



**Identificación de polimorfismos en el gen mieloperoxidasa y su papel en candidiasis
vulvovaginal recurrente por *Candida spp* en pacientes de Bogotá DC**

María Paula Montoya Estrada

Gloria Julieth Rincón González

Proyecto de grado

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico

Bogotá, 08 abril 2022



**Identificación de polimorfismos en el gen mieloperoxidasa y su papel en candidiasis
vulvovaginal recurrente por *Candida spp* en pacientes de Bogotá DC**

María Paula Montoya Estrada

Gloria Julieth Rincón González

Proyecto de grado

Asesoras internas

Claudia Andrea Cruz Baquero, Docente, Sc. D. Investigación en Medicina

Gladys Pinilla Bermúdez, Docente, Mg. Ciencias Químicas con énfasis en Biología molecular

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico

Bogotá, 08 abril 2022



**Identificación de polimorfismos en el gen mieloperoxidasa y su papel en candidiasis
vulvovaginal recurrente por *Candida spp* en pacientes de Bogotá DC**

María Paula Montoya Estrada

Gloria Julieth Rincón González

Proyecto de grado

APROBADA: _____

JURADOS: _____

ASESOR: _____

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico

Bogotá, 08 abril 2022

DEDICATORIA

Dedicamos este trabajo principalmente a Dios, por habernos dado la vida, la fuerza en la toma de decisiones y permitirnos haber llegado hasta este momento tan importante de nuestra formación profesional.

A nuestros padres Leonor, Pablo, Maryory y Nelson, por su apoyo, guía, paciencia, y por mostrarnos el camino a la superación, por ser ejemplo de humildad y esfuerzo.

A mis hermanos, Alejandro y Jorman, por su compañía incondicional y ser una motivación para mi vida personal.

A las profesoras Claudia Andrea Cruz y Gladys Pinilla por inspirarnos en el camino de la investigación durante este proyecto, por ayudarnos y enseñarnos que este es un proceso arduo que requiere compromiso y perseverancia.

¡GRACIAS TOTALES!

Con amor, Julieth Rincón y María Paula Montoya.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por brindarnos un espacio de aprendizaje y oportunidad, y a cada docente que hizo parte de nuestra formación profesional.

A nuestras amigas, por afianzar nuestro compromiso como colegas.

A las jóvenes investigadoras Wendy y Edith, por su colaboración en los procesos experimentales.

A la profesora Paola Santos por estar disponible cada vez que requeríamos de su ayuda académica para la continuidad del proyecto.

Al Semillero de investigación REMA, por permitirnos llevar a cabo el desarrollo de nuestra investigación.

A todos aquellos docentes, bacteriólogas y auxiliares que contribuyeron y aportaron ideas y opiniones que enriquecieron nuestro proyecto e hicieron posible la culminación de este.

Finalmente, a todos aquellos que leen este apartado, por permitir a nuestras experiencias y conocimientos incurrir dentro de su repertorio de información.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	12
INTRODUCCIÓN	13
1. ANTECEDENTES DEL PROYECTO	17
2. MARCO REFERENCIAL.....	18
2.1 Sistema inmune	18
2.2 Neutrófilos.....	19
2.3 Mieloperoxidasa.....	20
2.4 Polimorfismos relacionados con la deficiencia de MPO	21
2.5 Inmunodeficiencias.....	22
2.6 <i>Candida spp</i>	22
2.7 Patogenia de <i>Candida spp</i>	23
2.8 Generalidades de candidiasis	23
2.9 Epidemiología	24
2.10 Diagnóstico.....	24
2.11 Tratamiento.....	25
2.12 Deficiencia de Mieloperoxidasa y susceptibilidad a infecciones por <i>Candida spp</i>	25
2.13 Diagnóstico deficiencia de MPO.....	26
2.13.1 Técnicas citoquímicas	26
2.13.2 PCR convencional	27
2.13.3 Secuenciación de ADN.....	27
3. DISEÑO METODOLÓGICO.....	27
3.1 Universo, Población y Muestra.....	27
3.2 Hipótesis y Variables	28
3.3. Técnicas y procedimientos.....	28
3.3.1 Recolección de muestras de sangre	28
3.3.2 Consentimiento informado	28
3.3.3 Análisis parámetros hemáticos	28
3.3.4 Identificación de peroxidasa leucocitaria	29
3.3.5 Identificación del <i>gen mpo</i>	29
3.3.6 Enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa	30
3.3.7 Detección de polimorfismo del <i>gen mpo</i>	30
4. RESULTADOS.....	31

4.1	Análisis de parámetros hemáticos.....	31
4.2	Identificación del <i>gen mpo</i>	31
4.3	Enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa.....	33
4.4	Detección de polimorfismos del <i>gen mpo</i>	33
4	DISCUSIÓN.....	34
5	CONCLUSIONES.....	39
	REFERENCIAS.....	41

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los primers usados en la amplificación del <i>gen mpo</i>.....	58
Tabla 2. Estandarización de PCR (MgCl₂ y primers)	58
Tabla 3. Reactivos y cantidades usados para la PCR convencional.....	58
Tabla 4. Condiciones de los ciclos para la PCR convencional.....	59
Tabla 5. Resultados del cuadro hemático de las muestras del segundo grupo.....	61
Tabla 6. Resultados de espectrofotometría en el equipo Nanodrop.....	62
Tabla 7. Cuantificación productos PCR	66
Tabla 8. Resultados del alineamiento de las secuencias con BLAST	69

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Procesos de reacción de la MPO.....	51
Figura 2. Respuesta inmune frente a <i>C. albicans</i> por medio del reconocimiento de β -1,3-glucanos por el receptor Dectina-1	52
Figura 3. Reacción intrafagosomal dependiente de oxígeno y de MPO para la eliminación de microorganismos.	53
Figura 4. Localización <i>gen mpo</i>	53
Figura 5. Proceso de biosíntesis de la MPO en el RER durante el desarrollo de células mieloides humanas.....	54
Figura 6. Polimorfismos del <i>gen mpo</i> y su relación con la biosíntesis de la proteína.....	55
Figura 7. Representación esquemática del proceso de patogénesis y colonización de <i>C albicans</i> en el epitelio estratificado de la vagina.....	56
Figura 8. Ciclo de amplificación de PCR convencional.....	57
Figura 9. Tinción de Wright muestras grupo 2, objetivo 40x	60
Figura 10. Tinción de Wright muestras grupo 2, objetivo 100x	60
Figura 11. Tinción de peroxidasa leucocitaria muestras grupo 2, objetivo 100x	61
Figura 12. Resultados electroforesis en gel de agarosa de las muestras 1-28.....	63
Figura 13. Secuencia de los exones del <i>gen mpo</i> , obtenidos de la plataforma genome.ucsc.edu.....	63
Figura 14. Condiciones de los primers forward y reverse obtenidas por Thermo Fisher Scientific.....	64
Figura 15. Resultados de la PCR <i>In Silico</i> realizada por el programa bioinformático UCSC genome.....	64
Figura 16. Resultados electroforesis con los productos de PCR Estandarizada.....	65

Figura 17. Electroforesis de los productos de PCR muestras 1-28.....	65
Figura 18. Electroforesis de los productos de PCR segunda amplificación.....	66
Figura 19. Corte enzimático <i>In silico</i> por la plataforma Neb Cutter 2.0V.....	67
Figura 20. Electroforesis estandarización tiempos de corte enzimático agarosa 2% (15 minutos, 1 hora y 30 minutos, 4 horas, 24 horas)	67
Figura 21. Electroforesis de agarosa 2% corte enzimático muestras 1-15.....	68
Figura 22. Electroforesis de agarosa 2% corte enzimático muestras 16-28.....	68
Figura 23. Secuenciación de la muestra 1 del <i>gen mpo</i>	68
Figura 24. Secuenciación de la muestra 2 del <i>gen mpo</i>	69
Figura 25. Secuenciación de la muestra 3 del <i>gen mpo</i>	69
Figura 26. Secuenciación de la muestra 4 del <i>gen mpo</i>	70
Figura 27. Secuenciación de la muestra 5 del <i>gen mpo</i>	70
Figura 28. Secuenciación de la muestra 6 del <i>gen mpo</i>	70
Figura 29. Secuenciación de la muestra 7 del <i>gen mpo</i>	70
Figura 30. Secuenciación de la muestra 9 del <i>gen mpo</i>	71
Figura 31. Secuenciación de la muestra 10 del <i>gen mpo</i>	71
Figura 32. Secuenciación de la muestra 14 del <i>gen mpo</i>	71
Figura 33. Secuenciación de la muestra 15 del <i>gen mpo</i>,,,	72
Figura 34. Secuenciación de la muestra 15-2 del <i>gen mpo</i>	73
Figura 35. Secuenciación de la muestra 17 del <i>gen mpo</i>	73
Figura 36. Secuenciación de la muestra 17-2 del <i>gen mpo</i>	74

Figura 37. Secuenciación de la muestra 19 del <i>gen mpo</i>.....	74
Figura 38. Secuenciación de la muestra 19-2 del <i>gen mpo</i>.....	74
Figura 39. Secuenciación de la muestra 20 del <i>gen mpo</i>.....	75
Figura 40. Secuenciación de la muestra 20-2 del <i>gen mpo</i>.....	75
Figura 41. Secuenciación de la muestra 27 del <i>gen mpo</i>.....	75
Figura 42. Secuenciación de la muestra 27-2 del <i>gen mpo</i>.....	76
Figura 43. Alineamiento de la muestra 15 con el <i>gen mpo</i> analizado por el programa BLAST.....	76
Figura 44. Alineamiento de la muestra 15-2 con el <i>gen mpo</i> analizado por el programa BLAST.....	78
Figura 45. Alineamiento de la muestra 17 con el <i>gen mpo</i> analizado por el programa BLAST.....	80
Figura 46. Alineamiento de la muestra 17-2 con el <i>gen mpo</i> analizado por el programa BLAST.....	81
Figura 47. SNP <i>gen mpo</i> vs SNP encontrados en las muestras 15 y 17	82



RESUMEN

La mieloperoxidasa (MPO) es una proteína antimicrobiana presente en los gránulos azurófilos de los neutrófilos, su acción recae cuando se conjuga en el fagosoma con peróxido de hidrógeno, resultando en sustancias tóxicas para los microorganismos fagocitados (1). Se ha descrito que las infecciones vulvovaginales recurrentes por *Candida spp* tienen relación con la deficiencia primaria de MPO, el cual es un trastorno autosómico recesivo (2), que presenta polimorfismos asociados al procesamiento postraduccional defectuoso de la proteína precursora o con errores pretraduccionales (3), por esto, el propósito fue identificar la relación que existe entre dos polimorfismos de la MPO (Y173C y M251T) con una mayor probabilidad de presentar este tipo de infecciones, puesto que este tipo de polimorfismos no han sido estudiados en el país. Frente a la metodología, se realizó una encuesta, donde se recolectaron 27 muestras de mujeres entre 20-45 años, se les realizó cuadro hemático, tinción Wright y tinción de peroxidasa leucocitaria. Se prosiguió con la extracción de ADN utilizando el kit Wizard® Genomic DNA Purification de Promega, luego se realizó la cuantificación del ADN extraído por espectrofotometría en NanoDrop, y la evaluación de la integridad del ADN mediante electroforesis. Por otro lado, se diseñaron los primers haciendo uso de herramientas bioinformáticas para la estandarización de la PCR convencional, posteriormente se usaron enzimas de restricción y se secuenciaron los productos amplificados con el fin de identificar los polimorfismos mencionados previamente.

Palabras claves: Polimorfismos, Deficiencia de Mieloperoxidasa, Análisis Bioinformático, PCR, Secuenciación, Candidiasis vulvovaginal, *Candida spp*.

INTRODUCCIÓN

La inmunidad innata o natural, es la primera respuesta del sistema inmunitario contra diferentes agentes invasores externos, como bacterias, hongos, parásitos o virus; se compone de barreras, como la piel, membranas mucosas, lágrimas y ácido del estómago, también, de células como macrófagos, células dendríticas, polimorfonucleares (PMN) y células asesinas naturales (NK) (1). Los humanos poseen en promedio entre un 50 - 70% de neutrófilos del total de leucocitos; cuando los neutrófilos fagocitan microbios opsonizados, se forma el fagosoma, y por la liberación de enzimas, oxígeno y proteínas de los gránulos lisosómicos al espacio fagosómico se forma el fagolisosoma; posteriormente el complejo NADPH-oxidasa (2,3), se ensambla en la membrana del fagolisosoma y canaliza los electrones del NADPH presentes en el citoplasma al oxígeno por transporte a través de la membrana, produciendo aniones superóxido, sufriendo una dismutación que mantiene el pH intrafagosómico neutro y produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que es un agente antimicrobiano (4). La fagocitosis y eliminación de microbios es posible por tres tipos de gránulos, los azurófilos (primarios) los cuales contienen mieloperoxidasa (MPO) (5); los específicos (secundarios) que contienen lactoferrina y gelatinasas; y los terciarios con metaloproteína 9 (MMP9) (6,7).

Por otro lado, los primeros estudios acerca de la MPO y su función dentro de la respuesta innata se enfocaron en el cáncer, uno de los primeros fue realizado en 1975 por Clark et al (8). A partir de estos estudios se conoce que la MPO es una proteína miembro de la subfamilia de peroxidasas las cuales tienen entre 576-738 aminoácidos y existen como monómeros, dímeros o tetrameros (9), se presentan como isoenzimas; en los humanos existen diversos tipos de peroxidasas como la peroxidasa de eosinófilos (EPO), la lactoperoxidasa (LPO) y la peroxidasa de tiroides (TPO) (10).

La MPO se encuentra codificada en el segmento q12-24 del brazo largo del cromosoma 17. El producto transcripcional primario de este gen consta de 11 intrones y 12 exones (10-12). A partir de 1998, DeLeo FR et al (13), determinó que la MPO se sintetiza durante la etapa promielocítica del desarrollo de células mieloides. (10,16-21). Esta proteína es una glicoproteína tetramérica, constituida por 4 subunidades que forma 2 homodímeros. Cada uno de ellos contiene una subunidad α (pesada) de aproximadamente 59 kDa y una subunidad β (ligera) de aproximadamente 14 kDa, con un peso total de 130-150 kDa (22); la proteína está compuesta por un par de protómeros idénticos que contienen polipéptidos pesados-ligeros unidos covalentemente a través del grupo hemo único en cada protómero, y los dos protómeros unidos entre sí mediante un enlace disulfuro simple.

(10,16–21). Por lo anterior, para el año 2000 García et al (22), estableció que los neutrófilos contienen 4 formas de MPO, las cuales se denominan compuesto I-III y MPO nativa o férrica.

Por lo general, la mayoría de las reacciones de las peroxidasas implican la interacción con oxidantes como el H_2O_2 , hidroperóxidos de alquilo, ácidos peroxibenzoicos, ión hipoclorito (OCl^-), ion hipobromito (OBr^-), ion clorito (ClO_2^-), anión bromato (BrO_3^-), ion peryodato (IO_4^-), ácido m - nitrobenzoico, etc. Dependiendo de la disponibilidad de sustrato y el tipo de óxido-reductasas, pasan por un ciclo de peroxidasa o un ciclo de halogenación (23) Las formas intermedias de peroxidasas; compuesto I y compuesto II, se forman durante estos ciclos de reacción (24); se empieza con la reacción de la forma Fe^{+2} de la peroxidasa con el oxidante más común, H_2O_2 para formar el compuesto I. En ausencia de Cl^- , el compuesto I (MPO- Fe^{+2}) en presencia de H_2O_2 se reduce de nuevo al estado férrico. Primero, conduce a la formación del compuesto II, el cual se reduce al compuesto III por el segundo equivalente AH_2 . Durante el ciclo de halogenación, el MPO-compuesto I oxida exclusivamente Cl^- el cual entra al fagosoma por medio de un regulador de conductina (CFTR) a $HOCl$ (25). En conjunto estas reacciones forman compuestos antimicrobianos como ácido hipohaloso (HXO), $HOCl$, ácido hipobromoso y ácido hipotiocianoso siendo liberadas (26) en conjunto con ROS, mientras que NADPH oxidasa transfiere electrones al fagosoma, generando anión superóxido y H_2O_2 a partir de oxígeno molecular los cuales tienen fuertes propiedades microbicidas (Figura 1) (20,25,27).

Por otro lado, aunque las consecuencias clínicas de la deficiencia de MPO en humanos no se han investigado a fondo, algunos estudios han encontrado que los pacientes con falta total o subtotal de MPO tienen una mayor incidencia de afecciones inflamatorias crónicas mediadas por la inmunidad adaptativa. De manera similar, los pacientes con un polimorfismo genético presentan una disminución de la expresión de MPO y tienen un mayor riesgo de desarrollar nefritis lúpica autoinmune, además, los pacientes con esclerosis múltiple (EM) y diabetes mellitus (DM) tienen menor actividad de MPO en sus PMN (28–31).

Según Pahwa et al, la deficiencia primaria de MPO se hereda como un trastorno autosómico recesivo que se presenta con niveles variables de gravedad y características clínicas, algunas de estas mutaciones están asociadas con el procesamiento postraduccional y otras con defectos pretraduccionales, siendo las más estudiadas las mutaciones 569W, Y173C, M251T, G501S y R499C y una delección de 14 bases (D14) en el exón 9 (32). Por lo anterior, en el estudio realizado por DeLeo et al (13), identificó una mutación sin sentido en el *gen MPO* en el codón 173 en el cual la tirosina es reemplazada por cisteína, lo que genera una deficiencia de MPO en la inmunidad innata.

En el año 2000, Nauseef et al (33), identificó una mutación sin sentido en el *gen MPO*, en el cual se reemplaza la arginina por triptófano en el codón 569, generando una deficiencia de MPO, y como consecuencia un defecto en la fagocitosis de los PMN.

Ahora bien, las actividades de MPO implican la producción de diferentes especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno como (RNS), los cuales causan peroxidación de lípidos, nitración y carboxilaciones de proteínas (34,35). Por ende, los pacientes que carecen de MPO son más susceptibles a las infecciones fúngicas, en particular las causadas por *Candida albicans*, debido a que los neutrófilos son las células principales frente a la respuesta inmune de estos microorganismos. Sin embargo, aunque existen informes que demuestran que los pacientes con deficiencia de MPO pueden tener una mayor incidencia de infecciones graves, se ha demostrado que la mayoría de los pacientes que carecen de MPO no son particularmente susceptibles a las infecciones crónicas (28).

Por otro lado, en el 2004 Aratani et al (36), comparó en su investigación la importancia de MPO y NADPH-oxidasa para la defensa del huésped en ratones deficientes de MPO con enfermedad granulomatosa crónica (EGC) usando diferentes dosis de *C. albicans*, demostrando que MPO y NADPH-oxidasa son importantes para la defensa temprana del huésped contra *Candida spp*. En el mismo año, Megan et al (37), hace una revisión de la patología molecular de las inmunodeficiencias primarias (IDP). La revisión de Padrón et al (38), menciona defectos de los fagocitos, la clínica, y las características moleculares, así como el diagnóstico por pruebas de laboratorio que se relacionan con los trastornos inmunes. En el 2007, Kalinski et al (39), reportó una muerte por sepsis letal a causa de *Candida spp* asociada con la deficiencia de MPO de una primípara con preeclampsia y con coagulación intravascular diseminada (CID), la biopsia demostró que la deficiencia de la MPO contribuyó a la diseminación de *Candida spp*.

De acuerdo con lo anterior, *Candida spp* es un hongo dimórfico del filo *Ascomycota* que se aísla generalmente del tracto respiratorio, gastrointestinal y genitourinario en diferentes etapas de la vida sin presentar complicaciones clínicas relevantes (40). Las especies de *Candida spp* son organismos fúngicos que hacen parte importante de la microbiota vaginal entre un 20 – 50% de las mujeres sanas, sin embargo, pueden llegar a ser agentes causantes de infecciones vaginales dependiendo si las condiciones del medio lo permiten (41). Generalmente los factores asociados con la colonización son multifactoriales; los síntomas están asociados a una sobreabundancia de levadura y a la invasión de la misma en las células epiteliales vulvovaginales, así mismo, involucran la susceptibilidad del huésped, respuestas inflamatorias y los factores de virulencia del microorganismo (25,41–45)

En consecuencia, *C. albicans* es el miembro más reconocido del género, el cual genera más del 70% de las candidiasis vulvovaginales (CVV), sin embargo, actualmente la prevalencia de rango para especies no albicans está aumentando significativamente sobretodo en pacientes con virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (46–48), así mismo, se ha evidenciado el incremento a la resistencia frente a tratamientos antifúngicos con azoles en *C. albicans* y otras especies *Candida* no albicans (49).

En este sentido, según varios estudios, la MPO tiene un papel crítico en la defensa contra levaduras cuando existe una alta carga a nivel sistémico, por ende, la generación de los productos oxidativos generados por MPO y NADPH oxidasa como el HOCl y el oxígeno contribuyen a la muerte de estas levaduras (50,51). Las posibles razones que conllevan a una deficiencia de MPO pueden dividirse en dos tipos, aquellas que son pretranscripcionales, es decir que se relacionan con una mutación propiamente dicha en el *gen MPO*, o aquellas que son postraduccionales, que hacen referencia a errores en la biosíntesis de la proteína inmadura, como por ejemplo, un error en la inserción del grupo hemo en la aproMPO, paso clave para el plegado adecuado, la salida del RER y la entrada final en la vía de maduración (33), lo que finalmente genera consecuencias en la respuesta antimicrobiana, dado que se genera pérdida de la producción y acción del HOCl, lo que no solo representa la incapacidad de eliminar a los microorganismos fagocitados, sino también de modificar otros elementos antimicrobianos presentes en los fagosomas, tales como catepsina G y MMP-7 (52).

La innovación de este proyecto radica principalmente en que este tipo de mutaciones en el *gen mpo* no ha sido del todo estudiado, de manera que no se ha determinado su existencia en Colombia, y, por tanto, no se conoce la prevalencia que tiene esta mutación en la sociedad y de qué manera podría afectar a la población femenina que tiene infecciones recurrentes con *Candida spp.* Este proyecto fue pertinente ya que al ser científico y hacer uso de las áreas de la biología como la genómica, la metagenómica y de las macromoléculas biológicas, también permite el uso de tecnologías de punta en pro de la salud para optimizar y automatizar los procedimientos, el diagnóstico y el tratamiento con la ayuda de la innovación tecnológica que ha adquirido en el país.

A partir de los estudios realizados respecto a las diferentes mutaciones presentes en el *gen mpo* y su relación con las infecciones recurrentes por *Candida spp.*, se planteó la siguiente pregunta problema: ¿De qué manera las mutaciones del *gen mpo* son un determinante para generar susceptibilidad a candidiasis vulvovaginal recurrente (CVVR) por *Candida spp.* en mujeres de 20 a 45 años en la ciudad de Bogotá D.C.?; adicionalmente, el objetivo del proyecto era identificar la presencia de dos

polimorfismos (Y173C y M251T) del *gen mpo* en mujeres de 20 a 45 años con infecciones vulvovaginales recurrentes por *Candida spp* en una población piloto de la ciudad de Bogotá D.C.

1. ANTECEDENTES DEL PROYECTO

Uno de los primeros fue realizado en 1975 por Clark et al (53), en el cual se documentó el efecto citotóxico de los PMN humanos intactos, en este se evidenciaba la participación del sistema de peroxidasa durante la fagocitosis de células neoplásicas donde la MPO es liberada a la vacuola fagocítica y por ende el H₂O₂ es producido en el fluido extracelular en la fagocitosis. Así mismo, según Senelar et al (54), en 1982 con un estudio sobre leucocitos de pacientes con cáncer se menciona que el nivel reducido de MPO podría indicar un defecto celular en los PMN de pacientes con enfermedad maligna.

Posteriormente en 1998, se determinó que la MPO se sintetiza durante la etapa promielocítica del desarrollo de células mieloides y es el producto de la traducción primaria con un peso entre los 75-80 kDa, se estableció que se modifica en el RER por glucosilación cotranslacional ligada a N seguida de glucosilación para generar el apopMPO de 90 kD. DeLeo et al (13) en su trabajo, identifica una mutación sin sentido en el *gen mpo* en el codón 173 en el cual la tirosina es reemplazada por cisteína el cual genera una deficiencia de MPO en la inmunidad innata. En ese mismo año, García et al (22), menciona las características, mecanismos de reacción y la actividad de la MPO. Para ese entonces, en el 2000 Nauseef et al (33), identifica una mutación sin sentido en el *gen mpo*, en el cual se reemplaza la arginina por triptófano en el codón 569 concluyendo que el genotipo subyacente genera una deficiencia de MPO; para este punto se empiezan a evaluar las relaciones entre la estructura y la función de esta proteína. Así pues, en el 2004 Aratani et al (50), en su investigación, estudia el rol de la MPO en la respuesta inmune innata, comparando la importancia de MPO y NADPH-oxidasa para la defensa del huésped, para esto se infectaron ratones deficientes en MPO con EGC con diferentes dosis de *C. albicans* y se analizó la gravedad de la infección, sugiriendo que MPO y NADPH-oxidasa son igualmente importantes para la defensa temprana del huésped contra *Candida spp*.

Es necesario mencionar estudios como los realizados por Megan et al (37), en el año 2004 en donde se hace una revisión de la patología molecular de las IDP, las cuales son un grupo heterogéneo de trastornos que se dividen en cinco grupos, afectan la inmunidad celular y humoral, provocan una mayor susceptibilidad a infecciones e inmunodeficiencias, enfermedades autoinmunes, y están asociadas con defectos genéticos hereditarios. Para el 2007, se empezó a realizar estudios del papel

de la MPO en la preeclampsia; Kalinski et al (39), reporta un fallecimiento a causa de una sepsis letal por *Candida spp* asociada a la deficiencia de MPO de una primípara con preeclampsia, combinado con toxemia con CID, en donde la biopsia confirmó que la deficiencia de la MPO contribuye a la diseminación de *Candida spp*. La revisión realizada por Antachopoulos (55), en el año 2010 demuestra que tanto las inmunodeficiencias adquiridas como las congénitas pueden estar asociadas con una mayor susceptibilidad a las infecciones fúngicas invasivas, por ende, las inmunodeficiencias tanto celulares como humorales están asociadas con infecciones por microorganismos como *Candida spp*. Teniendo en cuenta lo anterior, Plantinga et al evalúa la importancia del sistema inmune innato en la respuesta frente a levaduras (56), por tanto, en su estudio se investiga si la variación genética en la señalización de Toll-like receptor (TLR) influye en la susceptibilidad a la candidemia, por eso se realizó la genotipificación de 13 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en 338 pacientes con candidemia.

