TCGGTACCCAGTTCAGGAAGCTCCGGGATGGTATCGGTGAGGAGGGGCAGGCGTCGTGG	11303		
Query 421	GCCGCT 426			
Sbjct 11304	GCCGCT 11309			

Figura 20. Alineamiento del producto de amplificación del gen *mpo* secuenciado para cadena antisentido de muestra 1, con la secuencia del gen *mpo* disponible en la base de datos Blast.

Por otro lado, se obtuvo una secuencia de tamaño aproximado de 426 pb teniendo en cuenta que el tamaño inicial del producto amplificado fue de 511 pb, dado a que durante el proceso de secuenciación se tienden a perder las colas de los productos amplificados; por ende, se obtiene un producto de menor tamaño como se evidencia en este resultado.

Homo sapiens myeloperoxidase (MPO) gene, complete cds
 Sequence ID: [DQ088846.1](#) Length: 15011 Number of Matches: 1

Range 1: 10946 to 11373 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previ

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
791 bits(428)	0.0	428/428(100%)	0/428(0%)	Plus/Plus
Query 1	GCTGGCGATATGTGAATCTTCCCTGCTGTCTCCAGTGACCTCCACCTTGAAGCAGAGA	60		
Sbjct 10946	GCTGGCGATATGTGAATCTTCCCTGCTGTCTCCAGTGACCTCCACCTTGAAGCAGAGA	11005		
Query 61	GACCTGCCATAGCCACCTGTCCCCTCCCCATGCAGGATACAATGCCTGGAGGCGCTTC	120		
Sbjct 11006	GACCTGCCATAGCCACCTGTCCCCTCCCCATGCAGGATACAATGCCTGGAGGCGCTTC	11065		
Query 121	TGTGGGCTCCCGAGCCTGAAACTGTGGGCCAGCTGGGCACGGTCTGAGGAACCTGAAA	180		
Sbjct 11066	TGTGGGCTCCCGAGCCTGAAACTGTGGGCCAGCTGGGCACGGTCTGAGGAACCTGAAA	11125		
Query 181	TTGGCGAGGAAACTGATGGAGCAGTATGGCACGCCAACACATCGACATCTGGATGGGC	240		
Sbjct 11126	TTGGCGAGGAAACTGATGGAGCAGTATGGCACGCCAACACATCGACATCTGGATGGGC	11185		
Query 241	GCGTGTCCGAGCCTCTGAAGCGCAAAGGCCGCTGGGCCCACTCCTCGCCTGCATCATC	300		
Sbjct 11186	GCGTGTCCGAGCCTCTGAAGCGCAAAGGCCGCTGGGCCCACTCCTCGCCTGCATCATC	11245		
Query 301	GGTACCCAGTTCAGGAAGCTCCGGGATGGTATCGGTGAGGAGGGGCAGGCGTCGTGGGC	360		
Sbjct 11246	GGTACCCAGTTCAGGAAGCTCCGGGATGGTATCGGTGAGGAGGGGCAGGCGTCGTGGGC	11305		
Query 361	CGCTGGGTGGCTGTGGGCCATCCTTGACTCTCTTGGAGCCCAAATTTCTCCTGTCAGT	420		
Sbjct 11306	CGCTGGGTGGCTGTGGGCCATCCTTGACTCTCTTGGAGCCCAAATTTCTCCTGTCAGT	11365		
Query 421	TGAAGGAC 428			
Sbjct 11366	TGAAGGAC 11373			

Figura 21. Alineamiento del producto de amplificación del gen *mpo* secuenciado para cadena sentido de muestra 1, con la secuencia del gen *mpo* disponible en la base de datos Blast.

Así mismo, se realizó el alineamiento para la cadena sentido (5´- 3´) secuenciada de la muestra 1, donde se obtuvo el 100 % de identidad con relación a la secuencia de la base de datos Blast como se observa en la figura 20, mostrando una analogía total entre el producto de amplificación secuenciado para una región del gen que codifica para MPO y la secuencia hallada en la base de datos.

5.2.1.2 Muestra N° 2: Control negativo.

Se realizó alineamiento para la secuenciación del producto de amplificación de control negativo para la cadena sentido (5´- 3´) , donde se obtuvo el 100 % de identidad con relación a la secuencia que proporciona la base de datos Blast como se observa en la figura 21, lo cual demuestra que el producto de amplificación secuenciado es congruente al ser comparado con la secuencia hallada en la base de datos para MPO; por otra parte, no se evidenciaron “gaps” en el alineamiento lo que nos indica que no existe ausencia o incongruencias de pb en la secuencia obtenida.

Homo sapiens myeloperoxidase (MPO) gene, complete cds
Sequence ID: [DQ088846.1](#) Length: 15011 Number of Matches: 1

Range 1: 10935 to 11371 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Mat

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
808 bits(437)	0.0	437/437(100%)	0/437(0%)	Plus/Plus
Query 1	TTTTCTGGGCTGCTGGCGATATGTGAATCTTCCCTGCTGTCTCCAGTGACCTCCCCACCT	60		
Sbjct 10935	TTTTCTGGGCTGCTGGCGATATGTGAATCTTCCCTGCTGTCTCCAGTGACCTCCCCACCT	10994		
Query 61	TGAAGCAGAGAGACCTGCCCATAGCCACCTGTCCCTCCCCATGCAGGATACAATGCCT	120		
Sbjct 10995	TGAAGCAGAGAGACCTGCCCATAGCCACCTGTCCCTCCCCATGCAGGATACAATGCCT	11054		
Query 121	GGAGGCCTTCTGTGGGCTCCCGCAGCCTGAAACTGTGGGCCAGCTGGGCACGGTGCTGA	180		
Sbjct 11055	GGAGGCCTTCTGTGGGCTCCCGCAGCCTGAAACTGTGGGCCAGCTGGGCACGGTGCTGA	11114		
Query 181	GGAACTGAAATTGGCGAGGAACTGATGGAGCAGTATGGCACGCCAACAAACATCGACA	240		
Sbjct 11115	GGAACTGAAATTGGCGAGGAACTGATGGAGCAGTATGGCACGCCAACAAACATCGACA	11174		
Query 241	TCTGGATGGGCGGCGTGTCCGAGCCTCTGAAGCGCAAAGGCCGCTGGGCCCACTCCTCG	300		
Sbjct 11175	TCTGGATGGGCGGCGTGTCCGAGCCTCTGAAGCGCAAAGGCCGCTGGGCCCACTCCTCG	11234		
Query 301	CCTGCATCATCGGTACCCAGTTCAGGAAGCTCCGGGATGGTGATCGGTGAGGAGGGGAG	360		
Sbjct 11235	CCTGCATCATCGGTACCCAGTTCAGGAAGCTCCGGGATGGTGATCGGTGAGGAGGGGAG	11294		
Query 361	GCCTCGTGGGCCGCTGGGTGGCTGTGGGCCATCCTTGACTCTTTGGAGCCAAATTC	420		
Sbjct 11295	GCCTCGTGGGCCGCTGGGTGGCTGTGGGCCATCCTTGACTCTTTGGAGCCAAATTC	11354		
Query 421	CTCCTGTCAAGTTGAAGG	437		
Sbjct 11355	CTCCTGTCAAGTTGAAGG	11371		

Figura 22. Alineamiento del producto de amplificación del gen *mpo* secuenciado para la cadena sentido del control negativo, con la secuencia del gen *mpo* disponible en la base de datos Blast.

De la misma manera, en el alineamiento del producto secuenciado del control negativo para la cadena antisentido, se obtuvo un 99 % de identidad con relación a la secuencia que proporciona la base de datos Blast para MPO como se observa en la figura 22, mostrando una buena similitud entre las secuencias; sin embargo, se observó un “gap” en el alineamiento, dado a que se presentó la ausencia de un base nitrogenada como resultado de que, durante el proceso de secuenciación no se identificó o ubicó la misma en la posición correcta; por ende, el programa busca la manera de acomodar la secuencia dejando un espacio que no pueda interferir en el correcto alineamiento.

Homo sapiens myeloperoxidase (MPO) gene, complete cds
 Sequence ID: [DQ088846.1](#) Length: 15011 Number of Matches: 1

Range 1: 10888 to 11331 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
808 bits(437)	0.0	442/444(99%)	1/444(0%)	Plus/Plus
Query 1	GAGGTCCTTCCCTCCCTCTATGACCTTGGTTGTGGGAAGTGGGTTTTCTGGGCTGC	60		
Sbjct 10888	GAGGTCCTTCCCTCCCTCTATGACCTTGGTTGTGGGAAGTGGGTTTTCTGGGCTGC	10947		
Query 61	TGGCGATATGTGAATCTTCCCTGCTGTCTCCAGTGACCTCCCACCTTGAAGCAGAGAGA	120		
Sbjct 10948	TGGCGATATGTGAATCTTCCCTGCTGTCTCCAGTGACCTCCCACCTTGAAGCAGAGAGA	11007		
Query 121	CCTGCCCATAGCCACCTGTCCCTCCCCATGCAGGATACAATGCCTGGAGGCGCTTCTG	180		
Sbjct 11008	CCTGCCCATAGCCACCTGTCCCTCCCCATGCAGGATACAATGCCTGGAGGCGCTTCTG	11067		
Query 181	TGGGCTCCCGCAGCCTGAAACTGTGGGCCAGCTGGGCACGGTCTGAGGAACCTGAAATT	240		
Sbjct 11068	TGGGCTCCCGCAGCCTGAAACTGTGGGCCAGCTGGGCACGGTCTGAGGAACCTGAAATT	11127		
Query 241	GGCGAGGAAACTGATGGAGCAGTATGGCACGCCCAACAACATCGACATCTGGATGGGCGG	300		
Sbjct 11128	GGCGAGGAAACTGATGGAGCAGTATGGCACGCCCAACAACATCGACATCTGGATGGGCGG	11187		
Query 301	CGTGTCCGAGCCTCTGAAGCGCAAAGGCCGCGTGGGCCCACTCCTCGCCTGCATCATCGG	360		
Sbjct 11188	CGTGTCCGAGCCTCTGAAGCGCAAAGGCCGCGTGGGCCCACTCCTCGCCTGCATCATCGG	11247		
Query 361	TACCCAGTTCAGGAAGCTCCGGGATGGTGATCGGTGAGGAGGGGCAGGCGTCGT - GGCCG	419		
Sbjct 11248	TACCCAGTTCAGGAAGCTCCGGGATGGTGATCGGTGAGGAGGGGCAGGCGTCGTGGCCG	11307		
Query 420	CTGTGTGGCTGTGGGCCATCCTT 443			
Sbjct 11308	CTGGGTGGCTGTGGGCCATCCTT 11331			

Figura 23. Alineamiento del producto de amplificación gen *mpo* secuenciado para cadena antisentido del control negativo, con la secuencia del gen *mpo* disponible en la base de datos Blast.

Del mismo modo, en el control negativo tanto en la cadena sentido 5'- 3' como en la complementaria, se obtuvo una secuencia de tamaño aproximado de 437 pb y 443 pb, teniendo en cuenta que el tamaño inicial del producto amplificado fue de 511 pb; sin embargo, los resultados de estas secuenciaciones tuvieron un tamaño mayor a las secuencias obtenidas en la muestra 1, como resultado de la estabilidad y calidad de los productos amplificados.

5.2.1.3 Muestra N° 3: Paciente con diagnóstico de candidiasis vulvovaginal.

Para la muestra número 3, en el alineamiento de la secuenciación de la cadena sentido (5'- 3'), se obtuvo un 100% de identidad con relación a la secuencia que proporciona la base de datos Blast como se observa en la figura 23, lo cual demuestra que el producto de amplificación secuenciado es congruente y análogo con la secuencia para MPO presente en la base de datos, es decir, la secuencia obtenida si representa una región del gen que codifica para la enzima.

