

# ***Actividad antifúngica In Vitro de péptidos análogos derivados de LL-37 contra levaduras del género Candida***

**Gabriel German Chaves Alfonso  
Yenifer Tatiana Coronado Ladino**

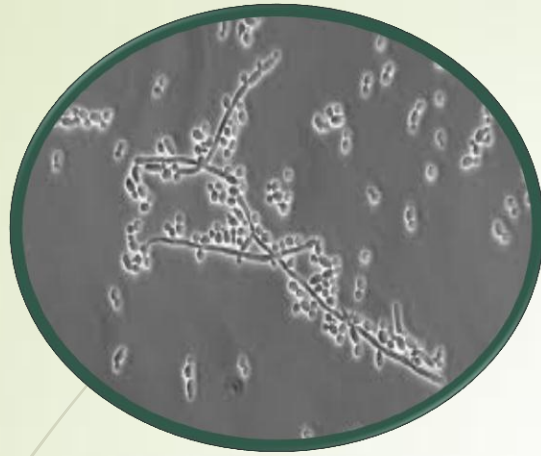


**Asesor Externo: Julián Esteban Muñoz Henao PhD.  
Asesor Interno: Gladys Pinilla Bermúdez Bac. M.S**

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca  
Facultad Ciencias de la Salud  
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico  
Trabajo de grado Bogotá 2018**



**Universidad del  
Rosario**

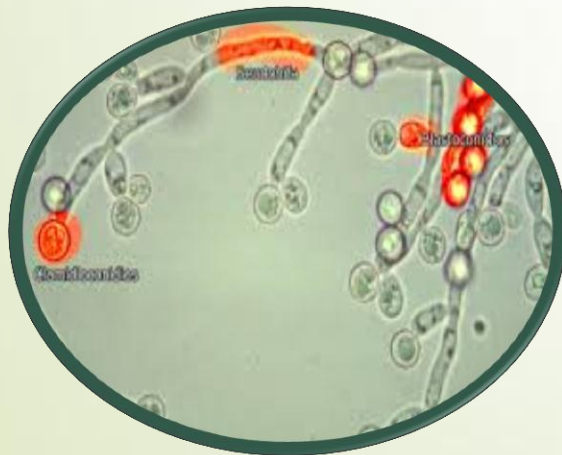


Hongos  
dimórficos  
pertencientes  
al phylum  
Ascomycota.

## ***Candida spp.***



Microbiota  
normal de piel  
y membranas  
mucosas.



Reproducción  
sexual y  
asexual

# INTRODUCCIÓN



# OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto antifúngico *In vitro* de los péptidos análogos derivados de LL-37 en levaduras del género *Candida*.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la actividad *in vitro* de los péptidos análogos derivados de LL-37 a través de curvas de crecimiento en levaduras del género *Candida*.
2. Observar la capacidad de los péptidos análogos en inhibir el crecimiento de cepas resistentes a antifúngicos, como es el caso de la *Candida albicans* 256.
3. Identificar la respuesta de la cepa resistente *Candida albicans* 256 frente a Anfotericina B, antifúngico de amplio espectro utilizado en el tratamiento contra micosis.

# JUSTIFICACIÓN

Candidiasis invasiva en Colombia; decima causa mas frecuente en Infecciones asociadas a dispositivos en las UCI.

Resistencia presentada por las levaduras del género *Candida*.

Implementación de nuevas alternativas terapéuticas, mediante el uso de péptidos análogos:

- AC-1
- AC-2
- D
- LL-37-1

# DISEÑO METODOLÓGICO

## UNIVERSO, POBLACIÓN Y MUESTRA

### Universo

Microorganismos del género *Candida*.

### Población

Levaduras de *C. albicans*.

### Muestra

Cepas de levaduras del género *Candida*

***Candida albicans* 256:** Cepa resistente a azoles.

***Candida* FVF:** Cepa proveniente de un aislamiento clínico de candidiasis vulvovaginal recurrente.

***Candida albicans* SC 5314:** Cepa de referencia.

# MATERIALES Y METODOS

Cepas utilizadas

```
graph TD; A[Cepas utilizadas] --> B[Criopreservadas a -80 °C.]; A --> C[24 horas antes de los experimentos fueron cultivadas en medio agar sabouraud dextrosa a temperatura ± 35 °C.]
```

Criopreservadas a -80 °C.

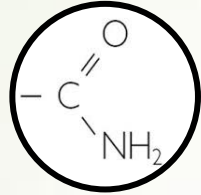
24 horas antes de los experimentos fueron cultivadas en medio agar sabouraud dextrosa a temperatura  $\pm 35$  °C.

## ANFOTERICINA B

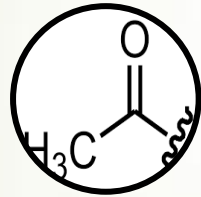
(Bristol Myers Squibb, Fungizone, Nueva York), (concentrada a 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),  
Squibb, Brooklyn, Nueva York), (concentrada a 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).



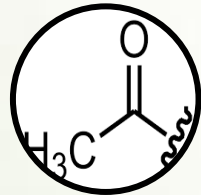
# PÉPTIDOS ANÁLOGOS DERIVADOS DE LL-37



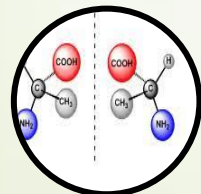
**LL-37-1 (LL-37)**, posee 24 aminoácidos y está amidado en la posición carboxilo terminal



**ACL 37-1 (AC-1)** posee 23 aminoácidos, en el amino terminal hay acetilación, y amidación en el carboxilo-terminal.



**ACL 37-2 (AC-2)** posee 24 aminoácidos iniciando con el aminoácido glicina, en el amino terminal hay acetilación, y amidación en el carboxilo-terminal.



**DL 37-2 (D)** posee 25 aminoácidos y una modificación en la posición amino terminal que lo convierte en un enantiómero D.



# DETERMINACIÓN FASES DE CRECIMIENTO PARA *C. albicans* 256, *Candida* FVF, *C. albicans* SC5314.

Inóculos de las cepas *C. albicans* 256, *C. albicans* SC5314 y *Candida* FVF, resuspendidas en medio RPMI 1640 con MOPS a una concentración de 0.5 McFarland.

150  $\mu$ l de medio RPMI suplementado con MOPS y 150  $\mu$ l del inóculo en placa de 100 pozos. Para determinar la reproducibilidad en cada ensayo, cada uno fue montado por triplicado.

Se utilizó el equipo **BioScreen C** a temperatura constante de 36°C, agitación continua y durante 48 horas, se realizaron intervalos de medición por hora en forma de densidades ópticas utilizando una longitud de onda de 600nm.