Es importante destacar el mecanismo de acción de la NADPH oxidasa en la inmunidad innata en la EGC, ya que, tal como se menciona en la revisión por Segal et al (5), la presencia de un trastorno hereditario en el mecanismo de regulación de la NADPH oxidasa correlacionada con infecciones bacterianas y fúngicas recurrentes graves al mismo tiempo, da como resultado una producción excesiva de anión superóxido y ROI, las cuales son fundamentales para la defensa del huésped cuando se presentan infecciones y enfermedades inmunes como EGC.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1 Sistema inmune

Respecto a la inmunidad frente a *Candida spp*, esta se centra en las células epiteliales vaginales como principal defensa antimicrobiana vaginal, que no solo constituyen una barrera mecánica y de atrapamiento con su material de superficie similar a la mucina y la queratina, sino que también son capaces de responder mediante la activación celular y la secreción de mediadores inmunes. El reclutamiento de PMN en la vagina, la producción de citocinas como IL-1 β e IL-18 y la activación de los subconjuntos de linfocitos T-helper 1 y T-helper 17 (Figura 2), se les ha atribuido un papel contra *Candida spp*. Así también, el microbiota normal permite que el microambiente vaginal sea lo suficientemente ácido para inhibir la transición de *C. albicans*. Sin embargo, esta levadura ha refinado los mecanismos para oponerse a las variaciones drásticas de pH y se ha demostrado que es

capaz de neutralizar el exceso de ácido por el amoníaco derivado del metabolismo de los aminoácidos (57).

2.2 Neutrófilos

Se ha evidenciado que los neutrófilos son células complejas que actúan como efectores importantes de la inflamación aguda, crónica y en la respuesta inmune innata, también participan en la cicatrización de heridas y limitan activamente el autoreclutamiento mediante la liberación de moléculas endógenas que inhiben la activación de la integrina o los cambios en el citoesqueleto. Igualmente, estudios recientes han revelado que la vida útil de un neutrófilo en circulación podría ser mucho más larga, y que pueden existir subpoblaciones diferenciadas de neutrófilos y sus reservorios, aunque aún queda por determinar si estas subpoblaciones son funcionales o están restringidas al linaje (6).

Respecto al origen y la maduración, los neutrófilos son generados continuamente en la médula ósea a partir de precursores mieloides, este proceso es controlado por el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF); los gránulos de neutrófilos se forman secuencialmente durante la maduración desde la etapa de promielocito (6), de este modo, existen tres tipos de gránulos en los neutrófilos los cuales se forman consecutivamente durante su maduración, están llenos de proteínas proinflamatorias y su función es actuar durante la eliminación de patógenos; dichos gránulos son azurófilos (primarios), que contienen mieloperoxidasa (MPO), específicos (secundarios) que contienen lactoferrina y gelatinasa (terciarios), que contienen metaloproteínasa de matriz 9 (MMP9) y los específicos (negativos a la peroxidasa). También poseen compuestos de tipo enzimático como lactoferrina y catepsinas que ayudan a la función de eliminación de patógenos de manera independiente a como lo hacen las peroxidasas (6). Adicionalmente, con el fin de descondensar la cromatina y que se lleve a cabo el proceso de NETosis, donde se liberan trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) compuestas por redes de cromatina con histonas, proteínas citoplasmáticas del citoesqueleto o proteínas granulares hacia el medio extracelular con el fin de atrapar y eliminar patógenos como *Candida spp* (58).

Como se ha mencionado anteriormente, los neutrófilos tienen múltiples funciones, por eso mismo representan el leucocito predominante en la circulación, y por tanto el primer respondiente a la infección, esta última acción lo realizan mediante la ingestión de microorganismos, para esto activan y ensamblan la NADPH oxidasa en el fagosoma, generando anión superóxido y H₂O₂. Al mismo

tiempo, los gránulos liberan su contenido en el fagosoma, donde las proteínas y enzimas antimicrobianas se sinergizan con los oxidantes para crear un ambiente tóxico para el microbio capturado. La acción antimicrobiana más rápida y completa de los neutrófilos contra muchos organismos se basa en los esfuerzos combinados de la proteína MPO y H_2O_2 de la oxidasa NADPH para oxidar el Cl^- , generando así HClO y una gran cantidad de productos de reacción aguas abajo. De manera que en la mayoría de los casos, las interacciones cooperativas entre los contenidos fagosomales, tanto del huésped como del microbio, terminan en la pérdida de viabilidad del microorganismo ingerido (Figura 3) (59).

2.3 Mieloperoxidasa

Ahora bien, la MPO es una proteína miembro de la subfamilia de peroxidases (10) tienen aproximadamente entre 576-738 aminoácidos, existen como monómeros, dímeros o tetrameros (9). Se encuentra en el segmento q12-24 del brazo largo del cromosoma 17, la expresión del *gen mpo* ocurre entre las etapas tardías de mieloblastos y promielocitos del desarrollo mieloide normal y disminuye rápidamente a medida que las células se diferencian (Figura 4) (11,12).

Su síntesis es el producto resultante de la traducción primaria que se somete a glicosilación en seis residuos de asparagina co-traduccional en el RER para generar aproMPO con cadenas laterales ricas en manosa de 90 kDa (14,15); el producto resultante es enzimáticamente inactivo y tiene la capacidad de formar complejos con chaperonas como calreticulina, ERp57 y calnexina en el RER. En particular, la calnexina se asocia de forma transitoria tanto con aproMPO como con proMPO, mientras que ERp57, calreticulina y calnexina se asocian de forma transitoria sólo con aproMPO; posteriormente, a partir de aproMPO se forma la proMPO (enzimáticamente inactiva) debido a la unión covalente de un grupo protésico hemo a la proteína para permitir su salida del RER, su maduración y paso al gránulo azurófilo, lo que significa que la proMPO se transfiere al aparato de Golgi y los gránulos donde los eventos proteolíticos adicionales conducen al monómero MPO; se dan tres modificaciones en el compartimiento post-RER donde una convertasa de tipo subtilisina escinde el propéptido de 116 aminoácidos de proMPO, luego, una cisteína proteasa escinde un hexapéptido (ASFVTG) y finalmente, la MPO madura existe como un dímero que contiene un sitio de unión al calcio que estabiliza la estructura, y está compuesta por un par de protómeros idénticos que contienen polipéptidos pesados-ligeros unidos covalentemente a través del grupo hemo único en cada protómero, y entre sí, unidos mediante un enlace disulfuro simple de la proteína con subunidades alfa y beta por la cisteína 369, de 57 kDa con 467 aminoácidos, y 12 kDa con 112 aminoácidos respectivamente (Figura 5) (9,10,18–21,60).

La MPO contiene motivos conservados en los lados proximal y distal del grupo hemo esencial, un sitio de unión al calcio (Ca^{+2}) y al menos dos enlaces covalentes que unen el grupo hemo a la columna vertebral de proteínas. Además, de los enlaces de éster conservados en la bolsa de hemo, MPO contiene un tercero, un enlace de sulfonio entre el grupo 2-vinil y la metionina. La presencia del enlace de sulfonio le da poder a MPO con cualidades espectrales únicas, así como un mayor potencial oxidante, lo que hace que la MPO sea el único miembro de la superfamilia de proteínas capaz de oxidar Cl^- a Cl^+ y generar HOCl a pH fisiológico (59).

Debido a ciertas causas como la exposición a metales pesados como cadmio (Cd^{+2}), cobre (Cu^{+1+2}), cromo (Cr^{+3}) y níquel (Ni^{+2}), así como diferentes patógenos como las bacterias que inducen o suprimen los niveles de ARNm se puede regular la actividad de MPO (9). Por otro lado, la desregulación de la MPO también se ha visto implicada en enfermedades como la artritis reumatoide (AR), Alzheimer, esclerosis múltiple (EM), la aterosclerosis, cáncer de pulmón y en el síndrome coronario agudo (SCA) (23,24,61–63). Lo anterior debido a la liberación descontrolada de MPO en el sitio de infección, generando inflamación y daño tisular incluso cuando no existe una causa aparente de infección (17).

2.4 Polimorfismos relacionados con la deficiencia de MPO

Frente a los polimorfismos descritos en la literatura que conllevan a una deficiencia de MPO, la forma hereditaria más común es R569W, descrita por Nauseef et al, la cual es una mutación sin sentido de un solo nucleótido en el exón 10 del *gen mpo*. Esta mutación da como resultado la sustitución de triptófano por arginina en el codón 569 (R569W) (64). Igualmente, la mutación G501S descrita por Ohashi et al, se identificó en un paciente japonés con deficiencia completa de MPO mediante hematografía automatizada, donde se reveló una sustitución de glicina por serina (G501S) en la región del exón 9 (65). Ahora bien, en el estudio realizado por Persad et al, una mujer japonesa de 28 años presentó una deficiencia completa de MPO, esta deficiencia se origina a partir de una nueva mutación que requiere dos alelos recesivos debido a la forma bialélica de expresión del *gen mpo*. Esta mutación es el resultado de una sustitución de arginina por cisteína (Arg499Cys o R499C), en la región de codificación genética del exón 9 (27,66). Por otro lado, en el estudio realizado por DeLeo et al, a partir de una muestra procedente de una persona de 27 años se describió una nueva forma genotípica distinta de deficiencia de MPO, la cual se caracteriza por presentar una sola mutación sin sentido prediciendo una sustitución de aminoácidos de tirosina por cisteína en codón 173 (Y173C) (13). Finalmente, Marchetti et al, realizó un cribado poblacional con 40.000 individuos

para detectar mutaciones en el *gen mpo*, los autores identificaron siete pacientes con deficiencia parcial de MPO y ocho pacientes con deficiencia total. La caracterización genética de los sujetos mostró la presencia de tres mutaciones ya conocidas (c.752T> C, c.1705C> T y c.1566_1579del14) y seis mutaciones novedosas: cuatro mutaciones sin sentido (c.995C> T, c. 1112A> G, c.1715T> G y c.1927T> C) que provocan la sustitución de los residuos p.A332V, p.D371G, p.L572W y p.W643R, luego una delección de una adenina dentro del exón 3 (c.325delA) que provoca un cambio del marco de lectura con la aparición de un codón de parada prematuro dentro del propéptido, y una mutación dentro del sitio de empalme 3 'del intrón 11 (c.2031-2A > C) (Figura 6) (67).

2.5 Inmunodeficiencias

Las inmunodeficiencias pueden ser adquiridas o congénitas (trastornos hereditarios, principalmente anomalías de un solo gen), están asociadas a la susceptibilidad a infecciones de tipo bacteriano, fúngico, viral, entre otros; así mismo, estas son un grupo de trastornos genéticos en diversas presentaciones, que se clasifican según el comportamiento funcional del sistema inmunitario y, en general, incluyen trastornos humorales, celulares primarios o combinados, del complemento y fagocíticos. Cabe resaltar la relación de la susceptibilidad variable a patógenos fúngicos que se observa en pacientes con inmunodeficiencia combinada grave, síndrome de hiper-IgM ligado al cromosoma X, síndrome de Wiskott-Aldrich, síndrome de DiGeorge, inmunodeficiencia común variable, defectos en el eje del interferón- γ -interleucina-12 y deficiencia de MPO (55).

2.6 *Candida spp*

Las especies de *Candida spp* que se aíslan en dicha patología son *C. albicans* en un 70%, *C. glabrata* en un 19%, *C. parapsilosis* 3%, *C. krusei* (2%) y *C. tropicalis* (1%). La diferencia entre la frecuencia de cada especie depende de características clínicas, anatómicas y del sistema inmune de cada mujer, por ejemplo, *C. glabrata* es la más común en mujeres mayores de 61. En el caso de *C. krusei*, *C. glabrata* y *C. albicans* estas se aíslan generalmente en pacientes con vaginitis recurrente (68).

La mayoría de las candidiasis son leves y afectan a la piel, las uñas y, sobre todo, a las mucosas oral y vaginal desde los primeros días de vida. 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. También se ha descrito una mayor colonización en la boca y en el aparato digestivo cuando hay tratamiento con antibióticos o quimioterapia, en personas con diabetes mal controlada, en pacientes hospitalizados y en personas infectadas por el VIH (69).

2.7 Patogenia de *Candida spp*

Uno de los cambios bioquímicos que permite la colonización por *Candida spp* es la variación en la microbiota vaginal, la cual consiste predominantemente en bacterias del género *Lactobacillus spp* como *L. iners* y *L. crispatus* debido a que estos producen ácido láctico que mantiene el pH vaginal en <4.5 (70–72), así mismo, este género favorece a través del metabolismo anaeróbico del glucógeno la producción de ácido D-láctico y H₂O₂ que en conjunto son inhibidores frente a la invasión por *Candida spp* (73), de manera que una reducción de estos microorganismos genera un crecimiento excesivo de *Candida spp* (74). Adicionalmente, las alteraciones de la microbiota en la vagina se relacionan con una alta incidencia en infecciones sépticas posparto y neonatal, enfermedades inflamatorias pélvicas, abortos espontáneos, partos prematuros, VIH (75–79).

Según estudios la patogénesis y las características de virulencia más importantes de *C. albicans* dependen de una serie de factores que le permiten plasticidad en el medio a colonizar, entre estos, se incluye el crecimiento dimórfico (80), enzimas secretadas como proteasas, fosfolipasas, adhesinas, hemolisinas y superóxido dismutasas, para resistir la fagocitosis dentro de las células del sistema inmune innato, (81) como Msb2 que es una proteína que genera resistencia a péptidos antimicrobianos como LL-37 (82), también las moléculas de señalización, mecanismos de resistencia al estrés, resistencia a antimicóticos como fluconazol por FEN1 o FEN2 (71), así como ERG11 que genera resistencia frente azoles y equinocandinas (83), por último, la adherencia tanto en superficies bióticas como abióticas por la formación de biopelículas también se considera un factor de virulencia de relevancia en *Candida spp* (Figura 7) (43,84,85).

2.8 Generalidades de candidiasis

La CVV se presentan aproximadamente en el 75% de mujeres entre los 15 a 30 años, debido a que en este rango de edad se presentan mayor número de embarazos, diabetes, medicamentos anticonceptivos y ropa ajustada, lo cual se manifiesta con sensación de picazón, ardor, quemazón e irritación, además, de flujo blanquecino moderado y homogéneo (68), por otro lado, la mortalidad y morbilidad a casusa de candidiasis sistémica oscila entre el 13-23%. En prematuros tienden a diseminarse con más frecuencia que en niños mayores o adultos, ocurre a todos los órganos y sistemas, incluyendo el sistema nervioso central (SNC) (86). Las infecciones sistémicas también se ven relacionadas con las IDP, como trastornos fagocíticos y trastornos por inmunodeficiencia celular priMaría y combinada (87).

2.9 Epidemiología

En relación con las manifestaciones clínicas más comunes y las especies de *Candida spp* aisladas en las infecciones vulvovaginales, según el estudio realizado por Cararach et al (68), el 75% de mujeres con vulvovaginitis por *C. albicans*, el 57% presento picazón, el 44% ardor y sensación de quemazón 99% flujo blanquecino, 79% aspecto homogéneo, y el 43% moderada cantidad de la secreción. Por otro lado, En el caso de *C. glabrata* presentó una clínica similar al de *C. albicans*, sin embargo, aquí el 50% presentó irritación. Solo dos mujeres tenían vaginitis asociada a *C. krusei*, presentando el 50% presentó picazón, ardor, enrojecimiento y flujo en abundante cantidad. Para *C. parapsilosis* el 100% presento flujo blanquecino y homogéneo, sin picazón y ardor. Por último, para *C. tropicalis* se presentó sintomatología como la mencionada anteriormente en *C. albicans* y adicionalmente había ardor al orinar y flujo blanquecino en escasa cantidad (68).

Cabe destacar que según Quindós (88) los factores de riesgo como cirugía abdominal, tumores sólidos y neoplasias hematológicas, trasplantes y/o tratamiento prolongado con corticoides en pacientes mayores de 65 años, también existen importantes diferencias geográficas en la distribución de las especies de *Candida spp* diferentes a *C. albicans* que causan candidiasis invasivas como *C. parapsilosis* que predomina en Australia, América Latina y los países mediterráneos de África, Asia y Europa, por otro lado, *C. glabrata* tiene un importante papel etiológico en EE. UU y en Europa central y del norte.

2.10 Diagnóstico

Al ser una infección que se manifiesta con prurito vulvovaginal, descenso vaginal, dolor vaginal con fisuras vulvovaginales, proceso inflamatorio intenso en la vulva y/o la vagina debido a la agresión al epitelio provocada por hongos (89), dispareunia y disuria externa, el diagnóstico oportuno de candidiasis se puede hacer mediante inspección visual, determinación del pH vaginal, microscopía, papanicolaou, prueba de látex y cultivo de secreción cervicovaginal (90).

Para un diagnóstico adecuado, inicialmente es importante la inspección visual, ya que el flujo vaginal de una infección por hongos puede tener diferentes apariencias, puede estar ausente, o muy discreto, con presencia de placas en la pared vaginal, típicamente como ‘requesón’, es obligatorio el examen microscópico de la secreción vaginal con solución salina (SS) o hidróxido de potasio al 10% (KOH al 10%) utilizando microscopía de luz, sin embargo, aunque este es un método de diagnóstico importante, también presenta una sensibilidad baja (40% al 70%), porque el resultado depende de la

experiencia del microscopista; también se puede realizar la medición del pH vaginal, si está en valores de pH normal (<4,5) se descarta la posibilidad de vaginosis por levaduras, mientras que un pH >4,5 sugiere vaginosis bacteriana, tricomoniasis o endocervicitis mucopurulenta; la sola presencia de BLASTosporas y/o pseudohifas indica que solo se trata de la presencia del *Candida spp* como comensal; el aumento de leucocitos y el cultivo en medio agar glucosa Sabouraud al 2% u otros medios disponibles para la detección de *Candida spp* como CHROMagar pueden identificar inmediatamente ciertas *Candida spp* debido a su pigmentación (90).

Por otra lado, con la implementación de las técnicas moleculares, se han utilizado métodos que emplean ADN para la identificación de hongos que pueden proporcionar resultados precisos y más rápidos, demostrando una sensibilidad > 90% en la identificación de especies de *Candida spp* (91). Otra alternativa con alta especificidad, es el análisis de biomoléculas mediante ionización por desorción por láser asistida por matriz (MALDI), seguida de la detección en un analizador de tiempo de vuelo (TOF), (92).

2.11 Tratamiento

El tratamiento de la CVV suele ser fácil y efectivo, sin embargo, es común confundir los síntomas con otras infecciones. Usualmente el tratamiento es la aplicación de una pomada antifúngica, ungüentos, comprimidos y supositorios o la utilización de comprimidos vaginales. En casos graves, el tratamiento tópico se complementa con tratamiento oral. Se utilizan fármacos como la nistatina, anfotericina B, azólicos, triazólicos e imidazólicos. En la CVV no complicadas todas las formas de antimicóticos disponibles son altamente efectivas, tanto orales como tópicos, por el contrario, en las CVV complicadas se debe realizar un tratamiento prolongado (5-7 a 10-14 días) de terapia convencional (93,94).

La CVV se considera como una de las enfermedades vaginales más prevalentes, se conoce que un tratamiento inadecuado o la presencia de cepas resistentes pueden provocar CVVR, por ello, en primer lugar, se deben identificar los factores de riesgo del paciente y luego indicar un tratamiento oral inicial de 14 días y luego un régimen con ketoconazol durante 6 meses, itraconazol durante 6 meses, fluconazol 6 meses o clotrimazol en forma de comprimidos vaginales semanalmente (94).

2.12 Deficiencia de Mieloperoxidasa y susceptibilidad a infecciones por *Candida spp*.

En el artículo experimental de Homme et al (26), se estudió el efecto de la deficiencia de la MPO sobre la inflamación pulmonar inducida por *C. albicans* no viable (nCA), en el cual se inocularon ratones intranasalmente con nCA. El método de estudio principal fue la medición de la acumulación de neutrófilos y macrófagos en el líquido de lavado broncoalveolar (LBA) la cual se analizó por citometría de flujo; por otro lado, los niveles de proteína inflamatoria macrófaga 2 (MIP-2), quimiocina derivada de queratinocitos (KC), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e (IL)-1 β en el pulmón se midieron por ELISA; la producción de MIP-2 y KC a partir de neutrófilos y macrófagos se cuantificó *In vitro*; la expresión de ARNm de MIP-2 en los neutrófilos se analizó mediante PCR de transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR); y el grado de fosforilación de ERK1/2 y Syk en los neutrófilos se analizó mediante transferencia Western blott.

En los resultados, los ratones MPO (-/-) que recibieron nCA mostraron una neumonía más grave que los ratones de tipo salvaje, es decir, aquellos que no presentaban deficiencia en MPO, ya que, dentro de las 12 h de la administración de nCA, los ratones MPO (-/-) tenían un número significativamente mayor de neutrófilos alveolares y una mayor producción de MIP-2 y KC en relación con las respuestas observadas en ratones de tipo salvaje; lo que significa que la administración pulmonar de nCA produjo una respuesta inflamatoria alterada en ratones MPO (-/-) en relación con ratones de tipo salvaje y la producción mejorada de MIP-2 por los neutrófilos MPO (-/-) puede contribuir en parte a la inflamación exacerbada en ratones mutantes, generando infecciones mucho más graves que aquellos ratones no mutados (26).

2.13 Diagnóstico deficiencia de MPO

A partir de la revisión bibliográfica del tema, se plantea la posibilidad de diagnosticar deficiencias en la proteína MPO en pacientes con CCVR mediante técnicas de tinción y análisis visual las cuales permitan caracterizar cualitativamente la presencia tanto de neutrófilos como de la proteína MPO, adicionalmente, se describen técnicas que aplican los principios de metagenómica y proteogenómica.

2.13.1 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, se demuestra la presencia de MPO por la acción oxidante de la misma sobre el sustrato bencidina en presencia de H₂O₂, observando gránulos azurófilos de un color rojo-marrón dentro de los neutrófilos (52).

2.13.2 PCR convencional

La PCR es una reacción enzimática *In vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN mediante cebadores para que la polimerasa sea capaz de incorporar nucleótidos complementarios a la cadena (95,96). Cada ciclo de la PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión. En la etapa de desnaturalización, las cadenas de ADN son separadas a 95 °C, en la hibridación los cebadores se alinean al extremo 3' del templado e hibridan con su secuencia complementaria, la temperatura melting (T_m) oscila entre 50-60°C, y en la extensión, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-cebadores y por la unión de dNTP's complementarios crea las cadenas completas de ADN (Figura 8) (96).

2.13.3 Secuenciación de ADN

Esta técnica se basa en la síntesis de una hebra de ADN complementaria a la hebra de cadena simple cuya secuencia se quiere determinar, esto mediante la adición de dideoxinucleótidos (ddNTPs) a la mezcla de la reacción, ya que, estos carecen del grupo 3'OH y al estar marcados con radiactividad interrumpen el proceso de síntesis. Cuando se incorpora un ddNTPs a la cadena en elongación, se termina su amplificación, de tal manera que al final, se tienen fragmentos de diferente longitud, los cuales se separan y se analizan por electroforesis (97,98). Inicialmente, el ADN se somete a 96 °C para poder desnaturalizar las cadenas, luego se disminuye la temperatura y vuelve a elevarse a 72°C para que la ADN polimerasa añada los nucleótidos a la cadena; la reacción se revela mediante electroforesis capilar en gel (52), y se analizan mediante programas bioinformáticos para mejorar la interpretación de los resultados.

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 Universo, Población y Muestra

El tipo de investigación que se desarrollará en este trabajo es de tipo mixta, es decir tanto cualitativa como cuantitativa, con un alcance descriptivo-correlacional. La población son 27 mujeres entre 20 y 45 años que presentan 3 o más episodios de CVVR al año.

3.2 Hipótesis y Variables

La hipótesis del presente trabajo es que la candidiasis vulvovaginal recurrente por *Candida spp* está relacionada con una deficiencia de la enzima MPO y, por ende, con la presencia de los polimorfismos del *gen mpo* en mujeres entre 20 y 45 años de la población piloto de la ciudad de Bogotá. Las variables se enfocaron en que la población de estudio tuviera las siguientes características, que no se encuentren en periodo de embarazo, lactancia, con enfermedades de base como diabetes mellitus tipo 2, asma, EPOC, cáncer, hipertensión, inmunodeficiencias y enfermedades cardiovasculares.

3.3. Técnicas y procedimientos

3.3.1 Recolección de muestras de sangre

Se recolectaron 27 muestras de sangre en tubos ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a mujeres interesadas en el proyecto, estudiantes de quinto semestre de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca de Bacteriología y Laboratorio Clínico por medio una encuesta virtual, y por el Hospital de tercer nivel (Unidad de Servicios de salud El Tunal), ubicado en Tunjuelito, Bogotá; el primer grupo de muestras se recolectó entre el 2018-2020 con un total de 9 muestras, sin embargo, la muestra 8 no se encontraba en las condiciones adecuadas y se omitió en el estudio; para el 2021 se recolectó el segundo grupo con 19 muestras.

3.3.2 Consentimiento informado

Este proyecto tiene como referencia principal las pautas éticas proporcionadas en la resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de la República de Colombia y las pautas éticas internacionales para la Investigación con seres Humanos preparadas por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS), en colaboración con la Organización Mundial de la Salud.

3.3.3 Análisis parámetros hemáticos

A partir de la sangre total de las muestras recolectadas se hizo el seguimiento de parámetros hematológicos por el equipo Myndray BC-3000 plus. La medición se realizó a temperatura ambiente. Se debe tener en cuenta que los parámetros de referencia se toman según el manual de funcionamiento del equipo utilizado (99), a excepción de la hemoglobina y el hematocrito que son parámetros variables según el sexo.

Se realizaron los respectivos FSP para cada muestra con tinción de Wright; se usaron 0,1 ml de sangre de cada muestra, los tiempos de tinción fueron 5 minutos de colorante de Wright y 3 minutos de buffer, luego se lavó con agua corriente, se secó al aire y se observó al microscopio en objetivo de 40x y 100x, el protocolo se realizó según el área de hematología la Fundación Hospital de la Misericordia (HOMI).

3.3.4 Identificación de peroxidasa leucocitaria

Tinción citoquímica peroxidasa

Se usó la técnica del Instituto Nacional de Cancerología, para realizar la tinción citoquímica peroxidasa leucocitaria (Mieloperoxidasa 4-Cloro-1-Naftol); se tomaron 0.1 ml de cada muestra para realizar un FSP, posteriormente se fijó la muestra con etanol formaldehído al 10% por 5 minutos, se lavó la lámina y se agregó solución colorante durante 10 minutos, se lavó con agua de chorro, y se realizó la tinción de Wright según los tiempos establecidos, y se observó al microscopio en 100x.

3.3.5 Identificación del *gen mpo*

Extracción de ADN

Se realizó la extracción del material genético de cada muestra utilizando el kit Wizard® Genomic DNA Purification de la casa comercial Promega. Se usaron 300µL de sangre en tubos EDTA; por cada muestra, la proporción de reactivo fue de 900µL de solución de lisis celular, 300µL de lisis nuclear, 100µL de solución de precipitación de proteínas, 300µL de isopropanol, 100µL de etanol al 70%, finalmente se dejó por 1 hora a 65°C con 100µL de solución rehidratante.