Homo sapiens myeloperoxidase (MPO) gene, complete cds
 Sequence ID: [DQ088846.1](#) Length: 15011 Number of Matches: 1

Range 1: 10928 to 11373 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Prev

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
824 bits(446)	0.0	446/446(100%)	0/446(0%)	Plus/Plus
Query 1	AGGTGGGTTTTCTGGGCTGCTGGCGATATGTGAATCTTCCCTGCTGTCTCCAGTGACCTC	60		
Sbjct 10928	AGGTGGGTTTTCTGGGCTGCTGGCGATATGTGAATCTTCCCTGCTGTCTCCAGTGACCTC	10987		
Query 61	CCCACCTTGAAGCAGAGAGACCTGCCCATAGCCACCTGTCCCTCCCCATGCAGGATAC	120		
Sbjct 10988	CCCACCTTGAAGCAGAGAGACCTGCCCATAGCCACCTGTCCCTCCCCATGCAGGATAC	11047		
Query 121	AATGCCTGGAGGCGCTTCTGTGGGCTCCCGCAGCCTGAAACTGTGGGCCAGCTGGGCACG	180		
Sbjct 11048	AATGCCTGGAGGCGCTTCTGTGGGCTCCCGCAGCCTGAAACTGTGGGCCAGCTGGGCACG	11107		
Query 181	GTGCTGAGGAACCTGAAATTGGCGAGGAAACTGATGGAGCAGTATGGCACGCCAACAAAC	240		
Sbjct 11108	GTGCTGAGGAACCTGAAATTGGCGAGGAAACTGATGGAGCAGTATGGCACGCCAACAAAC	11167		
Query 241	ATCGACATCTGGATGGGCGGCGTGTCCGAGCCTCTGAAGCGCAAGGCCCGGTGGGCCCA	300		
Sbjct 11168	ATCGACATCTGGATGGGCGGCGTGTCCGAGCCTCTGAAGCGCAAGGCCCGGTGGGCCCA	11227		
Query 301	CTCCTCGCCTGCATCATCGGTACCCAGTTCCAGGAAGCTCCGGGATGGTGATCGGTGAGGA	360		
Sbjct 11228	CTCCTCGCCTGCATCATCGGTACCCAGTTCCAGGAAGCTCCGGGATGGTGATCGGTGAGGA	11287		
Query 361	GGGGCAGGCGCTGTGGGCGCTGGGTGGTGTGGGCCCATCTTGACTCTCTTGGAGCCC	420		
Sbjct 11288	GGGGCAGGCGCTGTGGGCGCTGGGTGGTGTGGGCCCATCTTGACTCTCTTGGAGCCC	11347		
Query 421	AAATTTCTCCTGTCAGTTGAAGGAC	446		
Sbjct 11348	AAATTTCTCCTGTCAGTTGAAGGAC	11373		

Figura 24. Alineamiento del producto de amplificación gen *mpo* secuenciado para cadena sentido de la muestra 3, con la secuencia del gen *mpo* disponible en la base de datos Blast.

Igualmente, en el alineamiento del producto de amplificación de PCR de la muestra 3 secuenciada para la cadena complementaria, se obtuvo un 99 % de identidad con la secuencia para MPO que proporciona la base de datos Blast como se observa en la figura 24, mostrando una buena similitud entre las secuencias.

Homo sapiens myeloperoxidase (MPO) gene, complete cds
Sequence ID: [DQ088846.1](#) Length: 15011 Number of Matches: 1

Range 1: 10882 to 11340 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previ

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
843 bits(456)	0.0	458/459(99%)	0/459(0%)	Plus/Plus
Query 3		TGAGGTGAGGTCCTTCCCTCCCTCTATGACCTTGGTTGTGTTGGGAAGGTGGGTTTTCTG		62
Sbjct 10882		TGAGGTGAGGTCCTTCCCTCCCTCTATGACCTTGGTTGTGTTGGGAAGGTGGGTTTTCTG		10941
Query 63		GGCTGCTGGCGATATGTGAATCTTCCCTGCTGTCTCCAGTGACCTCCACCTTGAAGCA		122
Sbjct 10942		GGCTGCTGGCGATATGTGAATCTTCCCTGCTGTCTCCAGTGACCTCCACCTTGAAGCA		11001
Query 123		GAGAGACCTGCCCATAGCCACCTGTCCCTCCCCATGCAGGATACAATGCCGGAGGCG		182
Sbjct 11002		GAGAGACCTGCCCATAGCCACCTGTCCCTCCCCATGCAGGATACAATGCCGGAGGCG		11061
Query 183		CTTCTGTGGGCTCCCGCAGCCTGAAACTGTGGCCAGCTGGGCACGGTGTGAGGAACCT		242
Sbjct 11062		CTTCTGTGGGCTCCCGCAGCCTGAAACTGTGGCCAGCTGGGCACGGTGTGAGGAACCT		11121
Query 243		GAAATTGGCGAGGAAACTGATGGAGCAGTATGGCAGCCCAACAACATCGACATCTGGAT		302
Sbjct 11122		GAAATTGGCGAGGAAACTGATGGAGCAGTATGGCAGCCCAACAACATCGACATCTGGAT		11181
Query 303		GGGCGGCGTGTCCGAGCCTCTGAAGCGCAAAGGCCGCGTGGGCCACTCCTCGCCTGCAT		362
Sbjct 11182		GGGCGGCGTGTCCGAGCCTCTGAAGCGCAAAGGCCGCGTGGGCCACTCCTCGCCTGCAT		11241
Query 363		CATCGGTACCCAGTTTCAGGAAGTCCGGGATGGTGATCGGTGAGGAGGGGCAGGCGTCGT		422
Sbjct 11242		CATCGGTACCCAGTTTCAGGAAGTCCGGGATGGTGATCGGTGAGGAGGGGCAGGCGTCGT		11301
Query 423		GGGCCGCTGGGTGGCTGTGGGCCCATCCGTACTCTCTT	461	
Sbjct 11302		GGGCCGCTGGGTGGCTGTGGGCCCATCCGTACTCTCTT	11340	

Figura 25. Alineamiento del producto de amplificación gen *mpo* secuenciado para cadena complementaria de la muestra 3, con secuencia del gen *mpo* disponible en la base de datos Blast.

A partir del análisis realizado para el alineamiento de cada una de las muestras y sus respectivas cadenas como se mostró anteriormente, se infiere que los resultados obtenidos tanto de los productos de amplificación de PCR como de la secuenciación, mostraron un buen rendimiento; determinando que las condiciones para realizar la PCR fueron las adecuadas y responden a los objetivos planteados de lograr una apropiada estandarización y amplificación de las muestras trabajadas; del mismo modo, la calidad de la secuenciación fue satisfactoria, donde se observó alta identidad para cada secuencia al ser comparada con

las secuencias que proporciona la base de datos Blast , lo cual demuestra que los productos de amplificación son análogos para una región del gen que codifica para la enzima MPO.

5.2.2 Comparación de alineamientos de productos de amplificación secuenciados para una región del gen *mpo* en el programa bioinformático Multalin.

Posteriormente, al comprobar que cada uno de los resultados de secuenciación obtenidos correspondía a una región del gen *mpo*, se realizó el alineamiento entre las tres muestras secuenciadas y la secuencia referente de la base de datos *Homo sapiens* cromosoma 17, GRCh38.p12 Primary Assembly, secuencia de referencia: NC_000017, en el programa bioinformático *Multalin*, con el fin de determinar la presencia de un polimorfismo en una de las muestras problemas con antecedentes de candidiasis, hallando:

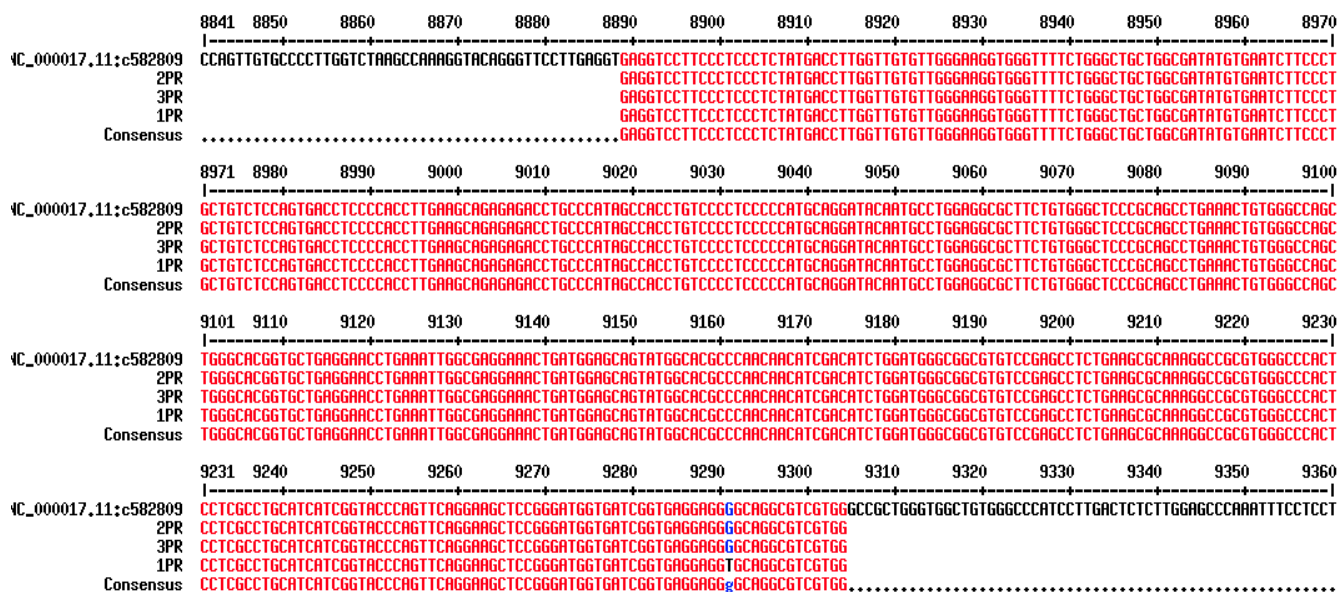


Figura 26. Alineamiento entre los productos de amplificación secuenciados para el gen de la MPO de las cadenas complementarias.

Para el alineamiento realizado entre las cadenas complementarias de las muestras problema, el control negativo y la secuencia referente de la base de datos NCBI para mieloperoxidasa *Homo sapiens* cromosoma 17, GRCh38.p12 Primary Assembly, ocurrió

un cambio en una base nitrogenada de la muestra número uno, correspondiente a un paciente con diagnóstico de candidiasis bucal. Como se observa en la figura 25, ocurre un cambio de timina por guanina referente a un polimorfismo de nucleótido sencillo (PNS), a causa de la sustitución de una base nitrogenada por otra.

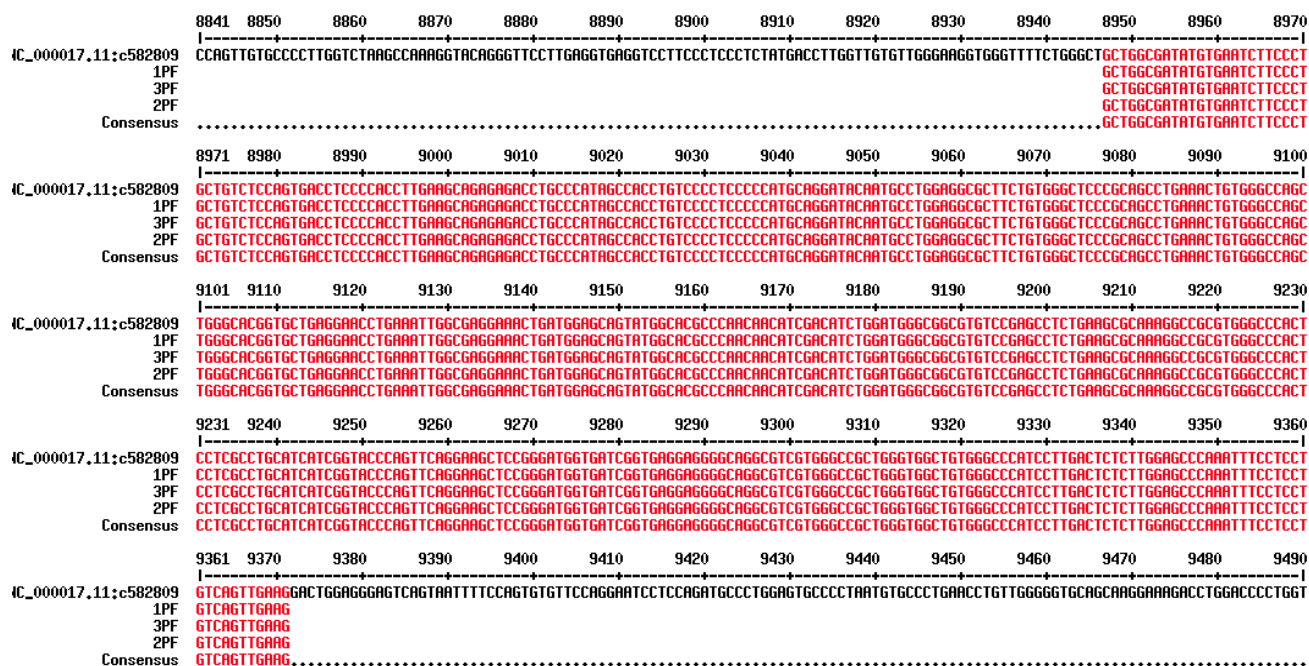


Figura 27. Alineamiento entre los productos de amplificación secuenciados para el gen de la MPO de cadenas sentido (5'-3').

