

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

Identification of polymorphisms in the myeloperoxidase gene and its role in recurrent vulvovaginal candidiasis due to *Candida* spp., in patients from Bogotá DC.

Sharon Hassbleidy Ochoa¹, Claudia Andrea Cruz², Julián Esteban Muñoz³, Jeanette Navarrete Ospina⁴, Maria Paula Montoya Estrada⁵, Gloria Julieth Rincon González⁶

Resumen

Introducción. 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. Varios autores han descrito que las infecciones vulvovaginales recurrentes por *Candida* spp., tienen relación con la deficiencia primaria de MPO, que es un trastorno autosómico recesivo, por polimorfismos asociados al procesamiento postraduccional o con errores pretraduccionales. **Objetivo.** Identificar la relación que existe entre los dos polimorfismos de la MPO (Y173C-M251T) con una mayor probabilidad de presentar infecciones vulvovaginales. **Materiales y métodos.** Se efectuó una encuesta, donde se recolectaron 27 muestras de sangre a mujeres entre 20-45 años, a las que se realizó cuadro hemático, tinción Wright, tinción de peroxidasa leucocitaria, extracción de ADN, se evaluó cantidad y calidad, se diseñaron los primers por herramientas bioinformáticas y se establecieron las condiciones para estandarizar la PCR convencional, y los productos amplificados se secuenciaron por secuenciación de electroforesis capilar (CES) para identificar los

1. Subred Integral de Servicios de Salud Sur. E.S.E. Hospital el Tunal.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9673-9680>

2. Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1041-9609>

3. Grupo de Estudios en Microbiología Traslacional y Enfermedades Emergentes MICROS, Instituto de Medicina Traslacional, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4495-7077>

4. Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá D.C., Colombia.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1935-7125>

5. Semillero Grupo REMA, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6970-7704>

6. Semillero Grupo REMA, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5038-1436>

Correspondencia: candreacruz@unicolmayor.edu.co

polimorfismos de interés. **Resultados.** En ninguna muestra se encontraron los polimorfismos de estudio, sin embargo, se hallaron cambios de nucleótidos en los exones 4 y 6 del fragmento estudiado en dos de las muestras analizadas, indicando que esta región presenta gran variabilidad genética. **Conclusión.** El presente estudio es una primera aproximación en Colombia sobre los polimorfismos del *gen mpo* en aislamientos obtenidos de pacientes con Candidiasis vulvovaginal en la ciudad de Bogotá D.C.

Palabras clave: polimorfismos, deficiencia de mieloperoxidasa, PCR, secuenciación, candidiasis vulvovaginal, *Candida* spp.

Abstract

Introduction. Myeloperoxidase (MPO) is an antimicrobial protein present in the azurophilic granules of neutrophils, its action falls when it is conjugated in the phagosome with hydrogen peroxide, resulting in toxic substances for phagocytosed microorganisms. Several authors have described that recurrent vulvovaginal infections by *Candida* spp., are related to primary MPO deficiency, which is an autosomal recessive disorder, due to polymorphisms associated with posttranslational processing or pre-translational errors. **Objective.** To identify the relationship between the two MPO polymorphisms (Y173C-M251T) with a higher probability of presenting vulvovaginal infection. **Materials and methods.** 27 blood samples were collected from women between 20-45 years old diagnosed with vulvovaginal candidiasis in order to analyze the complete blood count, Wright stain, leukocyte peroxidase stain and perform DNA extraction to assess the quantity and quality of genetic material. Subsequently, primers for the *mpo* gene were designed by bioinformatic tools and the conditions to standardize conventional PCR were established. Amplified products were sequenced by capillary electrophoresis (CES) to identify polymorphisms. **Results.** The polymorphisms of interest were not found in any sample. However, nucleotide changes were found in exons 4 and 6 of the fragment studied in two samples analyzed, indicating that this region may present genetic variability. **Conclusion.** The present study is a first approximation in Colombia on the *mpo* gene polymorphisms from patients with vulvovaginal Candidiasis in Bogotá D.C. Future studies with a more representative number of samples will give us stronger indications of the genetic variability that the *mpo* gene may present.

Keywords: polymorphisms, myeloperoxidase deficiency, PCR, sequencing, vulvovaginal candidiasis, *Candida* spp.

Introducción

La inmunidad innata o natural, es la primera respuesta del sistema inmunitario contra diferentes agentes externos, se compone de barreras como la piel, membranas mucosas, lágrimas, ácido del estómago y células como los macrófagos, células dendríticas, polimorfonucleares (PMN) y células asesinas naturales (NK) (1). Los humanos poseen entre 50-70% de neutrófilos del total de leucocitos, los cuales poseen tres tipos de gránulos, los primarios (Mieloperoxidasa) (2); los secundarios (Lactoferrina y gelatinasa) y los terciarios (Metaloproteínasa 9) (3). En el momento que los neutrófilos fagocitan microbios opsonizados, se forma el fagosoma, y por la NADPH-oxidasa se liberan enzimas, oxígeno y proteínas de los gránulos lisosómicos formando el fagolisosoma, produciendo antimicrobianos como aniones superóxido y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (4,5).