Evaluación de la calidad e integridad del ADN extraído

Por medio de espectrofotometría a 260-280 nm en el equipo UV-Vis Thermo Scientific™ NanoDrop™ One Microvolume se determinó la calidad y cantidad de ADN para cada muestra. Adicionalmente, se analizó la integridad del ADN por el método de electroforesis usando gel de agarosa de 0.8 % con 3.1 µL SYBER Safe agarose gel, 3 µL buffer de carga 1X, 5µL de patrón de peso molecular (PPM) y 3 µL del eluido de ADN a 80 voltios por 42 minutos.

Estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR In silico.

Se diseñaron los primers para la PCR convencional por herramientas bioinformáticas como NCBI y Thermo Fisher Scientific con el fin de amplificar un segmento de 568bp abarcando los polimorfismos 173 y 251. Las características de los primers usados se encuentran en la Tabla 1. Se

procedió a realizar la estandarización de la PCR teniendo en cuenta concentraciones de MgCl₂, primers (Tabla 2) y ADN, de este último se usaron tanto 50 ng y 25 ng a partir de la muestra 5 (58.7ng/uL). Se utilizó el termociclador AXIGEN MAXYGENE, y las condiciones de PCR se encuentran en la Tabla 3-4. Adicionalmente, se realizó una PCR convencional *In silico*, por medio de la herramienta bioinformática UCSC *In silico* PCR. Se analizó el producto de PCR por electroforesis en gel de agarosa de 0.8 % con 3.1 µL SYBER Safe agarose gel, añadiendo 5µL de producto y PPM durante 45 minutos a 80 voltios.

Cuantificación de productos de PCR

Por medio de espectrofotometría a 260-280 nm en el equipo UV-Vis Thermo Scientific™ NanoDrop™ One Microvolume se cuantificó la cantidad del producto amplificado para cada muestra.

3.3.6 Enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa

Por el programa bioinformático NEBcutter V2.0, se seleccionó la enzima de restricción de tipo II NlaIII (CATG), para la mutación ubicada en el segmento 251 del *gen mpo*, igualmente se realizó la electroforesis *In silico* por el mismo programa. En primer lugar, se estandarizó la duración del corte enzimático en un periodo de tiempo de 15 min, 1h y 30 min, 4 h y 24h, y se continuó con el protocolo establecido por la casa comercial en el cual para cada una de las muestras se usó 5µL de rCutSmart Buffer, 1 unidad de enzima, 1ng del producto de PCR y se completó con H₂O grado molecular hasta un volumen final de 50 µL; en segundo lugar, se incubó a 37°C por 4 horas y se inactivó durante 20 minutos a 65°C. Posteriormente, se preparó el gel de agarosa al 2% añadiendo 40 mL de TBE (Tris Borato EDTA) 1X, 0,8 gramos de agarosa con 3.1 µL de SYBER Safe agarose gel; se depositaron 6µL del corte enzimático mezclado con el Gel Loading Dye purple 1X y 5µL de PPM en el respectivo pozo, la corrida se realizó a 75 voltios durante 65 minutos para visualizar las bandas por el transiluminador UV BIO RAD con el programa Image Lab Software.

3.3.7 Detección de polimorfismo del *gen mpo*

Secuenciación

Se realizó la secuenciación de una sola hebra a los productos de PCR de las muestras 1,2,3,4,5,6,7,9,10,14; y para las muestras 15,17,19,20,27 secuenciación de doble hebra. Inicialmente, se cuantificó el producto de PCR obtenido (Tabla 7), para la secuenciación de electroforesis capilar (CES) en el equipo 3730xl DNA Analyzer-Thermo Fisher por el laboratorio Humaning Genomics Macrogen, en la cual se usan 40 µL del producto, 50 µL primers en concentración de 10 pmol/uL.

Finalmente, por medio de programas bioinformáticos como BLAST se procedió a realizar el análisis de secuencias para el *gen mpo* Homo sapiens cromosoma 17 Primary Assembly para evidenciar la analogía entre secuencias y la posible existencia de un polimorfismo.

4. RESULTADOS

4.1 Análisis de parámetros hemáticos

Tinción de Wright y tinción citoquímica de peroxidasa leucocitaria y frotis de sangre periférica

La tinción de Wright y la tinción citoquímica de peroxidasa leucocitaria realizadas para el primer grupo de muestras obtenidas presentaron hemolisis de las células sanguíneas, con precipitados de colorante, y adicionalmente contaminación con bacterias. Por tanto, estas muestras no se tienen en cuenta para evaluar la celularidad. Ahora bien, en el segundo grupo de muestras, en el FSP en 40x, en general las células sanguíneas no presentan variaciones ni anomalías de estructura, conservan su forma y tamaño adecuado (Figura 9). Por otro lado, en 100x se pudo observar que tanto en la imagen E como en la I (Muestra 14 y 16 respectivamente), presentaban plaquetas con un tamaño aumentado, lo cual es consistente con el cuadro hemático (Figura 10). Además, en la tinción citoquímica de peroxidasa leucocitaria, no se observó ausencia o deficiencia de la enzima MPO en ninguna de las muestras analizadas, teniendo en cuenta que esta enzima se visualiza de un color morado intenso en cada célula (Figura 11).

Cuadro hemático

Igualmente, para las muestras del primer grupo de estudio, no se realizó cuadro hemático debido a la escasa cantidad de volumen e inadecuada conservación de estas. Sin embargo, en la Tabla 5 se presentan el promedio para cada uno de los parámetros analizados en las muestras del segundo grupo.

4.2 Identificación del *gen mpo*

Evaluación de la calidad e integridad del ADN extraído

Una vez realizada la lectura cuantitativa de la calidad del ADN por espectrofotometría a 230, 260 y 280 nm, se obtuvo que en 260/280 las muestras 12,13,26 tienen una pureza óptima entre 1.8 a 2.1; una pureza aceptable entre 1.6 a 1.7 para las muestras 3,11,15,17,18,21,23,25,27, y las muestras

1,2,4,5,6,7,9,10,14,16,19,20,22,24,28 obtuvieron una proporción de <1.6 lo que representa contaminación con compuestos aromáticos; sin embargo, cabe destacar que la mayoría de las muestras obtuvieron una concentraciones de ADN aceptable para el estudio, tal como se observa en la Tabla 6. Adicionalmente, por el método de electroforesis en gel de agarosa se observa una banda que representa una muestra íntegra para el proceso de PCR (Figura 12).

PCR y PCR *In silico*.

Se obtuvo la secuencia de NCBI (National Center for Biotechnology Information) Gene: 4353 del *gen mpo* con intrones y exones (Figura 13) (100), luego a partir de la página Thermo Fisher Scientific (Figura 14) se determinó que los primers cumplían con las características necesarias para realizar la PCR convencional, y se realizó la PCR *In silico* por el programa UCSC genome (Figura 15), el cual comprobó la especificidad de los primers para el segmento a amplificar de 568bp del gen de estudio, y se procedió a realizar la PCR con las condiciones definidas a partir de la estandarización, con el fin de obtener un producto óptimo teniendo en cuenta condiciones químicas favorables que impidieran la aparición de productos con poca especificidad, tal como se observa en la Figura 16, donde se observa una mejor definición de la banda cuando se usa MgCl₂ a 3mM, primers de 0,25 pmol, y ADN de 50ng por muestra teniendo en cuenta la cuantificación de ADN realizada anteriormente.

Electroforesis en gel de agarosa productos PCR

En el primer ensayo, se observa una banda de 568 pb en la mayoría de las muestras, demostrando que se logró amplificar el fragmento del gen esperado, sin embargo, las muestras 4, 10, 26,27,28 no amplificaron; las muestras 15, 16, 23 presentan una banda con poca intensidad lo que indica poca cantidad del gen amplificado, y por ende de ADN (Figura 17). Después de una segunda extracción de ADN y posterior PCR se evidencia en el segundo ensayo, que las muestras 4, 10, 15, 16, 23, 26, 27, 28 presentan una banda definida representativa del gen amplificado lo que indica un mayor número de copias (Figura 18).

Cuantificación productos PCR

Tal como se evidencia en la Tabla 7. la PCR convencional amplificó el ADN en la posición en la que se esperaba dado que aumento su concentración, este resultado es congruente con lo observado en las Figuras 17 y 18.

4.3 Enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa

Inicialmente, el corte enzimático *In Silico* muestra tres bandas de 478, 83, 6 pb en agarosa de 2% tal como se observa en la Figura 19, a partir de esto, se evidencia en la electroforesis 3 bandas representativas del corte enzimático teniendo en cuenta que el tiempo estandarizado para la digestión enzimática fue de 4 horas, ya que se visualizó con mayor intensidad el corte realizado por la enzima (Figura 20). Por otro lado, en lo que respecta a las muestras 1,2,3,4,5,6,7,9,10,14,15, solo se evidencia la presencia de 1 banda de 568pb, lo que indica que la enzima no reconoció el sitio de corte y, por ende, posiblemente exista un polimorfismo en la posición 251 del gen de estudio, sin embargo, en las muestras 11,12,13,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28 se puede ver la presencia de 2 bandas muy tenues de 478 y 83 pb que son producto del corte enzimático (Figura 21 y 22).

4.4 Detección de polimorfismos del *gen mpo*

Secuenciación de NGS

Una vez se obtuvieron los resultados del corte enzimático, se tuvo en cuenta la historia clínica de cada paciente para realizar la secuenciación, de esta manera, las pacientes que presentaban mayor frecuencia de infecciones vulvovaginales por *Candida spp*, tuvieron prioridad para este ensayo independientemente del resultado obtenido, por otro lado, las muestras que presentaron solo una banda en el mismo ensayo, se seleccionaron por la posibilidad de presentar una mutación al no obtenerse el corte enzimático. Se espera realizar secuenciación a aquellas muestras que presentan polimorfismos con la finalidad de comparar la secuencia de cada una de las muestras con la secuencia del fragmento del *gen mpo* Homo sapiens cromosoma 17 Primary Assembly en NCBI, además, describir el tipo de mutación que se presenta de cada una de las muestras que así lo requieran mediante las herramientas de alineamiento bioinformático BLAST. En la Tabla 8. se evidencia para cada muestra el porcentaje de analogía, el numero de la figura resultado del alineamiento de la muestra con respecto al *gen mpo* por medio de BLAST, entre otros, como el tamaño del fragmento final, dado que durante el proceso de secuenciación se tienden a perder las colas de los productos amplificados.

En general, las mutaciones de interés para este estudio no se presentaron para ninguna de las muestras secuenciadas (Figuras 23-42), y solamente dos de los productos de amplificación secuenciados (Muestras 15 y 17) fueron de buena calidad y son congruentes al ser comparados con la secuencia hallada en la base de datos BLAST como se evidencia en las Figuras 43-46. Cabe resaltar, que en la figura 43 correspondiente a la muestra 15 secuenciada en sentido 3'-5' se muestra un cambio en dos pares de bases, ambos de una citosina (C) por una guanina (G) en las posiciones 1691 y 1692 del *gen mpo* y en la posición 2174 se evidencia la inserción de una guanina (G); en la figura 44 correspondiente a la muestra 15-2 secuenciada en sentido 5'-3' se muestra un cambio en la posición 2112 entre timina (T) por una adenina (A), en la posición 2108 carece de una citosina (C) y en la posición 2106 hay un cambio entre una citosina (C) por una timina (T), además, en la posición 1621 se presenta una inserción de una timina (T). Para la figura 45, correspondiente a la muestra 17 secuenciada en sentido 3'-5' se evidencian dos cambios en la posición 1694 y 1695, una inserción de una timina (T) y seguidamente un cambio de una guanina (G) por una timina (T), en la posición 1708 hay un cambio de una adenina (A) por una timina (T), finalmente, en un intrón existe un cambio de citosina (C) por una adenina (A) en la posición 1720. Por otro lado, en la figura 46, correspondiente a la muestra 17-2 secuenciada en sentido 5'-3' se evidencia que en la posición 2106 hace falta una citosina (C), también hay dos cambios en las posiciones 2094 y 2093, donde una guanina (G) cambia por una adenina (A) y luego una adenina (A) por una guanina (G) respectivamente, además, hace falta una guanina (G) en la posición 2083, por último, en la posición 2069 existe un cambio de una guanina (G) por una adenina (A). Adicionalmente, en el análisis bioinformático se compararon los polimorfismos anteriormente mencionados en la base de datos NCBI apartado variaciones genéticas cortas de dbSNP, determinando que aún no se encuentran descritos en la literatura (Figura 47).

4 DISCUSIÓN

Las especies de *Candida spp* hacen parte del microbiota vaginal, sin embargo, pueden llegar a ser agentes causantes de infecciones vaginales si las condiciones del medio permiten su proliferación y colonización, como sucede en la CVV; esta afecta al 75% de las mujeres en edad fértil al menos una vez en la vida y el 9% de esta proporción presenta episodios de CVVR (69,71). En estos casos la respuesta inmune inicia con el reconocimiento de los receptores TLR (58) como Dectin-1 (59), que reconoce estructuras relativas a la manosa presentes en *Candida spp* (61,101), de manera que, al activarse el complemento y la fagocitosis, los macrófagos reconocen la manosa presente en levaduras y liberan sustancias como lisozimas, colagenasas, elastasas, hidrolasas ácidas, óxido nítrico, H₂O₂,

superóxido, radicales hidroxilo, entre otros (20,63); mientras que las células dendríticas, NK, linfocitos reguladores y citotóxicos producen citocinas y quimiocinas que incrementa la respuesta contra *Candida spp* (28).

Adicionalmente, las inmunodeficiencias primarias (IDP) son un trastorno no común por el deterioro de una o varias funciones del sistema inmune, generalmente causadas por mutaciones que afectan a proteínas claves para su correcto funcionamiento (102). La deficiencia de MPO según la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS) es considerada como una IDP, clasificada en el grupo V por tratarse de un error innato de la inmunidad de los fagocitos, y específicamente en el grupo B, ya que es un defecto funcional de la vía enzimática oxidativa (7,103). No obstante, se han descrito formas secundarias a la deficiencia de MPO, donde se incluye la intoxicación por plomo, infecciones graves, lipofuscinosis neuronal, ictericia obstructiva, diabetes, leucemia mieloide aguda y crónica, síndrome mielodisplásico y linfoma de Hodgkin (104,105). Por ende, estas infecciones se presentan en mayor frecuencia cuando hay defectos durante el proceso de fagocitosis, alteraciones en la producción de neutrófilos, adhesión leucocitaria, vía enzimática oxidativa y deficiencia específica de gránulos, desencadenando mayor susceptibilidad a la adquisición de infecciones y enfermedades (10,23) por el déficit en la capacidad de eliminar microorganismos como sucede en la candidiasis (59,106). Por otro lado, la deficiencia de MPO desencadena un aumento en la expresión y actividad de la óxido nítrico sintasa inducible, dando como resultado niveles aumentados de óxido nítrico e intermediarios de nitrógeno reactivo, que desempeñan un papel en la muerte de microorganismos, y además, de la actividad de las proteasas antimicrobianas como la elastasa y la catepsina-G (28).

Ahora bien, según la literatura, el polimorfismo R569W, evidencia que un cambio en la secuencia de aminoácidos da como resultado la detención en la maduración de MPO, quedando en la forma apoproMPO de la enzima, también sugiere que la inserción del grupo hemo en el esqueleto peptídico de apoproMPO puede ser un requisito previo para la maduración proteolítica de proMPO. Mientras que, para los polimorfismos proximales a la histidina en la posición 502 (Hz502), es decir, R499C y G501S que se encuentran en individuos japoneses con deficiencia completa de MPO, se presenta interferencia con el desarrollo posterior de MPO madura, ya que, este aminoácido está fuertemente involucrado con la unión del grupo hemo. Finalmente, el polimorfismo Y173C, indica que hay errores en el mecanismo de biosíntesis de la MPO, debido a que las chaperonas calreticulina y calnexina reconocen la apoproMPO mutante mal plegada en el RE, la cual en vez de ir hacia la vía secretora o de lisosoma, eventualmente se degrada en el proteasoma lo que conlleva a una deficiencia

Teniendo en cuenta lo anterior, en este proyecto se buscó identificar la presencia de polimorfismos en una región del gen *mpo* en mujeres que cursan episodios de candidiasis vulvovaginal recurrente, dado a que en Colombia no se han realizado investigaciones relacionadas con los polimorfismos que pueden presentarse frente a este determinante inmunológico en la respuesta contra *Candida spp*; sin embargo, una 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*.

Inicialmente, con el fin de evidenciar las PMN que hacen parte de la defensa contra *Candida spp*, y a su vez, los gránulos azurófilos que contienen MPO, se realizaron coloraciones de Wright y la tinción citoquímica de peroxidasa leucocitaria, en donde se evidenció para las muestras del primer grupo un envejecimiento de la calidad al momento de evaluar la celularidad de cada muestra, la posible causa es un inadecuado almacenamiento, adicionalmente, se presentó contaminación con bacterias, lo que sugiere un incorrecto almacenamiento y proceso de filtración de los colorantes, o un error técnico al momento de realizar los extendidos y las coloraciones; igualmente, no se pudo realizar el análisis del cuadro hemático. Por otro lado, a las muestras del segundo grupo, se les realizó el cuadro hemático (Tabla 5); en el cual se refleja normalidad en cada uno de los parámetros, de manera que, las mujeres que participaron en este grupo cuentan con un recuento de PMN dentro del intervalo biológico de referencia (45-65%), evidenciando, que presentan un sistema inmune óptimo para la defensa de diversos agentes patógenos, entre ellos, *Candida spp*, ya que, según la literatura la deficiencia de MPO se relaciona con una mayor probabilidad de presentar neutropenia y por ende ser más susceptibles a presentar infecciones por levaduras.

Respecto a la tinción citoquímica de MPO, cabe resaltar que es un método cualitativo, fácil, rápido y económico para demostrar la presencia de la enzima MPO en neutrófilos, debido a la similitud entre la reacción de la MPO presente en los gránulos azurófilos y el H₂O₂ en el reactivo usado, tal como si fuera un proceso *In vivo*; por eso mismo, se recomienda realizar estudios con otras técnicas cuantitativas que permitan estimar la cantidad de enzima funcional presente. Tal como se muestra en la Figura 11, la enzima MPO está presente, sin embargo, es posible que no sea totalmente funcional, debido a un polimorfismo que no permita que la proteína se sintetice completamente, o exista un error postraduccional donde la proteína sea inmadura, y, por ende, que no tenga las propiedades necesarias para actuar de manera correcta frente a diversos microorganismos.

Cabe resaltar que factores como la presencia de hemolisis, detritos celulares, temperatura de almacenamiento inadecuada y muestras envejecidas, durante la extracción de ADN implicaron la modificación en el inserto para el proceso de lisis celular, dado que este se repitió varias veces hasta obtener el pellet nuclear característico, sin embargo, el anticoagulante EDTA presente en las muestras que los iones de magnesio (Mg^{+2}) y Ca^{+2} evitando el quiebre de la molécula de ADN por las nucleasas (107). Por consiguiente, fue necesario conocer la cantidad y calidad del ADN para su posterior uso en la PCR, puesto que, el ADN fragmentado en la electroforesis dificulta la amplificación de ADN de alto peso molecular y afecta la reproducibilidad de la técnica; en este proyecto se evidencia en la Figura 17, que todas las muestras extradiás presentan un banda óptima, igualmente, la cuantificación del ADN por espectrofotometría (Tabla 6), determino que a pesar de presentar contaminaciones o productos celulares no deseados la concentración de ADN fue significativa para la PCR.

Así mismo, se logró estandarizar la técnica de PCR convencional para la amplificación del *gen mpo*; para esto se tuvo en cuenta diversas concentraciones de primers, $MgCl_2$ y ADN, siendo necesario establecer valores en los cuales se observará un buen rendimiento y especificidad los mismos (Figura 16). Inicialmente, se estableció que la muestra N° 26 era la óptima para este ensayo, debido a la concentración de ADN y pureza frente a las demás muestras, a partir de esto, se determinó que una concentración de 50 ng/ μ l de ADN es adecuada para la amplificación. Del mismo modo, para establecer la concentración del cofactor $MgCl_2$ el cual proporciona la correcta actividad de la enzima Taq-polimerasa, se ensayaron diferentes concentraciones, siendo la más óptima de 3mM, esto debido a que altas concentraciones de $MgCl_2$ pueden disminuir la especificidad de la enzima, mientras que, a bajas concentraciones se aumenta la especificidad de esta. Por otro lado, la evaluación de los primers se realizó a la T_m determinado por el fabricante la cual corresponde a 66°C, con el fin de encontrar la concentración idónea evitando la presencia de productos inespecíficos durante la PCR, siendo adecuada una concentración de 0,25pmol. Por ende, tal como se evidencia en la Figura 17 y 18, se establece que la PCR estandarizada funciona para posteriores ensayos en los que se quiera obtener un producto de amplificación para el gen trabajado.

El uso de enzimas de restricción para este proyecto fue de gran innovación debido a la importancia de las enzimas como método específico de reconocimiento de una secuencia corta de ADN bicatenario, el cual será hidrolizado en el enlace fosfodiéster de cada hebra siempre en la misma posición, lo que permite su uso como método diagnóstico para la detección de polimorfismos. La enzima utilizada *NlaIII*, proviene de una cepa de *Escherichia coli* que porta el *gen NlaIII* de *Neisseria lactamica*, la cual tiene las características de ser de tipo II, lo que significa que corta el ADN dejando

extremos cohesivos, tiene la facilidad de digerir 1 ug de ADN en un rango de 5-15 min a 37°C durante 1 hora y se inactiva a altas temperaturas, es de alta fidelidad, su actividad no se ve afectada por metilación del ADN y reconoce secuencias palindrómicas.

Respecto a la estandarización realizada *In vitro* comparada con la *In silico*, se evidencia que el corte enzimático no se logra percibir de manera correcta en la corrida electroforética debido a variaciones como, los fragmentos resultantes del corte enzimático, los cuales tenían un tamaño de 478, 83 y 6 pb, los cuales eran complicados de visualizar en el gel de agarosa del 2%, adicionalmente, el método de tinción del gel dificultó la observación de los cortes realizados debido a las pocas pares de bases con las que contaban los dos últimos fragmentos para unirse con el agente intercalante como el SYBER Safe agarose gel, caso contrario a lo visualizado con el fragmento de mayor tamaño, otra causa pudo ser la cercanía del tercer corte con la última parte del fragmento utilizado, ya que, en la teoría se menciona que la enzima pierde especificidad cuando el corte se encuentra a 6pb de la última porción del gen empelado, por otro lado, el tiempo de corrida pudo ocasionar que el ultimo fragmento de 6 pb saliera por el extremo del gel, sin embargo, aunque se ensayó la enzima en 15 min, 1 hora y 30 min, 4 horas y 24 horas, no se evidencio un cambio en los fragmento observados, lo cual tiene concordancia con las característica de la enzima, donde se menciona que esta no tiene sobreactividad cuando ya no hay ADN disponible para digerir.

No obstante, se evidencio en la corrida electroforética que algunas muestras tenían una leve presencia de dos bandas correspondientes a los fragmentos de 83 y 6 pb, posiblemente por las condiciones de la corrida y la concentración de ADN, por ende, se determina que la enzima reconoció el sitio de corte y las muestras no presentaban el polimorfismo en la posición 251 del gen de estudio; de todos modos, se recomienda mejorar el procedimiento de corte enzimático para futuros estudios, ya que esta técnica es ampliamente utilizada en la actualidad en biología molecular para estudios genéticos, mapeo de secuencias y clonación.

En el caso de la secuenciación, es necesario realizar previamente la purificación de los productos de PCR, esto con el fin de eliminar los residuos que pueden interferir con la electroforesis de capilaridad, en el caso de las muestras que no mostraron una secuenciación completa se evidencia ruido de fondo y pérdida de resolución, posiblemente por la presencia de contaminantes en la muestra, carencia de ADN molde, falta de cebador o este no reconoció el ADN molde produciendo señales débiles e incompletas. Sin embargo, los resultados de la secuenciación para las muestras 15 y 17 mostraron poco ruido de fondo en las gráficas, alta resolución y buena calidad, parámetros importantes para realizar una correcta interpretación.

De manera subsiguiente, las secuencias de las muestras 15 y 17 fueron evaluadas mediante análisis bioinformático por alineamiento, donde cada una presentó analogía entre un 99-100%; sin embargo, se encontraron varios polimorfismos tanto en la cadena molde como en la cadena complementaria de ambas muestras, de manera que, al comparar estos polimorfismos con los presentados en la literatura, se infirió que no han sido reportados y que posiblemente no se trata de una modificación causada por algún factor de contaminación o error en la secuenciación por el comportamiento que experimentan los picos de cada base nitrogenada en el electroferograma.

Debido al análisis bioinformático realizado, se estableció la ubicación específica de los polimorfismos hallados en la región del gen estudiado, los cuales se encuentran en los exones 4 y 6, así mismo, se permitió conocer la gran variabilidad polimórfica en la región analizada, lo que a futuro conlleva 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; ya que los encontrados al estar en la región codificante de la proteína tienen la capacidad de modificar el producto final de ARN mensajero, siendo representativos por la importancia clínica que estos pueden presentar para el mecanismo de acción de la proteína, sin embargo, queda la inquietud sobre 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.

Ahora bien, respecto a los polimorfismos de importancia para el estudio, se destaca que ninguno se relacionó con las muestras secuenciadas, y, por ende, no se puede relacionar con la CVVR en la población piloto de estudio, dando paso a nuevos estudios que involucren una población más amplia, ya que, según la literatura la frecuencia de estos polimorfismos es baja, además, que en el país no se tienen registros de su estudio y prevalencia. Finalmente, cabe recordar que las posibles razones que conllevan a una deficiencia de MPO pueden dividirse en dos tipos, las pre transcripcionales, es decir, que se relacionan con una mutación propiamente dicha en el *gen mpo*, o aquellas que son postraduccionales, que hacen referencia a errores en la síntesis de la proteína; por lo tanto, aunque un estudio genético es de gran importancia, ya que es un método sensible, específico y actual, no es el único método para determinar que la CVVR se relacione únicamente con un error pre transcripcional.