Como se observa en la figura 26, las secuencias son análogas entre sí para la cadena sentido 5'-3', es decir, no existe ningún cambio en pares de bases nitrogenadas; por lo tanto se infiere que tanto las muestras problema, el control negativo y la secuencia referente de la base de datos NCBI para mieloperoxidasa *Homo sapiens* cromosoma 17, GRCh38.p12 Primary Assembly, tienen una identidad igual entre estas y para la región amplificada del gen *mpo* se comparte la misma secuencia en el sentido de la cadena mencionado.

5.2.3 Análisis de electroferogramas de los productos de amplificación de PCR secuenciados de las cadenas complementarias.

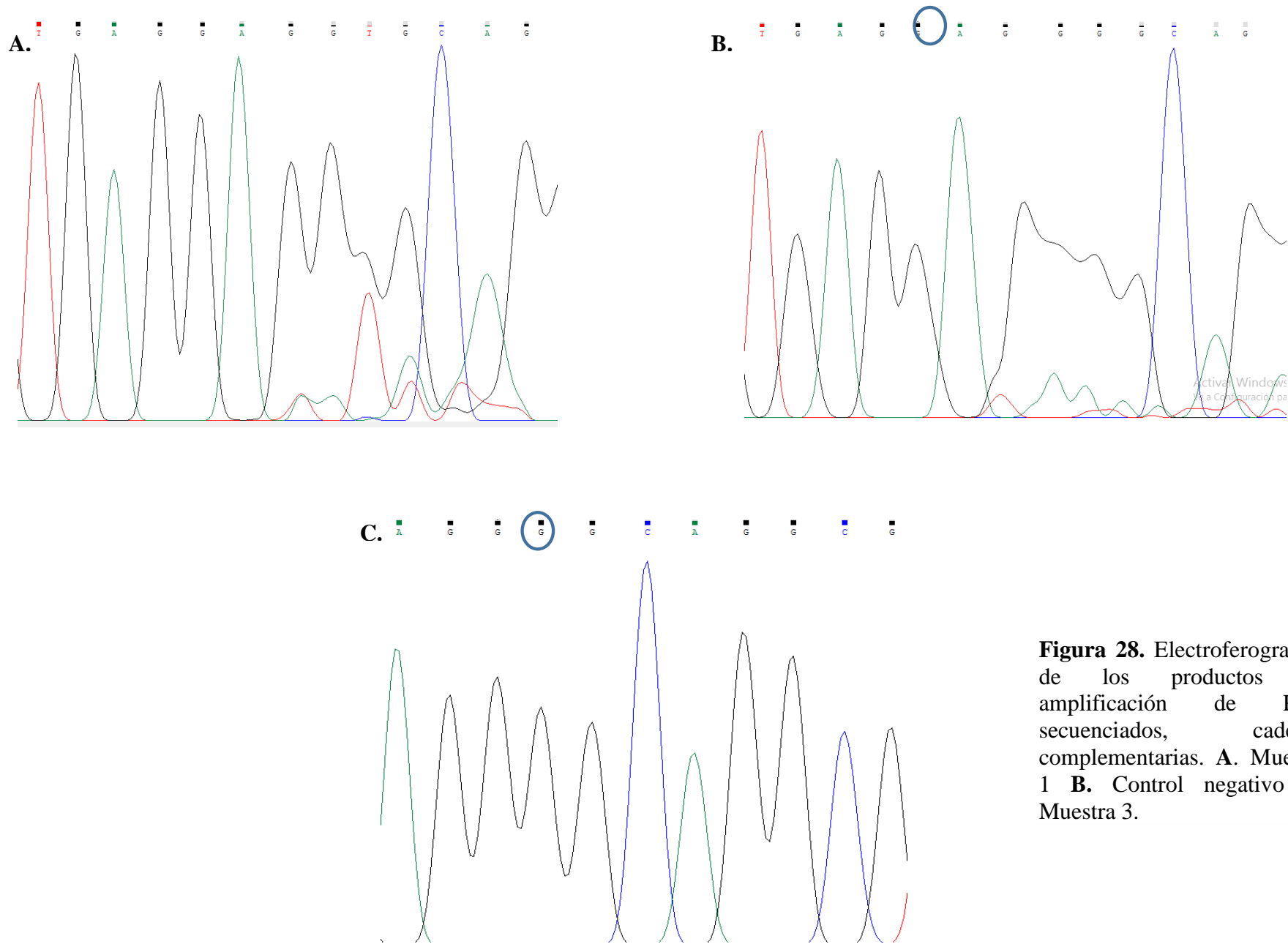


Figura 28. Electroferogramas de los productos de amplificación de PCR secuenciados, cadenas complementarias. **A.** Muestra 1 **B.** Control negativo **C.** Muestra 3.

En el análisis de los electroferogramas para las cadenas complementarias de los productos de amplificación de PCR secuenciados, se encontraron características y diferencias entre estos; como se describió anteriormente se halló un cambio de una base nitrogenada en la muestra número 1 con respecto al control negativo y a la muestra número 3 como se observa en la figura 27; esto se evidenció por la sustitución de una timina por guanina, que está presente originalmente en la cadena complementaria de la región del gen *mpo* amplificada.

Sin embargo; según la página web para interpretación de secuencias, Bioinformatics at COMAV ⁶⁰, se deben tener en cuenta varios parámetros al momento de analizar un electroferograma, como el ruido en la gráfica, la pérdida de resolución y la calidad. Siendo así, al analizar los resultados obtenidos, se observó en general que las secuencias fueron de buena calidad, dado a que la resolución permitió diferenciar cada uno de los picos, además de su alta expresión y señal; no obstante, en las figuras A y B se observó un poco de ruido en la región donde se encuentra la modificación, por tal motivo se cuestionó si realmente la sustitución correspondía a un verdadero cambio; dado a que en la figura A, se llega a confundir el pico que hace la timina con el que intenta hacer la guanina en esa posición; esto puede confirmarse llevando a cabo nuevamente la secuenciación con el fin de verificar si realmente el cambio está presente en la muestra.

5.3 Análisis bioinformático de la región del gen *mpo* amplificado, para determinar la ubicación del polimorfismo hallado en la base de datos NCBI.

Una vez se realizaron los alineamientos, se buscó establecer si el polimorfismo hallado estaba documentado en la base de datos NCBI; para ello, se ubicó la región del gen *mpo* que se amplificó, en el GEN BANK de la sección “Genomic regions, transcripts and products” para la secuencia *Homo sapiens* cromosoma 17, GRCh38.p12 Primary Assembly: NC_000017.

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, la cual tiene un tamaño aproximado de 11080 pb; con base en ello, se hizo el respectivo análisis para determinar si este estaba presente, encontrando:

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

Gene: MPO
 Title: myeloperoxidase
 Location: 5,001,16,080
 Length: 11,080 nt
 [Positional Info]
 Gene position: 9,292

Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs1450589448		
RefSNP	Allele	HGVS Names
Organism: human (<i>Homo sapiens</i>)	SNV: single nucleotide variation	CM000679.2:g.58271644C>T NC_000017.10:g.56349005C>T NC_000017.11:g.58271644C>T NG_009629.1:g.14292G>A NM_000250.1:c.2030+11G>A
Molecule Type: Genomic	RefSNP Alleles: C/T (FWD)	
Created/Updated in build: 151/151	Allele Origin:	
Map to Genome Build: 108/Weight 1	Ancestral Allele: Not available	
Validation Status:	Clinical Significance: NA	

SNP Details are organized in the following sections:

- [GeneView](#) [Map](#) [Submission](#) [Fasta](#) [Resource](#) [Diversity](#) [Validation](#)

Integrated Maps (Hint: click on 'Chr Pos' to see variant in the new NCBI variation viewer)

Assembly	Annotation Release	Chr	Chr Pos	Contig	Contig Pos	SNP to Chr	Contig allele	Contig to Chr	Neighbor SNP	Map Method
GRCh38.p7	108	17	58271644	NT_010783.16	31335664	Fwd	C	Fwd	view	mapup
GRCh37.p13	105	17	56349005	NT_010783.15	21623157	Fwd	C	Fwd	view	blast

GeneView

GeneView via analysis of contig annotation: [MPO](#) myeloperoxidase

View more variation on this gene (click to hide).

Clinical Source: in gene region cSNP has frequency double hit [Go](#)

Primary Assembly Mapping

Assembly	SNP to Chr	Chr	Chr position	Contig	Contig position	Allele
GRCh38.p7	Fwd	17	58271644	NT_010783.16	31335664	C

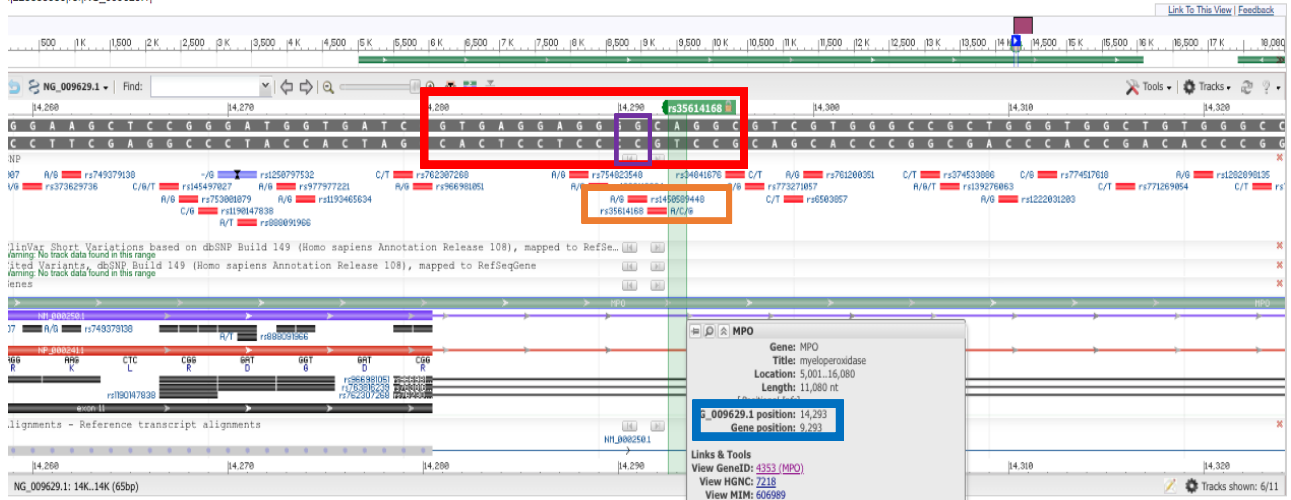
RefSeqGene Mapping

RefSeqGene	Gene (ID)	SNP to RefSeqGene	Position	Allele
NG_009629.1	MPO (4353)	Rev	14292	G

Function class:
 rs1450589448 is located in the intron region of NM_000250.1.

B.

homo sapiens myeloperoxidase (MPO), RefSeqGene (LRG_84) on chromosome 17
 [J23555956(ref/NG_009629.1)]



Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs35614168

RefSNP	Allele	HGVS Names
Organism: human (<i>Homo sapiens</i>)	Variation Class: SNV: single nucleotide variation	CM000679.2:g.58271643G>C CM000679.2:g.58271643G>T
Molecule Type: Genomic	RefSNP Alleles: A/C/G (REV)	NC_000017.10:g.56349004G>C NC_000017.10:g.56349004G>T
Created/Updated in build: 126/151	Allele Origin:	NC_000017.11:g.58271643G>C NC_000017.11:g.58271643G>T
Map to Genome Build: 108/Weight 1	Ancestral Allele: C	NG_009629.1:g.14293C>A NG_009629.1:g.14293C>G
Validation Status:	Variation Viewer: VarView	NM_000250.1:c.2030+12C>A NM_000250.1:c.2030+12C>G
	Clinical Significance: NA	
	MAF/MinorAlleleCount: T=0.0001/17 (ExAC) T=0.0006/3 (1000 Genomes) T=0.0006/8 (GO-ESP) T=0.0004/55 (TOPMED)	...more

SNP Details are organized in the following sections:

- [GeneView](#) [Map](#) [Submission](#) [Fasta](#) [Resource](#) [Diversity](#) [Validation](#)

Integrated Maps (Hint: click on 'Chr Pos' to see variant in the new NCBI variation viewer)

Assembly	Annotation Release	Chr	Chr Pos	Contig	Contig Pos	SNP to Chr	Contig allele	Contig to Chr	Neighbor SNP	Map Method
GRCh38.p7	108	17	58271643	NT_010783.16	31335663	Rev	G	Fwd	view	mapup
GRCh37.p13	105	17	56349004	NT_010783.15	21623156	Rev	G	Fwd	view	blast

GeneView

GeneView via analysis of contig annotation: **MPO** *myeloperoxidase*

- View more variation on this gene (click to hide).
 Clinical Source: in gene region cSNP has frequency double hit