**CURVAS DE CRECIMIENTO  
UTILIZANDO LOS PÉPTIDOS  
(AC-1, LL-37-1, AC-2 Y D).**

Se utilizaron cinco  
concentraciones de los  
péptidos:

- **10  $\mu$ M**
- **5  $\mu$ M**
- **2.5  $\mu$ M**
- **1.25  $\mu$ M**
- **0.62  $\mu$ M**

Realizadas en diluciones  
seriadas en base 2.

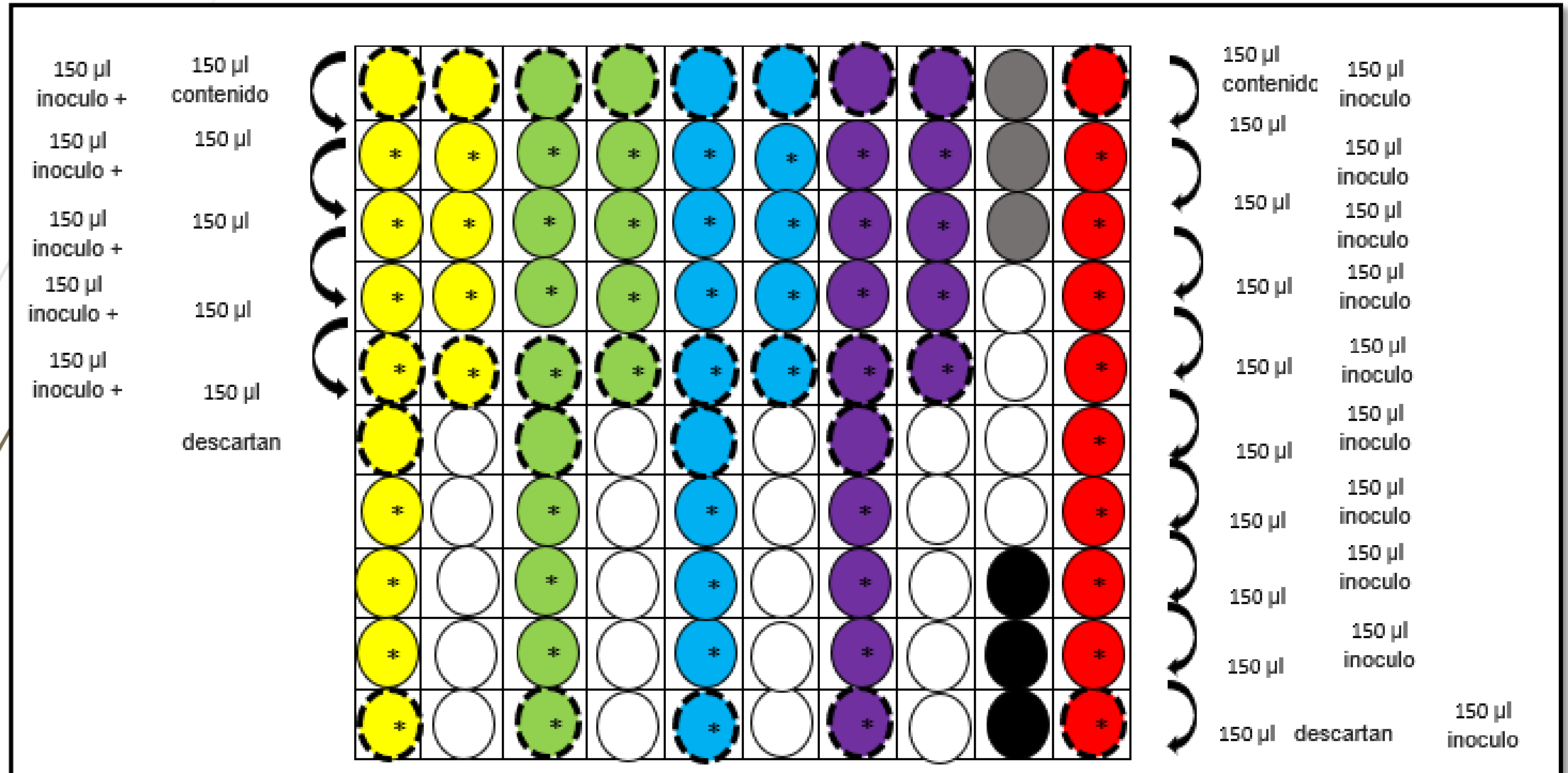
**CONTROL  
ANFOTERICINA B PARA  
*C. albicans* 256, *C. albicans*  
SC5314 y *Candida* FVF.**

Fueron probadas 10  
concentraciones:

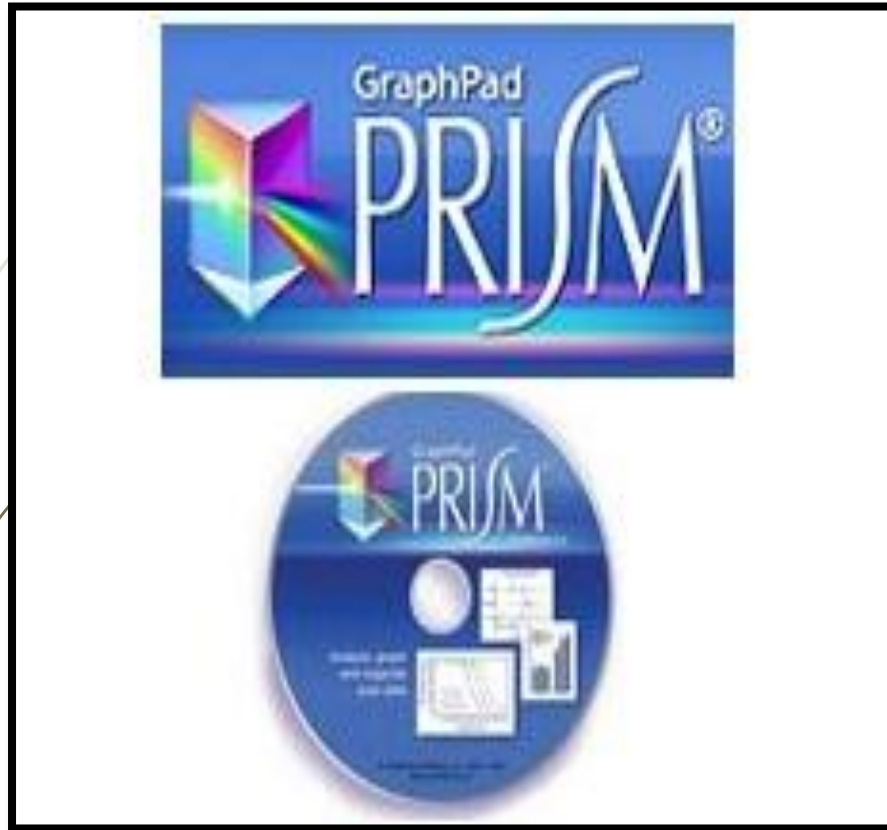
- **40  $\mu$ g/mL**
- **20  $\mu$ g/mL**
- **10  $\mu$ g/mL**
- **5  $\mu$ g/mL**
- **2.5  $\mu$ g/mL**
- **1.25  $\mu$ g/mL**
- **0.625  $\mu$ g/mL**
- **0.312  $\mu$ g/mL**
- **0.156  $\mu$ g/mL**
- **0.07  $\mu$ g/mL**

Realizadas en diluciones seriadas en  
base 2.