5 CONCLUSIONES

Con base en la literatura presentada, se determinó que la MPO tiene un papel fundamental en la activación del sistema inmune innato como parte del sistema fagocítico del neutrófilo, donde

participa activamente en el estrés oxidativo en conjunto con diversas enzimas para eliminar diversos microorganismos, por ejemplo *Candida spp*; sin embargo, se ha determinado que en algunas mujeres pueden presentarse alteraciones de la MPO, generando un bajo rendimiento en la actividad microbicida de los neutrófilos, esto debido a errores genéticos o inmunodeficiencias. En consecuencia, a partir del cuadro hemático y el FSP, se concluye que estos son métodos útiles al momento de diagnosticar cualquier tipo de infección, pero no poseen alta sensibilidad para la enfermedad de interés, para esto se requiere implementar ensayos cuantitativos que indiquen una deficiencia en la concentración de la enzima o un error en la funcionalidad de la misma, no obstante, cabe destacar que la tinción de peroxidasa leucocitaria es un ensayo cualitativo que presenta gran afinidad con los gránulos azurófilos, y por lo mismo, es un método útil para determinar de manera rápida, fácil y económica si existe alguna deficiencia de MPO cualquiera sea su causa siempre teniendo en cuenta la clínica presentada.

Ahora bien, también se usaron métodos de biología molecular para correlacionar un posible polimorfismo con la susceptibilidad a presentar infecciones vulvovaginales recurrentes por *Candida spp*, por ejemplo, se logró estandarizar la PCR convencional con el uso de primers diseñados específicamente para reconocer la región donde se ubican los polimorfismos de interés, además, el corte enzimático *In silico* e *In vitro*, el cual identifica el polimorfismo 251, permitió diferenciar qué posibles muestras eran normales y cuales podían llegar a presentar el polimorfismo, para posteriormente ser secuenciadas, con el fin de comparar la secuencia por medio de herramientas bioinformáticas. Sin embargo, cabe resaltar que estas técnicas son susceptibles a presentar errores técnicos que impiden ser usadas como un método diagnóstico por personal no entrenado, y aunque sean técnicas sensibles y específicas, es necesario hacer énfasis en un método igual de sensible, pero más sencillo y económico, que se pueda usar en la población colombiana para diagnosticar esta deficiencia a tiempo.

Finalmente, el campo de estudio se deja abierto, para que en futuras investigaciones se identifiquen los mismos polimorfismos en una mayor cantidad de muestras, haciendo uso de las técnicas mencionadas, sin embargo, a partir de este proyecto se presenta un avance en el diagnóstico de la deficiencia relacionada con este tipo de infecciones que afecta a la población femenina en Colombia teniendo en cuenta los factores involucrados en la adquisición de la infección y su recurrencia, igualmente, mediante el mismo se pretende incentivar a la autoridades competentes a un mayor seguimiento de este evento en salud, teniendo en cuenta que se carece de estudios referentes al mismo.

REFERENCIAS

1. NIH. Definición de inmunidad innata - Diccionario de cáncer del NCI - Instituto Nacional del Cáncer [Internet]. INMUNIDAD INNATA. [cited 2021 Aug 8]. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/inmunidad-innata>
2. Aratani Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys*. 2018;640(November 2017):47–52.
3. Van Der Veen BS, De Winther MPJ, Heeringa P. Myeloperoxidase: Molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxidants Redox Signal*. 2009;11(11):2899–937.
4. Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: An integrated view. *Immunol Rev*. 2007;219(1):88–102.
5. Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol*. 2005;23(2):197–223.
6. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2013;13(3):159–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3399>
7. Staines Boone AT, González Serrano ME, Guidos Morales HE, Hernández Bautista VM, Espinosa Rosales FJ, Espinosa Padilla SE. Inmunodeficiencias por alteraciones en las células fagocitarias.pdf. *Medigraphic*. 2005;14.
8. Henderson WR, Chi EY, Jong EC, Klebanoff SJ. Mast cell-mediated tumor-cell cytotoxicity. Role of the peroxidase system. *J Exp Med*. 1981;153(3):520–33.
9. Khan AA, Rahmani AH, Aldebasi YH, Aly SM. Biochemical and pathological studies on peroxidases -an updated review. *Glob J Health Sci*. 2014;6(5):87–98.
10. Nauseef WM. Biosynthesis of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2018;642:1–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.02.001>
11. Miyasaki KT, Nemirovskiy E. Myeloperoxidase isoform activities released by human neutrophils in response to dental and periodontal bacteria. *Oral Microbiol Immunol*. 1997;12(1):27–32.
12. NCBI. MPO mieloperoxidasa [Homo sapiens (humano)] - Gen - NCBI [Internet]. 2014 [cited 2021 Aug 8]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4353#gene-expression>
13. 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.
14. Grishkovskaya XI, Paumann-Page M, Tscheliessnig R, Stampfer J, Hofbauer XS, Souidi M, et al. Structure of human promyeloperoxidase (proMPO) and the role of the propeptide in processing and maturation. *J Biol Chem*. 2017;292(20):8244–61.
 15. Van Antwerpen P, Slomianny MC, Boudjeltia KZ, Delporte C, Faid V, Calay D, et al. Glycosylation pattern of mature dimeric leukocyte and recombinant monomeric myeloperoxidase: Glycosylation is required for optimal enzymatic activity. *J Biol Chem*. 2010;285(21):16351–9.
 16. Beckman Coulter. Mieloperoxidasa - Beckman Coulter [Internet]. [cited 2021 Aug 8]. Available from: <https://www.mybeckman.co/reagents/coulter-flow-cytometry/antibodies-and-kits/single-color-antibodies/myeloperoxidase>
 17. Khan A, Alsahli M, Rahmani A. Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: Recent Biochemical and Pathological Perspectives. *Med Sci*. 2018;6(2):33.
 18. Kinkade JM. Evidence for the Involvement of an Acidic Compartment in the Processing of Myeloperoxidase in Human Promyelocytic Leukemia HL-60 Cells ' ronment (10). Lysosomes are generally considered to be acidic organelles , and pro- teolysis involved in the product. 1987;255(2):428–36.
 19. Zhu J De. Myeloidcell-lineage and premylocytic-stage-specific- expression of the mouse myeloperoxidase gene is controlled at initiation as well as elongation levels of transcription. *Cell Res*. 1999;9(2):107–34.
 20. Nauseef WM, McCormick SJ, Goedken M. Coordinated participation of calreticulin and calnexin in the biosynthesis of myeloperoxidase. *J Biol Chem*. 1998;273(12):7107–11.
 21. Fiedler TJ, Davey CA, Fenna RE. X-ray crystal structure and characterization of halide-binding sites of human myeloperoxidase at 1.8 Å resolution. *J Biol Chem*. 2000;275(16):11964–71.
 22. García Morales OH, Roche NP, Flores Sánchez RM. Enzimas generadoras de especies reactivas del oxígeno: Mieloperoxidasa. *Rev Cuba Investig Biomed*. 1998;17(3):190–7.
 23. Reynolds WF, Rhees J, Maciejewski D, Paladino T, Sieburg H, Maki RA, et al. Myeloperoxidase polymorphism is associated with gender specific risk for Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 1999;155(1):31–41.
 24. Crawford FC, Freeman MJ, Schinka JA, Morris MD, Abdullah LI, Richards D, et al. Association between Alzheimer's disease and a functional polymorphism in the Myeloperoxidase gene. *Exp Neurol*. 2001;167(2):456–9.
 25. Willems HME, Ahmed SS, Liu J, Xu Z, Peters BM. Vulvovaginal candidiasis: A current

- understanding and burning questions. *J Fungi*. 2020;6(1).
26. 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.
 27. Persad AS, Kameoka Y, Kanda S, Niho Y, Suzuki K. Arginine to cysteine mutation (R499C) found in a Japanese patient with complete myeloperoxidase deficiency. *Gene Expr*. 2005;13(2):67–71.
 28. Odobasic D, Kitching AR, Holdsworth SR. Neutrophil-mediated regulation of innate and adaptive immunity: The role of myeloperoxidase. *J Immunol Res*. 2016;2016.
 29. Kutter D, Devaquet P, Vanderstocken G, Paulus JM, Marchal V, Gothot A. Consequences of total and subtotal myeloperoxidase deficiency: Risk or benefit? *Acta Haematol*. 2000;104(1):10–5.
 30. Kutter D. Prevalence of myeloperoxidase deficiency: Population studies using Bayer-Technicon automated hematology. *J Mol Med*. 1998;76(10):669–75.
 31. Zielinska-Jencylik J, Sypula A, Budko E, Rzadkowska-Bodalska H. Interferonogenic and antiviral effect of extracts from *Erodium cicutarium*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 1987;35(2):211–20.
 32. Pahwa R, Modi P JI. Myeloperoxidase Deficiency. *tatPearls Publ*. 2020;
 33. Nauseef WM, McCormick S, Goedken M. Impact of missense mutation on biosynthesis of myeloperoxidase. *Redox Rep*. 2000;5(4):197–206.
 34. Rutkowski R, A Pancewicz S, Rutkowski K, Rutkowska J. [Reactive oxygen and nitrogen species in inflammatory process]. *Pol Merkur Lek [Internet]*. 2007;134:131–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18044345/>
 35. Freeman TA, Parvizi J, Della Valle CJ, Steinbeck MJ. Reactive oxygen and nitrogen species induce protein and DNA modifications driving arthrofibrosis following total knee arthroplasty. *Fibrogenes Tissue Repair*. 2009;2(1):1–11.
 36. Aratani, Kura, Watanabe, Akagawa, Takano, Suzuki, et al. In vivo role of myeloperoxidase for the host defense. *Jpn J Infect Dis [Internet]*. 2004 Oct 1 [cited 2021 Aug 8];57(5):S15–S15. Available from: <https://europepmc.org/article/med/15507755>
 37. Lim MS, Elenitoba-johnson KSJ. Immunodeficiencies. 2004;6(2):59–83.
 38. Cos Padrón Y, Torres Leyva I, Marsán Suárez V, Macías Abraham C. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. *Rev Cuba Hematol Inmunol Hemoter [Internet]*. 2004;20(0864–0289). Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-

02892004000100002&lng=es&nrm=iso&tlng=es

39. Kalinski T, Jentsch-Ullrich K, Fill S, König B, Costa SD, Roessner A. Lethal candida sepsis associated with myeloperoxidase deficiency and pre-eclampsia: Case report. *Apmis*. 2007;115(7):875–80.
40. Netea MG, Maródi L. Innate immune mechanisms for recognition and uptake of *Candida* species. *Trends Immunol*. 2010;31(9):346–53.
41. Rosati D, Bruno M, Jaeger M, Ten Oever J, Netea MG. Recurrent vulvovaginal candidiasis: An immunological perspective. *Microorganisms*. 2020;8(2):1–14.
42. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet*. 2007;369(9577):1961–71.
43. Uppuluri P, Lopez Ribot JL. *Candida albicans* biofilms. *Candida albicans Cell Mol Biol Second Ed*. 2017;18(5):63–75.
44. Sangaré I, Sirima C, Bamba S, Zida A, Cissé M, Bazié WW, et al. Prevalence of vulvovaginal candidiasis in pregnancy at three health centers in Burkina Faso. *J Mycol Med [Internet]*. 2018;28(1):186–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.08.006>
45. Mbakwem-Aniebo C, Osadebe AU, Athanasonny E, Okonko IO. Prevalence of *Candida* spp. and age-related disparities amongst women presenting with vaginitis at the obstetrics and gynaecology (O&G) clinic in a tertiary hospital in Port Harcourt, Nigeria. *Afr Health Sci*. 2020;20(1):51–8.
46. Beltrame A, Matteelli A, Carvalho ACC, Saleri N, Casalini C, Capone S, et al. Vaginal colonization with *Candida* spp. in human immunodeficiency virus - Infected women: A cohort study. *Int J STD AIDS*. 2006;17(4):260–6.
47. Vermitsky JP, Self MJ, Chadwick SG, Trama JP, Adelson ME, Mordechai E, et al. Survey of vaginal-flora *Candida* species isolates from women of different age groups by use of species-specific PCR detection. *J Clin Microbiol*. 2008;46(4):1501–3.
48. Bradford LL, Ravel J. The vaginal mycobiome: A contemporary perspective on fungi in women's health and diseases. *Virulence*. 2017;8(3):342–51.
49. Bitew A, Abebaw Y. Vulvovaginal candidiasis: Species distribution of *Candida* and their antifungal susceptibility pattern. *BMC Womens Health*. 2018;18(1):1–10.
50. Aratani Y, Kura F, Watanabe H, Akagawa H, Takano Y, Suzuki K, et al. Critical role of myeloperoxidase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase in high-burden systemic infection of mice with *Candida albicans*. *J Infect Dis*. 2002;185(12):1833–7.
51. Aratani Y, Kura F, Watanabe H, Akagawa H, Takano Y, Suzuki K, et al. Relative contributions of myeloperoxidase and NADPH-oxidase to the early host defense against

- pulmonary infections with *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol.* 2002;40(6):557–63.
52. Lina Marcela RP. Identificación de polimorfismo(s) en el gen de la Mieloperoxidasa asociado a infecciones recurrentes por . Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2018.
 53. Clark BRA, Klebanoff SJ, System PC. Brief Definitive Report NEUTROPHIL-MEDIATED TUMOR CELL CYTOTOXICITY : ROLE OF THE PEROXIDASE SYSTEM * Polymorphonuclear leukocytes (PMN) employ a system comprised of myeloperoxidase (MPO), H₂O₂ , and an oxidizable halide cofactor to kill a variety . 1975;141:1442–7.
 54. Montpellier TS. *Br. J. exp. Path* (1982) 63, 320 SERUM INHIBITORY EFFECT ON MYELOPEROXIDASE IN HUMAN CANCER. 1982;320–4.
 55. Antachopoulos C. 2010 (Antachopoulos) Invasive fungal infections in congenital immunodeficiencies.pdf. 2010;1.
 56. 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.
 57. Cassone A. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: Pathogenesis, immunity and vaccine prospects. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 2015;122(6):785–94.
 58. Vélez G, Rocha Y, Arias A, López J. Función del sistema NADPH oxidasa en la formación de trampas extracelulares de los neutrófilos (NETs). *Rev Cuba Hematol Inmunol y Hemoter.* 2016;32(1):43–56.
 59. Nauseef WM. Myeloperoxidase in human neutrophil host defence. *Cell Microbiol.* 2014;16(8):1146–55.
 60. Beckman Coulter. Mieloperoxidasa - Beckman Coulter [Internet]. Antígeno de mieloperoxidasa. [cited 2021 Aug 23]. Available from: <https://www.mybeckman.co/reagents/coulter-flow-cytometry/antibodies-and-kits/single-color-antibodies/myeloperoxidase>
 61. Nagra RM, Becher B, Tourtellotte WW, Antel JP, Gold D, Paladino T, et al. Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 1997;78(1–2):97–107.
 62. Hoy A, Leininger-Muller B, Kutter D, Siest G, Visvikis S. Growing significance of myeloperoxidase in non-infectious diseases. *Clin Chem Lab Med.* 2002;40(1):2–8.
 63. Green PS, Mendez AJ, Jacob JS, Crowley JR, Growdon W, Hyman BT, et al. Neuronal

- expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2004;90(3):724–33.
64. 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.
 65. Ohashi YY, Kameoka Y, Persad AS, Koi F, Yamagoe S, Hashimoto K, et al. Novel missense mutation found in a Japanese patient with myeloperoxidase deficiency. *Gene*. 2004;327(2):195–200.
 66. Aratani Y, Koyama H, Nyui SI, Suzuki K, Kura F, Maeda N. Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. *Infect Immun*. 1999;67(4):1828–36.
 67. 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.
 68. Comino R, Davi E, Marti JC, Docente U, Gene D De. OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA La vulvovaginitis candidia. 2013;56(2):108–16. Available from: file:///C:/Users/Usuario/Downloads/S0304501312001641_S300_es.pdf
 69. 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. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2015.10.001>
 70. Kalia N, Singh J, Kaur M. Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent vulvovaginal infections: A critical review. *Ann Clin Microbiol Antimicrob [Internet]*. 2020;19(1):1–19. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12941-020-0347-4>
 71. Kwak W, Han YH, Seol D, Kim H, Ahn H, Jeong M, et al. Complete Genome of *Lactobacillus iners* KY Using Flongle Provides Insight Into the Genetic Background of Optimal Adaption to Vaginal Ecniche. *Front Microbiol*. 2020;11(May):1–10.
 72. Aldunate M, Srbinovski D, Hearps AC, Latham CF, Ramsland PA, Gugasyan R, et al. Antimicrobial and immune modulatory effects of lactic acid and short chain fatty acids produced by vaginal microbiota associated with eubiosis and bacterial vaginosis. *Front Physiol*. 2015;6(JUN):1–23.
 73. Parolin C, Marangoni A, Laghi L, Foschi C, Palomino RAÑ, Calonghi N, et al. Isolation of vaginal lactobacilli and characterization of anti-candida activity. *PLoS One*. 2015;10(6):1–17.
 74. Van De Wijgert JHHM, Borgdorff H, Verhelst R, Crucitti T, Francis S, Verstraelen H, et al. The vaginal microbiota: What have we learned after a decade of molecular characterization? *PLoS One*. 2014;9(8).

75. Li J, McCormick J, Bocking A, Reid G. Importance of vaginal microbes in reproductive health. *Reprod Sci.* 2012;19(3):235–42.
76. Taylor BD, Darville T, Haggerty CL. Does bacterial vaginosis cause pelvic inflammatory disease? *Sex Transm Dis.* 2013;40(2):117–22.
77. Sha BE, Zariffard MR, Wang QJ, Chen HY, Bremer J, Cohen MH, et al. Female genital-tract HIV load correlates inversely with *Lactobacillus* species but positively with bacterial vaginosis and *Mycoplasma hominis*. *J Infect Dis.* 2005;191(1):25–32.
78. Hayes R, Watson-Jones D, Celum C, Van De Wijgert J, Wasserheit J. Treatment of sexually transmitted infections for HIV prevention: End of the road or new beginning? *Aids.* 2010;24(SUPPL. 4):1–19.
79. Van De Wijgert JHHM, Morrison CS, Cornelisse PGA, Munjoma M, Moncada J, Awio P, et al. Bacterial vaginosis and vaginal yeast, but not vaginal cleansing, increase HIV-1 acquisition in African women. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2008;48(2):203–10.
80. Jacobsen ID, Hube B. *Candida albicans* morphology: still in focus. *Expert Rev Anti Infect Ther [Internet].* 2017;15(4):327–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/14787210.2017.1290524>
81. Poulain D. *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. *Crit Rev Microbiol.* 2015;41(2):208–17.
82. Szafranski-Schneider E, Swidergall M, Cottier F, Tielker D, Román E, Pla J, et al. Msb2 shedding protects *Candida albicans* against antimicrobial peptides. *PLoS Pathog.* 2012;8(2).
83. Spettel K, Barousch W, Makristathis A, Zeller I, Nehr M, Selitsch B, et al. Analysis of antifungal resistance genes in *Candida albicans* and *Candida glabrata* using next generation sequencing. *PLoS One.* 2019;14(1):1–19.
84. Gao J, Wang H, Li Z, Wong AHH, Wang YZ, Guo Y, et al. *Candida albicans* gains azole resistance by altering sphingolipid composition. *Nat Commun [Internet].* 2018;9(1):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-06944-1>
85. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36(2):288–305.
86. Ramos JT, Francisco L, Daoud Z. Infección fúngica invasora en niños: diferencias y analogías con el adulto. *Rev Española Quimioter.* 2016;29(1):59–65.
87. Wu EY, Ehrlich L, Handly B, Frush DP, Rebecca H, Hill C, et al. Immunodeficiency Disorders : an Update. 2017;46(12):1630–44.
88. Quindós G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev*

- Iberoam Micol [Internet]. 2014;31(1):42–8. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.001>
89. Sanches JM, Giraldo PC, Bardin MG, Amaral R, Discacciati MG, Rossato L. Laboratorial Aspects of Cytolytic Vaginosis and Vulvovaginal Candidiasis as a Key for Accurate Diagnosis: A Pilot Study. *Rev Bras Ginecol e Obstet.* 2020;42(10):634–41.
 90. Uribarren-Berrueta T del NJ, Pineda-Murillo J, Cortés-Figueroa AÁ, Castañón Olivares LR. Candidosis vaginal. Segunda parte: diagnóstico, tratamiento y situación de algunos países latinoamericanos. *Rev Médica Risaralda.* 2017;23(1):159–66.
 91. Farr A, Effendy I, Frey Tirri B, Hof H, Mayser P, Petricevic L, et al. Guideline: Vulvovaginal candidosis (AWMF 015/072, level S2k). *Mycoses.* 2021;64(6):583–602.
 92. Pereira LC, Correia AF, da Silva ZDL, de Resende CN, Brandão F, Almeida RM, et al. Vulvovaginal candidiasis and current perspectives: new risk factors and laboratory diagnosis by using MALDI TOF for identifying species in primary infection and recurrence. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021;40(8):1681–93.
 93. Candidosis vaginal - Diagnóstico y tratamiento - Mayo Clinic [Internet]. [cited 2021 Sep 5]. Available from: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/yeast-infection/diagnosis-treatment/drc-20379004>
 94. Colomer M. Candidiasis vulvovaginal Tratamiento tópico y oral. *Actual científica Av Farm.* 2009;28(1):68–9.
 95. Pérez AM. Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR). Repos Inst la Univ Politècnica València [Internet]. 2011;10. Available from: [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacción en cadena de la polimerasa.pdf](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacción%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf)
 96. Tamay de Dios L * Ibarra C, ** Velasquillo C*. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Medigraphic [Internet].* 2013 [cited 2021 Sep 5];2:70–8. Available from: www.medigraphic.org.mx
<http://www.medigraphic.com/rid>
www.medigraphic.org.mx
 97. Márquez L, Serrato A, Cerritos R. Secuenciación de fragmentos de ADN. Herramientas Mol Apl en Ecol Asp teóricos y prácticos [Internet]. 2014;231–49. Available from: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/secuenciacion.pdf>
 98. Carla LC, Fernando GC, María TC, Antonio OP, Emilia CM, Rafael CM. Aplicaciones de las técnicas de secuenciación masiva en la Microbiología Clínica [Internet]. 2021. 1–55 p. Available from: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc->

procedimiento71.pdf

99. Products A. Manual de funcionamiento BC 3000 plus Hematología. Maquin Mont LTDA [Internet]. 2014;(7001):1–43. Available from:
http://www.maquinariamontana.com/images/manuales/H616_618_620.pdf%0Ahttp://sistemamid.com/preview.php?a=6209
100. NCBI. Cromosoma 17 de Homo sapiens, GRCh38.p13 Ensamblaje primario - Nucleótido - NCBI [Internet]. [cited 2021 Sep 6]. Available from:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000017.11?report=genbank&from=58269855&to=58280935&strand=true
101. Patisroğlu T, Eke Güngör H, Belohradsky JS, Ünal E, Klein C. Myeloperoxidase deficiency: The secret under the flag of unstained cell. *Turkish J Hematol*. 2013;30(2):232–3.
102. Campos-Sanchez E, Martínez-Cano J, del Pino Molina L, López-Granados E, Cobaleda C. Epigenetic Dereglulation in Human Primary Immunodeficiencies. *Trends Immunol*. 2019;40(1):49–65.
103. Capucine P, Bousfiha A, Jeddane L, Ailal F, Gaspar HB, Crow WA-H, et al. The 2017 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies. *Lubr Eng*. 1997;53(7):12–7.
104. Lanza F. Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency. *J Mol Med*. 1998;76(10):676–81.
105. Carmel R, Watkins D, Rosenblatt DS. Chapter 10 – Megaloblastic Anemia. *Nathan Oski's Hematol Oncol Infancy Child*. 8th Ed. 2015;308-343.e11.
106. Cheng G, Salerno JC, Cao Z, Pagano PJ, Lambeth JD. Identification and characterization of VPO1, a new animal heme-containing Peroxidase.
107. El-Ashram S, Al Nasr I, Suo X. Nucleic acid protocols: Extraction and optimization. *Biotechnol Reports* [Internet]. 2016;12:33–9. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2016.10.001>
108. Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I, et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: Implications for innate immunity. *Blood*. 2011;117(3):953–9.
109. Quie PG, White JG, Holmes B, Good RA. In vitro bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood. *J Clin Invest*. 1967;46(4):668–79.
110. Koziol-Montewka M, Magrys A, Paluch-Oles J, Bogut A, Buczynski K, Jablonka S. MPO and cytokines in the serum of cancer patients in the context of *Candida* colonization and infection. *Immunol Invest*. 2006;35(2):167–79.

111. Vigezzi C, Riera FO, Rodriguez E, Icely PA, Miró MS, Figueredo CM, et al. Candidiasis invasora: un enfoque a la infección en el sistema nervioso central. *Rev Argent Microbiol.* 2021;53(2):171–8.
112. Serrato Díaz A, Flores Rentería L, Aportela Cortez J, Sierra Palacios E. PCR: reacción en cadena de la polimerasa. [cited 2021 Sep 5]; Available from: [www.biologia](http://www.biologia.com).