Primary Assembly Mapping

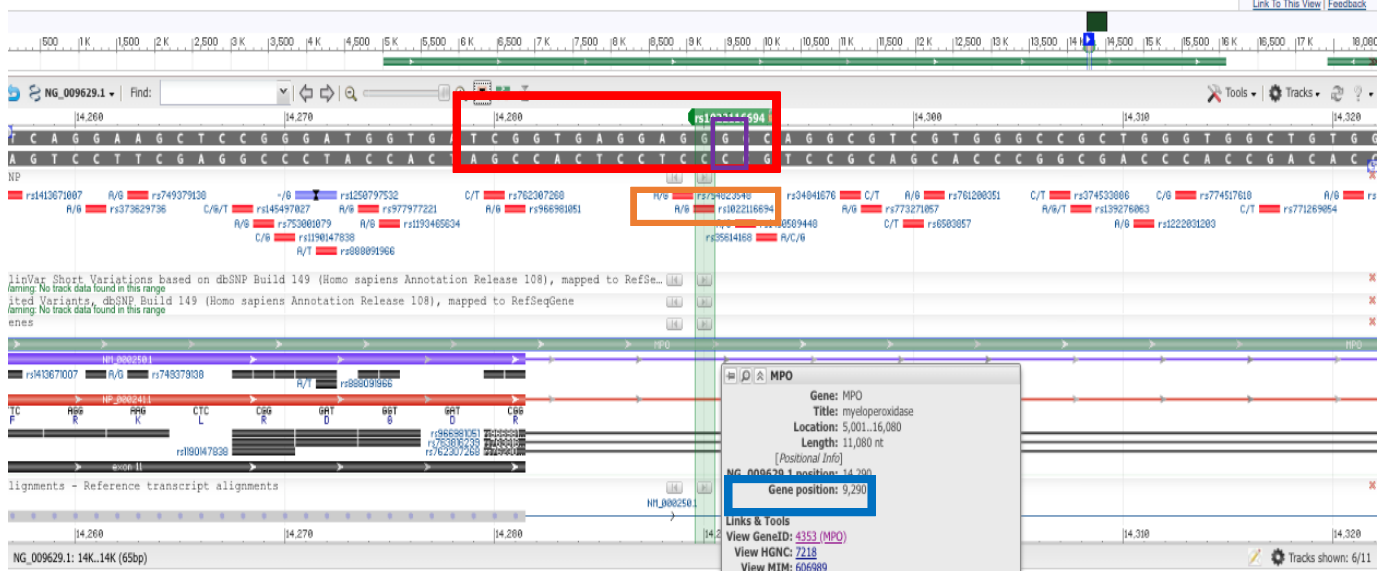
Assembly	SNP to Chr	Chr	Chr position	Contig	Contig position	Allele
GRCh38.p7	Rev	17	58271643	NT_010783.16	31335663	G

RefSeqGene Mapping

RefSeqGene	Gene (ID)	SNP to RefSeqGene	Position	Allele
NG_009629.1	MPO (4353)	Fwd	14293	C

Function class:
 rs35614168 is located in the intron region of NM_000250.1

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



Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs11022116694

RefSNP	Allele	HGVS Names
Organism: human (<i>Homo sapiens</i>)	Variation Class: SNV: single nucleotide variation	CM000679.2:g.58271646C>T
Molecule Type: Genomic	RefSNP Alleles: C/T (FWD)	NC_000017.10:g.56349007C>T
Created/Updated in build: 150/151	Allele Origin:	NC_000017.11:g.58271646C>T
Map to Genome Build: 108/Weight 1	Ancestral Allele: Not available	NC_000017.8:g.56823645C>T
Validation Status:	Variation Viewers: SNV cSNP Indel	NC_000017.9:g.53704006C>T
	Clinical Significance: NA	NG_009629.1:g.14290G>A
	MAF/MinorAlleleCount: T=0.00004/5 (TOPMED)	NM_000250.1:c.2030+9G>A

SNP Details are organized in the following sections:

[GeneView](#) [Map](#) [Submission](#) [Fasta](#) [Resource](#) [Diversity](#) [Validation](#)

Integrated Maps (Hint: click on 'Chr Pos' to see variant in the new NCBI variation viewer)

Assembly	Annotation Release	Chr	Chr Pos	Contig	Contig Pos	SNP to Chr	Contig allele	Contig to Chr	Neighbor SNP	Map Method
GRCh38.p7	108	17	58271646	NT_010783.16	31335666	Fwd	C	Fwd	view	mapup
GRCh37.p13	105	17	56349007	NT_010783.15	21623159	Fwd	C	Fwd	view	blast

GeneView

GeneView via analysis of contig annotation: **MPO** myeloperoxidase

View more variation on this gene (click to hide).

Clinical Source: in gene region cSNP has frequency double hit

Primary Assembly Mapping

Assembly	SNP to Chr	Chr	Chr position	Contig	Contig position	Allele
GRCh38.p7	Fwd	17	58271646	NT_010783.16	31335666	C

RefSeqGene Mapping

RefSeqGene	Gene (ID)	SNP to RefSeqGene	Position	Allele
NG_009629.1	MPO (4353)	Rev	14290	G

Function class:

rs11022116694 is located in the intron region of NM_000250.1.

Figura 29. Análisis bioinformático para la ubicación de polimorfismos en el gen *mpo*. **A.** Polimorfismo rs1450589448 (A9292G) **B.** Polimorfismo rs35614168 (A9293C/G) **C.** rs11022116694 (A9290G). *ubicación del polimorfismo en la región del gen *mpo* (recuadros rojos), ubicación de la base nitrogenada que presenta el polimorfismo hallado

en el presente proyecto (recuadro morado), identificación de los polimorfismos referenciados (recuadro naranja), posición del polimorfismo en la secuencia para el gen *mpo* y significancia clínica (recuadro azul)

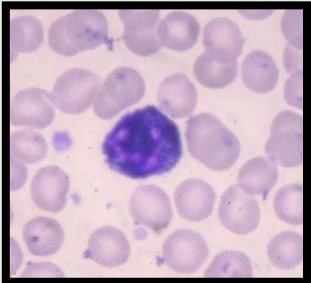
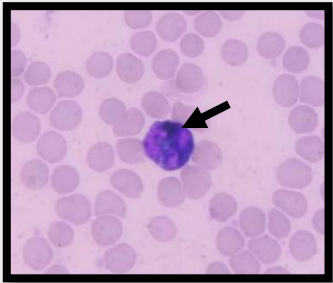
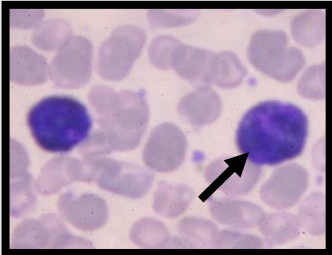
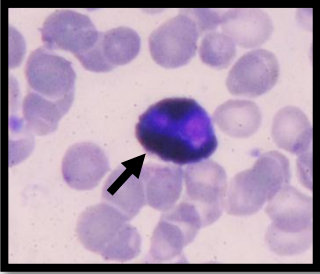
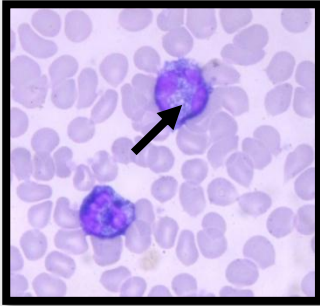
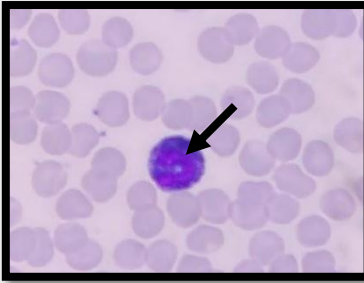
Como se observa en la figura 28, el polimorfismo hallado en la secuenciación realizada en este proyecto no está documentada en la base de datos NCBI; sin embargo, existen otros polimorfismos (SNPs) cercanos a la base nitrogenada en la que se detectó el cambio G9291T. La base de datos GENE NCBI, muestra la presencia de otros polimorfismos como rs11022116694 (A9290G), rs1450589448 (A9292G),rs35614168 (A9293C/G) ubicados en una región no codificante del gen (intrón), por lo que no tiene repercusión en la funcionalidad de la proteína y por ende tampoco significancia clínica; de manera que, si el polimorfismo detectado fuera reportado, su ubicación estaría en la misma región no codificante de los polimorfismos mencionados, determinando que no tendría significancia clínica relevante.

5.4 Comparación de tinción citoquímica y FSP de las muestras en estudio.

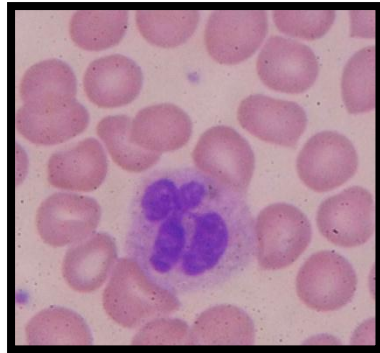
Mediante la tinción citoquímica para MPO, no se observó ausencia o deficiencia de la enzima en ninguna de las muestras; por el contrario, se observaron PMN con buena presencia de la enzima, la cual se visualiza de un color morado intenso en cada célula; sin embargo, esta técnica solo nos permite visualizar cualitativamente la presencia de la enzima MPO, por lo que es posible inferir que, aunque la enzima este presente no significa que sea totalmente funcional. Por otro lado, en los extendidos de sangre periférica se observó la morfología de los neutrófilos sin ninguna alteración morfológica; sin embargo, se halló que la muestra 1 cursaba con cuadro de monocitosis con $0,80 \times 10^3 /\mu\text{l}$ y la muestra 3 presentaba un cuadro de neutrofilia con $7,3 \times 10^3 /\mu\text{l}$ con pocos neutrófilos hipersegmentados lo que es indicativo de respuesta a infecciones.

Del mismo modo, al interpretar los cuadros hemáticos de cada muestra se determinó que todos se encontraban dentro de los valores normales para cada parámetro evaluado, sin alteración alguna. Se prestó atención al recuento de neutrófilos (valor de referencia: $2,0 \times 10^3/\mu\text{L}$ - $8,0 \times 10^3/\mu\text{L}$) dado a que la deficiencia de MPO está relacionada con neutropenia³⁰, sin embargo no se observó en ninguno caso como se muestra en la tabla 12.

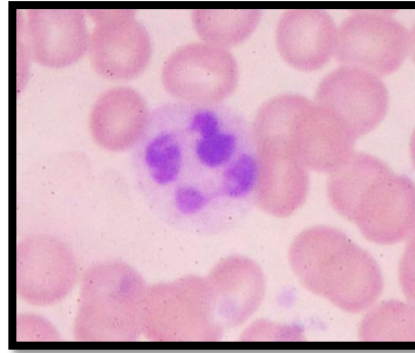
Tabla 11. Tinción citoquímica para MPO y FSP.

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

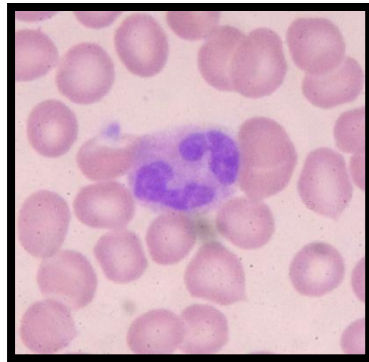
FSP



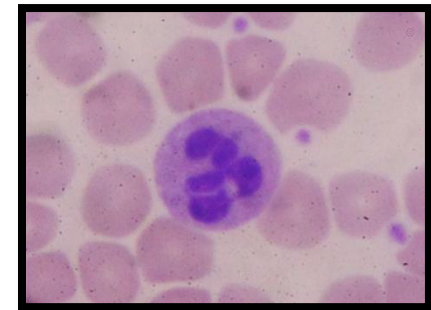
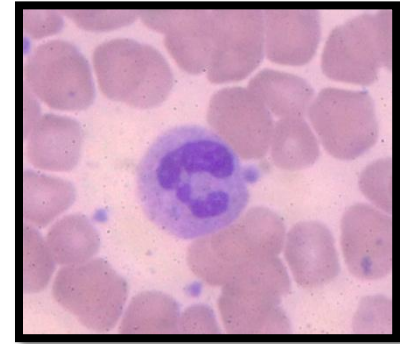
D.



E.



F.



*Observación microscópica de PMN en tinción citoquímica para MPO y frotis de sangre periférica (1000 X) **A, B, C** Presencia de MPO observada de color morado intenso en PMN de las muestras de estudio **D, E, F** Neutrófilos observados en FSP de las diferentes muestras sin alteraciones aparentes.

Tabla 12. Cuadros hemáticos muestras problema y control negativo.