La MPO es una glicoproteína tetramérica implicada en la producción de diferentes especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) (6,7); está constituida por 4 subunidades que forman 2 homodímeros, cada uno con una subunidad α (pesada 58.5 kDa) y una subunidad β (ligera 14 kDa), con un peso total de 130-150 kDa (8,9,10,11); está compuesta por un par de protómeros idénticos unidos covalentemente a través del grupo hemo, y los dos

protómeros unidos por un enlace disulfuro simple, además, existen 4 formas que se denominan compuesto I-III y MPO nativa o férrica (12).

Por lo general, la mayoría de las reacciones de las peroxidases implican la interacción con oxidantes como el H_2O_2 , ion hipoclorito (OCl^-), ion hipobromito (OBr^-), entre otros. Dependiendo de la disponibilidad de sustrato y el tipo de óxido-reductasas, pasan por un ciclo de peroxidasa para formar el compuesto I, II y III, o un ciclo de halogenación donde se produce únicamente HOCl (13, 14). Se debe tener claro que el producto resultante de la traducción principal se somete a glicosilación co-traducciona en los residuos de asparagina en el retículo endoplasmático rugoso (RER) para generar apoproMPO (10) que tiene la capacidad de formar complejos con chaperonas, después se forma la proMPO y debido a la unión covalentemente de un grupo hemo sale del RER y pasa al gránulo azurófilo, donde finalmente tiene tres modificaciones obteniendo la MPO madura y activa (8,9,10,11).

Según Pahwa *et al* 2022, la deficiencia primaria de MPO se hereda como un trastorno autosómico recesivo; algunos de estos polimorfismos están asociados con el procesamiento postraducciona y otras con defectos pretraduccionales, siendo las más estudiadas los polimorfismos R569W, Y173C, M251T, G501S, R499C y una

delección de 14 bases en el exón 9 (15, 16, 17, 18). Por ende, se conoce que las personas con un polimorfismo en el gen tienen menor actividad de la proteína en sus PMN (19, 20, 21, 22), resultando más susceptibles a las infecciones fúngicas, como es el caso de *Candida albicans* (19).

En cuanto a *Candida albicans*, se sabe que es un hongo dimórfico del filo *Ascomycota* y una de las especies más representativas desde el punto de vista clínico del género *Candida* spp. La candidiasis tiene diferentes manifestaciones clínicas, donde los pacientes pueden presentar desde infecciones cutáneas, a nivel de mucosas hasta alcanzar órganos profundos (23, 24). De estas manifestaciones, la candidiasis invasora representa un porcentaje significativo (cerca del 75%) de las infecciones por hongos en pacientes hospitalizados y su frecuencia varía de acuerdo con el servicio de hospitalización y los factores de riesgo de los pacientes. En Colombia se estima que las infecciones por candidiasis invasiva representan un 75% de las infecciones causadas por hongos en pacientes hospitalizados causando una mortalidad asociada al 78% en el año 2016 (23). Otra manifestación clínica importante de la candidiasis son las infecciones vaginales (25, 26, 27). En este sentido, uno de los cambios bioquímicos que permite la colonización por *Candida* spp., es la variación en la microbiota vaginal que produce ácido láctico y mantiene el pH <4.5 (27, 28), de manera que una

reducción de estos microorganismos puede generar proliferación de la *Candida* spp.

La MPO tiene un papel crítico en la defensa contra este tipo de microorganismos, al participar en la generación de productos oxidativos como el HOCl y el oxígeno, los cuales contribuyen a la muerte de estas levaduras (29). El objetivo de este estudio se basa en analizar los polimorfismos en el gen *mpo*, polimorfismos que no han sido del todo estudiados, y se desconoce la prevalencia y la incidencia actual en Colombia. A partir de lo anterior, se planteó 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 la ciudad de Bogotá D.C.

Materiales y métodos

Recolección de muestras de sangre

Se recolectaron muestras de sangre en tubos con ácido EDTA (Becton Dickinson, New Jersey, NJ, USA) de 15 individuos sexo femenino universitarias interesadas en participar en el estudio a partir de una encuesta virtual realizada en el periodo 2020-2021 y 12 pacientes provenientes del Hospital de tercer nivel El Tunal USS, las cuales presentaban sintomatología de candidiasis vulvovaginal. Este proyecto tiene como

referencia principal las pautas éticas proporcionadas en la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de la República de Colombia y por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS). Como criterios de inclusión de las pacientes con candidiasis vulvovaginal, fueron seleccionadas aquellas que presentarían una edad entre 20 a 45 años, recurrencia de infecciones vulvovaginales por *Candida* spp., (3 o más veces por año), además, se tuvieron en cuenta criterios de exclusión como, no encontrarse en estado de embarazo al momento de la toma de la muestra, no presentar enfermedades de base como diabetes mellitus tipo 2, asma, EPOC, cáncer, hipertensión, inmunodeficiencias o enfermedades cardiovasculares.

Tinción de Wright, Tinción citoquímica de peroxidasa leucocitaria y cuadro hemático

A partir de la sangre total de las muestras recolectadas se hizo el seguimiento de parámetros hematológicos por el equipo Myn-dray BC-3000 plus. Se realizó la tinción de Wright según el protocolo de hematología de la Fundación Hospital de la Misericordia (HOMI). Se usó la técnica Mieloperoxidasa 4-Cloro-1-Naftol, para esto se realizó un frotis de sangre periférica que posteriormente se fijó con etanol formaldehído al 10% por 5 minutos y se realizó la tinción de Wright según los tiempos establecidos.