# ESQUEMA MONTAJE EXPERIMENTAL.



# ANALISIS ESTADISITICO

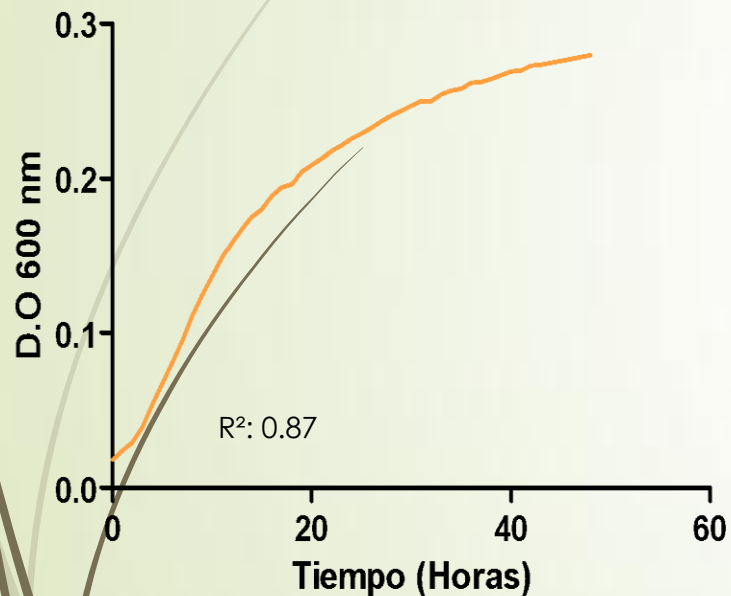


- Los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).
- Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante análisis de varianza (ANOVA unidireccional) seguido por un ensayo post-test de Tukey-Kramer. Se estableció una diferencia significativa estadística con un p valor  $<0,05$ .

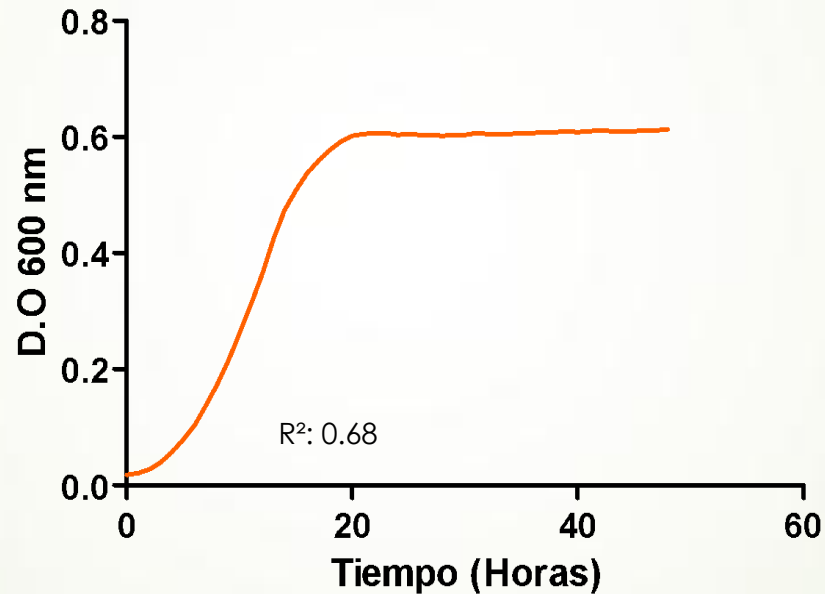
# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## FASES DE CRECIMIENTO

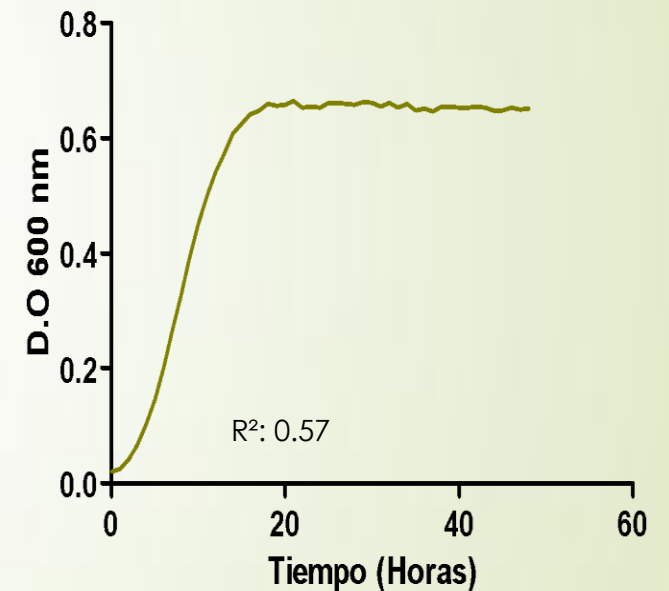
Fase de Crecimiento *Candida albicans* 256



Fase de Crecimiento *Candida* FVF.