Muestra 1.	Muestra 2 (control negativo).	Muestra 3.																																																																																																																																																																																															
Paciente diagnosticada con Candidiasis bucal	Muestra 2 (control negativo).	Paciente diagnosticada con Candidiasis vulvovaginal																																																																																																																																																																																															
<p>ID Pac.: Nomb.: Coment.: Negativa</p> <p>Sala: Fech. Nac.: ID analiza:</p> <p>DIFF</p> <table border="1"> <tr><td>WBC</td><td>7.24</td><td>[10³/uL]</td><td></td></tr> <tr><td>RBC</td><td>5.06</td><td>[10⁶/uL]</td><td></td></tr> <tr><td>HGB</td><td>14.4</td><td>[g/dL]</td><td></td></tr> <tr><td>HCT</td><td>43.3</td><td>[%]</td><td></td></tr> <tr><td>MCV</td><td>85.6</td><td>[fL]</td><td></td></tr> <tr><td>MCH</td><td>28.5</td><td>[pg]</td><td></td></tr> <tr><td>MCHC</td><td>33.3</td><td>[g/dL]</td><td></td></tr> <tr><td>PLT</td><td>315</td><td>[10³/uL]</td><td></td></tr> <tr><td>RDW-SD</td><td>41.9</td><td>[fL]</td><td></td></tr> <tr><td>RDW-CV</td><td>13.7</td><td>[%]</td><td></td></tr> <tr><td>MPV</td><td>10.8</td><td>[fl]</td><td></td></tr> <tr><td>NEUT</td><td>3.29</td><td>[10³/uL]</td><td>45.4 [%]</td></tr> <tr><td>LYMPH</td><td>2.81</td><td>[10³/uL]</td><td>38.8 [%]</td></tr> <tr><td>MONO</td><td>0.75</td><td>[10³/uL]</td><td>10.4 [%]</td></tr> <tr><td>EO</td><td>0.35</td><td>[10³/uL]</td><td>4.8 [%]</td></tr> <tr><td>BASO</td><td>0.04</td><td>[10³/uL]</td><td>0.6 [%]</td></tr> </table> <p>RBC</p>	WBC	7.24	[10 ³ /uL]		RBC	5.06	[10 ⁶ /uL]		HGB	14.4	[g/dL]		HCT	43.3	[%]		MCV	85.6	[fL]		MCH	28.5	[pg]		MCHC	33.3	[g/dL]		PLT	315	[10 ³ /uL]		RDW-SD	41.9	[fL]		RDW-CV	13.7	[%]		MPV	10.8	[fl]		NEUT	3.29	[10 ³ /uL]	45.4 [%]	LYMPH	2.81	[10 ³ /uL]	38.8 [%]	MONO	0.75	[10 ³ /uL]	10.4 [%]	EO	0.35	[10 ³ /uL]	4.8 [%]	BASO	0.04	[10 ³ /uL]	0.6 [%]	<p>ID Pac.: Nomb.: Coment.: Negativa</p> <p>Sala: Fech. Nac.: ID anal:</p> <p>DIFF</p> <table border="1"> <tr><td>WBC</td><td>7.49</td><td>[10³/uL]</td><td></td></tr> <tr><td>RBC</td><td>5.42</td><td>[10⁶/uL]</td><td></td></tr> <tr><td>HGB</td><td>16.2</td><td>[g/dL]</td><td></td></tr> <tr><td>HCT</td><td>47.3</td><td>[%]</td><td></td></tr> <tr><td>MCV</td><td>87.3</td><td>[fL]</td><td></td></tr> <tr><td>MCH</td><td>29.9</td><td>[pg]</td><td></td></tr> <tr><td>MCHC</td><td>34.2</td><td>[g/dL]</td><td></td></tr> <tr><td>PLT</td><td>543</td><td>[10³/uL]</td><td></td></tr> <tr><td>RDW-SD</td><td>40.5</td><td>[fL]</td><td></td></tr> <tr><td>RDW-CV</td><td>12.6</td><td>[%]</td><td></td></tr> <tr><td>MPV</td><td>8.6</td><td>[fL]</td><td></td></tr> <tr><td>NEUT</td><td>4.04</td><td>[10³/uL]</td><td>54.0 [%]</td></tr> <tr><td>LYMPH</td><td>2.66</td><td>[10³/uL]</td><td>35.5 [%]</td></tr> <tr><td>MONO</td><td>0.62</td><td>[10³/uL]</td><td>8.3 [%]</td></tr> <tr><td>EO</td><td>0.13</td><td>[10³/uL]</td><td>1.7 [%]</td></tr> <tr><td>BASO</td><td>0.04</td><td>[10³/uL]</td><td>0.5 [%]</td></tr> </table> <p>RBC</p>	WBC	7.49	[10 ³ /uL]		RBC	5.42	[10 ⁶ /uL]		HGB	16.2	[g/dL]		HCT	47.3	[%]		MCV	87.3	[fL]		MCH	29.9	[pg]		MCHC	34.2	[g/dL]		PLT	543	[10 ³ /uL]		RDW-SD	40.5	[fL]		RDW-CV	12.6	[%]		MPV	8.6	[fL]		NEUT	4.04	[10 ³ /uL]	54.0 [%]	LYMPH	2.66	[10 ³ /uL]	35.5 [%]	MONO	0.62	[10 ³ /uL]	8.3 [%]	EO	0.13	[10 ³ /uL]	1.7 [%]	BASO	0.04	[10 ³ /uL]	0.5 [%]	<p>RESULTADOS</p> <p>FECHA: 04/09/2018 ID: 1024496641 Habr. SEC.: 2 - 3 ERROR ENCENDIDO. CONFIRMAR REACTIVOS</p> <p>Alarmas PLT: MIC</p> <table border="1"> <tr><td>LEU</td><td>9.3</td><td>10⁷/mm³</td><td>(3.3 - 10.0)</td><td>UCM</td><td>56</td><td>um³</td></tr> <tr><td>ERI</td><td>4.72</td><td>10⁶/mm³</td><td>(3.8 - 5.0)</td><td>HCM</td><td>28.9</td><td>pg</td></tr> <tr><td>Hb</td><td>13.6</td><td>g/dl</td><td>(11.4 - 15.2)</td><td>CCPM</td><td>33.6</td><td>g/dl</td></tr> <tr><td>HTC</td><td>40.4</td><td>%</td><td>(31.0 - 50.2)</td><td>TEC</td><td>12.4</td><td>%</td></tr> <tr><td>PLT</td><td>275</td><td>10⁹/mm³</td><td>(180 - 380)</td><td>MPV</td><td>7.7</td><td>um³</td></tr> <tr><td>PTE</td><td>0.211</td><td>%</td><td>(0.10 - 0.30)</td><td>CV</td><td>0.0</td><td>%</td></tr> </table> <p>DIFF:</p> <table border="1"> <tr><td>NEUT</td><td>22.5</td><td>%</td><td>(17.0 - 40.0)</td><td>BLD</td><td>2.0</td><td>10⁹/mm³</td></tr> <tr><td>LYMPH</td><td>3.0</td><td>%</td><td>(4.0 - 10.0)</td><td>ANC</td><td>0.7</td><td>10⁹/mm³</td></tr> <tr><td>MONO</td><td>73.7</td><td>%</td><td>(4.0 - 5.0)</td><td>RBC</td><td>7.0</td><td>H 10⁹/mm³</td></tr> </table> <p>LEU ERI PLT</p>	LEU	9.3	10 ⁷ /mm ³	(3.3 - 10.0)	UCM	56	um ³	ERI	4.72	10 ⁶ /mm ³	(3.8 - 5.0)	HCM	28.9	pg	Hb	13.6	g/dl	(11.4 - 15.2)	CCPM	33.6	g/dl	HTC	40.4	%	(31.0 - 50.2)	TEC	12.4	%	PLT	275	10 ⁹ /mm ³	(180 - 380)	MPV	7.7	um ³	PTE	0.211	%	(0.10 - 0.30)	CV	0.0	%	NEUT	22.5	%	(17.0 - 40.0)	BLD	2.0	10 ⁹ /mm ³	LYMPH	3.0	%	(4.0 - 10.0)	ANC	0.7	10 ⁹ /mm ³	MONO	73.7	%	(4.0 - 5.0)	RBC	7.0	H 10 ⁹ /mm ³
WBC	7.24	[10 ³ /uL]																																																																																																																																																																																															
RBC	5.06	[10 ⁶ /uL]																																																																																																																																																																																															
HGB	14.4	[g/dL]																																																																																																																																																																																															
HCT	43.3	[%]																																																																																																																																																																																															
MCV	85.6	[fL]																																																																																																																																																																																															
MCH	28.5	[pg]																																																																																																																																																																																															
MCHC	33.3	[g/dL]																																																																																																																																																																																															
PLT	315	[10 ³ /uL]																																																																																																																																																																																															
RDW-SD	41.9	[fL]																																																																																																																																																																																															
RDW-CV	13.7	[%]																																																																																																																																																																																															
MPV	10.8	[fl]																																																																																																																																																																																															
NEUT	3.29	[10 ³ /uL]	45.4 [%]																																																																																																																																																																																														
LYMPH	2.81	[10 ³ /uL]	38.8 [%]																																																																																																																																																																																														
MONO	0.75	[10 ³ /uL]	10.4 [%]																																																																																																																																																																																														
EO	0.35	[10 ³ /uL]	4.8 [%]																																																																																																																																																																																														
BASO	0.04	[10 ³ /uL]	0.6 [%]																																																																																																																																																																																														
WBC	7.49	[10 ³ /uL]																																																																																																																																																																																															
RBC	5.42	[10 ⁶ /uL]																																																																																																																																																																																															
HGB	16.2	[g/dL]																																																																																																																																																																																															
HCT	47.3	[%]																																																																																																																																																																																															
MCV	87.3	[fL]																																																																																																																																																																																															
MCH	29.9	[pg]																																																																																																																																																																																															
MCHC	34.2	[g/dL]																																																																																																																																																																																															
PLT	543	[10 ³ /uL]																																																																																																																																																																																															
RDW-SD	40.5	[fL]																																																																																																																																																																																															
RDW-CV	12.6	[%]																																																																																																																																																																																															
MPV	8.6	[fL]																																																																																																																																																																																															
NEUT	4.04	[10 ³ /uL]	54.0 [%]																																																																																																																																																																																														
LYMPH	2.66	[10 ³ /uL]	35.5 [%]																																																																																																																																																																																														
MONO	0.62	[10 ³ /uL]	8.3 [%]																																																																																																																																																																																														
EO	0.13	[10 ³ /uL]	1.7 [%]																																																																																																																																																																																														
BASO	0.04	[10 ³ /uL]	0.5 [%]																																																																																																																																																																																														
LEU	9.3	10 ⁷ /mm ³	(3.3 - 10.0)	UCM	56	um ³																																																																																																																																																																																											
ERI	4.72	10 ⁶ /mm ³	(3.8 - 5.0)	HCM	28.9	pg																																																																																																																																																																																											
Hb	13.6	g/dl	(11.4 - 15.2)	CCPM	33.6	g/dl																																																																																																																																																																																											
HTC	40.4	%	(31.0 - 50.2)	TEC	12.4	%																																																																																																																																																																																											
PLT	275	10 ⁹ /mm ³	(180 - 380)	MPV	7.7	um ³																																																																																																																																																																																											
PTE	0.211	%	(0.10 - 0.30)	CV	0.0	%																																																																																																																																																																																											
NEUT	22.5	%	(17.0 - 40.0)	BLD	2.0	10 ⁹ /mm ³																																																																																																																																																																																											
LYMPH	3.0	%	(4.0 - 10.0)	ANC	0.7	10 ⁹ /mm ³																																																																																																																																																																																											
MONO	73.7	%	(4.0 - 5.0)	RBC	7.0	H 10 ⁹ /mm ³																																																																																																																																																																																											

6. Discusión

La respuesta inmune innata que desencadena el organismo frente a infecciones por microorganismos, resulta en la activación de diversos sistemas antimicrobianos cuya función principal es trabajar en conjunto con diferentes compuestos, siendo uno de ellos el sistema MPO- H₂O₂- Haluros; Klebanoff et al, uno de los primeros en estudiarlo informó que los iones de MPO, H₂O₂, y haluros lograban formar un poderoso sistema antimicrobiano en los neutrófilos, fue desde entonces que surgió el interés por entender el mecanismo que desencadenaban diferentes células inmunológicas^{9,16}; sin embargo, si existe falla o deficiencia de algún compuesto altera la eficiencia antimicrobiana ejercida por estas células, como lo es la mieloperoxidasa, enzima de interés en este estudio, está involucrada en este sistema microbicida.

En estudios realizados por Klebanoff et al, se describió que una posible alteración de la enzima MPO podría causar una disfunción o deficiencia de la misma y por tanto podía dar lugar a susceptibilidad de infecciones, siendo una la candidiasis; posteriormente, esto fue apoyado por diversos estudios realizados, como es el caso de Pahwa et al, quienes describieron diferentes polimorfismos y mutaciones que actuaban en la efectividad de la enzima^{16,26}.