Extracción de ADN y evaluación de la calidad e integridad

Se realizó la extracción del material genético de cada muestra utilizando el kit Wizard® (Genomic DNA Purification, Promega, TM050, Madison, WI, USA). Por otro lado, por medio de espectrofotometría a 260-280 nm en el equipo UV-Vis (Thermo Scientific™ NanoDrop™ One Microvolume, USA) se determinó la calidad y cantidad de ADN para cada muestra. Adicionalmente, se analizó la integridad del ADN por electroforesis usando gel de agarosa al 0.8 % a 80 voltios por 42 minutos.

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

Se diseñaron los primers Forward con T_m 69,4°C (3' GTTGTCCAAGTCAAGCG-GCTGC 5') y Reverse con T_m 68,3°C (5' CAGTTGACGCCAGTGACGAAGG 3') para la PCR convencional por NCBI y Thermo Fisher Scientific con el fin de amplificar un segmento de 568 bp abarcando los polimorfismos Y173C y M251T; ambos presentaron una longitud de 22 pb y un porcentaje de GC de 59,09%. Se procedió a realizar la estandarización de la PCR teniendo en cuenta concentraciones de MgCl₂ (3mM, 2.5mM, 2mM y 1.5mM); de primers (0.25 pmolar, 0.2 pmolar y 0.15 pmolar) y cantidad de ADN. Se utilizó el termociclador Axygen® MaxyGene™ II Thermal Cycler

with 96 well block, 110V (USA), y las condiciones de PCR se encuentran en la Tabla 1. Adicionalmente, se realizó una PCR *In silico* por UCSC Genome, luego se analizó el producto de PCR por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % 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, USA) se cuantificó la cantidad del producto amplificado para cada muestra.

Secuenciación por electroforesis capilar

Se efectuó secuenciación CES en el equipo (96-capillary 3730xl DNA Analyzer-Thermo Fisher, laboratorio Humaning Genomics Macrogen, Seúl, Corea del Sur) de doble hebra a los productos de PCR de las muestras 15 y 17, puesto que, por la recurrencia de las infecciones vulvovaginales, estas podrían presentar una mayor probabilidad de tener un polimorfismo de interés.

Análisis Bioinformático por BLAST, ExPASy y MultAlin

Por medio de programas bioinformáticos como BLAST se procedió a realizar el análisis de secuencias para el *gen mpo* Homo sapiens cromosoma 17 Primary Assem-

bly GRCh38.p14 con el fin de evidenciar la homología entre secuencias y la posible existencia de un polimorfismo. Finalmente, por medio de la herramienta ExPASy y MultAlin se hizo la traducción a lenguaje FASTA y la comparación de la secuencia entre la proteína MPO y las muestras que eran representativas.

Resultados

Tinción de Wright, tinción citoquímica de peroxidasa leucocitaria y cuadro hemático

Para el primer grupo de muestras obtenidas que presentaron hemólisis, no se realizó tinción de Wright, tinción citoquímica de peroxidasa leucocitaria ni cuadro hemático, debido a la presencia de precipitados de colorante y contaminación con bacterias propias de las condiciones de almacenamiento de la muestra. La celularidad y parámetros del cuadro hemático del segundo grupo de muestras fue normal, además, en la tinción citoquímica de peroxidasa leucocitaria no se observó ausencia o deficiencia de la enzima MPO (Figura 1).

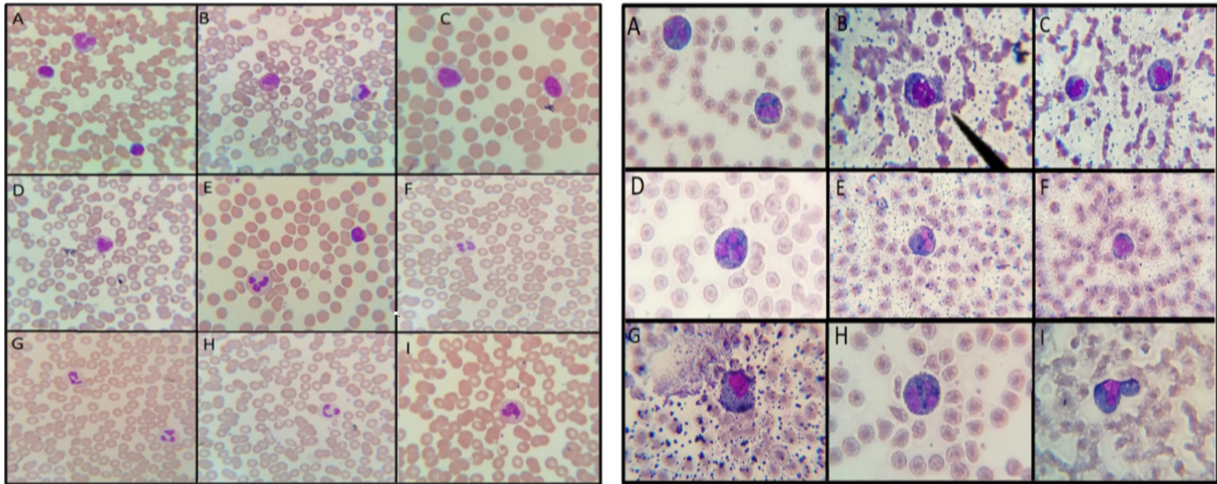


Figura 1. A la izquierda se observa la tinción de Wright muestras de pacientes con CVVR en 40x, a la derecha tinción de peroxidasa leucocitaria de pacientes con CVVR a 100x.