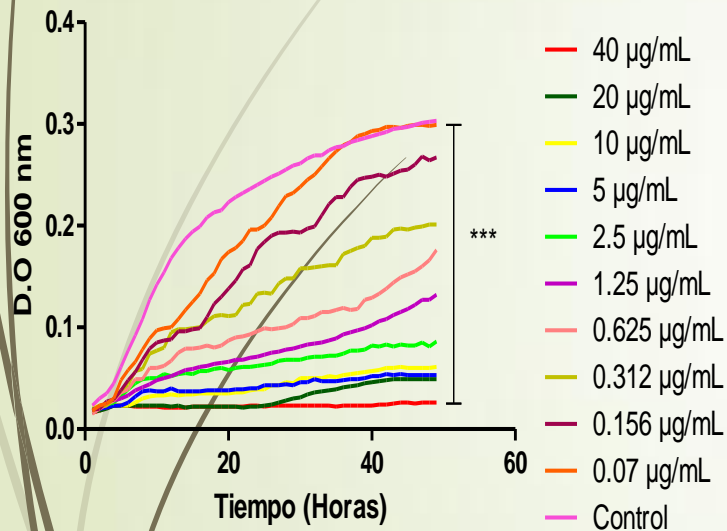
Fase de crecimiento *Candida albicans* SC5314



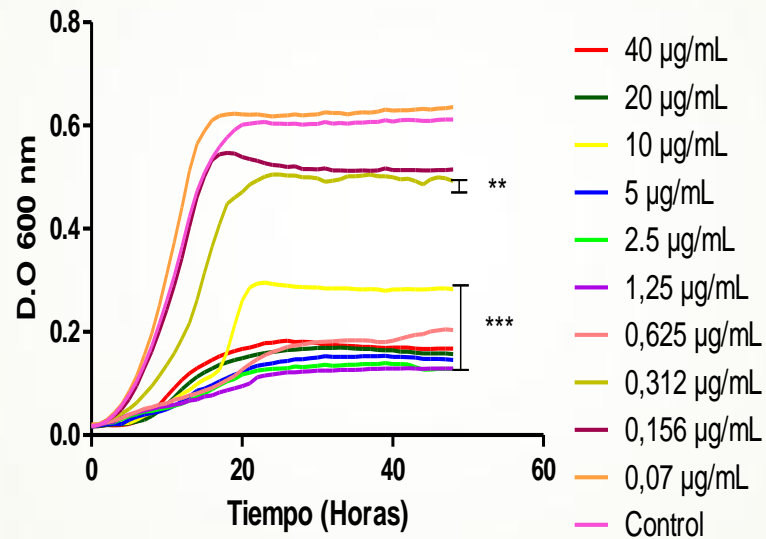
Crecimiento en fase logarítmico de las levaduras *C. albicans* 256 alcanzando una D.O. de 0.3. *Candida* FVF y *Candida albicans* SC5314 se destaca un crecimiento mayor con una D.O. de 0.6. durante un periodo de 48 horas, utilizando medio RPMI suplementado con MOPS.

# CONTROL ANFOTERICINA B Para *C. albicans* 256, *C. albicans* SC5314 y *Candida* FVF.

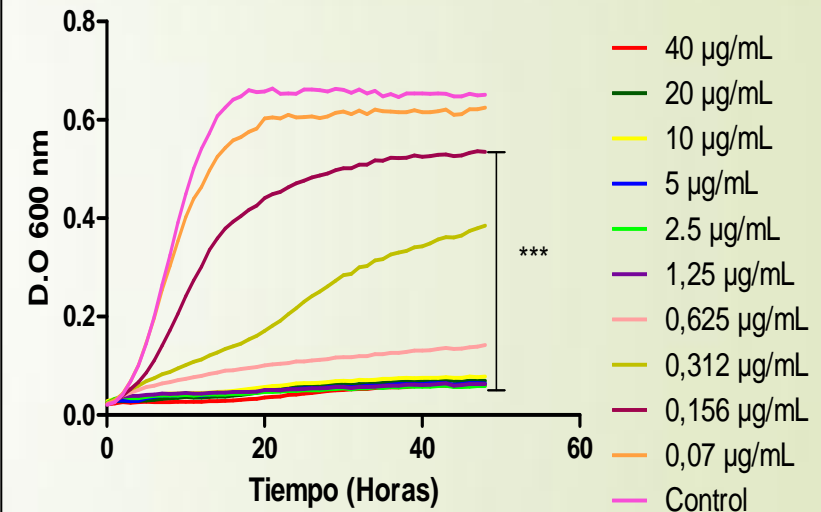
*Candida albicans* 256 y Anfotericina B



*Candida* FVF y Anfotericina B



*Candida albicans* SC5314 y Anfotericina B

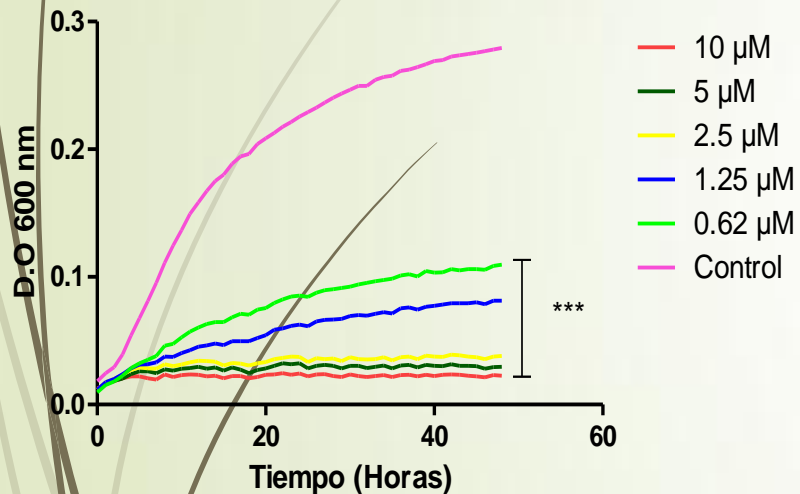


Curvas de crecimiento de las cepas *Candida albicans* 256, *Candida* FVF y *Candida albicans* SC5314 frente a varias concentraciones de Anfotericina B; en comparación con el grupo control (Fase de crecimiento en ausencia de Anfotericina B). Análisis por One-way ANOVA seguida de post-test Tukey.