Por tal motivo, durante en este proyecto, se buscó identificar la presencia de un polimorfismo en una región del gen *mpo* en pacientes que hubiesen cursado por episodios de candidiasis recurrente, dado a que en Colombia no se han realizado investigaciones relacionadas a este determinante inmunológico^{5,59}; sin embargo, un limitante de la investigación fue la dificultad para conseguir una gran cantidad de muestras que pudiesen otorgar mayor certeza de encontrar un polimorfismo en el gen *mpo*.

No obstante, mediante la aplicación de diferentes técnicas, como la comparación de kits de extracción de ADN, la estandarización de la PCR para la amplificación del gen de interés, la secuenciación de los productos amplificados, análisis bioinformáticos de los

resultados obtenidos y tinción para MPO se lograron obtener resultados satisfactorios frente a lo propuesto.

Inicialmente, se quiso comparar dos kits de extracción de ADN para verificar cuál de los dos suministraba mejor concentración, estabilidad y pureza del ADN; ya que, a partir de esto, según la calidad del ADN obtenido se esperaba un buen rendimiento del mismo en los ensayos posteriores. Se demostró que los dos kits permitían un proceso de extracción simple y rápido; sin embargo, se estableció que el kit The Wizard Genomic DNA Purification Kit- Promega corporation, que utiliza el método de salting out, mostró una mejor pureza del ADN una vez este se cuantificó, dado a que al ser medido en las densidades ópticas de 260 y 280 en la cuantificación (D.O.260: D.O.280) los resultados de las tres muestras estuvieron entre 1,8 a 2, un valor indicativo de buena calidad y ausencia de contaminación^{58,64.}; además la concentración de ADN de cada muestra fue significativa para la realización de la PCR y posterior secuenciación, obteniendo valores mayores de 100 ng/μl que permitieron realizar diferentes diluciones; de allí se determinó emplear este kit para extracción de ADN de muestras sanguíneas⁵⁸.

Así mismo, se logró cumplir el objetivo de estandarizar la técnica de PCR convencional para la amplificación del gen *mpo*; que se fundamentó en hacer variaciones de concentraciones de diferentes reactivos, tanto de primers, MgCl₂ y ADN siendo necesario establecer valores en los cuales se observara un buen rendimiento y especificidad de estos; para ello, se manejaron diluciones seriadas para cada reactivo. Para comenzar, se estableció la concentración de ADN a manejar; allí se utilizó el ADN de la muestra N° 3 que mostró mejor concentración (181,7 ng/μl) y pureza (1,89) frente a las demás muestras, permitiendo realizar diluciones 1/2, 1/4 y 1/6, determinando que una concentración menor a 50 ng/μl de ADN es adecuada para su amplificación.

Del mismo modo, para establecer la concentración de MgCl₂ el cual proporciona una correcta actividad de la enzima Taq-polimerasa actuando como cofactor de esta, se llevaron a cabo diluciones seriadas para establecer la concentración idónea en su rendimiento, dado a que a altas concentraciones de MgCl₂ se puede disminuir la especificidad de la enzima,

es decir, este no logra trabajar en conjunto con la Taq-polimerasa, obstaculizando su actividad; por otro lado, a bajas concentraciones, este puede aumentar la especificidad, es decir, el $MgCl_2$ no logra equilibrar y controlar la actividad de la enzima, permitiendo que pegue todo a la cadena de ADN ⁵⁹, de tal forma es importante establecer una adecuada concentración para su óptimo rendimiento, en este caso fue de 2mM.

Por otro lado, la evaluación de los primers se realizó mediante titulación de los mismos para encontrar la concentración idónea, con el objetivo de evitar la presencia de productos inespecíficos durante la PCR; así mismo, se estableció la temperatura de anillaje para esta, la cual está relacionada directamente con la temperatura Melting de los primers diseñados, porque esta señala la especificidad de cada uno, es decir, si la temperatura de anillamiento es muy baja, se obtendrá una PCR menos específica, si por el contrario es alta, la especificidad será mayor, pero si llega a sobrepasar la temperatura que logran soportar los primers, no se amplificará nada, puesto que la unión de los oligonucleótidos con sus sitios complementarios será poco estable y la polimerasa no podrá iniciar la síntesis, por lo que es de gran importancia resaltar tanto la concentración de los primers como la temperatura en la que los primers logran pegarse a la cadena para su iniciar la síntesis de ADN ^{58,59}.

En la estandarización de la PCR convencional para la amplificación del gen *mpo*, se concluye que los resultados obtenidos fueron satisfactorios porque se logró determinar concentraciones adecuadas de cada reactivo y un producto de amplificación óptimo de acuerdo a las condiciones tanto químicas como térmicas a las que fue sometido el ADN, por ende se establece que la PCR estandarizada funciona para posteriores ensayos en los que se quiera obtener un producto de amplificación para el gen trabajado.

Del mismo modo, los resultados de la secuenciación mostraron una buena obtención de la misma, en donde se obtuvo nulo o poco ruido en las gráficas, alta resolución y buena calidad; parámetros importantes para realizar una correcta interpretación⁶⁰. De acuerdo a esto, se determinó que tanto la extracción de ADN como la PCR realizada fueron ejecutadas correctamente, por lo tanto, dieron lugar a un buen proceso de secuenciación.

Todas las secuencias fueron evaluadas mediante análisis bioinformático para alineamiento, donde cada una presentó analogía entre un 99- 100%; sin embargo, se pudo hallar un cambio en una de las bases nitrogenadas (G9291T) en la cadena complementaria para la muestra 1 (paciente con candidiasis bucal) , lo que permitió inferir que se trataba de un polimorfismo y que este era consecuente con la calidad de la secuencia, es decir, posiblemente no se trata de una modificación causada por algún factor de contaminación o error en la secuenciación debido al comportamiento que experimentan los picos de cada base nitrogenada en el electroferograma.

Con base en lo anterior, el polimorfismo hallado (G9291T), al ser comparado con lo reportado en la literatura por parte de diferentes autores como Pahwa r et al , Zhang, T et al, Ding G et al, Persad AS et al, entre otros; quienes describieron polimorfismos en el gen *mpo* como “R569W, M251T, G463A, R499C” los cuales están involucrados en la modificación de codones que codifican para aminoácidos diferentes y repercuten en la maduración de la enzima MPO, demuestra que los estudios anteriores se han realizado en la primera región del gen en comparación al presente estudio, donde se tuvo en cuenta aproximadamente la región final del gen, encontrando gran variabilidad polimórfica en la región analizada; esto nos direcciona a estudiar diversas regiones del gen *mpo* con el objetivo de determinar la presencia de otros polimorfismos que puedan estar involucrados en la alteración de la enzima en estudio^{26,40, 41,46,54.}

Además, se realizó un análisis bioinformático en la base de datos NCBI que permitió establecer la ubicación específica del cambio hallado en una región del gen; este está presente en una región no codificante, es decir, en un intrón el cual no tiene la capacidad de codificar la proteína y además no es expresado en el producto final del ARN mensajero (mRNA)⁴³ como han sido descritos polimorfismos anteriormente mencionados, que si tienen la capacidad de alterar la función de la proteína. Por lo tanto, se esperaba que el polimorfismo encontrado no tenga importancia clínica frente al problema de deficiencia de MPO; sin embargo, al hallar una gran cantidad de polimorfismos documentados en la base de datos específicamente en esta misma región, se estableció que el polimorfismo hallado

no está reportado pero podría incluirse si se comprueba que se trata de una verdadera modificación.

Por otro lado, durante los diversos análisis bioinformáticos se determinó que la región amplificada junto con el rendimiento de los primers permitieron localizar una región en la que se encuentran tanto intrones como exones, como se observa en la figura 29, dado a que allí existe una región (barra negra) que corresponde a un exón el cual presenta diversos polimorfismos involucrados en la modificación de una aminoácido a causa de un cambio en una base nitrogenada, por lo tanto valdría la pena profundizar e investigar si alguno de estos polimorfismos tiene repercusión en la funcionalidad y deficiencia de la enzima MPO, destacando una nueva región por estudiar diferente a lo que se ha informado según la literatura.

Finalmente, los resultados obtenidos con la tinción citoquímica para MPO mostraron buena cantidad de la enzima MPO en los PMN de cada muestra como se observó en la tabla número 11; además, los reportes tanto de cuadros hemáticos como de frotis de sangre periférica no mostraron alteración en los valores hematológicos para cada paciente, pues se esperaría que estos al cursar con episodios de infecciones recurrentes, en este caso candidiasis, estuvieran relacionados con casos de neutropenia, como lo describe Aratani et al. quienes han estudiado que pacientes que cursan con deficiencia de MPO pueden presentar episodios de neutropenia que los condiciona en mayor proporción a contraer infecciones fúngicas y además los neutrófilos MPO-deficientes matan diferentes especies de microorganismos más lentamente que los PMN normales ⁵²; Del mismo modo, se ha reportado que la presencia de la enzima no llega a ser indicativo de que esta sea funcionalmente activa, pero está presente cualitativamente en los PMN^{16, 26}.

7. Conclusiones

A partir del desarrollo de este proyecto, se concluye que la mieloperoxidasa juega un papel fundamental en la activación de un sistema microbicida altamente potente capaz de destruir gran variedad de microorganismos; pero pueden llegar a presentarse alteraciones a nivel enzimático que generan un bajo rendimiento de la actividad enzimática como resultado de múltiples factores, como los cambios genéticos, incluido la presencia de polimorfismos, que conlleva a la recurrencia de infecciones, como lo es la candidiasis, patología de interés en el presente proyecto. Sin embargo, en Colombia, no se han desarrollado estudios sobre esto, a pesar de que hay una gran incidencia de infecciones de candidiasis en el país, dado a que no se realiza seguimiento de posibles factores involucrados en la adquisición de la infección y no existe un reporte significativo de la incidencia de la infección.

Por otro lado, 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, destacando el buen rendimiento de los primers diseñados, la estandarización y amplificación de la técnica de PCR; donde se logró comparar la similitud entre la secuenciación de cadena obtenida con la secuencia disponible en la base de datos NCBI; destacando la importancia del uso de herramientas informáticas que permiten hacer un análisis comparativo entre los resultados obtenidos en la práctica con fundamentos teóricos desarrollados anteriormente.

Queda un campo abierto de investigación hacia la búsqueda de polimorfismos involucrados en cambios genéticos que alteran la funcionalidad de la MPO, con la posibilidad de estudio de una mayor cantidad de muestras dado a la baja incidencia con que se presentan estos polimorfismos de de 1-4,000 personas, principalmente en nuestra población.

Referencias

1. Kullberg BJ, Arendrup MC. Invasive Candidiasis. N Engl J Med [Internet]. 2015;373(15):1445-56. Disponible en: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1315399>
2. Sánchez EA. Diagnostico de candidiasis y candidemia en neonatos [Internet]. 2009. p. 40-8. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis332.pdf>
3. Plantinga TS, Johnson MD, Scott WK, Van De Vosse E, Velez Edwards DR, Smith PB, et al. Toll-like receptor 1 polymorphisms increase susceptibility to candidemia. J Infect Dis. 2012;205(6):934-43.
4. [facmed.unam.mx](http://www.facmed.unam.mx) [Internet]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; [Última modificación 4 enero 2016; citado 03 may 2018]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/candidosis.html>
5. Quindós G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. Rev Iberoam Micol [Internet]. 2014;31(1):42-8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.001>
6. Pappas PG. Invasive Candidiasis. Infect Dis Clin North Am. 2006;20(3):485-506.
7. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. Lancet. 2007;369(9577):1961-71.
8. Pemán J, Quindós G. Aspectos actuales de las enfermedades invasoras causadas por Candida y otros hongos levaduriformes. Rev Iberoam Micol

[Internet]. 2016;33(3):133-9. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2015.10.001>

9. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2005;77(5):598-625. Disponible en:
<http://www.jleukbio.org/cgi/doi/10.1189/jlb.1204697>
10. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2013;13(3):159-75. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3399>
11. Nauseef WM. Myeloperoxidase in human neutrophil host defence. *Cell Microbiol*. 2014;16(8):1146-55.
12. Cassone A. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: Pathogenesis, immunity and vaccine prospects. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2015;122(6):785-94.
13. Cararach Tur M, Comino Delgado R, Davi Armengol E, Marimon García E, Martínez Escoriza JC, Palacios Gil-Antuñano S, et al. La vulvovaginitis candidiásica recurrente. *Progresos Obstet y Ginecol*. 2013;56(2):108-16.
14. Duque CM, Uribe OL, Soto AF, Alarcón J. Candidiasis vulvovaginal en un grupo mujeres gestantes de Medellín. *Infectio* [Internet]. 2009;13(1):14-20. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0123939209701390>
15. Yano J, Peters BM, Noverr MC, Fidel PL. Novel mechanism behind the immunopathogenesis of vulvovaginal candidiasis: «neutrophil anergy». *Infect Immun*. 2018;86(3).