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, la mayoría de las muestras obtuvieron una pureza y concentración aceptable. Adicionalmente, por el método de electroforesis en gel de agarosa se observa una banda que representa una muestra íntegra para el proceso de PCR.

PCR In silico y estandarización de la PCR convencional

Inicialmente, haciendo uso de plataformas como NCBI se adquiere la secuencia completa del gen de estudio con intrones y exones, posteriormente se utilizó la plataforma Thermo Fisher Scientific para verificar las características de los primers diseñados para la PCR convencional. Al realizar la

PCR *In silico* por el programa UCSC genome, se comprobó la especificidad para unirse a la region del gen de estudio. Por último, se realizó la PCR convencional con las condiciones definidas a partir de la estandarización, donde se observa una banda más definida cuando se usa MgCl₂ a 3mM, primers de 0,25 pmol, y ADN de 50ng por muestra. Tal como se observa en la Figura 2, se evidencia 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 que no amplificaron o presentaron una banda con poca intensidad se les realizó una segunda extracción de ADN y posterior PCR.

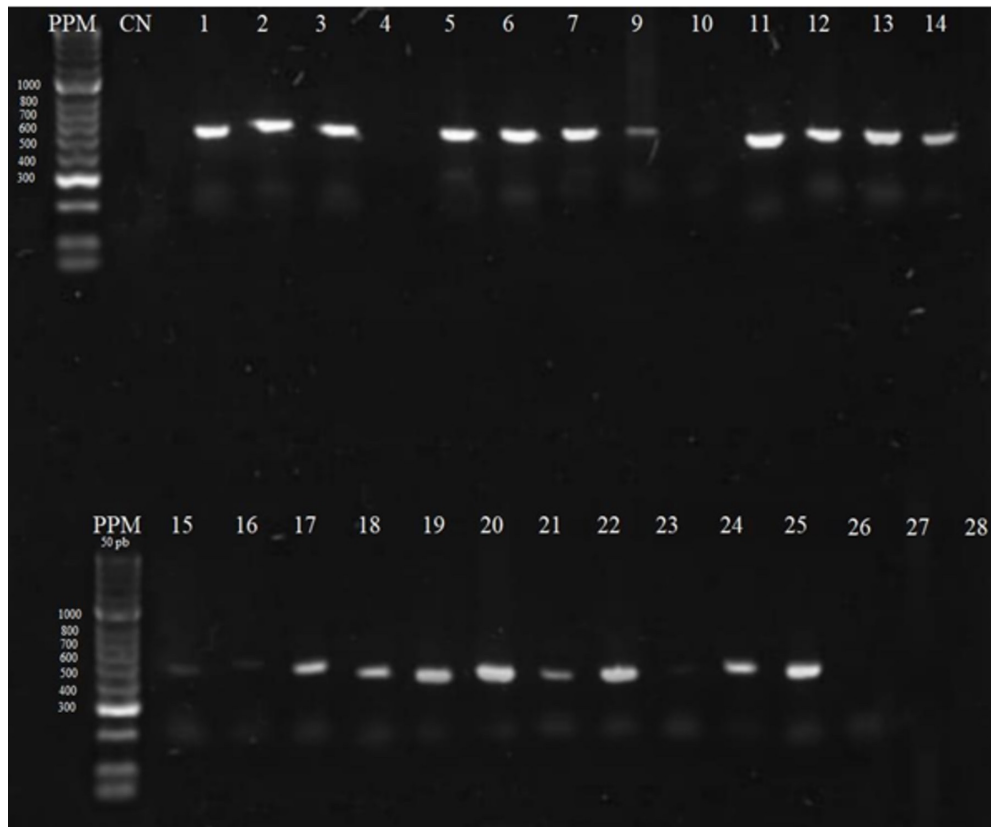


Figura 2. Electroforesis posterior a PCR convencional de las muestras 1-28. PPM (Patrón de Peso Molecular 50 pb) CN (Control negativo) 1-28 Muestras amplificadas. Se evidencia una banda de 568 pb en la mayoría de las muestras, demostrando que se logró amplificar el fragmento del gen esperado; las muestras 15, 16, 23 presentan una banda con poca intensidad lo que indica poca cantidad del gen amplificado, y por ende de ADN, lo cual llevó a realizar una segunda extracción y PCR convencional.