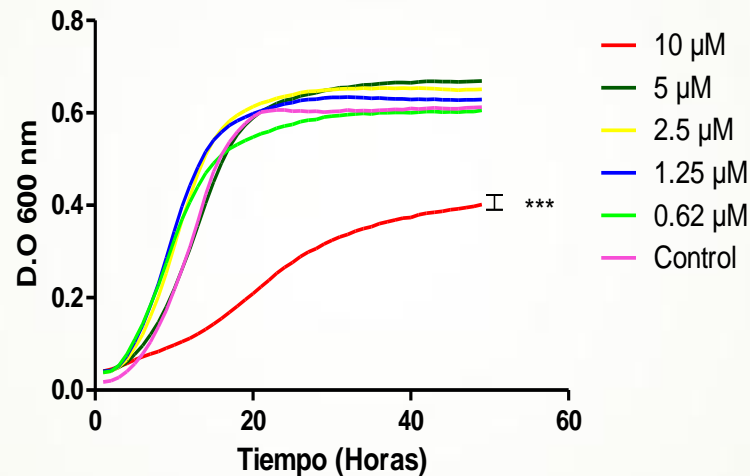
\*\*\* p<0,001  
\*\* p<0,01

# Actividad antimicrobiana del Péptido AC-1 frente a levaduras del género *Candida*.

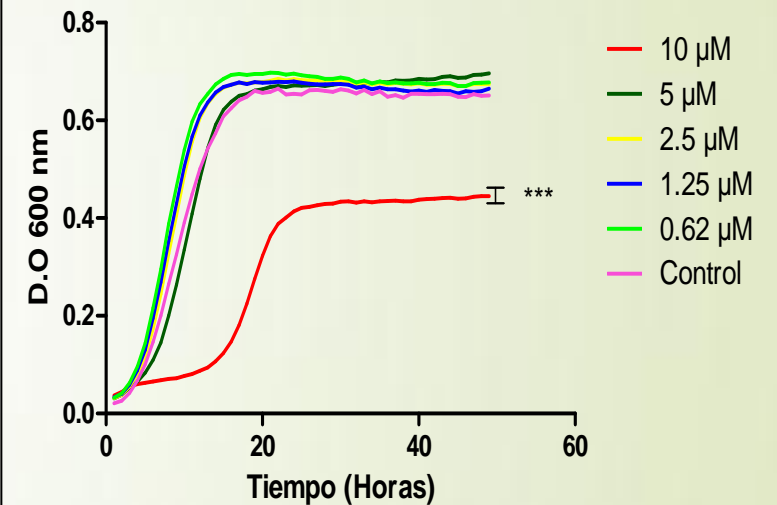
*Candida albicans* 256 y Péptido AC-1



*Candida* FVF y Péptido AC-1




*Candida albicans* SC5314 y Péptido AC-1



Curvas de crecimiento de las cepas *Candida albicans* 256, *Candida* FVF y *Candida albicans* SC5314 frente a varias concentraciones del péptido AC-1; en comparación con el grupo control (Fase de crecimiento en ausencia de péptido). Análisis por One-way ANOVA seguida de post-test Tukey.

\*\*\* p<0,001





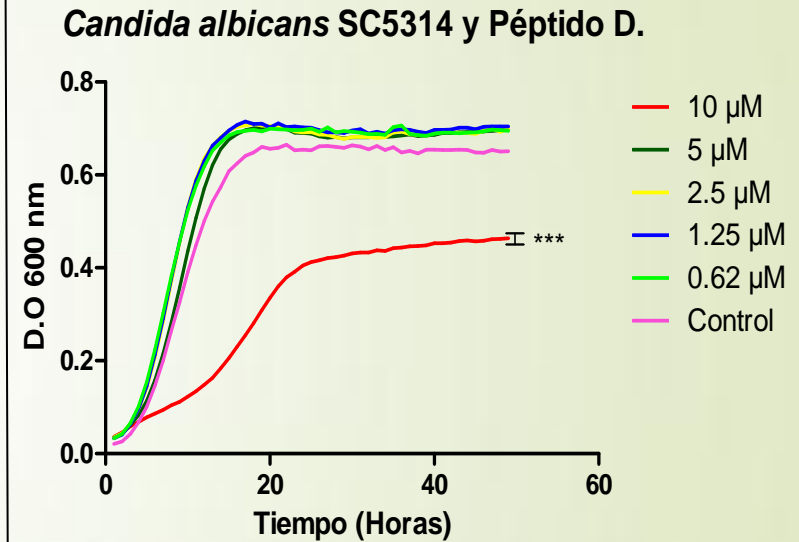
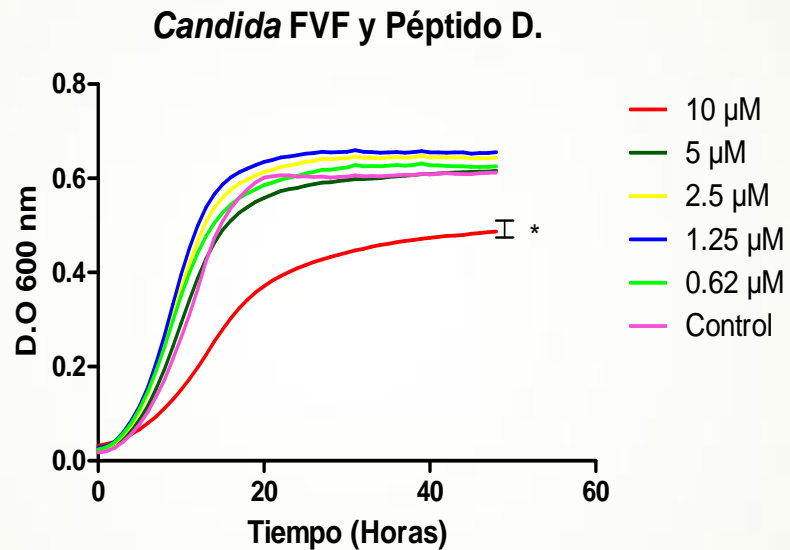
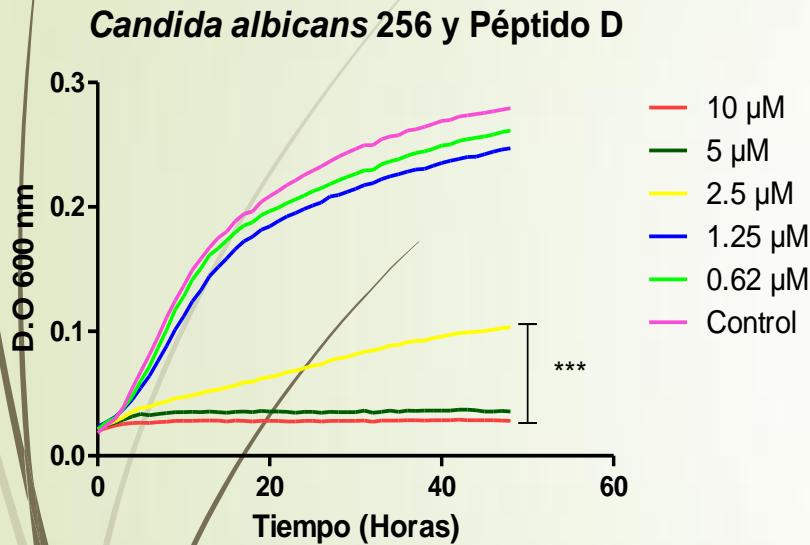
Pei-Wen Tsai *et al.* 2014. Utilizó varias concentraciones de LL-37 obteniendo un efecto inhibitorio hasta **1.1 μM**

En el presente trabajo a la concentración de **0.62 μM** en *C.albicans* 256 se demostró un efecto inhibitorio significativo