ANEXO DE FIGURAS Y TABLAS

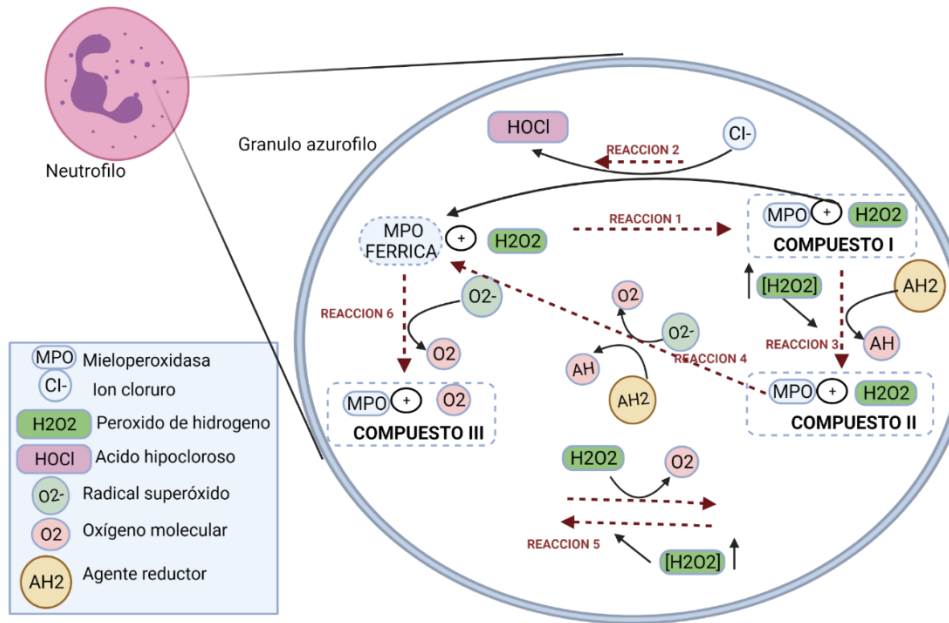


Figura 1. Procesos de reacción de la MPO. Los neutrófilos contienen 4 formas de MPO, las cuales se denominan MPO nativa o férrica, compuesto I, compuesto II, compuesto III, los cuales tienen similitud en su composición aminoacídica y actividad. La MPO reacciona con el H_2O_2 proveniente de las células fagocitarias formando un complejo enzima-sustrato con una fuerte capacidad oxidativa (reacción 1). Este complejo se combina generalmente con el haluro cloruro, que se oxida para formar el HOCl (reacción 2). El compuesto I puede ser reducido a compuesto II por un exceso de H_2O_2 o por la presencia de un agente reductor (AH2) como, por ejemplo, el ditiotreitól, cisteína, glutatión y cisteamina (reacción 3). Este compuesto II, a pesar de ser bastante estable puede reducirse a MPO férrica en presencia de un agente reductor o el radical superóxido (O_2^-) (reacción 4) o también puede oxidarse a compuesto III bajo concentraciones elevadas de H_2O_2 (reacción 5). Por otra parte, la MPO nativa puede ser oxidada por el O_2 a oximieloperoxidasa (compuesto III) (reacción 6). Adaptado de García Morales OH, Roche NP, Flores Sánchez RM. Enzimas generadoras de especies reactivas del oxígeno: Mieloperoxidasa. Rev Cuba Investig Biomed. 1998;17(3):190–7. (22)

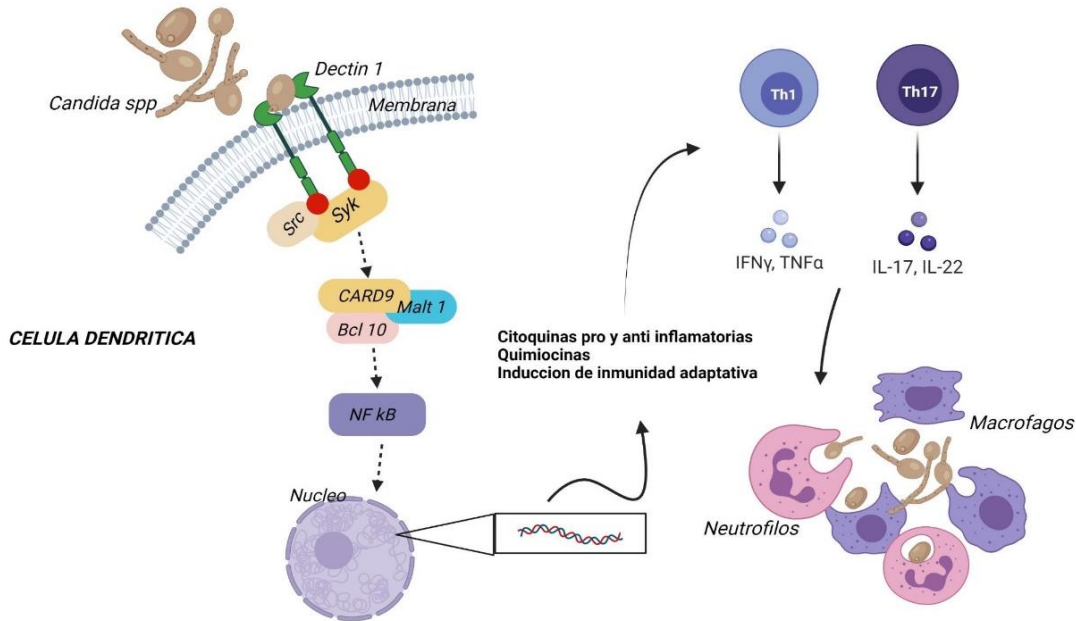


Figura 2. Respuesta inmune frente a *C. albicans* por medio del reconocimiento de β -1,3-glucanos por el receptor Dectina-1. La Dectina-1 es un receptor de lectina tipo C (CRL) expresado en su mayoría en células mieloides, incluyendo macrófagos, células dendríticas y neutrófilos, dichos receptores son una superfamilia heterogénea de receptores transmembrana y solubles, que se caracterizan por contener dominios conservados de lectina tipo C, además son los PRR mejor distinguidos en la respuesta frente a patógenos fúngicos. Los principales receptores que participan son: Dectina-1, Dectina-2, Dectina-3, el receptor Mincle, el CR3, el receptor de manosa y el DC-SIGN. Muchas de las respuestas antifúngicas dependen exclusivamente de Dectina-1, que induce la activación de diversas cascadas de señalización, principalmente de la activación de la quinasa Syk y de CARD9, y por ende, la formación del complejo CARD9-Bcl10MALT1 que corresponde a la vía de activación canónica más importante, finalmente, este complejo media la activación del factor de transcripción NF κ B y la consecuente expresión génica de mediadores proinflamatorios involucrados en la respuesta inmune frente a *Candida spp.* Cabe resaltar que estos receptores son necesarios para el reconocimiento, la fagocitosis, la inducción de mecanismos efectores antimicrobianos y mediadores inflamatorios, ya que dirigen y modulan la inmunidad adaptativa, incluidas las respuestas Th1 y Th17. Adaptada de Vigezzi C, Riera FO, Rodriguez E, Icely PA, Miró MS, Figueredo CM, et al. Candidiasis invasora: un enfoque a la infección en el sistema nervioso central. Rev Argent Microbiol. 2021;53(2):171–8. (111)

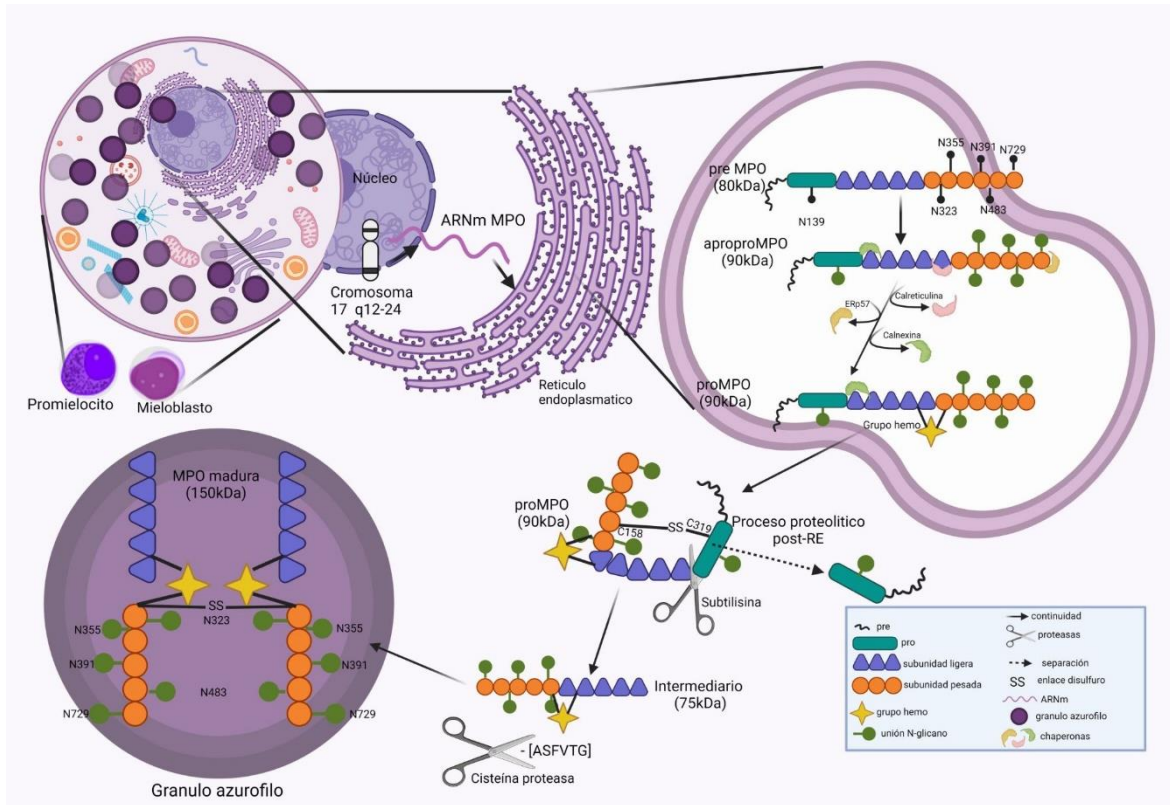


Figura 5. Proceso de biosíntesis de la MPO en el RER durante el desarrollo de células mieloides humanas (promielocíticas y mieloBLASTo). Se observa el proceso de biosíntesis de la MPO el cual inicialmente tiene lugar en el núcleo donde el *gen mpo* se transcribe y se genera el ARNm, el cual se dirige al RER, y allí por el proceso de traducción mediado por los ribosomas se genera el producto primario de la traducción de la MPO, posteriormente, se produce la modificación postraduccional del preMPO, donde se da proceso de glicosilación en los residuos asparagina, posteriormente, se genera la aproproMPO a la cual se unen chaperonas (calreticulina, ERp57 y calnexina) que evitan el plegamiento temprano de la proteína, y por ende, permiten que se dé el proceso de síntesis postraduccional donde se da la unión covalente de un grupo prostético hemo a la proteína para permitir su maduración y pasó al gránulo azurófilo. Una vez está en el compartimento post-RER, se da el procesamiento proteolítico mediado por una convertasa que escinde el propéptido de 116 aminoácidos de proMPO, luego una cisteína escinde un hexapéptido (ASFVTG) y finalmente, la MPO madura existe como un dímero que pasa al gránulo azurófilo.

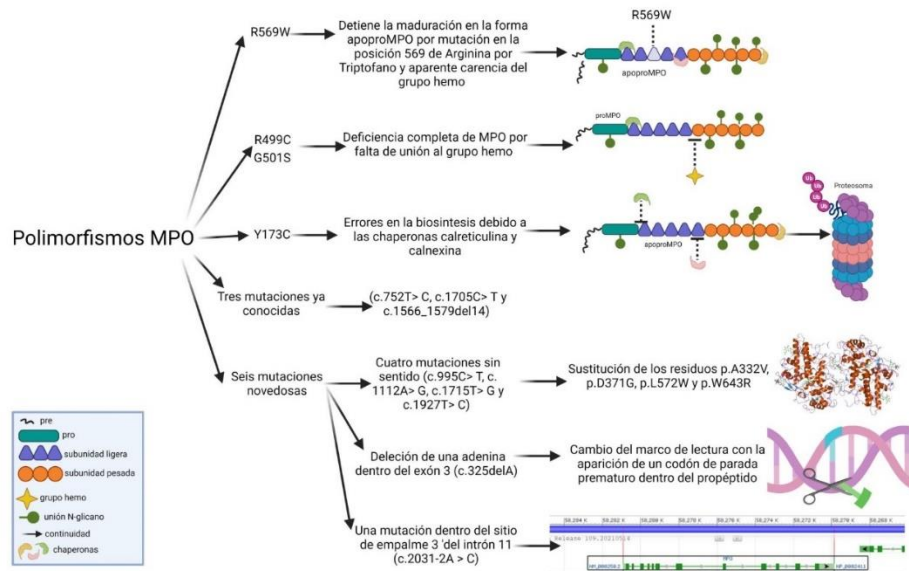


Figura 6. Polimorfismos del *gen mpo* y su relación con la biosíntesis de la proteína. Se presenta un diagrama explicando los diferentes polimorfismos descritos hasta el momento en la literatura y su interferencia con el proceso de biosíntesis proteica de la MPO. Las líneas punteadas hacen referencia a la interrupción de la unión de la molécula señalada.

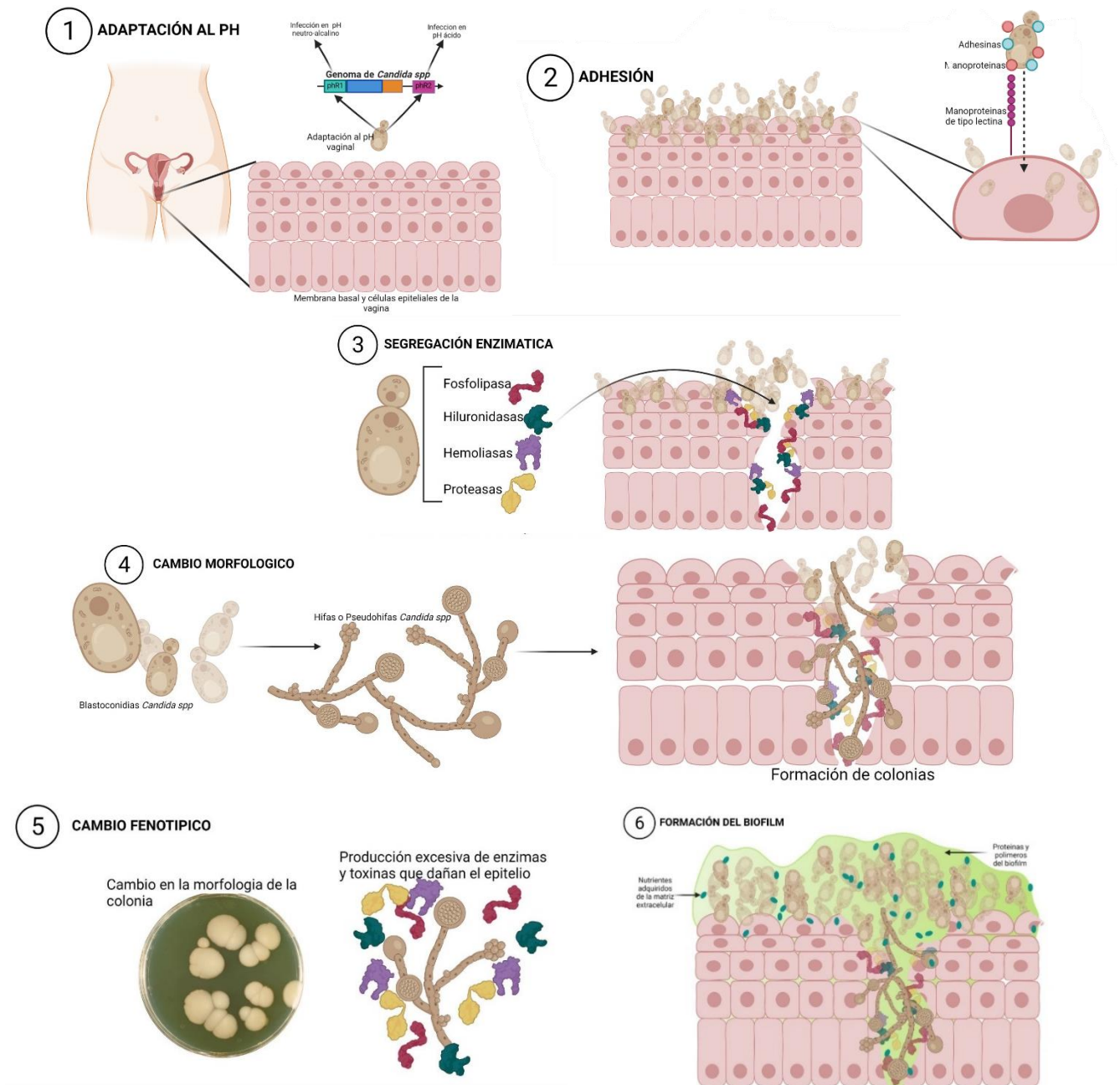


Figura 7. Representación esquemática del proceso de patogénesis y colonización de *C. albicans* en el epitelio estratificado de la vagina. Inicialmente para que *C. albicans* tenga la posibilidad de transformarse de comensal a patógeno es necesario que se produzca la disrupción del pH vaginal, esto se produce por un desequilibrio en las poblaciones comensales de *Lactobacillus spp*, que son los microorganismos encargados principalmente de mantener el pH ácido y por ende el microbiota. Frente a este cambio de pH *C. albicans* activa dos genes que le permiten adaptarse al estado neutro-alkalino o ácido que se presente en el medio, para el primer caso se activa el gen pH11 y para el

segundo caso se activa el gen *phR2*. Posteriormente, para empezar el proceso de colonización *C. albicans* se une por medio de ligandos de tipo manoproteínas a receptores de tipo lectina en las células epiteliales, seguidamente, se da el proceso de segregación enzimática de moléculas como fosfolipasas, hialuronidasas, amilasas y proteasas que permiten la ruptura de las células epiteliales y la membrana basal, de manera que este es uno de los mecanismos importantes frente a la patogenia y colonización de *C. albicans*, ya que a partir de este proceso las levaduras pueden tener un cambio morfológico con la formación de hifas o pseudohifas que en conjunto son capaces de formar colonias dentro del epitelio y generar la sintomatología específica de esta infección vulvovaginal, en este mismo momento es cuando se produce un cambio fenotípico que genera un aumento en la cantidad de enzimas proteolíticas que causan más daño en el epitelio, y dan la posibilidad de que *C. albicans* forme las biopelículas, que se compone no solo de hifas o pseudohifas sino también de levaduras, y nutrientes provenientes de la circulación sanguínea, de manera que se produce un curso clínico insidioso que es de difícil tratamiento.

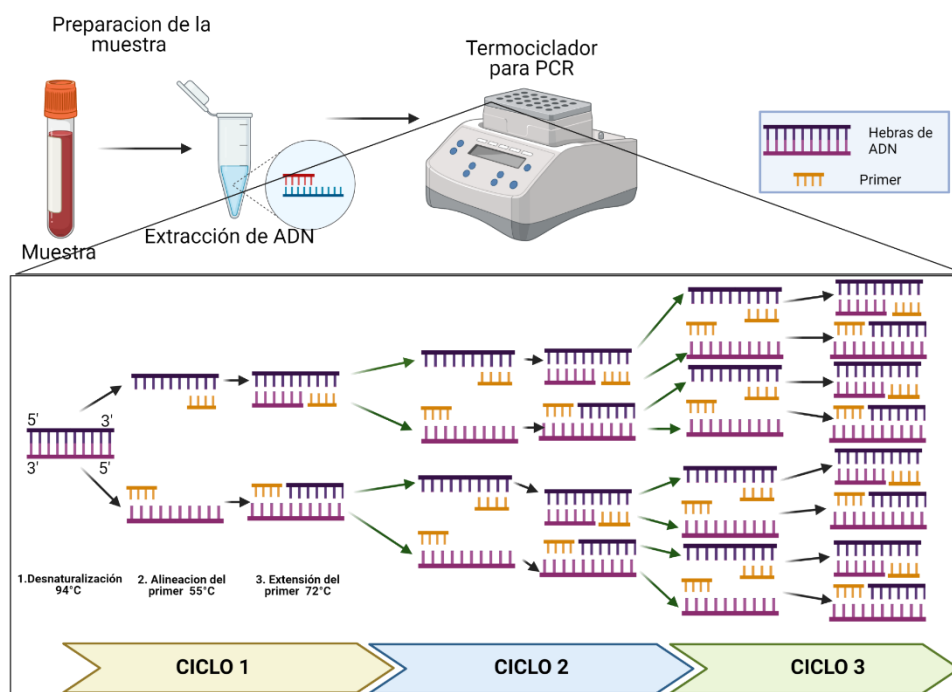


Figura 8. Ciclo de amplificación de PCR convencional. Los procesos de cada ciclo de amplificación de PCR consta de tres etapas: en primer lugar está la separación de las hebras de ADN llamada desnaturalización, luego se da la unión de los cebadores a una secuencia complementaria del ADN molde, a esta etapa se le conoce como alineamiento y la etapa de extensión por la síntesis semiconservativa de una nueva cadena por adición de nucleótidos debido a la acción de la ADN polimerasa; cabe mencionar que es de vital importancia la temperatura específica para

cada una de las etapas. De manera teórica, transcurridos n ciclos, por cada molécula de DNA inicial, el número de copias de segmentos de DNA de longitud variable es 2^n , por ello, esta técnica permite generar en 30 ciclos de amplificación más de dos billones de copias de ADN a partir de una sola molécula. Adaptado de Serrato Díaz A, Flores Rentería L, Aportela Cortez J, Sierra Palacios E. PCR: reacción en cadena de la polimerasa. [cited 2021 Sep 5]; Available from: www.biologia (112).

Tabla 1. Características de los primers usados en la amplificación del *gen mpo*.

	Secuencia	Long (pb)	Tm (°C)	%GC	Tamaño del producto (pb)
Forward primer	3'CTCCACCTGTGGAGCAACCAC 5'	21	69,4	59,09%	568
Reverse primer	5'AGACCAGCTGCGTTCAGCAGC 3'	21	68,3	59,09%	

Tabla 2. Estandarización de PCR (MgCl₂ y primers)

	MgCl ₂				Primers		
[] Inicial	25 mM				10pmol		
[] Final	3mM	2.5mM	2mM	1.5mM	0.25pmol	0.2pmol	0.15pmol
Volumen inicial para 20uL	2.4 uL	2uL	1.6uL	1.2uL	0.5 uL	0.4 uL	0.3 uL

Tabla 3. Reactivos y cantidades usados para la PCR convencional.

REACTIVOS	[] INICIAL	[] FINAL	VOL. PARA 20 µL (1 MUESTRA)	VOL. PARA 30 MUESTRAS
Agua	Nota: La cantidad de agua para cada reacción dependió de la cantidad de		En promedio se utilizaron 10.1 µL	303 µL

	uL de ADN adicionados para una concentración de 50 ng, con el fin, de completar un volumen final de 20 uL de reacción.			
Buffer	5X	1X	4 µL	120 µL
MgCl ₂	25 mM	3 mM	2,4 µL	72 µL
dNTPs	200 mM	4 mM	0,4 µL	12 µL
Primer F	10 pmol/uL	0,25 pmol/uL	0,5 µL	15 µL
Primer R	10 pmol/uL	0,25 pmol/uL	0,5 µL	15 µL
Taq	5 U/µL	0,025 U/µL	0,1 µL	3 µL
ADN	Nota: Para cada muestra se utilizó una concentración de 50ng.			

Tabla 4. Condiciones de los ciclos para la PCR convencional.

FASE	Desnaturación inicial	Desnaturación	Hibridación	Elongación	Elongación final	Conservación
N° CICLOS	1 ciclo	3 ciclos			2 ciclos	1 ciclo
T° (°C)	94	94	66	72	72	8
TIEMPO	5 min	40seg	40seg	30seg	10 min	∞
Volumen de la reacción: 20uL						

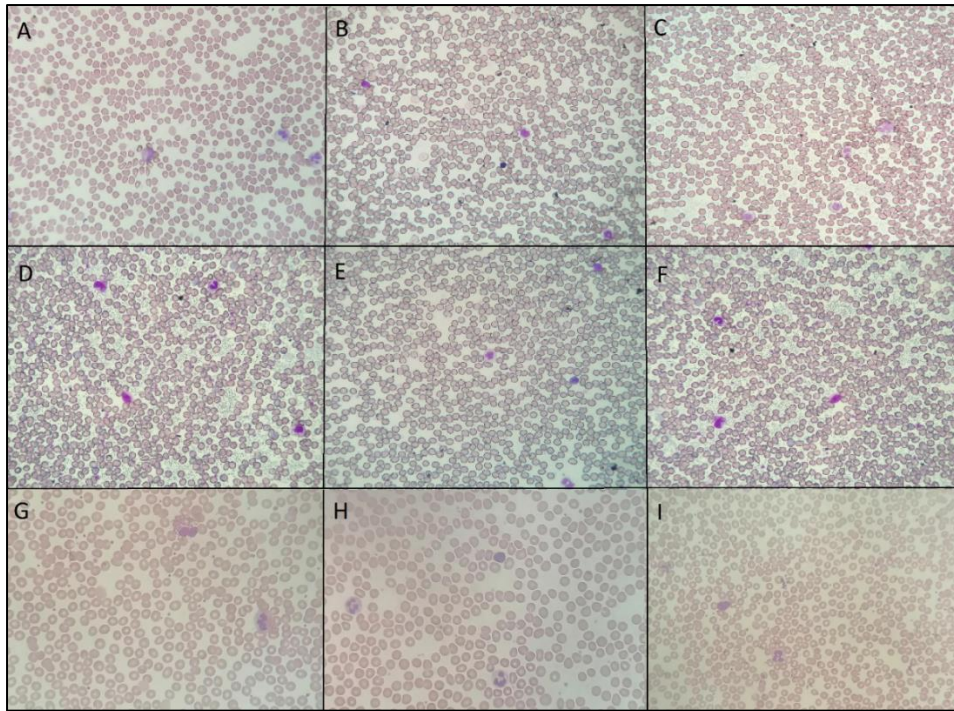


Figura 9. Tinción de Wright muestras grupo 2, objetivo 40x. Imágenes de la A-F son representativas de las muestras del segundo grupo que tenían mayor definición de las células sanguíneas en objetivo de 40x.

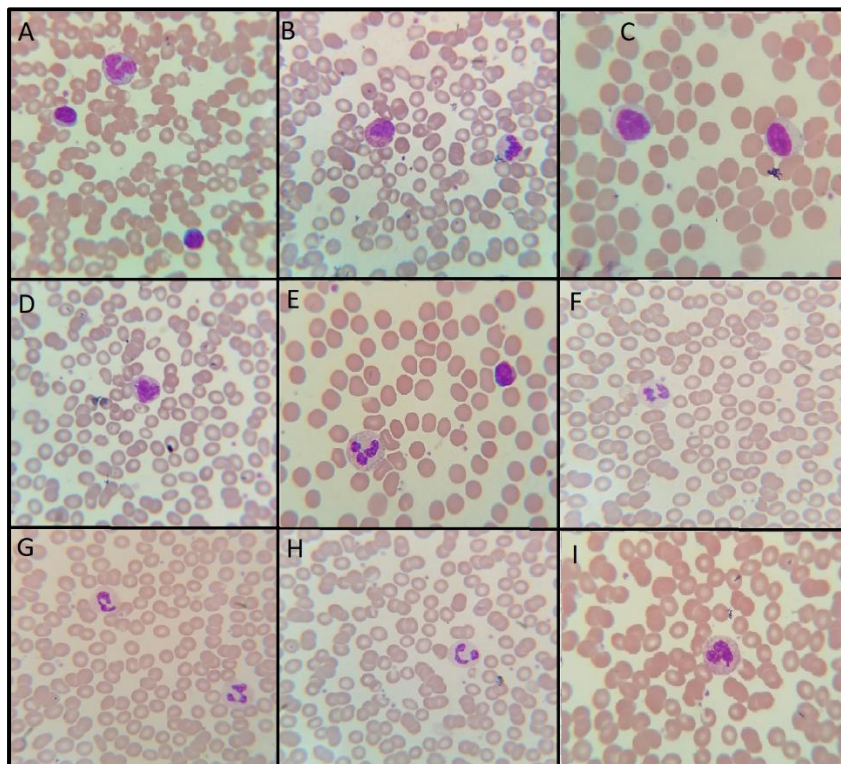


Figura 10. Tinción de Wright muestras grupo 2, objetivo 100x. Imágenes de la A-I son representativas de las muestras del segundo grupo que tenían mayor definición de las células sanguíneas en objetivo de 100x.