Secuenciación CES y Análisis bioinformático por ExpASy y MultAlin

Se realizó la secuenciación por electroforesis de capilaridad (CES), con la finalidad de comparar la secuencia de 15 muestras con la secuencia del fragmento del *gen mpo* Homo sapiens cromosoma 17 Primary Assembly en NCBI. En general, los polimorfismos buscados para este estudio no se presentaron, sin embargo, los productos de amplificación secuenciados (Muestras 15 y 17) al ser comparados con la secuencia hallada en la base de datos BLAST evi-

denciaron que la muestra 15 (3'-5') presentó un cambio en dos pares de bases, ambos de una citosina (C) → una guanina (G) en las posiciones 1691 y 1692 del gen *mpo* y en la posición 2174 se evidencia la inserción de una G, Figura 3 (A). En la figura 3 (B) correspondiente a la muestra 15 (5'-3') se muestra un cambio en la posición 2112 entre timina (T) → adenina (A), en la posición 2108 carece de una C y en la posición 2106 hay un cambio entre una C → T, además, en la posición 1621 se presenta una inserción de una T.

A 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	ATCAGGGGATGTGCAACAACAGGTGCGGCTGGCTGGGGGTGGCTGCAGGAACCGGGCTC	106		
Sbjct 1687	ATCAGGGGATGTGCAACAACAGGTGCGGCTGGCTGGGGGTGGCTGCAGGAACCGGGCTC	1746		
Query 107	AGAGAGGGCTCCCGGACGCCACAAGCCTCCCGGTGTGACGCGCCCTGTCTCCCTGCAGA	166		
Sbjct 1747	AGAGAGGGCTCCCGGACGCCACAAGCCTCCCGGTGTGACGCGCCCTGTCTCCCTGCAGA	1806		
Query 167	CGCAGCCCCACGCTGGGGGCTCCAACCGTGCCTTTGTGCGCTGGCTGCCGGCGGAGTAT	226		
Sbjct 1807	CGCAGCCCCACGCTGGGGGCTCCAACCGTGCCTTTGTGCGCTGGCTGCCGGCGGAGTAT	1866		
Query 227	GAGGACGGCTTCTCTTCCCTACGGCTGGACGCCCGGGGTCAAGCGCAACGGCTTCCCG	286		
Sbjct 1867	GAGGACGGCTTCTCTTCCCTACGGCTGGACGCCCGGGGTCAAGCGCAACGGCTTCCCG	1926		
Query 287	GTGGCTCTGGTGAAGCGCCGGCGGAGAGGGGGCGAGGCCCGGCCACGCGGTGCGCGGAC	346		
Sbjct 1927	GTGGCTCTGGTGAAGCGCCGGCGGAGAGGGGGCGAGGCCCGGCCACGCGGTGCGCGGAC	1986		
Query 347	CCAGGCGCCAGCTGATCTCCGTGTCCCGCAGGCTCGCGCGGTCTCCAACGAGATCGTGCG	406		
Sbjct 1987	CCAGGCGCCAGCTGATCTCCGTGTCCCGCAGGCTCGCGCGGTCTCCAACGAGATCGTGCG	2046		
Query 407	CTTCCCACTGATCAGCTGACTCCGGACCCAGGAGCGCTCACTCATGTTTCATGCAATGGGG	466		
Sbjct 2047	CTTCCCACTGATCAGCTGACTCCGGACCCAGGAGCGCTCACTCATGTTTCATGCAATGGGG	2106		
Query 467	CCAGCTGTTGGACCACGACCTCGACTTACCCCTGAGCCGGCCGCCGGGGCTCTCTCGT	526		
Sbjct 2107	CCAGCTGTTGGACCACGACCTCGACTTACCCCTGAGCCGGCCGCCGGGGCTCTCTCGT	2166		
Query 527	CACTGGCGGTCAAC	540		
Sbjct 2167	CACTGGCGGTCAAC	2179		

B 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	AACTGCTGGCCCATTTGCATGAACATGAGTGAGCGCTCCTGGTCCGGAGTCAGCTGATCA	2056		
Query 101	GTGGGGAAGCGCACGATCTCGTTGGAGACCGCGCAGGCTGCGGGACACGGAGATCAGCT	160		
Sbjct 2055	GTGGGGAAGCGCACGATCTCGTTGGAGACCGCGCAGGCTGCGGGACACGGAGATCAGCT	1996		
Query 161	GGCGCTGGGTCCGCGCACCCGCTGGCCGGGCTCGCCCTCTGCCCAGCGGCGCTCAC	220		
Sbjct 1995	GGCGCTGGGTCCGCGCACCCGCTGGCCGGGCTCGCCCTCTGCCCAGCGGCGCTCAC	1936		
Query 221	CAGAGCCACCGGGAAGCGTTGCGCTTGACCCGGGCGTCCAGCCGTAAGGAAGAGAGAA	280		
Sbjct 1935	CAGAGCCACCGGGAAGCGTTGCGCTTGACCCGGGCGTCCAGCCGTAAGGAAGAGAGAA	1876		
Query 281	GCCGTCTCATACTCCGCGGACGCGCACAAGGACCGGTTGGAGGCCCCAGCGT	340		
Sbjct 1875	GCCGTCTCATACTCCGCGGACGCGCACAAGGACCGGTTGGAGGCCCCAGCGT	1816		
Query 341	GGGGTGCCTGTCAGGGGAGGACAGGGCGTGACACCGGGAGGCTTGTGGCGTCCGGGA	400		
Sbjct 1815	GGGGTGCCTGTCAGGGGAGGACAGGGCGTGACACCGGGAGGCTTGTGGCGTCCGGGA	1756		
Query 401	CGCCTCTCTGAGCCCGGTTCTGACGCGACCCCGAGCCAGCCGACCTGTTGTTGCACAT	460		
Sbjct 1755	CGCCTCTCTGAGCCCGGTTCTGACGCGACCCCGAGCCAGCCGACCTGTTGTTGCACAT	1696		
Query 461	CCCGGTGATGGTGGGATTTGTCCTGCTCCGGGCAAGTACCCCCACGTCCTGGTAGGC	520		
Sbjct 1695	CCCGGTGATGGTGGGATTTGTCCTGCTCCGGGCAAGTACCCCCACGTCCTGGTAGGC	1636		
Query 521	GCAGCCGCTTGACTTTGGACAA	542		
Sbjct 1635	GCAGCCGCTTGACTTTGGACAA	1615		