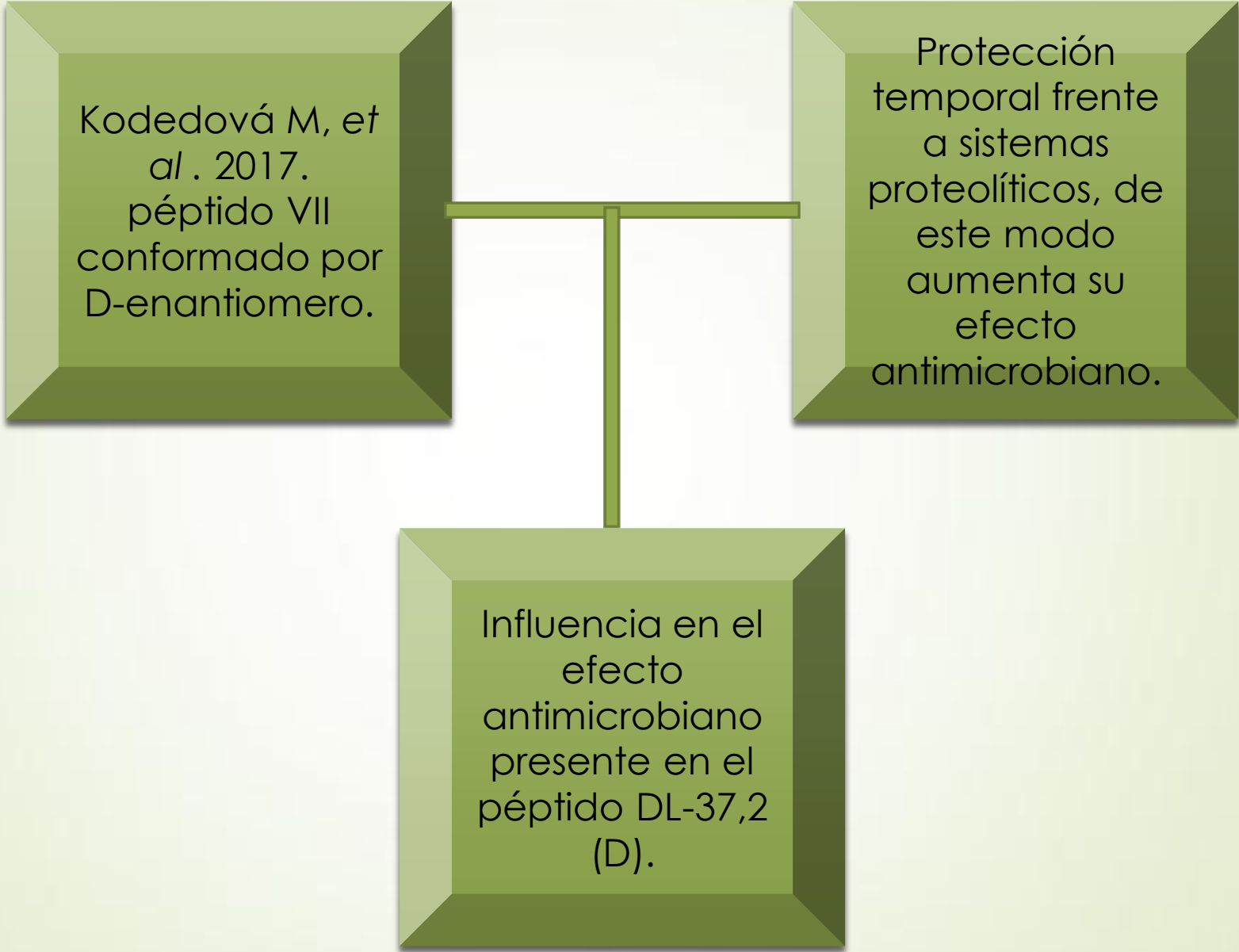
El péptido AC-1 demuestra tener una capacidad antimicrobiana efectiva en su mínima concentración utilizada, siendo esta significativa para la creación de posibles tratamientos con un efecto mínimo citotóxico

# Actividad antimicrobiana del Péptido D frente a levaduras del género *Candida*.



Curvas de crecimiento de las cepas *Candida albicans* 256, *Candida* FVF y *Candida albicans* SC5314 frente a varias concentraciones del péptido D; en comparación con el grupo control (Fase de crecimiento en ausencia de péptido). Análisis por One-way ANOVA seguida de post-test Tukey.

\*\*\*  $p < 0,001$   
\*  $p < 0,05$

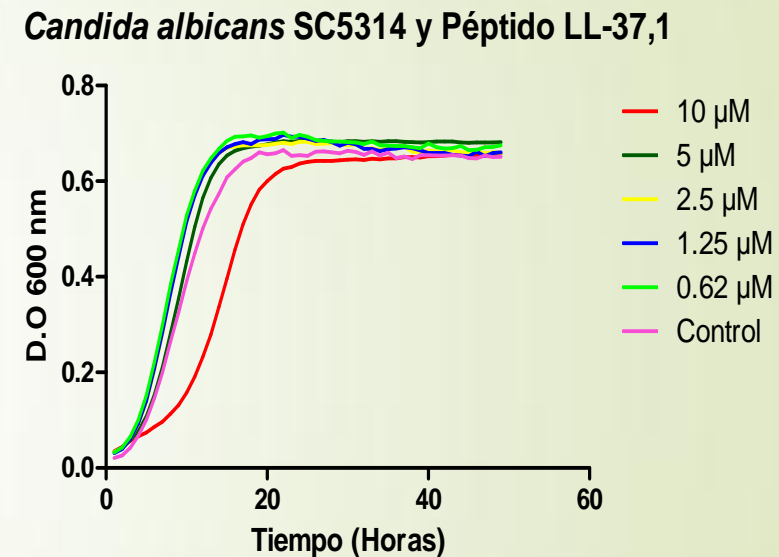
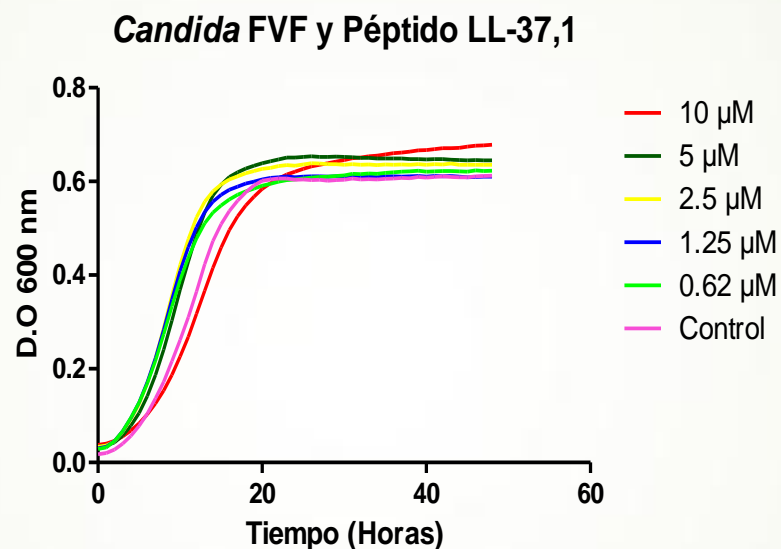
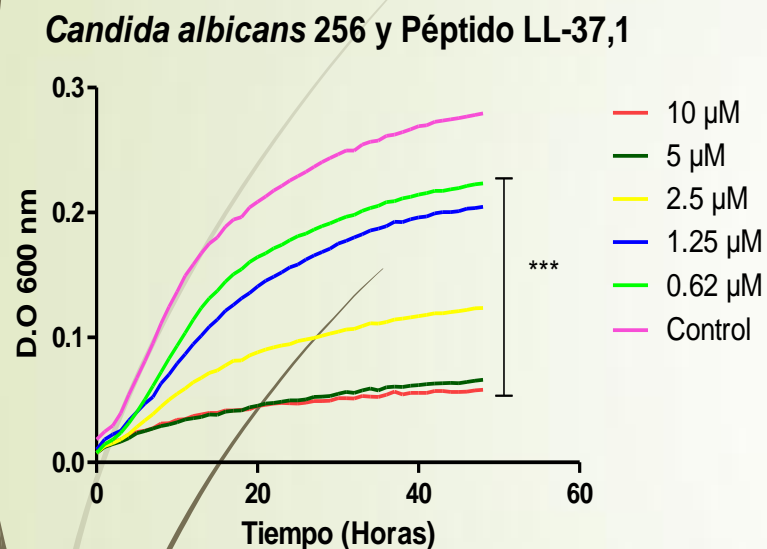