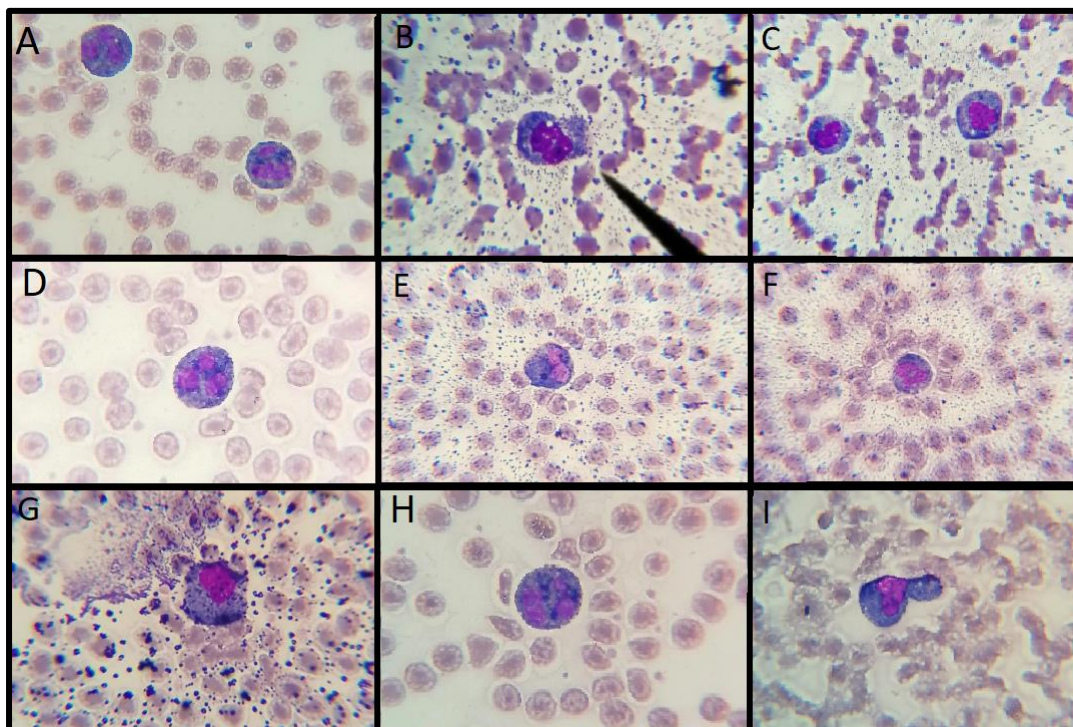


Figura 11. Tinción de peroxidasa leucocitaria muestras grupo 2, objetivo 100x. Imágenes de la A-I son representativas de las muestras del segundo grupo que tenían mayor definición de los PMN en objetivo de 100x.

Tabla 5. Resultados del cuadro hemático de las muestras del segundo grupo (Muestras 11-28).

CUADRO ROJO	RBC	HB	HCT	MCV	MCH	MCHC	RDW-CV
	3.5-5.5 x10 ¹² /L	12-16 gr/dL	36- 48%	82-95 fL	27-31 pg	32-36 g %	11.5- 14.5 %
	5.0 x10 ¹² /L	15.3 gr/dL	44.6 %	88.8 fL	30.3 pg	34.2 g %	13.8 %
	WBC	LYMPH	MID	GRAN			

CUADRO BLANCO	4.0 -10.0 x10 ⁹ /L	20-40%	3-9%	50-70%
	7.6 x10 ⁹ /L	36.7 %	6.4 %	57.2 %
CUADRO PLAQUETARIO	PLT 150.0-400.0 x10 ⁹ /L	MPV 7-10 fL		
	314.7 x10 ⁹ /L	9.1 fL		

Tabla 6. Resultados de espectrofotometría en el equipo Nanodrop (Muestras 1-28).

CONSECUTIVO MUESTRA	A260/280	A260/230	ng/uL	CONSECUTIVO MUESTRA	A260/280	A260/230	ng/uL
1	0,70	0,13	11,7	16	1.45	0.37	35,4
2	1,30	0,36	19,1	17	1.78	0.71	37.2
3	1.59	0.72	17.6	18	1.68	0.78	52.1
4	1,14	0,21	12,2	19	1,07	0,18	22,9
5	1,30	0,32	58,7	20	0.88	0.18	18,3
6	1,02	0,22	25	21	1.67	1.12	14.7
7	1.28	0.26	17.5	22	1.35	0.40	17,2
9	0.86	0.22	5,9	23	1.60	0.81	13.9
10	1.02	0.14	7.5	24	1.31	0.37	24,1
11	1,65	1,48	27,7	25	1.76	1.42	14.9
12	1.80	1.20	38.0	26	1,80	1,74	80,6
13	1.80	0.53	33.7	27	1.65	0.49	16.8
14	1,19	0,64	7,9	28	1,16	0,26	16,5
15	1,72	0,10	12,5				

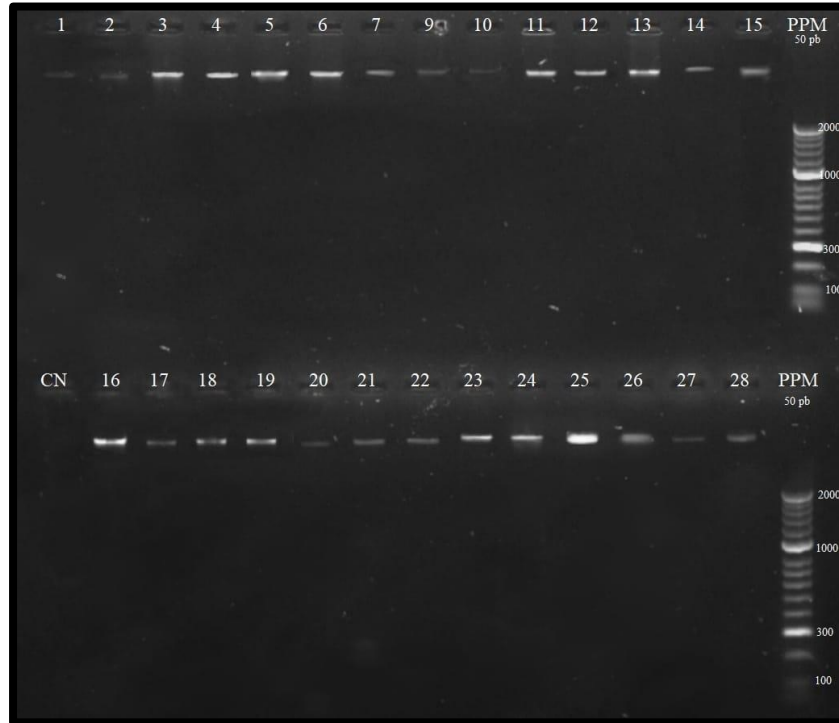


Figura 12. Resultados electroforesis en gel de agarosa de las muestras 1-28

>hg38_knownGene_ENST00000225275.4 range=chr17:58269855-58280935 5'pad=0 3'pad=0 strand=- repeatMasking=none

```

GACAATATCAGGTGAGCTGTGGAGTGGGGTCTTGGAGCTGGATGACA
GCAGCTGGCAAGGGGATAAGAGAGCAGTGAGCCCTCCCTCAAGGAGGTC
TGGCTTTATCCATAGACAGGGCCCTCTGAGGTGGGGCTGAGGTACAAAGG
GGGATTGAGCAGCCAGGAGAAGAGAGATGGGGTTCCTTCTTCTCTTC
TCTCAGATGCATGGTGGACTTAGGACCTTGCTGGGCTGGGGTCTCACTG
CAGAGATGAAGCTGCTTCTGGCCCTAGCAAGGCTCCTGGCCATTCTGGCC
ACGCCCAGCCCTCTGAAGTGCTGCTCAGCTGTCTGGGGGAGGTGGGA
CACCTCGTTGGTGTGAGCTCCATGGAGGAGGCCAAGCAGCTGGTGGACA
AGGCCACAAAGGAGCGGGGAAAGCATCAAGCAGCGGCTTCGCAGCGGC
TCAGCAGCCCATGGAACCTCTATCTACTTCAAGCAGCCGGTGGCAGC
CACCAGGACGGCGGTGAGGGCCGCTGACTACCTGCACGTGGCTCTAGAC
TGCTGGAGAGGAAGCTGCGGTCCTGTGGCGAAGGCCATTCAATGTCACT
GATGTGCTGACGCCCGCCAGCTGAATGTGTTGTCGAAGTCAAGCGGCTG
CGCTACCAAGGACGTGGGGGTGACTTGCCCGGAGCAGGACAAATACCGCA
CCATCACCGGATGTGCAACAACAGACGCAAGCCACGCTGGGGCCCTCC
AACCCTGCCCTTTGTGGCTGGCTGCGGGCGAGTATGAGGACGGCTTCTC
TCTTCCCTACGGCTGAGCCCGGGGTCGAAGCGCAACGGCTTCCCGGTGG
CTCTGGCTCGCGGCTCCTCAACGAGATCGTGCGCTTCCCACTGATCAG
CTGACTCCGGACAGGAGCGCTCACTCATGTTATGCAATGGGGCAGCT
GTTGGACCAAGACTCGACTTCCCTTCAAGCGGCTGCGCGGCTCCTCT
TCGTCACTGGCTCAACTGCGAGACAGCTGCGTTCAGCAGCCGCTGCTG
TTCCCGCTCAAGATCCCAGCCCAATGACCCCGCATCAAGAACCAAGCCGA
CTGCATCCCGTTCTTCCGCTCCTGCGCGGCTTGGCCCGGAGCAACATCA
CCATCCGCAACAGATCAACCGGCTCACTTCTTCTGTTGACGCCAGCATG
GTGTACGGCAGCAGGAGCCCTTGGCCAGGAACCTGCGCAACATGTCCAA
CCAGCTGGGGCTGCTGGCCGTCAACAGCGGCTTCCAAAGCAACGGCCGG
CCCTGCTGCCCTTTGACAACTGCACGATGACCCCTGTCTCTCAACAA
CGCTCAGCGCATCCCTGCTTCTGGCAGGGGACACCCGTTCAGTGA
GATGCCCGAGCTCACCTCCATGCACACCCTTACTTCGGGAGCAACAC
GGCTGCGCACAGAGCTCAAGAGCTGAACCTAGGTGGGATGGGGAGAGG
CTTACCAGGAAGCCCGGAAGATCGTGGGGCCATGGTCCAGATCATCAC
TTACCGGGACTACCTGCCCTGGTGTGGGGCCAAAGGCTGAGGAAAGT
ACCTGCCCAGCTACCGTCTTCAAACTGACTCAGTGGACCCAGCAGATCGCC
AAGCTTCCACCAATGCCCTTCCGCTACGGCCACCCCTCATCCAACTT
CATGTCTCCGCTGGACAATCGGTACAGCCATGGAACCCAAACCCGCTG
TCCCCCTCAGCAGGGTCTTTTTGCTCCTGGAGGGTGTGCTGGAAAGGT
GGCATTGACCCCATCCTCCGGGGCTCATGGCCACCCCTGCCAAGCTGAA
TCGTGAGAACCAATTCAGTGGATGAGATCCGGAGCGATTGTTGAGC
AGGTCATGAGGATTGGGCTGGACCTGCCTGCTGAACTGCAGCGCAGC
AGGGACCACGGCTCCAGGATACAATGCTGGAGGGCTTCTGTGGGCT
CCCGCAGCTGAAACTGTGGCCAGCTGGCAGCGTGTGAGGAACTGA
AATTGGCGAGGAACTGATGGAGCAGTATGGCAGCCCAACATCGAC
ATCTGGATGGGCGGCTGTCCGAGCTCTGAAGCGCAAGGCCGCGTGGG
CCCACTCCTCGCTGCATCATCGGTACCCAGTTCAGGAAGCTCCGGATG
GTGATCGTTTTGGTGGGAGAACGAGGGTGTGTTCAAGTGCAGCAGCGA
CAGGCCCTGGCCAGATCTATTGCCCGGATCATCTGCGACAAACAGG
CATCACCCAGTGTCTAAGAACCAACATCTCATGTCCAACTCATATCCCC
GGGACTTTGTCAACTGCAGTACACTTCCCTGATTGAACCTGGCTTCTGG
AGGGAAGCTCTTAGAGGCGAGGTAAGGGGGTGCAGCAGTGAAGGGGATA
TCTGGGCTGGCCAGTGGAAACACGGAGATCTCCTTGGCCATAGATGAGCC
CAGCCCTGTTCTGGGTGCAGCTGAGAAAATGAGTGAAGTACAGCTTCAATT
GTGTGCTCATGTATGTGCGAAGTATATAAATGGCTTTTTCATGCTGTGT
GTTGTCTGAAACTGGGGAGTGTTCATGGGTTATGTGTATGTCGCATTTA
TGTGAGTGTGTTTTGTGCTGATGAGAACTGAGTATGTGGAAGGCGAGC
AGAGCGGACTGGTGAAGGACACAGCTCAGGAACTAGACTGCCTGGGTTCC
AATCCTGGCTCTGGCTTGCTAGCTATGTGACCTTGAAGCAATACCTT
CCTTAAACAAGAGTTTTCTTCTTGTAAATACATCTGTATGGTTTTCTT
GGAGGGCCCACTTGTATCCTCTGGTCTTCAATTTATTGAGCAGCTACTAC
ATGCAAGGCACTGTACTAGGCGTGAGAAAGCATATAGAGGCAAGAAAGAGA
TACCAAGATGCCATCTGTCTCTGGTGAAGCAGCTGGACCAAGTGGTGGC
TTGGAGGGATAAGCCAGCTGCAGCTGGGCTGTGTGGTGTACTTATGGGCT
CAGCCAGCAGGCTCAGGCCATGGCTCCCTTTTTCTTCTCACCTGAT
TTCTTGTATTCACTGAAGTTCTCTGAAGGAGAACTGGGCTGTGTGGC
CTTCTGTACCAATTTATTTGCTCCCAATGTTATGATAATAAAGGCACCC
CTGATGGGACCTCCA

```

Figura 13. Secuencia de los exones del *gen mpo*, obtenidos de la plataforma genome.ucsc.edu

3. Type or paste your sequence

Primer#1: 5'- 22 nt: A=4.0 T=5.0 C=6.0 G=7.0 CG=59.09%

Primer#2: 5'- 22 nt: A=6.0 T=3.0 C=5.0 G=8.0 CG=59.09%

4. PCR conditions

Primer conc. μ M

Results

ID #1	Sequence #1	Molecular weight g/mol	Extinction coefficient l/(mol'cm)	Tm °C	ID #2	Sequence #2	Molecular weight g/mol	Extinction coefficient l/(mol'cm)	Tm °C	Annealing Temperature °C
Primer#1	GTTGTCCAAGTCAAGCGGCTGC	6751.4	205500.0	69.4	Primer#2	CAGTTGACGCCAGTGACGAAGG	6809.5	218800.0	68.3	68.3

Figura 14. Condiciones de los primers forward y reverse obtenidas por Thermo Fisher Scientific

Genomes Genome Browser Tools Mirrors Downloads My Data Projects

UCSC In-Silico PCR

>chr17:56356412-56356979 568bp GTTGTCCAAGTCAAGCGGCTGC CAGTTGACGCCAGTGACGAAGG

```
GTTGTCCAAGTCAAGCGGCTGCcctaccaggacgtgggggtgacttgcc
cggagcaggacaaataccgaccatcaccgggatgtgcaacaacagggtgc
ggctggctgggggtggctgcaggaaaccgggctcagagagcgtcccggac
gccacaagcctcccgggtgtcagcgcctgtctcctcccctgcagacgcagcc
ccacgtggggcctccaactgtcctttgtgcgtggctgcggcggag
tatgaggacggcttctctctccctacggctggagccccggggtcaagcg
caacggcttcccgggtggctcggtagcggcggcggcagggggggcggg
gcccggccacgagggtgcgggacccaggcggcagctgatcctcgtgtccc
gcaggctcgcgggtctccaacgagatcgtgccttcccactgatcagc
tgactcggaccaggagcgtcactcatgttcatgcaatggggccagctg
ttggaccagacctgacttcaccctgagccggcggcggcctCCTT
CGTCACTGGCGTCAACTG
```

Primer Melting Temperatures

Forward: 68.5 C gttgtccaagtcaagcggctgc
Reverse: 67.5 C cagttgacgccagtgacgaagg
The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration.

Figura 15. Resultados de la PCR *In Silico* realizada por el programa bioinformático UCSC genome.

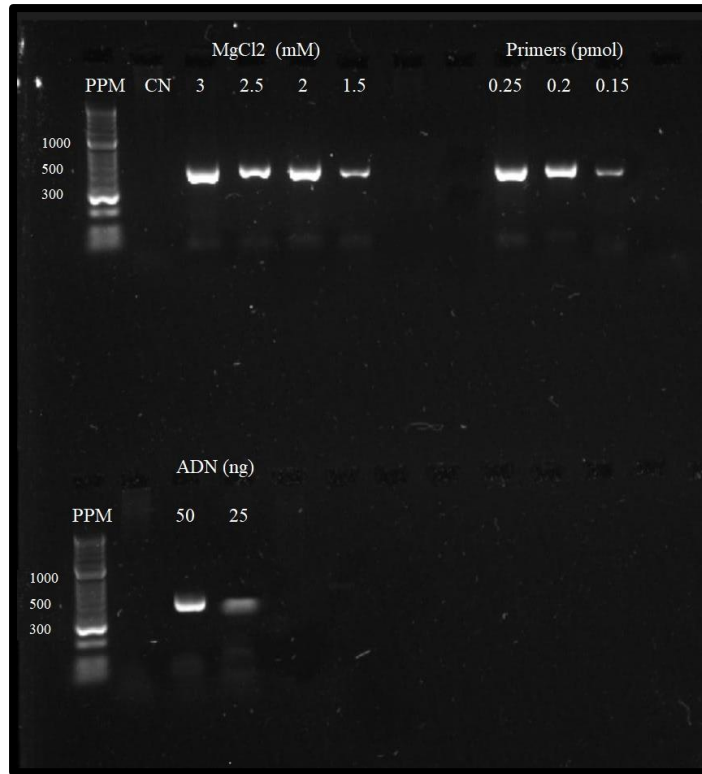


Figura 16. Resultados electroforesis con los productos de PCR Estandarizada

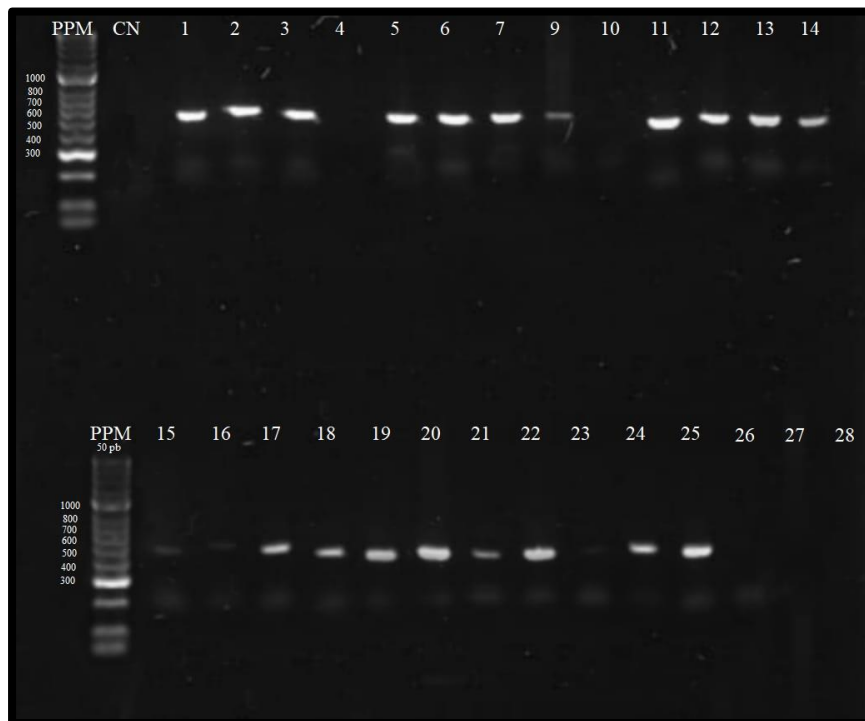


Figura 17. Electroforesis de los productos de PCR muestras 1-28

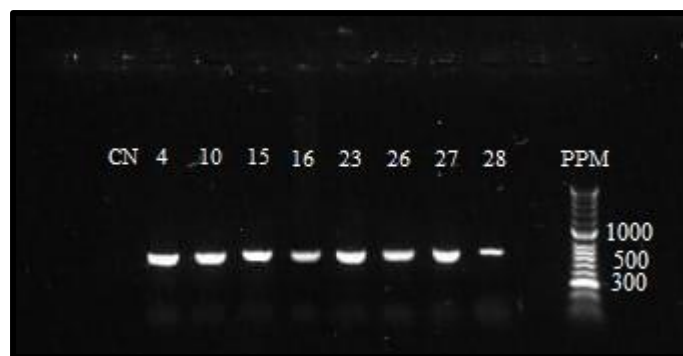


Figura 18. Electroforesis de los productos de PCR segunda amplificación

Tabla 7. Cuantificación productos PCR

CONSECUTIVO MUESTRA	ng/uL	CONSECUTIVO MUESTRA	ng/uL
1	1.710,8	16	1.898,3
2	740,9	17	1.418,4
3	1.365,5	18	859,1
4	985,2	19	1.072,9
5	1.130,9	20	1.211,6
6	1.133,9	21	1.187,3
7	1.273,2	22	1.432,6
9	757,4	23	1.651,4
10	892,1	24	1.617,1
11	1.110,6	25	1.091,3
12	1.505,3	26	1.724,6
13	3.107,01	27	658,3
14	1.071,1	28	2.385,5
15	783,3		

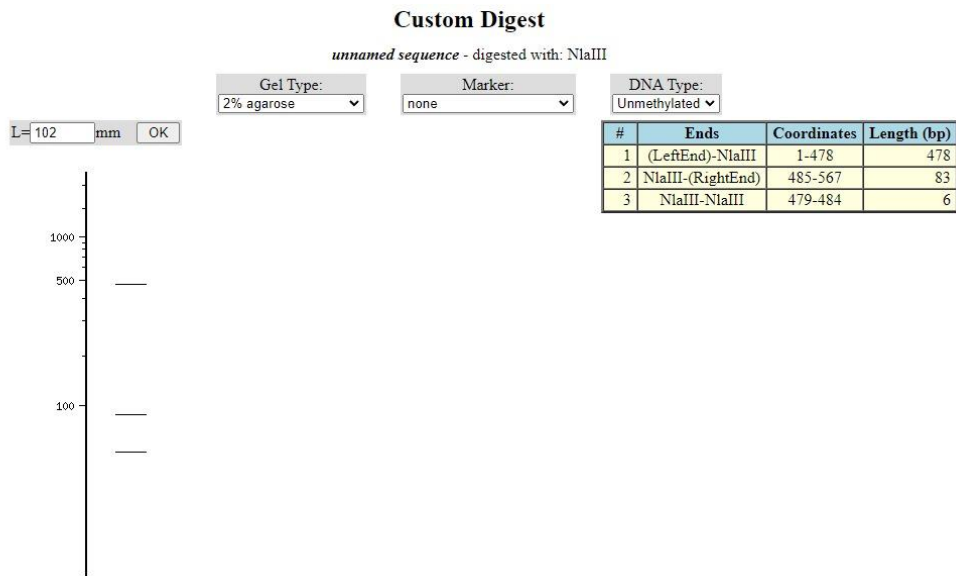


Figura 19. Corte enzimático *In silico* por la plataforma Neb Cutter 2.0V

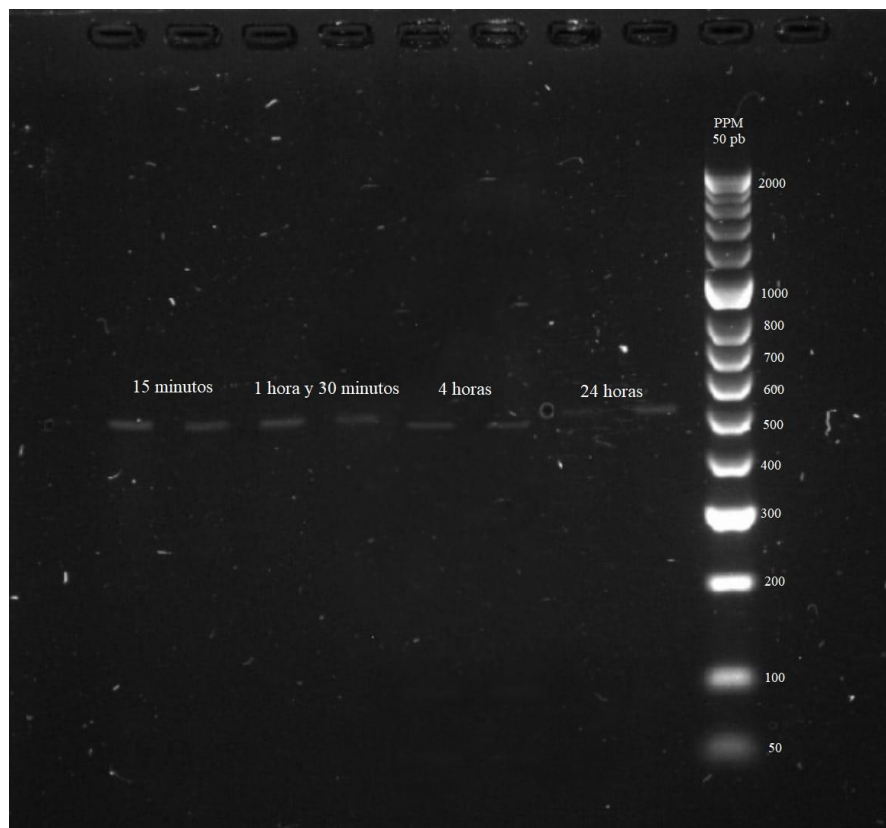


Figura 20. Electroforesis estandarización tiempos de corte enzimático agarosa 2% (15 minutos, 1 hora y 30 minutos, 4 horas, 24 horas)