C Homo sapiens myeloperoxidase precursor (MPO) gene, complete cdsSequence ID: [AH002972.2](#) Length: 5838 Number of Matches: 1

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

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
891 bits(482)	0.0	491/495(99%)	1/495(0%)	Plus/Plus
Query 49	ATCACCGTATGTGCAACAACAGTGTGCGGCTGGATGGGGTGGCTGCAGGAACCGGGCT	108		
Sbjct 1687	ATCACCGG-CATGTGCAACAACAGGTGCGGCTGGCTGGGGTGGCTGCAGGAACCGGGCT	1745		
Query 109	CAGAGAGGCGTCCCAGGACGCCACAAGCCTCCCGGTGTGAGCCCTGTCTCCCTGCAG	168		
Sbjct 1746	CAGAGAGGCGTCCCAGGACGCCACAAGCCTCCCGGTGTGAGCCCTGTCTCCCTGCAG	1805		
Query 169	ACGCAGCCCAAGCTGGGGGCTCAACCGTGCCTTTGTGCGTGGCTGCCGGCGGAGTA	228		
Sbjct 1806	ACGCAGCCCAAGCTGGGGGCTCAACCGTGCCTTTGTGCGTGGCTGCCGGCGGAGTA	1865		
Query 229	TGAGGACGGCTTCTCTTCCCTACGGCTGGACGCCCGGGTCAAGCGAACGGCTTCCC	288		
Sbjct 1866	TGAGGACGGCTTCTCTTCCCTACGGCTGGACGCCCGGGTCAAGCGAACGGCTTCCC	1925		
Query 289	GGTGGCTCTGGTGAAGCGCCGGCGGGCAGAGGGGGCAGAGCCCGCCACGCGGTGGCGGA	348		
Sbjct 1926	GGTGGCTCTGGTGAAGCGCCGGCGGGCAGAGGGGGCAGAGCCCGCCACGCGGTGGCGGA	1985		
Query 349	CCCAGGCGCAGCTGATCTCCGTGTCCCGCAGGCTCGCGCGGTCTCCACGAGATCGTGC	408		
Sbjct 1986	CCCAGGCGCAGCTGATCTCCGTGTCCCGCAGGCTCGCGCGGTCTCCACGAGATCGTGC	2045		
Query 409	GCTTCCCCTGATCAGTACTCCGGACAGGAGCGCTCACTCATGTTCAATGCAATGGG	468		
Sbjct 2046	GCTTCCCCTGATCAGTACTCCGGACAGGAGCGCTCACTCATGTTCAATGCAATGGG	2105		
Query 469	GCCAGCTGTGGACCACGACTCGACTTACCCCTGAGCCGGCCGCCGGGCTCCTTCG	528		
Sbjct 2106	GCCAGCTGTGGACCACGACTCGACTTACCCCTGAGCCGGCCGCCGGGCTCCTTCG	2165		
Query 529	TCACTGGCGTCAACT	543		
Sbjct 2166	TCACTGGCGTCAACT	2180		

D Homo sapiens myeloperoxidase precursor (MPO) gene, complete cdsSequence 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-CGCTCTGGTCCGAAGTCAAGTCAAGTGGG	102		
Sbjct 2110	CTGGCCCATTGCATGAAATGAGTGAAGCTCTGGTCCGAGTCAAGTCAAGTGGG	2051		
Query 103	GAAGCGCAGATCTCGTTGGAGACCGCGGAGCCTGCGGGACACGGAGTCAAGTGGCGC	162		
Sbjct 2050	GAAGCGCAGATCTCGTTGGAGACCGCGGAGCCTGCGGGACACGGAGTCAAGTGGCGC	1991		
Query 163	CTGGTCCGCGCACCGCTGGCCGGGCTCGCCCCCTGCCCCGCGCGCTCACCAGAG	222		
Sbjct 1990	CTGGTCCGCGCACCGCTGGCCGGGCTCGCCCCCTGCCCCGCGCGCTCACCAGAG	1931		
Query 223	CCACCGGGAAGCCGTTGCGCTTGACCCCGGGCGTCCAGCCGTAGGGAAGAGAGAAGCCGT	282		
Sbjct 1930	CCACCGGGAAGCCGTTGCGCTTGACCCCGGGCGTCCAGCCGTAGGGAAGAGAGAAGCCGT	1871		
Query 283	CCTACATCCCGCGGACGCGCACAAAGGACGGTTGGAGGCCCCAGCGTGGGGC	342		
Sbjct 1870	CCTACATCCCGCGGACGCGCACAAAGGACGGTTGGAGGCCCCAGCGTGGGGC	1811		
Query 343	TGCGTCTGAGGGGAGGACAGGGCGCTGACACCGGGAGGCTTGTGGCTCCGGGACGCT	402		
Sbjct 1810	TGCGTCTGAGGGGAGGACAGGGCGCTGACACCGGGAGGCTTGTGGCTCCGGGACGCT	1751		
Query 403	CTCTGAGCCCGGTTCTGACGCCACCCCAAGCCAGCCGACCTGTTGTTGCACATCCCGG	462		
Sbjct 1750	CTCTGAGCCCGGTTCTGACGCCACCCCAAGCCAGCCGACCTGTTGTTGCACATCCCGG	1691		
Query 463	TGATGGTGGGATTTGCTCTGCTCCGGGCAAGTCAACCCACGCTCGTGGTAGGCGCAGC	522		
Sbjct 1690	TGATGGTGGGATTTGCTCTGCTCCGGGCAAGTCAACCCACGCTCGTGGTAGGCGCAGC	1631		
Query 523	CGCTTGACTTGGACAAC	539		
Sbjct 1630	CGCTTGACTTGGACAAC	1614		