Kodedová M, et al. 2017. péptido VII conformado por D-enantiomero.

Protección temporal frente a sistemas proteolíticos, de este modo aumenta su efecto antimicrobiano.



Influencia en el efecto antimicrobiano presente en el péptido DL-37,2 (D).

# Actividad antimicrobiana del Péptido LL-37,1 frente a levaduras del género *Candida*.



Curvas de crecimiento de las cepas *Candida albicans* 256, *Candida* FVF y *Candida albicans* SC5314 frente a varias concentraciones del péptido LL-37,1; en comparación con el grupo control (Fase de crecimiento en ausencia de péptido). Análisis por One-way ANOVA seguida de post-test Tukey.

\*\*\* p<0,001

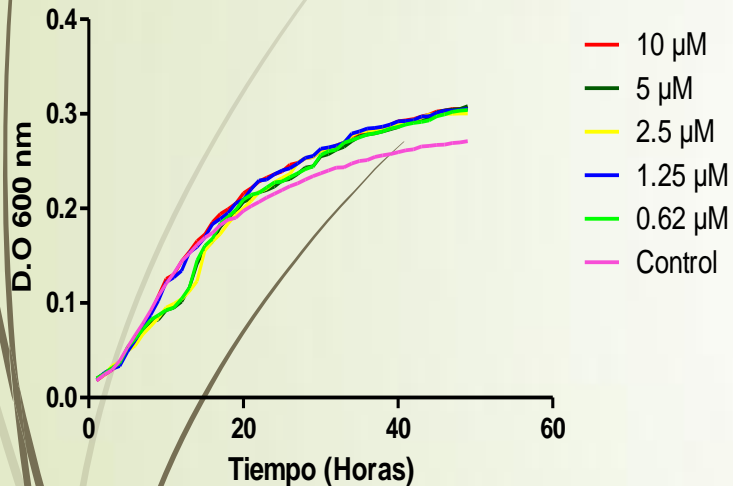


(Pei-Wen Tsai *et al.* 2014.  
efecto inhibitorio hasta  
**1.1 $\mu$ M**)

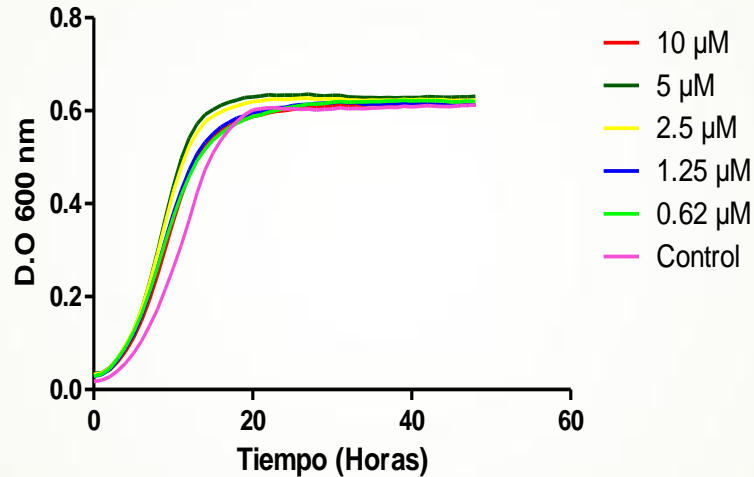
El péptido  
LL-37-1 demuestra tener una  
capacidad antimicrobiana  
efectiva en su mínima  
concentración utilizada **0.62  
 $\mu$ M** en *C.albicans* 256  
resistente a azoles.

# Actividad antimicrobiana del Péptido AC-2 frente a las levaduras del género *Candida*.

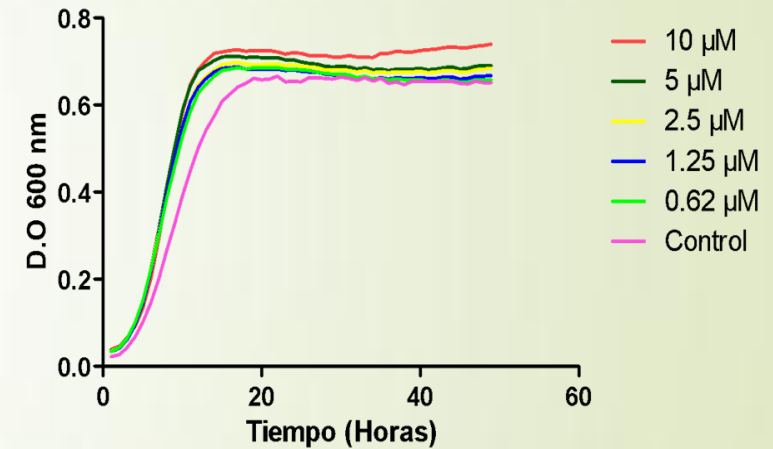
*Candida albicans* 256 y Péptido AC-2.