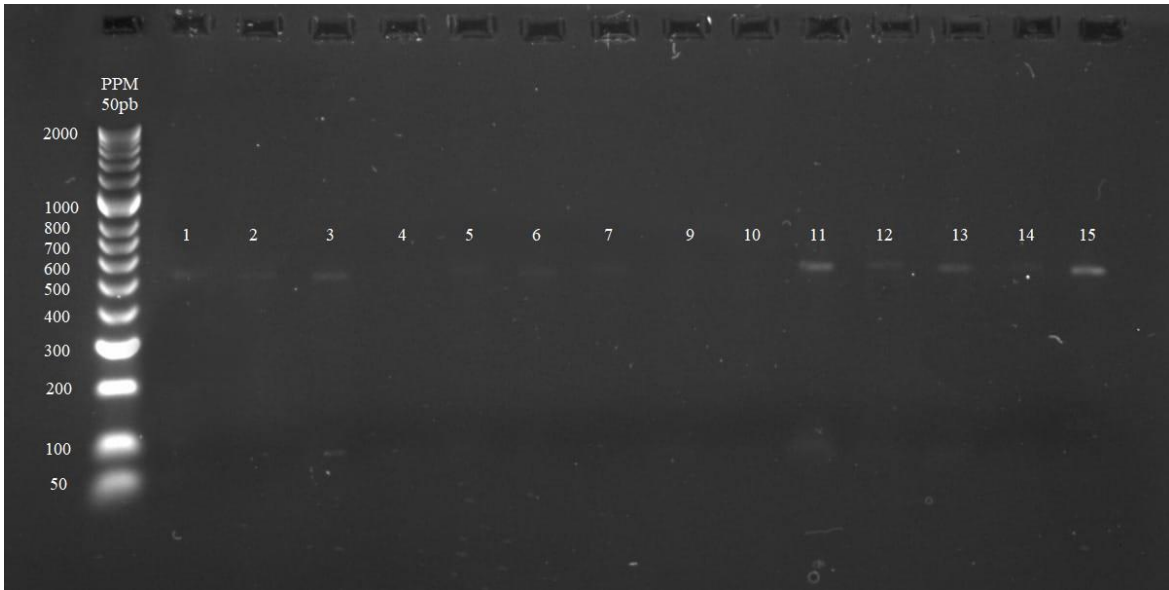


Figura 21. Electroforesis de agarosa 2% corte enzimático muestras 1-15

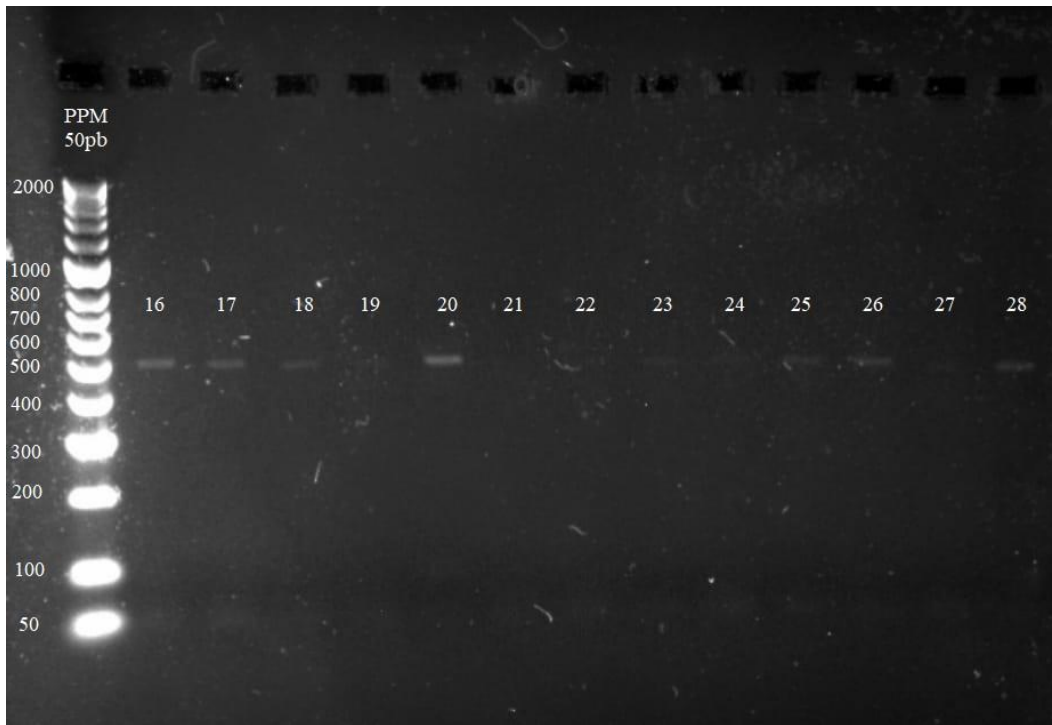


Figura 22. Electroforesis de agarosa 2% corte enzimático muestras 16-28

Tabla 8. Resultados del alineamiento de las secuencias con BLAST

Muestra	Secuenciación 3'-5'	Secuenciación 5'-3'	Analogía con el <i>gen</i> <i>mpo</i>	Figura	Tamaño final del producto secuenciado
1	X		0%	23	50
2	X		0%	24	68
3	X		0%	25	455
4	X		0%	26	466
5	X		0%	27	51
6	X		0%	28	50
7	X		0%	29	44
9	X		0%	30	44
10	X		0%	31	84
14	X		0%	32	62
15	X		99.39%	33	599
15		X	99.20%	34	594
17	X		99.19%	35	597
17		X	98.99%	36	589
19	X		0%	37	51
19		X	0%	38	53
20	X		0%	39	41
20		X	0%	40	41
27	X		0%	41	55
27		X	0%	42	49

File: mpo22301ss_MieloperoxidasaF.ab1 Run Ended: 2022/4/4 19:56:35 Signal G:829 A:872 C:791 T:558
Sample: mpo22301ss_MieloperoxidasaF Lane: 91 Base spacing: -13.4993105 50 bases in 634 scans

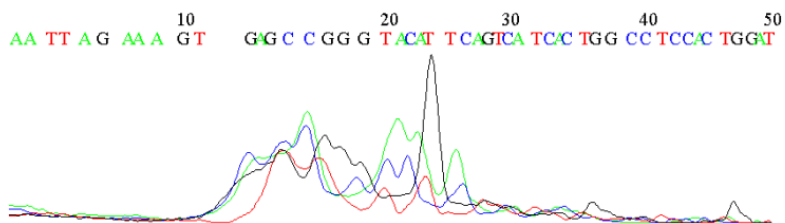


Figura 23. Secuenciación de la muestra 1 del *gen* *mpo*

File: mpo22302ss_MieloperoxidasasF.ab1 Run Ended: 2022/4/4 19:56:35 Signal G:461 A:474 C:607 T:374
 Sample: mpo22302ss_MieloperoxidasasF Lane: 89 Base spacing: -13.4993105 68 bases in 852 scans

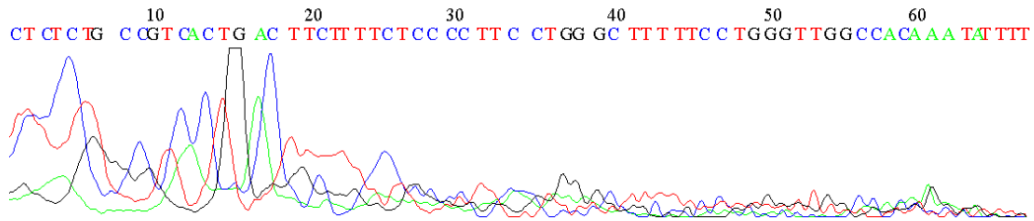


Figura 24. Secuenciación de la muestra 2 del gen mpo

File: mpo22303ss_MieloperoxidasasF.ab1 Run Ended: 2022/4/4 19:56:35 Signal G:45 A:51 C:79 T:59
 Sample: mpo22303ss_MieloperoxidasasF Lane: 87 Base spacing: 14.316718 455 bases in 5303 scans Page 1 of 1

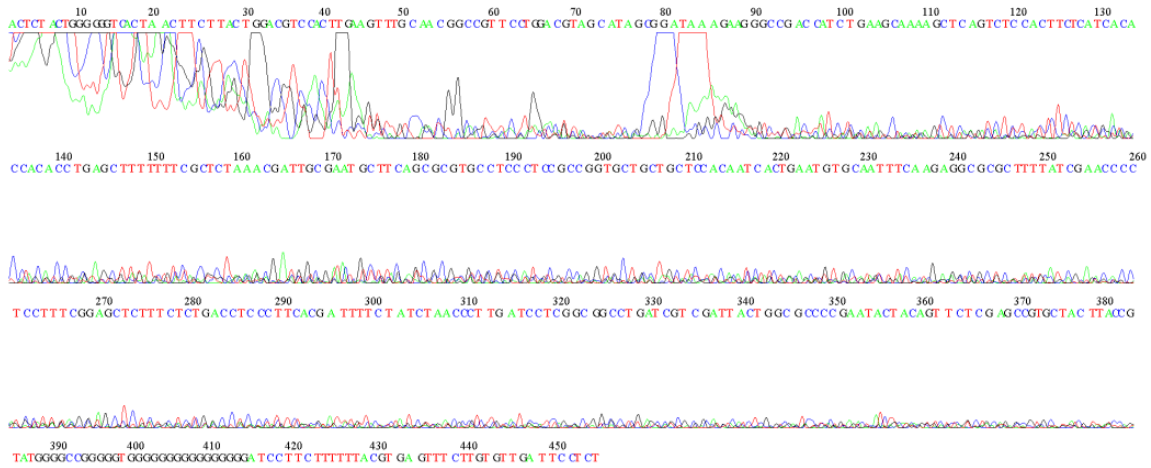


Figura 25. Secuenciación de la muestra 3 del gen mpo

File: mpo22304ss_MieloperoxidasaF.ab1 Run Ended: 2022/4/4 19:56:35 Signal G:65 A:72 C:102 T:74
 Sample: mpo22304ss_MieloperoxidasaF Lane: 85 Base spacing: 14.303811 466 bases in 5754 scans Page 1 of 1

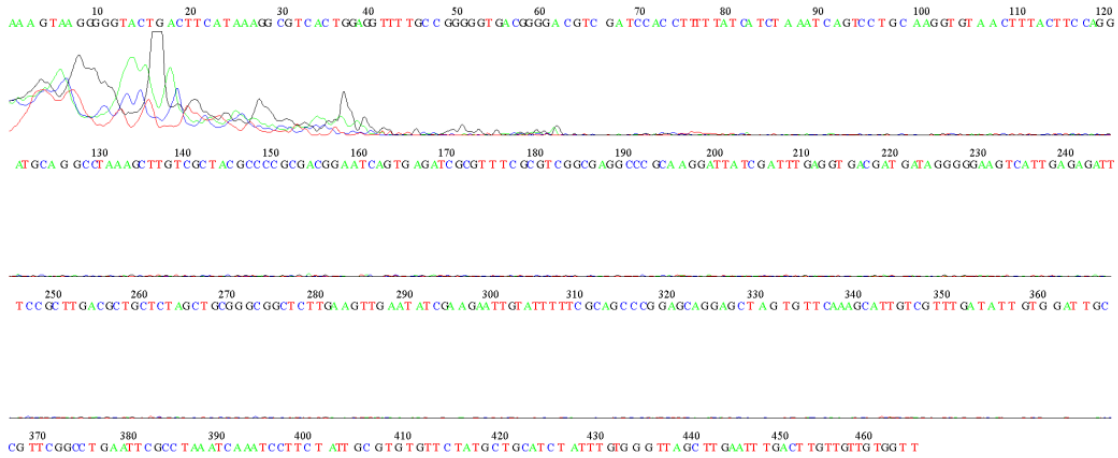


Figura 26. Secuenciación de la muestra 4 del gen mpo

File: mpo22305ss_MieloperoxidasaF.ab1 Run Ended: 2022/4/4 19:56:35 Signal G:558 A:754 C:690 T:397
 Sample: mpo22305ss_MieloperoxidasaF Lane: 83 Base spacing: -13.4993105 51 bases in 588 scans

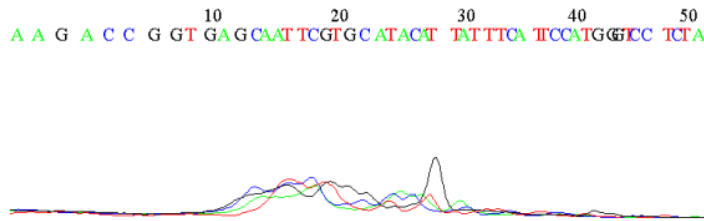


Figura 27. Secuenciación de la muestra 5 del gen mpo

File: mpo22306ss_MieloperoxidasaF.ab1 Run Ended: 2022/4/4 19:56:35 Signal G:348 A:462 C:546 T:324
 Sample: mpo22306ss_MieloperoxidasaF Lane: 81 Base spacing: -13.4993105 50 bases in 621 scans

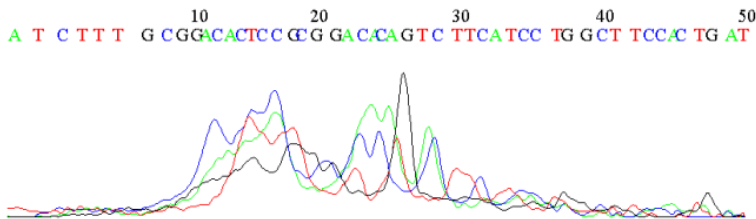


Figura 28. Secuenciación de la muestra 6 del gen mpo

File: mpo22307ss_MieloperoxidasaF.ab1 Run Ended: 2022/4/4 19:56:35 Signal G:1208 A:667 C:677 T:563
 Sample: mpo22307ss_MieloperoxidasaF Lane: 96 Base spacing: -13.4993105 44 bases in 544 scans

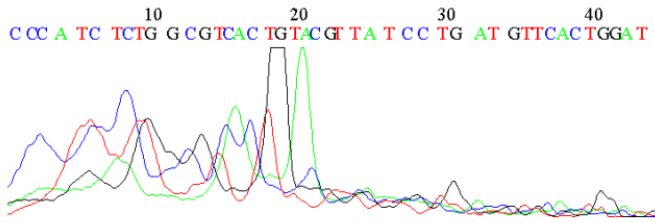


Figura 29. Secuenciación de la muestra 7 del gen mpo

File: mpo22309ss_MieloperoxidasaF.ab1 Run Ended: 2022/4/4 19:56:35 Signal G:597 A:897 C:1013 T:572
 Sample: mpo22309ss_MieloperoxidasaF Lane: 94 Base spacing: -13.4993105 44 bases in 558 scans

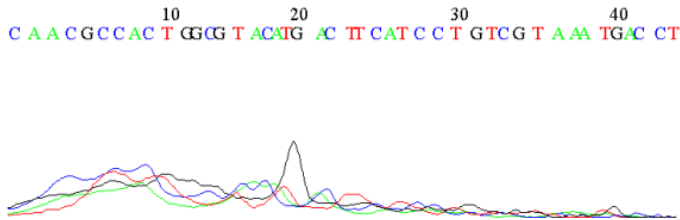


Figura 30. Secuenciación de la muestra 9 del gen mpo

File: mpo22310ss_MieloperoxidasaF.ab1 Run Ended: 2022/4/4 19:56:35 Signal G:256 A:253 C:351 T:251
 Sample: mpo22310ss_MieloperoxidasaF Lane: 92 Base spacing: -13.4993105 84 bases in 1100 scans Page 1 of 1

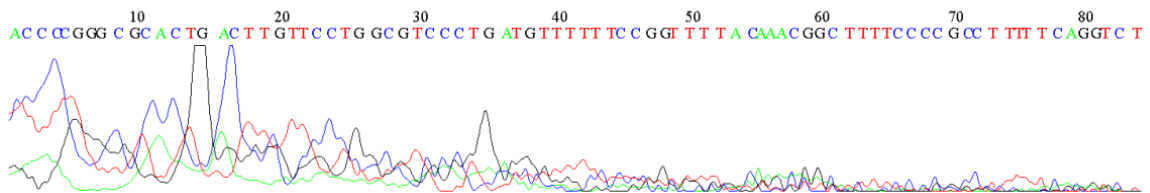


Figura 31. Secuenciación de la muestra 10 del gen mpo

File: mpo22314ss_MieloperoxidasaF.ab1 Run Ended: 2022/4/4 19:56:35 Signal G:976 A:652 C:1072 T:802
Sample: mpo22314ss_MieloperoxidasaF Lane: 90 Base spacing: -13.4993105 62 bases in 825 scans

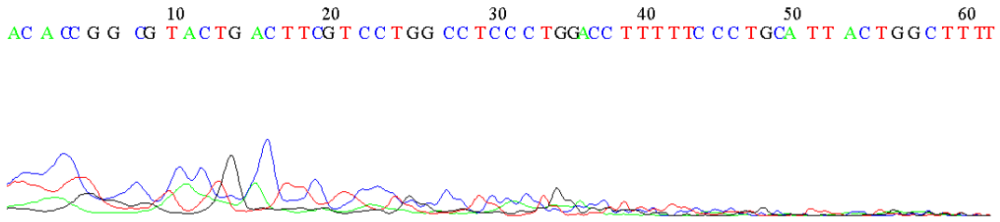


Figura 32. Secuenciación de la muestra 14 del gen mpo

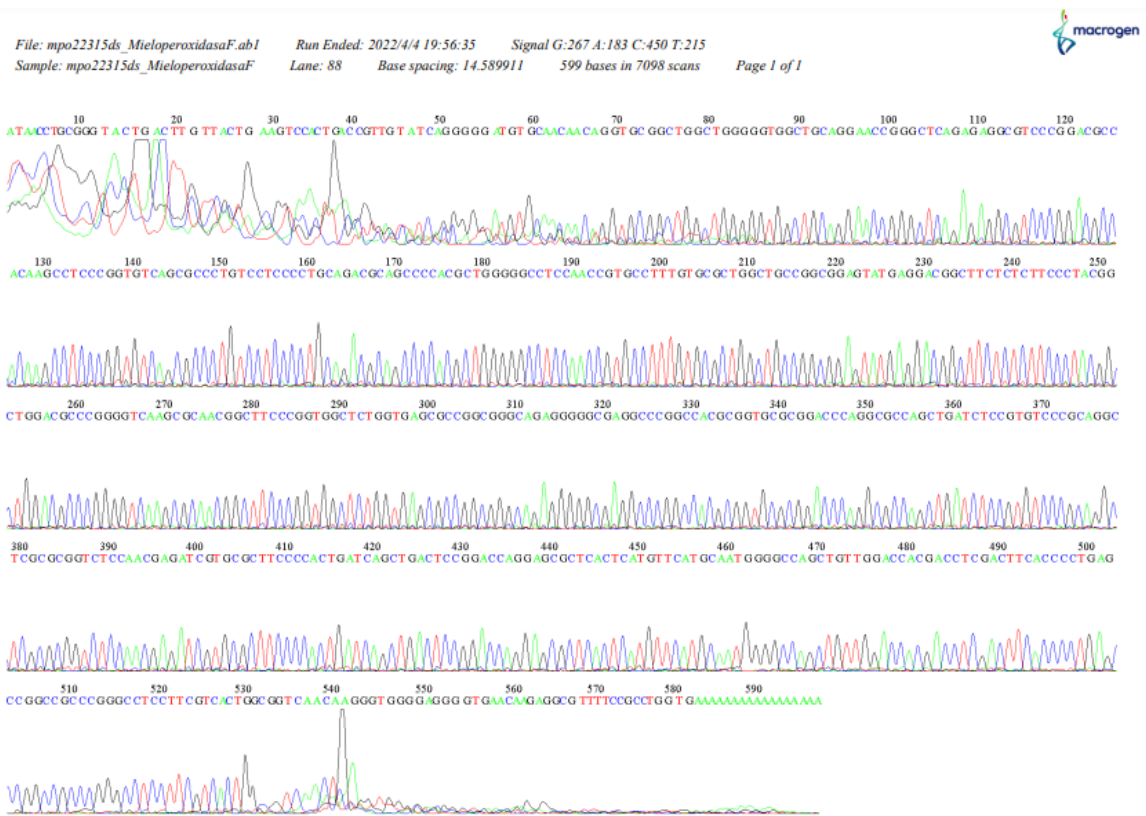


Figura 33. Secuenciación de la muestra 15 del gen mpo

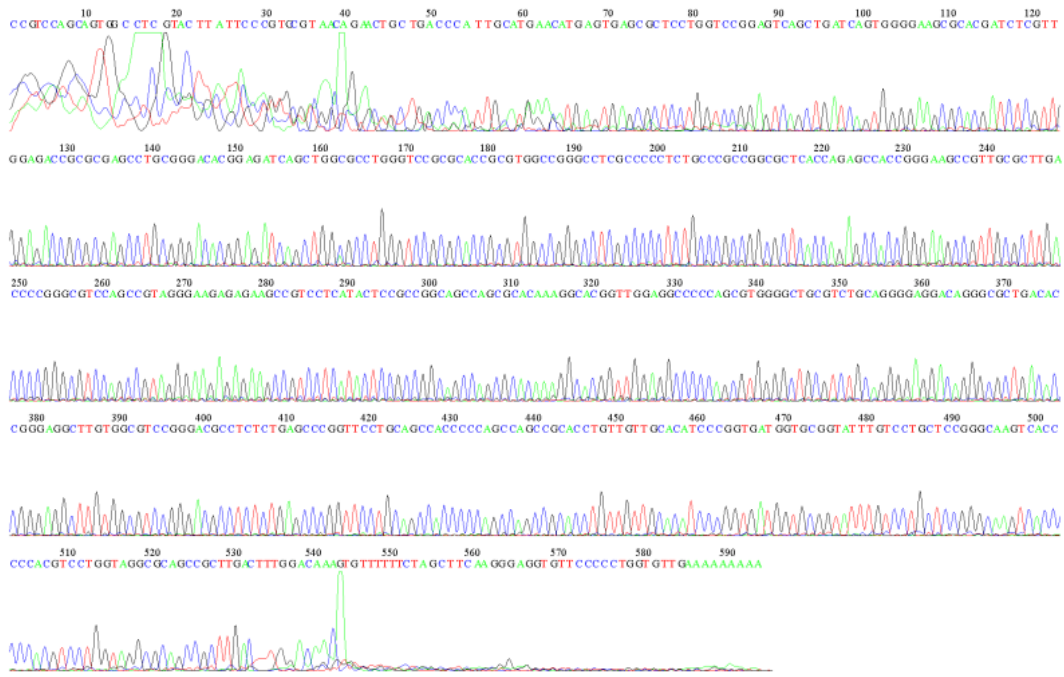


Figura 34. Secuenciación de la muestra 15-2 del gen *mpo*

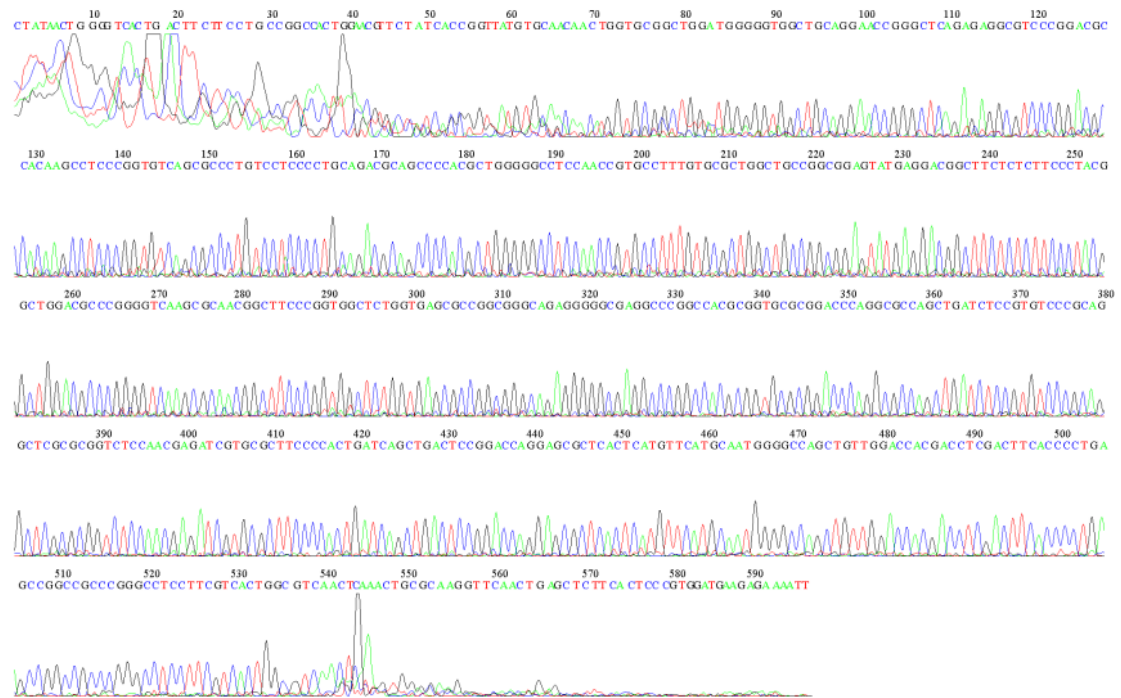


Figura 35. Secuenciación de la muestra 17 del gen *mpo*

File: mpo223172ds_MieloperoxidasaR.ab1 Run Ended: 2022/4/4 19:56:35 Signal G:172 A:171 C:315 T:147
 Sample: mpo223172ds_MieloperoxidasaR Lane: 82 Base spacing: 14.43486 589 bases in 7146 scans Page 1 of 1

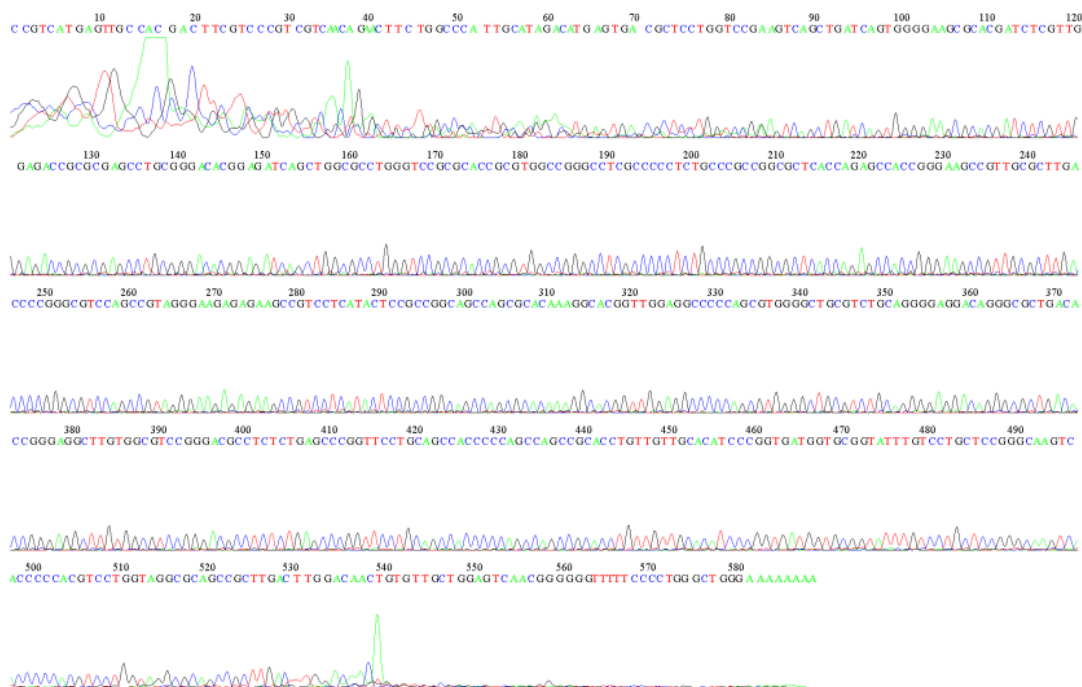


Figura 36. Secuenciación de la muestra 17-2 del gen mpo

File: mpo22319ds_MieloperoxidasaF.ab1 Run Ended: 2022/4/4 20:52:27 Signal G:2539 A:1174 C:1954 T:1431
 Sample: mpo22319ds_MieloperoxidasaF Lane: 15 Base spacing: -13.4993105 51 bases in 642 scans