Figura 3. Query: Secuencia *gen mpo* en base de datos NCBI, Sbjct: Muestras alineadas. A. Alineamiento de la muestra 15 (3²-5³) con el *gen mpo* analizado por el programa BLAST B. Alineamiento de la muestra 15 (5²-3³) con el *gen mpo* analizado por el programa BLAST. C. Alineamiento de la muestra 17 (3²-5³) con el *gen* analizado por el programa BLAST. D. Alineamiento de la muestra 17 (5³) con el *gen mpo* analizado por el programa BLAST.

Para la Figura 3 (C) correspondiente a la muestra 17 (3'-5') se evidencian dos cambios en la posición 1694 y 1695, una inserción de una T y seguidamente un cambio de una G → T, en la posición 1708 hay un cambio de una adenina A → T, finalmente, en un intrón existe un cambio de C → A en la posición 1720. Por otro lado, en la Figura 3 (D) correspondiente a la muestra 17-2 (5'-3') se evidencia que en la posición 2106 hace falta una C, también hay dos cambios en las posiciones 2094 y 2093, donde una G → A y luego una A → G respectivamente, además, hace falta una G en la posición 2083, por último, en la posición 2069 existe un cambio de una G → A. Adicionalmente, se compararon los polimorfismos anteriormente mencionados de las muestras 15 y 17 en la base de datos NCBI determinando que aún no se encuentra ninguno de los descritos en la literatura.

Al comparar los extremos del fragmento de ADN secuenciado y traducido para cada muestra con la proteína MPO, existe una limitada longitud de los fragmentos analizados y escasa similitud observada al inicio y al final de esta, por lo que, las variaciones encontradas principalmente en los extremos no podrían corroborarse como un cambio significativo de aminoácidos.

Discusión

Las especies de *Candida* spp., hacen parte de la microbiota vaginal, sin embargo, pue-

den llegar a ser agentes causantes de infecciones vaginales, como candidiasis vulvovaginal (CVV); esta micosis afecta al 75% de las mujeres en edad fértil y el 9% de esta proporción presenta episodios de candidiasis vulvovaginal recurrente (CVVR) (30), de manera que, al activarse el complemento y la fagocitosis, los macrófagos la reconocen las levaduras y liberan sustancias como lisozimas, colagenasas, hidrolasas ácidas, óxido nítrico, H₂O₂, superóxido, radicales hidroxilo, entre otros; mientras que diferentes células incrementan la respuesta contra el patógeno (31, 19).

Se ha reportado que el polimorfismo R569W evidencia un cambio en la secuencia de aminoácidos que da como resultado la detención en la maduración de la enzima, quedando en la forma apoproMPO; mientras que, los polimorfismos proximales a la histidina en la posición 502, es decir, R499C y G501S se encuentran en individuos con deficiencia completa de MPO, ya que la histidina está involucrada con la unión del grupo hemo. Finalmente, en el polimorfismo Y173C, las chaperonas calreticulina y calnexina reconocen la apoproMPO mal plegada en el RE, y por ende se degrada en el proteasoma lo que conlleva a una deficiencia de MPO.

De las coloraciones de Wright y la tinción citoquímica de peroxidasa leucocitaria, se infiere que existe normalidad en cada parámetros analizados, 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 patógenos, entre ellos, *Candida* spp., de acuerdo con 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 (31).

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, sin embargo, es posible que no sea totalmente funcional, por eso mismo, se recomienda realizar estudios con otras técnicas cuantitativas que permitan estimar la cantidad de enzima funcional presente, como en los estudios realizados por Kitahara M *et al* (32) y Romano M *et al* (33), en los cuales se cuantifica la actividad de la peroxidasa para corroborar la deficiencia de la MPO.