*Candida* FVF y Péptido AC-2



*Candida albicans* SC5314 y Péptido AC-2



Curvas de crecimiento de las cepas *Candida albicans* 256, *Candida* FVF y *Candida albicans* SC5314 frente a varias concentraciones del péptido AC-2; en comparación con el grupo control (Fase de crecimiento en ausencia de péptido). Análisis por One-way ANOVA seguida de post-test Tukey.



**CARGA NETA**

**HIDROFOBICIDAD**

**ANFIPATICIDAD**

**VARIANTES EN EL EFECTO INHIBITORIO PEPTIDICO**



# CONCLUSIONES

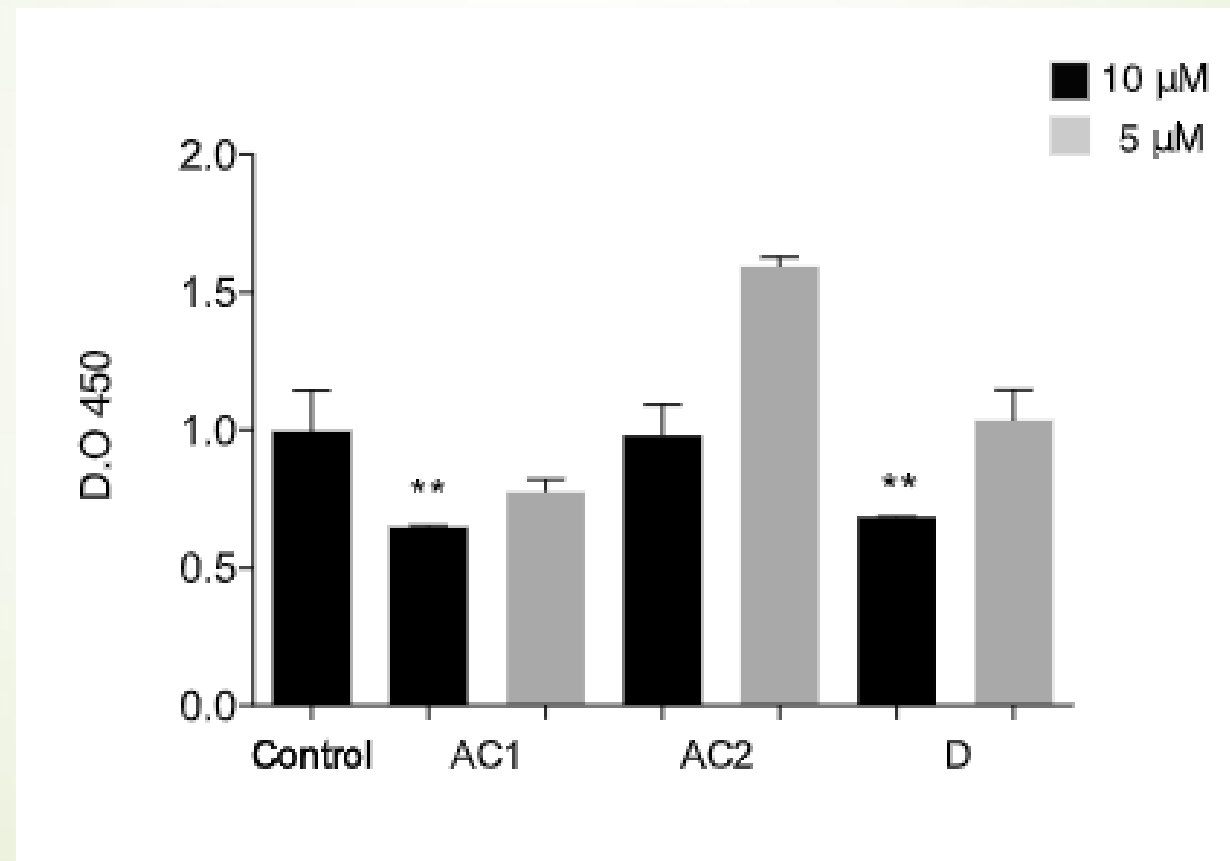
- Los péptidos AC-1 y D en las curvas de crecimiento reflejaron ser los péptidos con mayor potencia inhibitoria y demostraron que a las concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$  se evidenciaba un efecto antimicrobiano en las levaduras utilizadas en el estudio siendo estos péptidos promisorios para su posterior uso terapéutico en procesos infecciosos fúngicos.
- En la actividad antimicrobiana se destaca el papel de los péptidos LL-37,1 y AC-1 los cuales inhibieron la cepa de *C. albicans* 256 resistente a azoles hasta una concentración de 0.62  $\mu\text{M}$ .
- El efecto inhibitorio de la Anfotericina B contra la cepa *Candida albicans* 256 fue efectivo a todas las concentraciones demostrando su sensibilidad frente a la misma.

# RECOMENDACIONES

- Realizar estudios de citotoxicidad utilizando los péptidos AC-1 y LL-37-1 en la concentración de  $0.62 \mu\text{M}$  para posibles estudios *In vivo* de impacto.
- Desarrollar ensayos en distintas cepas de levaduras del género *Candida* utilizando los péptidos AC-1 y LL-37-1 a concentraciones menores de  $0,62 \mu\text{M}$ .
- Probar las distintas variaciones de péptidos análogos de LL-37 en mas especies de levaduras del genero *Candida* (En curso).
- Evaluar la actividad antifúngica de los péptidos análogos de LL-37 en la formación de biofilm de levaduras del genero *Candida* (En curso).

# Resultados de Biofilm

## Biofilm *C. albicans* 256



# Presentación Internacional



**16<sup>th</sup> Infocus**

NOVIEMBRE 15 - 17 DE 2018

Santiago de Cali, Colombia

HOTEL INTERCONTINENTAL

Estimado(a) Julian Esteban,

Gracias por su participación en el 16th INFOCUS 2018 - CONCURSO DE RESÚMENES DE INVESTIGACIÓN. Nos complace informarle que su trabajo **"Actividad antifúngica in vitro de péptidos análogos derivados de catelicidina humana (LL-37) contra levaduras del género Candida."** ha sido aceptado para ser presentado en forma de póster.

A partir del 15 de octubre nos comunicaremos con usted para suministrarle mayores detalles.

Cordialmente,

**INFOCUS 2018**

[infocus2018@mncoordinacionlogistica.com](mailto:infocus2018@mncoordinacionlogistica.com)



GRACIAS