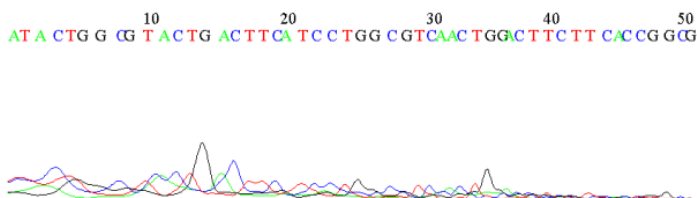


Figura 37. Secuenciación de la muestra 19 del gen mpo

File: mpo223192ds_MieloperoxidasaR.ab1 Run Ended: 2022/4/4 20:52:27 Signal G:1457 A:2339 C:1364 T:879
 Sample: mpo223192ds_MieloperoxidasaR Lane: 13 Base spacing: -13.4993105 53 bases in 687 scans

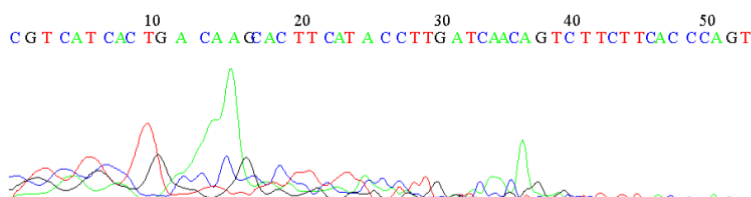


Figura 38. Secuenciación de la muestra 19-2 del *gen mpo*

File: *mpo22320ds_MieloperoxidasaF.ab1* Run Ended: 2022/4/4 20:52:27 Signal G:454 A:854 C:687 T:440
Sample: *mpo22320ds_MieloperoxidasaF* Lane: 11 Base spacing: -13.4993105 41 bases in 531 scans

A A A G G G G A T C G G A A T C G G A T A C A T T A T T T G T C C T G T T C G

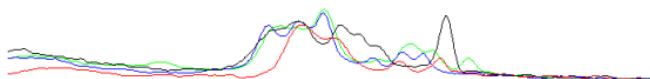


Figura 39. Secuenciación de la muestra 20 del *gen mpo*

File: *mpo223202ds_MieloperoxidasaR.ab1* Run Ended: 2022/4/4 20:52:27 Signal G:564 A:1337 C:921 T:507
Sample: *mpo223202ds_MieloperoxidasaR* Lane: 9 Base spacing: -13.4993105 41 bases in 551 scans

A G G T T A T T T T G C G C T T A G T T G T T A A C A G A T T T T G T G T T G G

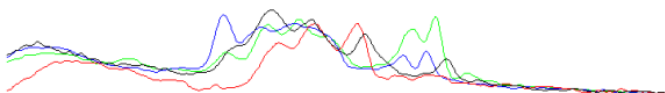


Figura 40. Secuenciación de la muestra 20-2 del *gen mpo*

File: *mpo22327ds_MieloperoxidasaF.ab1* Run Ended: 2022/4/4 20:52:27 Signal G:602 A:844 C:905 T:573
Sample: *mpo22327ds_MieloperoxidasaF* Lane: 7 Base spacing: -13.4993105 49 bases in 638 scans

C T A A G T T T T T G C A A G C T T G G T A C A G A C T T C A T C C T G G C G T A C C T G A G G T

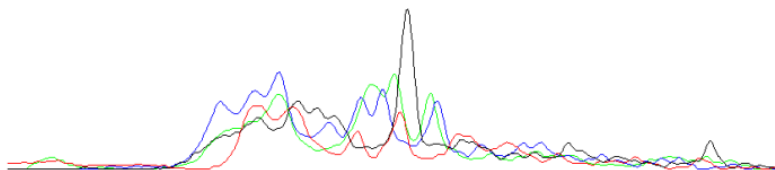


Figura 41. Secuenciación de la muestra 27 del *gen mpo*

File: mpo223272ds_MieloperoxidasaR.ab1 Run Ended: 2022/4/4 20:52:27 Signal G:738 A:1132 C:989 T:546
 Sample: mpo223272ds_MieloperoxidasaR Lane: 5 Base spacing: -13.4993105 55 bases in 708 scans

T T T T T T A A G CGC A G C G T G G C A C A G T C A G T T T C C C T T T G A C C C A G G C C G T T T G T

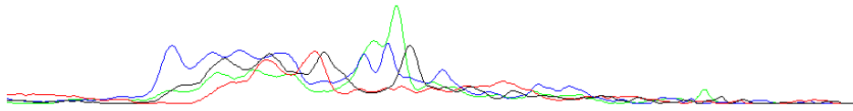


Figura 42. Secuenciación de la muestra 27-2 del *gen mpo*

Homo sapiens myeloperoxidase precursor (MPO) gene, complete cds

Sequence ID: [AH002972.2](#) Length: 5838 Number of Matches: 1

Range 1: 1687 to 2179 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
894 bits(484)	0.0	491/494(99%)	1/494(0%)	Plus/Plus
Query 47	ATCAGGGGGATGTGCAACAACAGGTGCGGCTGGCTGGGGGTGGCTGCAGGAACCGGGCTC	106		
Sbjct 1687	ATCAGGGGGATGTGCAACAACAGGTGCGGCTGGCTGGGGGTGGCTGCAGGAACCGGGCTC	1746		
Query 107	AGAGAGGCGTCCCGGACGCCACAAGCCTCCCGGTGTCAGCGCCCTGTCCTCCCCTGCAGA	166		
Sbjct 1747	AGAGAGGCGTCCCGGACGCCACAAGCCTCCCGGTGTCAGCGCCCTGTCCTCCCCTGCAGA	1806		
Query 167	CGCAGCCCCACGCTGGGGGCTCCAACCGTGCCTTTGTGCGCTGGCTGCCGGCGGAGTAT	226		
Sbjct 1807	CGCAGCCCCACGCTGGGGGCTCCAACCGTGCCTTTGTGCGCTGGCTGCCGGCGGAGTAT	1866		
Query 227	GAGGACGGCTTCTCTCTTCCCTACGGCTGGACGCCCGGGGTCAAGCGCAACGGCTTCCCG	286		
Sbjct 1867	GAGGACGGCTTCTCTCTTCCCTACGGCTGGACGCCCGGGGTCAAGCGCAACGGCTTCCCG	1926		
Query 287	GTGGCTCTGGTGAGCGCCGGCGGGCAGAGGGGGCGAGGCCCGGCCACGCGGTGCGCGGAC	346		
Sbjct 1927	GTGGCTCTGGTGAGCGCCGGCGGGCAGAGGGGGCGAGGCCCGGCCACGCGGTGCGCGGAC	1986		
Query 347	CCAGGCGCCAGCTGATCTCCGTGTCCCGCAGGCTCGCGCGGTCTCCAACGAGATCGTGCG	406		
Sbjct 1987	CCAGGCGCCAGCTGATCTCCGTGTCCCGCAGGCTCGCGCGGTCTCCAACGAGATCGTGCG	2046		
Query 407	CTTCCCCTACTGATCAGCTGACTCCGGACCAGGAGCGCTCACTCATGTTTCATGCAATGGGG	466		
Sbjct 2047	CTTCCCCTACTGATCAGCTGACTCCGGACCAGGAGCGCTCACTCATGTTTCATGCAATGGGG	2106		
Query 467	CCAGCTGTTGGACCACGACCTCGACTTCACCCCTGAGCCGGCCGCCCGGGCCTCCTTCGT	526		
Sbjct 2107	CCAGCTGTTGGACCACGACCTCGACTTCACCCCTGAGCCGGCCGCCCGGGCCTCCTTCGT	2166		
Query 527	CACTGGCGGTCAAC	540		
Sbjct 2167	CACTGGCGGTCAAC	2179		



Figura 43. Alineamiento de la muestra 15 con el *gen mpo* analizado por el programa BLAST

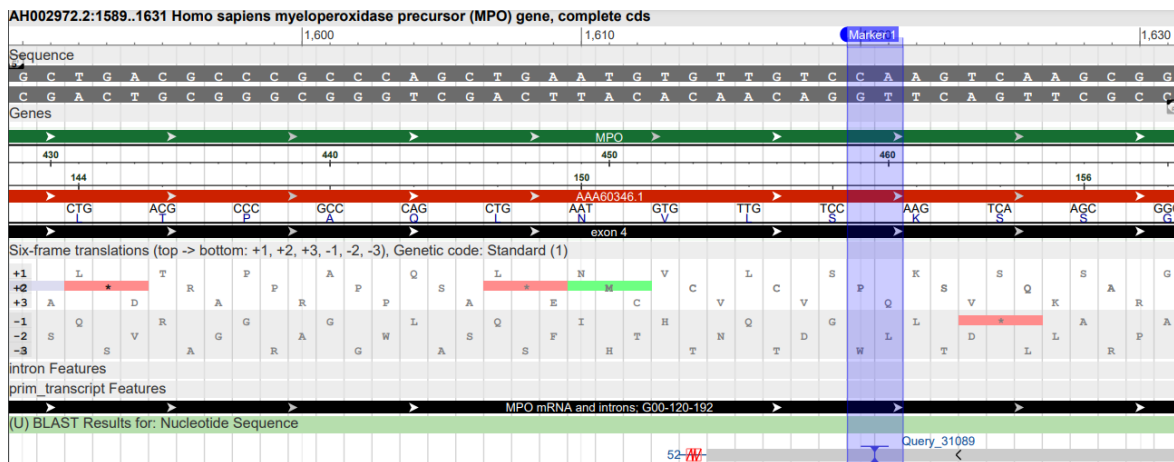
Homo sapiens myeloperoxidase precursor (MPO) gene, complete cds

Sequence ID: [AH002972.2](#) Length: 5838 Number of Matches: 1

Range 1: 1615 to 2115 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
904 bits(489)	0.0	498/502(99%)	2/502(0%)	Plus/Minus
Query 42	AACTGCT-GACCCATTGCATGAACATGAGTGAGCGCTCCTGGTCCGGAGTCAGCTGATCA	100		
Sbjct 2115	AACAGCTGGCCCCATTGCATGAACATGAGTGAGCGCTCCTGGTCCGGAGTCAGCTGATCA	2056		
Query 101	GTGGGAAGCGCACGATCTCGTTGGAGACCGCGGAGCCTGCGGGACACGGAGATCAGCT	160		
Sbjct 2055	GTGGGAAGCGCACGATCTCGTTGGAGACCGCGGAGCCTGCGGGACACGGAGATCAGCT	1996		
Query 161	GGCGCTGGGTCCGCGCACCGCGTGGCCGGGCTCGCCCCCTCTGCCCGCCGGCGCTCAC	220		
Sbjct 1995	GGCGCTGGGTCCGCGCACCGCGTGGCCGGGCTCGCCCCCTCTGCCCGCCGGCGCTCAC	1936		
Query 221	CAGAGCCACCGGAAGCCGTTGCGCTTGACCCCGGGCGTCCAGCCGTAGGGAAGAGAGAA	280		
Sbjct 1935	CAGAGCCACCGGAAGCCGTTGCGCTTGACCCCGGGCGTCCAGCCGTAGGGAAGAGAGAA	1876		
Query 281	GCCGCTCCTACTCCGCCGGCAGCCAGCGCACAAAGGCACGGTTGGAGGCCCCAGCGT	340		
Sbjct 1875	GCCGCTCCTACTCCGCCGGCAGCCAGCGCACAAAGGCACGGTTGGAGGCCCCAGCGT	1816		
Query 341	GGGGCTGCGTCTGCAGGGGAGGACAGGGCGTGACACCGGGAGGCTTGTGGCGTCCGGGA	400		
Sbjct 1815	GGGGCTGCGTCTGCAGGGGAGGACAGGGCGTGACACCGGGAGGCTTGTGGCGTCCGGGA	1756		
Query 401	CGCCTCTCTGAGCCCGGTTCTGCAGCCACCCAGCCAGCCGCACCTGTTGTTGCACAT	460		
Sbjct 1755	CGCCTCTCTGAGCCCGGTTCTGCAGCCACCCAGCCAGCCGCACCTGTTGTTGCACAT	1696		
Query 461	CCCGGTGATGGTGCGGTATTTGCTCTGCTCCGGCAAGTACCCCCACGTCCTGGTAGGC	520		
Sbjct 1695	CCCGGTGATGGTGCGGTATTTGCTCTGCTCCGGCAAGTACCCCCACGTCCTGGTAGGC	1636		
Query 521	GCAGCCGCTTGACTTTGGACAA	542		
Sbjct 1635	GCAGCCGCTTGACTTGGACAA	1615		



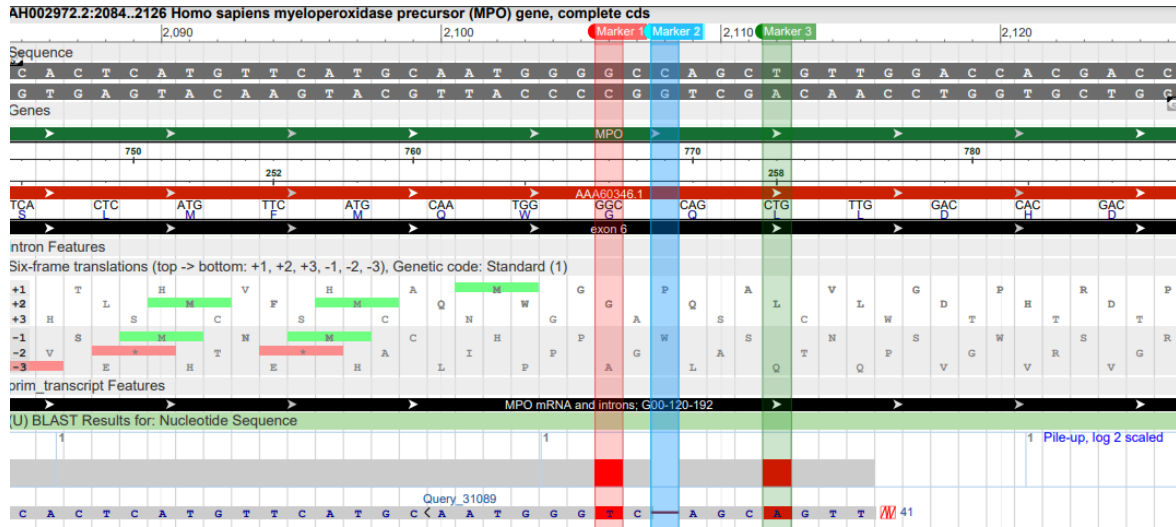


Figura 44. Alineamiento de la muestra 15-2 con el *gen mpo* analizado por el programa BLAST

Homo sapiens myeloperoxidase precursor (MPO) gene, complete cds

Sequence ID: [AH002972.2](#) Length: 5838 Number of Matches: 1

Range 1: 1687 to 2180 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ F

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
891 bits(482)	0.0	491/495(99%)	1/495(0%)	Plus/Plus
Query 49	ATCACCGTTATGTGCAACAAC	TGGTGC	GGCTGGATGGGGGTGGCTGCAGGAACCGGGCT	108
Sbjct 1687	ATCACCGG-GATGTGCAACAAC	AGGTGC	GGCTGGGGGTGGCTGCAGGAACCGGGCT	1745
Query 109	CAGAGAGGCGTCCCGACGCCACAAGCCTCCCGGTGT	CAGCGCCCTGTCCTCCCTGCAG	168	
Sbjct 1746	CAGAGAGGCGTCCCGACGCCACAAGCCTCCCGGTGT	CAGCGCCCTGTCCTCCCTGCAG	1805	
Query 169	ACGCAGCCCCACGCTGGGGCCCTCAACCGTGC	TTTGTGCGCTGGCTGCCGGCGGAGTA	228	
Sbjct 1806	ACGCAGCCCCACGCTGGGGCCCTCAACCGTGC	TTTGTGCGCTGGCTGCCGGCGGAGTA	1865	
Query 229	TGAGGACGGCTTCTCTCTTCCCTACGGCTGGACG	CCCAGGGTCAAGCGCAACGGCTTCCC	288	
Sbjct 1866	TGAGGACGGCTTCTCTCTTCCCTACGGCTGGACG	CCCAGGGTCAAGCGCAACGGCTTCCC	1925	
Query 289	GGTGGCTCTGGTGAGCGCCGGCGGGCAGAGGGGG	CGAGGGCCGGCCACGCGGTGC	348	
Sbjct 1926	GGTGGCTCTGGTGAGCGCCGGCGGGCAGAGGGGG	CGAGGGCCGGCCACGCGGTGC	1985	
Query 349	CCCAGGCGCCAGCTGATCTCCGTGTCCCGCAGGCT	CGCGCGGTCTCCAACGAGATCGTGC	408	
Sbjct 1986	CCCAGGCGCCAGCTGATCTCCGTGTCCCGCAGGCT	CGCGCGGTCTCCAACGAGATCGTGC	2045	
Query 409	GCTTCCCCACTGATCAGCTGACTCCGGACCAGGAG	CGCTCACTCATGTTTCAATGCAATGGG	468	
Sbjct 2046	GCTTCCCCACTGATCAGCTGACTCCGGACCAGGAG	CGCTCACTCATGTTTCAATGCAATGGG	2105	
Query 469	GCCAGCTGTTGGACCACGACCTCGACTTCA	CCCCGTGAGCCGGCCGCCGGGGCTCCTTCG	528	
Sbjct 2106	GCCAGCTGTTGGACCACGACCTCGACTTCA	CCCCGTGAGCCGGCCGCCGGGGCTCCTTCG	2165	
Query 529	TCACTGGCGTCAACT		543	
Sbjct 2166	TCACTGGCGTCAACT		2180	

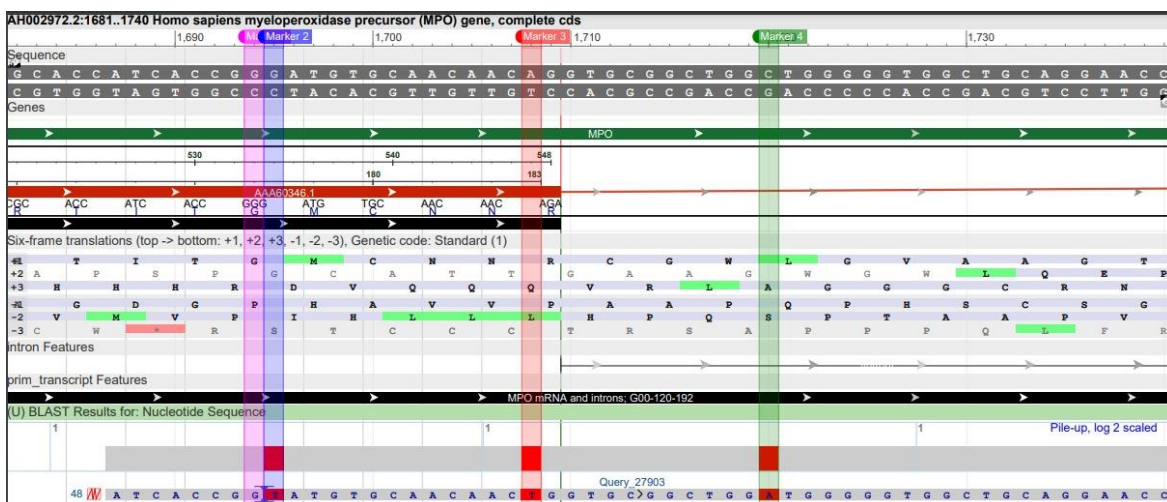


Figura 45. Alineamiento de la muestra 17 con el gen *mpo* analizado por el programa BLAST

Homo sapiens myeloperoxidase precursor (MPO) gene, complete cds

Sequence ID: [AH002972.2](#) Length: 5838 Number of Matches: 1

Range 1: 1614 to 2110 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
889 bits(481)	0.0	492/497(99%)	2/497(0%)	Plus/Minus
Query 45	CTGG-CCCATTGCATAGACATGAGTGA-CGCTCCTGGTCCGAAGTCAGCTGATCAGTGGG	102		
Sbjct 2110	CTGGCCCATTGCATGAACATGAGTGAAGCGCTCCTGGTCCGGAGTCAGCTGATCAGTGGG	2051		
Query 103	GAAGCGCACGATCTCGTTGGAGACCGCGCAGCCTGCGGGACACGGAGATCAGCTGGCGC	162		
Sbjct 2050	GAAGCGCACGATCTCGTTGGAGACCGCGCAGCCTGCGGGACACGGAGATCAGCTGGCGC	1991		
Query 163	CTGGGTCCGCGCACCGCGTGGCCGGGCTCGCCCCCTGCCCCGCCGGCGCTCACCAGAG	222		
Sbjct 1990	CTGGGTCCGCGCACCGCGTGGCCGGGCTCGCCCCCTGCCCCGCCGGCGCTCACCAGAG	1931		
Query 223	CCACCGGGAAGCCGTTGCGCTTGACCCCGGGCGTCCAGCCGTAGGGAAGAGAGAAGCCGT	282		
Sbjct 1930	CCACCGGGAAGCCGTTGCGCTTGACCCCGGGCGTCCAGCCGTAGGGAAGAGAGAAGCCGT	1871		
Query 283	CCTCATACTCCGCCGGCAGCCAGCGCACAAAGGCACGGTTGGAGGCCCCAGCGTGGGGC	342		
Sbjct 1870	CCTCATACTCCGCCGGCAGCCAGCGCACAAAGGCACGGTTGGAGGCCCCAGCGTGGGGC	1811		
Query 343	TGCGTCTGCAGGGGAGGACAGGGCGCTGACACCGGGAGGCTTGTGGCGTCCGGGACGCCT	402		
Sbjct 1810	TGCGTCTGCAGGGGAGGACAGGGCGCTGACACCGGGAGGCTTGTGGCGTCCGGGACGCCT	1751		
Query 403	CTCTGAGCCCCGGTTCCTGCAGCCACCCAGCCAGCCGACCTGTTGTTGCACATCCCGG	462		
Sbjct 1750	CTCTGAGCCCCGGTTCCTGCAGCCACCCAGCCAGCCGACCTGTTGTTGCACATCCCGG	1691		
Query 463	TGATGGTGCGGTATTTGCTCTGCTCCGGGCAAGTCACCCACAGTCTCTGGTAGGCGCAGC	522		
Sbjct 1690	TGATGGTGCGGTATTTGCTCTGCTCCGGGCAAGTCACCCACAGTCTCTGGTAGGCGCAGC	1631		
Query 523	CGCTTGACTTGGACAAC	539		
Sbjct 1630	CGCTTGACTTGGACAAC	1614		

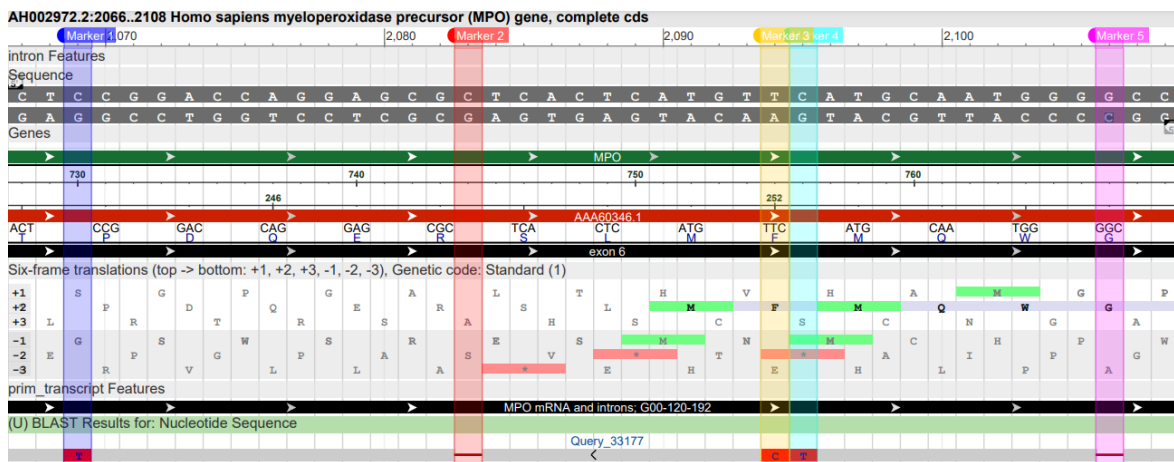


Figura 46. Alineamiento de la muestra 17-2 con el *gen mpo* analizado por el programa BLAST

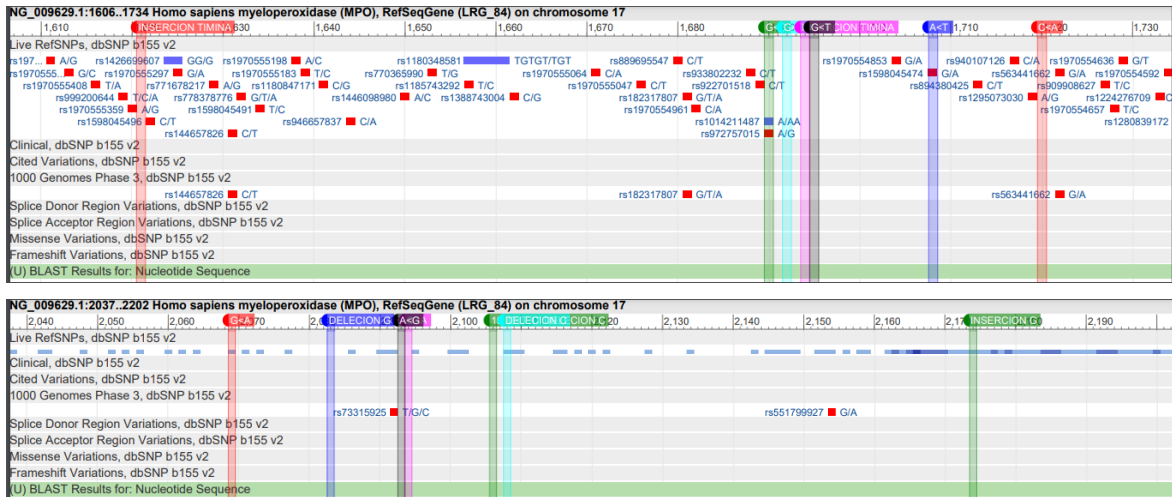


Figura 47. SNP *gen mpo* vs SNP encontrados en las muestras 15 y 17