Por otro lado, se logró estandarizar la técnica de PCR convencional para la amplificación del *gen mpo*, para esto se realizaron titulaciones de primers, MgCl₂ y ADN. Se determinó una concentración de 50 ng/μl de ADN, una concentración de MgCl₂ de 3 mM, y una concentración de primers de 0,25 pmol. La T_m establecida para realizar la hibridación fue de 66°C según las indicaciones de la casa comercial donde se sinte-

tizaron los primers. En el caso de la CES, la secuenciación para las muestras 15 y 17 mostraron poco ruido de fondo en las gráficas y alta resolución; estas fueron evaluadas mediante análisis bioinformático por alineamiento, donde cada una presentó homología entre un 99-100%; no obstante, se encontraron varios polimorfismos en ambas cadenas de las muestras, al comparar estos polimorfismos con los presentados en la literatura, estos no han sido reportados.

Los polimorfismos hallados en la región del gen estudiado se encontraban en los exones 4 y 6, evidenciando gran variabilidad genética 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; puesto que los encontrados son representativos pudiendo modificar el mecanismo de acción de la proteína, sin embargo, queda la inquietud si alguno de estos polimorfismos tiene repercusión en la funcionalidad y deficiencia de la enzima MPO. También es importante mencionar que el alineamiento por el programa MultAlin evidencia principalmente que los cambios de interés de la proteína de referencia no alcanzan a estar dentro del rango de secuencia de las muestras analizadas.

Respecto a los polimorfismos de importancia para el estudio, se destaca que ninguno se relaciona con las muestras secuenciadas,

y, por ende, no se puede relacionar con la CVVR en las muestras de estudio, dando paso a nuevos estudios que involucren un número diverso de muestras de pacientes con CVVR. Según la literatura, la frecuencia de estos polimorfismos es baja, además, que en el país no se tienen registros de su estudio y prevalencia, siendo representativo como una primera aproximación en Colombia y se presenta como una posible herramienta en el estudio de la deficiencia relacionada con estos polimorfismos del *gen mpo* relacionados con este tipo de infecciones.

Agradecimientos

Al grupo REMA de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y al Semillero de investigación REMA, por permitirnos llevar a cabo el estudio.

Referencias

1. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2018, 14(Suppl 2):49 <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>.
2. 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.
3. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* (Internet). 2013;13(3):159–75. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3399>
4. Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: An integrated view. *Immunol Rev*. 2007;219(1):88–102.
5. 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.
6. Rutkowski R, Pancewicz S, Rutkowski K, Rutkowska J. (Reactive oxygen and nitrogen species in inflammatory process). *Pol Merkur Lek*. 2007;134:131–6. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18044345/>
7. 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.
8. Nauseef WM. Biosynthesis of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys*. 2018;642:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.02.001>
9. Rizo-Téllez, SA, Sekheri M, Filep JG. Myeloperoxidase: Regulation of Neutrophil Function and Target for Therapy. *Antioxidants* 2022, 11, 2302. <https://doi.org/10.3390/antiox11112302>.
10. Zhu J De. Myeloidcell-lineage and premyelocytic-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.
11. 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.
12. 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.
13. Flemmig J, Remmler J, Röhring F, Arnhold J. Epicatechin regenerates the chlorinating activity of myeloperoxidase in vitro and in neutrophil granulocytes. *J Inorg Biochem*. 2014;130(1):84–91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.10.002>
14. Willems HME, Ahmed SS, Liu J, Xu Z, Peters BM. Vulvovaginal candidiasis: A current understanding and burning questions. *J Fungi*. 2020;6(1).

15. Pahwa R, Modi P, Jialal I. Myeloperoxidase Deficiency. StatPearls. 2022 Aug 1; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470278/>
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Odobasic D, Kitching AR, Holdsworth SR. Neutrophil-mediated regulation of innate and adaptive immunity: The role of myeloperoxidase. *J Immunol Res;* 2016.
20. 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.
21. Kutter D. Prevalence of myeloperoxidase deficiency: Population studies using Bayer-Technicon automated hematology. *J Mol Med.* 1998;76(10):669–75.
22. 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.
23. Cortés JA, Ruiz JF, Melgarejo-Moreno LN, Lemos EV. Candidemia in Colombia. *Biomédica.* Marzo de 2020;40(1):195–207
24. Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers.* Mayo de 2018;4(1):1–20)
25. Rosati D, Bruno M, Jaeger M, Ten Oever J, Netea MG. Recurrent vulvovaginal candidiasis: An immunological perspective. *Microorganisms.* 2020;8(2):1–14.
26. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet.* 2007;369 (9577):1961–71.
27. Kalia N, Singh J, Kaur M. Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent vulvovaginal infections: A critical review. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2020;19(1):1–19. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-0347-4>
28. 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;6:1–23.
29. Jacobsen ID, Hube B. *Candida albicans* morphology: still in focus. *Expert Rev Anti Infect Ther (Internet).* 2017;15(4):327–30. <http://dx.doi.org/10.1080/14787210.2017.1290524>
30. 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.
31. Nauseef WM. Myeloperoxidase in human neutrophil host defence. *Cell Microbiol.* 2014;16(8):1146–55.
32. Kitahara M, Eyre HJ, Simonian Y, Atkin CL, Hasstedt SJ. Hereditary Myeloperoxidase Deficiency. *Blood.* 1981 May 1;57(5):888–93.
33. Romano M, Dri P, Dadalt L, Patriarca P, Baralle FE. Biochemical and Molecular Characterization of Hereditary Myeloperoxidase Deficiency. *Blood.* 1997 Nov 15;90(10):4126–34.