16. Klebanoff SJ, Kettle AJ, Rosen H, Winterbourn CC, Nauseef WM. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2013;93(2):185-98. Disponible en: <http://www.jleukbio.org/cgi/doi/10.1189/jlb.0712349>

17. Caratachea MAC. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Rev del Inst Nac Enfermedades Respir*. 2007;20(3):213-21.

18. Otero RE, Peñamaría MM, Rodríguez PM, Martín BB. Candidiasis oral en el paciente mayor. *Av Odontoestomatol*. 2015;31(3):135-48.

19. Gutiérrez HB, Machín MO, González JS, Arteaga DY. Candidiasis Invasora , presentación y evolución de un caso clínico . 4:1-7.

20. Homme M, Tateno N, Miura N, Ohno N, Aratani Y. Myeloperoxidase deficiency in mice exacerbates lung inflammation induced by nonviable *Candida albicans*. *Inflamm Res*. 2013;62(11):981-90.

21. Cuenca-Estrella M. Infecciones por candida spp. infecciones superficiales y profundas. *Med - Programa Form Médica Contin* [Internet]. 2002;8(68):3615-24. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304541202706756>

22. Paz Cabrera González V, Marcela Hernández Ríos Mauricio Garrido Flores D, García Sesnich J. Dientes Con Periodontitis Apical Asintomática (Paa) Y Absceso Apical Agudo (Aaa).

23. Rodríguez ortega judy, miranda tarragó josefa, morejón lugones haydée, santana garay julio c. candidiasis de la mucosa bucal: revisión bibliográfica. *rev cubana estomatol* [internet]. 2002 ago [citado 2018 ago 01] ; 39(2): 187-

233. disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0034-75072002000200007&lng=es
24. Guadalupe N, Mancera I, Bonilla CR, Ayala JL. de prótesis dentales en pacientes de la Clínica Odontológica. 2017;74(2):74-8.
25. Staines A, Gonzalez M, Guidos H, Hernandez V, Espinosa F. Inmunodeficiencias por alteraciones en las células fagocitarias: Un desafío para la pediatría. *Alergia, Asma e inmunología pediátricas*. 2005; 14 (1): 5-9.
26. Pahwa R, Jialal I. Myeloperoxidase deficiency. [updated 2017 Dec 17]. in: StatPearls [internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018 Jan-. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/nbk470278/>
27. Serrato Díaz A, Flores Rentería L, Aportela Cortez J, Sierra Palacios E. PCR: reacción en cadena. *Herramientas Mol Apl en Ecol Teor y prácticos*. 2014;53-74.
28. Strzepa A, Pritchard KA, Dittel BN. Myeloperoxidase: A new player in autoimmunity. *Cell Immunol*. 2017;317(January):1-8.
29. Murillo S. Incidencia de Candidiasis Vaginal en mujeres gestantes entre las edades comprendidas de 20 a los 35 años de edad atendidas en el Hospital Verdi Cevallos Balda de la ciudad de Portoviejo, 2012-2013. 2013;70. Disponible en: http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/1786/1/Tesis_Sandra_Murillo.pdf
30. Ynca J, Especies de candida implicadas en candidiasis pseudomembranosa bucal, en pacientes con cáncer de cabeza y cuello sometidos a radioterapia, del Instituto Nacional de enfermedades neoplásicas y Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins [Para obtener el título profesional de cirujano dentista]. Lima: Universidad Nacional Myor de San Marcos : 2005

31. Pineda J, Cortés AÁ, Uribarrem T del N Jesus, Castañón LR. Artículo de Revisión Candidosis vaginal. Revisión de la literatura y situación de México y otros países latinoamericanos. Rev Médica Risaralda. 2017;23(1):38-44.
32. Pemán J, Quindós G. Aspectos actuales de las enfermedades invasoras causadas por Candida y otros hongos levaduriformes. Rev Iberoam Micol [Internet]. 2016;33(3):133-9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2015.10.001>
33. Silk H. Diseases of the mouth. Prim Care - Clin Off Pract [Internet]. 2014;41(1):75-90. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pop.2013.10.011>
34. Universitario H, Samaritana DELA, Jiménez LF, Granados CE. Índice. 2012;
35. Izquierdo, G., & Santolaya, M. E. (2014). Candidiasis invasoras en recién nacidos: diagnóstico, tratamiento y prevención. Revista Chilena de Infectología, 31(1), 73–83. doi:10.4067/s0716-10182014000100011
36. Alburquenque C, Tapia C V. Interacción Candida albicans -Hospedero : un proceso complejo en el que la inmunidad innata juega un importante papel. Bol Micol. 2013;28(2):37-47.
37. Otero Rey, E., Peñamaría Mallón, M., Rodríguez Piñón, M., Martín Biedma, B., & Blanco Carrión, A. (2015). Candidiasis oral en el paciente mayor. Avances En Odontoestomatología, 31(3), 135–148. doi:10.4321/s0213-12852015000300004
38. Vélez Tobón Gabriel Jaime, Rocha Arrieta Yermis Carolina, Arias Sierra Andrés Augusto, López Quintero Juan Álvaro. Función del sistema NADPH oxidasa en la formación de trampas extracelulares de los neutrófilos (NETs).

Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter [Internet]. 2016 Mar [citado 2018 Ago 29] ; 32(1): 43-56. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892016000100005&lng=es.

39. Microbiología e inmunología [internet] México: Universidad de Carolina del Sur, Instituto Politecnico Nacional. Disponible en: <http://www.microbiologybook.org/Spanish-immuno/imm-chapter1.htm>
40. DeLeo FR, Goedken M, McCormick SJ, Nauseef WM. A novel form of hereditary myeloperoxidase deficiency linked to endoplasmic reticulum/proteasome degradation. *J Clin Invest*. 1998;101(12):2900-9.
41. Nauseef WM, Cogley M, McCormick S. Effect of the R569W missense mutation on the biosynthesis of myeloperoxidase. *J Biol Chem*. 1996;271(16):9546-9.
42. Nauseef WM, McCormick S, Goedken M. Impact of missense mutations on biosynthesis of myeloperoxidase. *Redox Rep [Internet]*. 2000;5(4):197-206. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/135100000101535753>
43. Khan academy [Internet] Secuenciación de AND; 2018 Disponible en: <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/dna-sequencing>
44. Pinilla G, Cruz A, Chavarro B. Herramientas de bioinformática en la web, descripción y aplicaciones.
45. Shendure J, Balasubramanian S, Church GM, Gilbert W, Rogers J, Schloss JA, et al. DNA sequencing at 40: Past, present and future. *Nature [Internet]*. 2017;550(7676):345-53. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nature24286>

46. Ding G, Liu F, Shen B, Feng C, Xu J, Ding Q. The association between polymorphisms in prooxidant or antioxidant enzymes (Myeloperoxidase, SOD2, and CAT) and genes and prostate cancer risk in the chinese population of han nationality. *Clin Genitourin Cancer*. 2012;10(4):251-5.
47. Ding G, Liu F, Feng C, Xu J, Ding Q. Asociación entre los polimorfismos de genes de mieloperoxidasa y la susceptibilidad a cáncer de próstata: Un estudio caso-control en la población de nacionalidad china. *Actas Urol Esp*. 2013;37(2):79-82.
48. Marchetti C, Patriarca P, Solero G Pietro, Baralle FE, Romano M. Genetic Characterization of Myeloperoxidase Deficiency in Italy. *Hum Mutat*. 2004;23(5):496-505.
49. Milligan KL, Mann D, Rump A, Anderson VL, Hsu AP, Kuhns DB, et al. Complete Myeloperoxidase Deficiency: Beware the “False-Positive” Dihydrorhodamine Oxidation. *J Pediatr* [Internet]. 2016;176:204-6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.05.047>
50. Patiroğlu T, Eke Güngör H, Belohradsky JS, Unal E, Klein C. Myeloperoxidase deficiency: the secret under the flag of unstained cell. *Turkish J Haematol Off J Turkish Soc Haematol* [Internet]. 2013;30(2):232-3. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24385801%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3878482>
51. Aratani Y, Kura F, Watanabe H, Akagawa H, Takano Y, Suzuki K, et al. In vivo role of myeloperoxidase for the host defense. *Jpn J Infect Dis*. 2004;57(5):2004.

52. Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Koyama, H. (2000). Differential Host Susceptibility to Pulmonary Infections with Bacteria and Fungi in Mice Deficient in Myeloperoxidase. *The Journal of Infectious Diseases*, 182(4), 1276–1279. doi:10.1086/315843.ç
53. Nunoi, H., Kohi, F., Kajiwara, H., & Suzuki, K. (2003). Prevalence of Inherited Myeloperoxidase Deficiency in Japan. *Microbiology and Immunology*, 47(7), 527–531. doi:10.1111/j.1348-0421.2003.tb03414.
54. Persad AS, Kameoka Y, Suzuki K. Arginine to Cysteine Mutation (R499C) Found in a Japanese Patient With Complete Myeloperoxidase Deficiency. 2018;13:67-71.
55. William J W, Ernest B, Allan J. E, Marshall A. L, Hematología. Vol 2. Cuarta edición. E.E. U. U, New York. 1999
56. Khan, A., Alsahli, M., & Rahmani, A. (2018). Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: Recent Biochemical and Pathological Perspectives. *Medical Sciences*, 6(2), 33 doi:10.3390/medsci6020033
57. García Morales Onel H, Pereira Roche Nayade, Flores Sánchez Rosa M. Enzimas generadoras de especies reactivas del oxígeno: mieloperoxidasa. *Rev Cubana Invest Bioméd [Internet]*. 1998 Dic [citado 2018 Ago 30]; 17 (3): 190-197. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S086403001998000300002&lng=es.
58. Hebecker, B., Naglik, J. R., Hube, B., & Jacobsen, I. D. (2014). Pathogenicity mechanisms and host response during oral *Candida albicans* infections. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 12(7), 867–879. doi:10.1586/14787210.2014.916210

59. Jimnez L. Varón M. Prevalencia de candidemia por *Candida Albicans* y *Candida No Albicans* en el Hospital Universitario de la Samaritana 2008-2011 [Postgrado Medicina Interna]. Universidad de la Sabana; 2012. 33 p.
60. Bioinformatics at COMAV, n.d, Bioinformatics at COMAV Secuenciación de Sanger [internet] [31 septiembre 2018]. Disponible en: https://bioinf.comav.upv.es/courses/intro_bioinf/sanger.html
61. Prokopowicz, Z., Marcinkiewicz, J., Katz, D. R., & Chain, B. M. (2011). Neutrophil Myeloperoxidase: Soldier and Statesman. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 60(1), 43–54. doi:10.1007/s00005-011-0156-8
62. Zhang, T., Shan, K.-R., Tu, X., He, Y., Pei, J.-J., & Guan, Z.-Z. (2013). Myeloperoxidase Activity and Its Corresponding mRNA Expression as well as Gene Polymorphism in the Population Living in the Coal-Burning Endemic Fluorosis Area in Guizhou of China. *Biological Trace Element Research*, 152(3), 379–386. doi:10.1007/s12011-013-9632-9
63. Odobasic, D., Kitching, A. R., & Holdsworth, S. R. (2016). Neutrophil-Mediated Regulation of Innate and Adaptive Immunity: The Role of Myeloperoxidase. *Journal of Immunology Research*, 2016, 1–11. doi:10.1155/2016/2349817
64. Labome [Internet] . Argentina: Carbajal A. Extracción y purificación de ADN; [Actualizado 24 de mayo de 2018; 3 Nov. 2018] Disponible en: <http://www.labome.es/method/DNA-Extraction-and-Purification.html>

ANEXOS

Anexo A. Consentimiento informado para autorización toma de muestra



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLINICO
PROYECTO DE INVESTIGACION

INFORMACION A LOS PARTICIPANTES DEL PROYECTO:

IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL GEN DE LA MIELOPEROXIDASA ASOCIADO A INFECCIONES VAGINALES RECURRENTE POR *CANDIDA ALBICANS* EN MUJERES REMITIDAS A UN HOSPITAL DE TERCER NIVEL DE BOGOTÁ.

Estimados Pacientes:

El grupo de investigación REMA (Relaciones microbianas y epidemiológicas aplicadas al laboratorio clínico y molecular), ha planeado el desarrollo de un trabajo que permita ampliar el conocimiento de algunas bacterias y la respuesta inmune a la infección.

Esta investigación se considera de riesgo mínimo ya que se realizará una toma de muestra de sangre (5 ml) usando una jeringa estéril, la cual se utilizará para la realización de un análisis genético relacionado con la eficiencia de la respuesta inmune.

El participar en este trabajo no va a significarle ningún tipo de estímulo económico. Sin embargo, el conocimiento que se derive de esta investigación será de gran utilidad en el conocimiento de la respuesta inmune innata y encontrar mejores estrategias para el tratamiento de estas infecciones, beneficiando a las personas que padecen de esta enfermedad. Los resultados obtenidos serán mantenidos en reserva.

Hago constar que he sido informado de la investigación, de sus riesgos y sus beneficios, que lo he comprendido claramente y que en caso de alguna duda puedo comunicarme con las bacteriólogas: Claudia Andrea Cruz Baquero 3507729535 Janeth Navarrete 3103439504, Gladys Pinilla 3134139100

AUTORIZO

Nombre _____

Firma _____

CC _____

Fecha _____

Anexo B. Protocolo de extracción de ADN para el kit The Wizard Genomic DNA Purification Kit- Promega corporation.



3. Protocols for Genomic DNA Isolation

We tested the purification of genomic DNA from fresh whole blood collected in EDTA, heparin and citrate anti-coagulant tubes and detected no adverse effects upon subsequent manipulations of the DNA, including PCR (2). Anticoagulant blood samples may be stored at 2–8°C for up to two months, but DNA yield will be reduced with increasing length of storage.

The protocol in Section 3.A has been designed and tested for blood samples up to 3ml in volume. The protocol in Section 3.B has been designed and tested for blood samples up to 10ml in volume. The yield of genomic DNA will vary depending on the quantity of white blood cells present. Frozen blood may be used in the following protocols, but yield may be lower than that obtained using fresh blood, and additional Cell Lysis Solution may be required.

Caution: When handling blood samples (Sections 3.A, B and C), follow recommended procedures at your institution for biohazardous materials or see reference 3.

3.A. Isolating Genomic DNA from Whole Blood (300µl or 3ml Sample Volume)

Materials to Be Supplied by the User

- sterile 1.5ml microcentrifuge tubes (for 300µl blood samples)
- sterile 15ml centrifuge tubes (for 3ml blood samples)
- water bath, 37°C
- isopropanol, room temperature
- 70% ethanol, room temperature
- water bath, 65°C (optional; for rapid DNA rehydration)

1. **For 300µl Sample Volume:** Add 900µl of Cell Lysis Solution to a sterile 1.5ml microcentrifuge tube.

For 3ml Sample Volume: Add 9.0ml of Cell Lysis Solution to a sterile 15ml centrifuge tube.

- !** **Important:** Blood must be collected in EDTA, heparin or citrate anticoagulant tubes to prevent clotting.
2. Gently rock the tube of blood until thoroughly mixed; then transfer blood to the tube containing the Cell Lysis Solution. Invert the tube 5–6 times to mix.
 3. Incubate the mixture for 10 minutes at room temperature (invert 2–3 times once during the incubation) to lyse the red blood cells. Centrifuge at 13,000–16,000 × *g* for 20 seconds at room temperature for 300µl sample. Centrifuge at 2,000 × *g* for 10 minutes at room temperature for 3ml sample.
 4. Remove and discard as much supernatant as possible without disturbing the visible white pellet. Approximately 10–20µl of residual liquid will remain in the 1.5ml tube (300µl sample). Approximately 50–100µl of residual liquid will remain in the 15ml tube (3ml sample).

If blood sample has been frozen, repeat Steps 1–4 until pellet is white. There may be some loss of DNA from frozen samples.

Note: Some red blood cells or cell debris may be visible along with the white blood cells. If the pellet appears to contain only red blood cells, add an additional aliquot of Cell Lysis Solution after removing the supernatant above the cell pellet, and then repeat **Steps 3–4**.

- Vortex the tube vigorously until the white blood cells are resuspended (10–15 seconds).



Completely resuspend the white blood cells to obtain efficient cell lysis.

- Add Nuclei Lysis Solution (300 μ l for 300 μ l sample volume; 3.0ml for 3ml sample volume) to the tube containing the resuspended cells. Pipet the solution 5–6 times to lyse the white blood cells. The solution should become very viscous. If clumps of cells are visible after mixing, incubate the solution at 37°C until the clumps are disrupted. If the clumps are still visible after 1 hour, add additional Nuclei Lysis Solution (100 μ l for 300 μ l sample volume; 1.0ml for 3ml sample volume) and repeat the incubation.
- Optional:** Add RNase Solution (1.5 μ l for 300 μ l sample volume; 15 μ l for 3ml sample volume) to the nuclear lysate, and mix the sample by inverting the tube 2–5 times. Incubate the mixture at 37°C for 15 minutes, and then cool to room temperature.
- Add Protein Precipitation Solution (100 μ l for 300 μ l sample volume; 1.0ml for 3ml sample volume) to the nuclear lysate, and vortex vigorously for 10–20 seconds. Small protein clumps may be visible after vortexing.
Note: If additional Nuclei Lysis Solution was added in **Step 6**, add a total of 130 μ l Protein Precipitation Solution for 300 μ l sample volume and 1.3ml Protein Precipitation Solution for 3ml sample volume.
- Centrifuge at 13,000–16,000 $\times g$ for 3 minutes at room temperature for 300 μ l sample volume. Centrifuge at 2,000 $\times g$ for 10 minutes at room temperature for 3ml sample volume.
A dark brown protein pellet should be visible. If no pellet is observed, refer to Section 4.
- For 300 μ l sample volume, transfer the supernatant to a clean 1.5ml microcentrifuge tube containing 300 μ l of room-temperature isopropanol. For 3ml sample volume, transfer the supernatant to a 15ml centrifuge tube containing 3ml room-temperature isopropanol.
Note: Some supernatant may remain in the original tube containing the protein pellet. Leave this residual liquid in the tube to avoid contaminating the DNA solution with the precipitated protein.
- Gently mix the solution by inversion until the white thread-like strands of DNA form a visible mass.
- Centrifuge at 13,000–16,000 $\times g$ for 1 minute at room temperature for 300 μ l sample. Centrifuge at 2,000 $\times g$ for 1 minute at room temperature for 3ml sample. The DNA will be visible as a small white pellet.
- Decant the supernatant, and add one sample volume of room temperature 70% ethanol to the DNA. Gently invert the tube several times to wash the DNA pellet and the sides of the microcentrifuge tube. Centrifuge as in Step 12.
- Carefully aspirate the ethanol using either a drawn Pasteur pipette or a sequencing pipette tip. The DNA pellet is very loose at this point and care must be used to avoid aspirating the pellet into the pipette. Invert the tube on clean absorbent paper and air-dry the pellet for 10–15 minutes.
- Add DNA Rehydration Solution (100 μ l for 300 μ l sample volume; 250 μ l for 3ml sample volume) to the tube and rehydrate the DNA by incubating at 65°C for 1 hour. Periodically mix the solution by gently tapping the tube. Alternatively, rehydrate the DNA by incubating the solution overnight at room temperature or at 4°C.
- Store the DNA at 2–8°C.

Anexo C. Protocolo de extracción de ADN Kit Ultraclean® Bloodspin DNA isolation



Detailed Protocol (Describes what is happening at each step)

Please wear gloves at all times

1. **Add 200 µl of whole blood or body fluids to a 2 ml Collection Tube (provided) and add 10 µl of Proteinase K.**

Note: (Optional: RNase A can be added at this step. Use 2 µl of 20 mg/ml.)

What's happening: Proteinase K breaks down the cell wall and helps lyse the cells. To ensure complete removal of RNA, add RNase A at this step. No incubation is necessary.

2. **Add 200 µl of Solution B1** and mix by vortexing for 15 seconds.

What's happening: Solution B1 is a lysis reagent. It contains a chaotropic salt and detergent.

3. Incubate the sample at 65°C for 10 minutes. Centrifuge briefly to collect the lysate.

What's happening: Heat helps denature proteins and completes lysis.

4. **Add 200 µl of Solution B2** and vortex for 15 seconds. Centrifuge briefly to collect the sample from the lid.

What's happening: Solution B2 contains 100% ethanol and provides optimal conditions for DNA binding.

5. Transfer the lysate to the Spin Filter and centrifuge for 1 minute at 13,000 x g.

What's happening: DNA binds to the silica membrane in the spin filter because it is in a high salt condition. The liquid flow through contains unwanted cell material such as denatured proteins and RNA.

6. Transfer Spin Filter to new 2 ml Collection Tube (provided).

7. **Add 500 µl of Solution B3** to Spin Filter. Centrifuge for 30 seconds at 13,000 x g

What's happening: Solution B3 is a salt based wash solution that cleans the DNA bound to the Spin Filter.

8. Remove the Spin Filter and discard the flow through. Place Spin Filter back into the same 2 ml Collection Tube.

9. **Add 500 µl of Solution B4** to Spin Filter. Centrifuge 30 seconds at 13,000 x g.

What's happening: Solution B4 is an ethanol based wash solution that cleans the DNA bound to the Spin Filter. It removes all residual salt contaminants.

10. Remove the Spin Filter and discard the flow through. Place the Spin Filter back into the same 2 ml Collection Tube.

11. Centrifuge again for 30 seconds at 13,000 x g to dry the Spin Filter membrane.

What's happening: The Spin Filter is dried of ethanol to allow for maximal DNA release from the Spin Filter membrane during elution.

12. **Carefully remove Spin Filter** and transfer to a new 2 ml Collection Tube (provided).

13. **Add 100-200 µl of Solution B5.**

Note: To increase yields, incubate for 5 minutes at 65°C.

14. Centrifuge 1 minute at 13,000 x g.

15. Remove Spin Filter unit and close tube lid. Genomic DNA in tube is now ready to use for any application.

What's happening: Solution B5 is 10mM Tris 1mM EDTA. As it passes through the Spin Filter, the DNA is released (eluted) off the filter and it passes into the 2 ml Collection Tube. The DNA is released because it will not stay bound to the Spin Filter when there is no salt present.

Anexo D. Protocolo purificación de los productos de

amplificación de PCR PureLink[®] PCR Purification Kit

1.Unión del ADN

1. Agregar 4 volúmenes de tampón de unión PureLink[®] (B2) con isopropanol o tampón de unión HC (B3) con isopropanol para 1 volumen del producto de PCR (50-100 μ L). Mezclar

2. Retirar una columna de centrifugación PureLink[®] en un tubo de recogida del paquete.

3. Agregar la muestra con el Tampón de Unión apropiado (del paso 1 del procedimiento) a la Columna de PureLink[®].

4. Centrifugar la columna a temperatura ambiente a $10,000 \times g$ por 1 minuto.

5. Desechar el flujo y coloque la columna en un tubo de recolección

2. Lavar el ADN

1. Agregar 650 μ L de tampón de lavado con etanol la columna.

2. Centrifugar la columna a temperatura ambiente a $10.000 \times g$ durante 1 minuto. Desechar el flujo a través del tubo de recolección y coloque la columna en el tubo.

3. Centrifugar la columna a velocidad máxima a temperatura ambiente durante 2-3 minutos para eliminar cualquier tampón de lavado residual. Desechar el tubo de recolección.

3. Elución del ADN

1. Colocar la columna giratoria en un tubo de elución CleanLink[®] de 1.7 ml suministrado con el kit.

2. Agregar 50 μ L de tampón de elución (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5) o agua destilada estéril (pH > 7,0) al centro de la columna.

3. Incubar la columna a temperatura ambiente durante 1 minuto.

4. Centrifugar la columna a velocidad máxima durante 2 minutos.

5. El tubo de elución contiene el producto de PCR purificado. Eliminar y descartar la columna. El volumen de elución recuperado es de 48 μ L aprox .

6. Almacene el producto de PCR purificado a -20°C o use el producto de PCR para la aplicación deseada aguas abajo.

Anexo E. Tinción citoquímica para peroxidasa leucocitaria MPO

Instituto Nacional de Cancerología MIELOPEROXIDASA (MPO) 4- CLORO- 1- NAFTOL

Antes de iniciar la reacción los reactivos deben estar temperados a temperatura ambiente

1. Fijar los extendidos con etanol forlmaldehído al 10% por 5 minutos. (4.5 ml de Etanol + 0.5 de forlmaldehído)

2. Lavar la lámina con agua de chorro.

3. Preparar solución sustrato: 0,25 ml de (4-cloro 1- naftol) + 5 ml de Buffer Tris HCl. Filtrar la mezcla y agregar 20 μL de peróxido de hidrógeno diluido más 250 μL de agua destilada.

4. añadir solución sustrato de 5- 10 minutos a temperatura ambiente. Lavar con agua de chorro.

5. Colorear los extendidos con Wrigth según los tiempos entandarizados.

6. Lavar con agua de chorro y dejar secar a temperatura ambiente.

*Preparación de solución madre 4Cl- 1Naftol: 50 ml de etanol + 4 gr de 4- cloro – 1- naftol